

Aus dem
Medizinischen Zentrum für Nervenheilkunde, Klinik für Neurologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. H. Oertel
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



Die Rolle von striatalen Tyrosinhydroxylase-positiven Neuronen bei L-DOPA-induzierten Dyskinesien der Maus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin (Dr. med.)
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Ursula Johanna Keber

aus Coesfeld

Marburg, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. H. Schaefer

Referent: Herr PD Dr. Candan Depboylu

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. Axel Pagenstecher

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Morbus Parkinson.....	1
1.1.1 Funktionelle Anatomie der Basalganglien.....	2
1.1.2 Pathophysiologie des Morbus Parkinson.....	4
1.1.3 Klinische Manifestation.....	4
1.1.4 Grundzüge der derzeitigen Therapie.....	5
1.2 L-DOPA Pharmakotherapie.....	5
1.2.1 Metabolismus und Wirkmechanismus.....	5
1.2.2 Limitierung und Probleme bei der Langzeitbehandlung.....	7
1.3 L-DOPA-induzierte Dyskinesien.....	8
1.3.1 Pathophysiologie – Teile des Puzzles.....	8
1.3.2 Therapieansätze.....	10
1.3.3 LID im unilateralen 6-OHDA Mausmodell.....	10
1.4 Striatale TH-positive Neurone.....	12
1.5 Ziele der Arbeit.....	14
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Übersicht über die Versuchsanordnung.....	15
2.2 Materialien und Bezugsquellen.....	16
2.2.1 Chemikalien.....	16
2.2.2 Puffer und Lösungen.....	18
2.2.3 Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien.....	20
2.2.4 Geräte.....	21
2.3 Methoden - Tierversuche.....	22
2.3.1 Versuchstiere.....	22
2.3.2 Stereotaktische 6-Hydroxydopamin-Läsion.....	23
2.3.3 Zylindertest.....	24
2.3.4 Amphetamin-induzierter Rotationstest im offenen Feld.....	25

2.3.5	L-DOPA-Behandlung.....	25
2.3.6	AIM-Scoring.....	26
2.4	Histologische Methoden.....	28
2.4.1	Perfusions- und Immersionsfixierung sowie Gewebeaufbereitung.....	28
2.4.2	Immunhistochemie.....	29
2.4.3	Auswertung der Histologie.....	34
2.5	Statistische Methoden.....	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Effekte der 6-OHDA-Läsion.....	41
3.1.1	Postoperativer Verlauf.....	41
3.1.2	Zylindertest.....	41
3.1.3	Amphetamin-induzierter Rotationstest im offenen Feld.....	42
3.1.4	Untergang dopaminerger Neurone.....	43
3.1.5	Zunahme serotonerger Fasern im Striatum.....	46
3.2	L-DOPA-induzierte Dyskinesien.....	47
3.2.1	Dauer und Ausprägung der L-DOPA-induzierten Dyskinesien.....	48
3.2.2	Korrelation der Dyskinesien zum Läsionsgrad.....	49
3.3	Serotonerge Fasern im Striatum.....	50
3.4	Δ FosB-positive Zellen.....	52
3.4.1	Quantifizierung im gesamten Striatum.....	52
3.4.2	Verteilung in den striatalen Subregionen.....	53
3.4.3	Korrelation zu L-DOPA-induzierten Dyskinesien.....	54
3.4.4	Δ FosB-positive Zellen im Ncl. accumbens.....	54
3.5	TH-positive Zellen.....	55
3.5.1	Phänotypisierung.....	55
3.5.2	Quantifizierung im gesamten Striatum.....	56
3.5.3	Zusammenhang zu Δ FosB-positiven Zellen.....	57
3.5.4	Zusammenhang zu TH-positiven und serotonergen Fasern.....	57
3.5.5	Verteilung TH-positiver Zellen in den striatalen Subregionen.....	58
3.5.6	Korrelation zu L-DOPA-induzierten Dyskinesien.....	60
3.5.7	TH-positive Zellen im Ncl. accumbens und Cortex.....	61
3.6	Striatale Lokalisation der LID-Subtypen.....	62
3.7	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	65

4 Diskussion	66
4.1 LID im unilateralen 6-OHDA Mausmodell.....	66
4.1.1 Die unilaterale MFB-6-OHDA-Läsion als Modell für das späte IPS.....	67
4.1.2 L-DOPA-induzierte Dyskinesien im 6-OHDA Mausmodell.....	69
4.2 Neuronale Plastizität infolge der L-DOPA-Therapie.....	72
4.2.1 Einfluss von L-DOPA auf die nigrostriatalen Projektionen	72
4.2.2 Einfluss von L-DOPA auf die striatale serotonerge Faserinnervation.....	73
4.2.3 Einfluss von L-DOPA auf striatale TH-positive Zellen.....	74
4.2.4 Einfluss auf accumbale und kortikale TH- und Δ FosB-positive Zellen	76
4.3 Neuronale Plastizität bei LID.....	76
4.3.1 LID und die striatale serotonerge Faserinnervation	77
4.3.2 LID und TH-positive Zellen im Striatum	78
4.3.3 Die Rolle von Ncl. accumbens und Cortex bei LID.....	80
4.4 Synopsis: TH-positive Zellen als Einflussfaktor bei der Entstehung von LID.....	81
4.5 Ausblick und klinische Implikationen.....	84
Literaturverzeichnis	86
Appendix	98
Curriculum vitae	99
Verzeichnis der akademischen Lehrer	101
Danksagung	102
Veröffentlichungen im Zusammenhang mit dieser Dissertation	103
Ehrenwörtliche Erklärung	104

Zusammenfassung

Die Parkinson-Krankheit ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung weltweit. Der Goldstandard zur symptomatischen Behandlung ist der Wirkstoff L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA), der im Verlauf jedoch bei vielen Patienten ausgeprägte motorische Nebenwirkungen in Form von abnormen unfreiwilligen Bewegungen, sogenannten L-DOPA-induzierten Dyskinesien (LID), hervorruft. Deren genaue Ätiopathogenese liegt bislang noch im Dunkeln. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Expression Tyrosinhydroxylase(TH)-positiver und damit L-DOPA-produzierender Zellen im denervierten Corpus striatum (Striatum) als fundamentalen Faktor für die Entstehung und Ausprägung von LID aufzudecken.

Hierzu wurden 6-Hydroxydopamin-lädierte Mäuse über 15 Tage mit L-DOPA behandelt, das Auftreten von LID wurde charakterisiert und mit der immunhistochemisch bestimmten Anzahl striataler TH-positiver Zellen korreliert. Bemerkenswerterweise entwickelten 70% der L-DOPA-behandelten Mäuse ausgeprägte LID, die mit einer deutlich gesteigerten Expression TH-positiver Neurone einhergingen und deren Ausprägung eng mit der Zellzahl korrelierte. Die Zunahme TH-positiver Neurone stand im Einklang mit einer gesteigerten Expression von Δ FosB, einem validen molekularen Marker für Dyskinesien. Zudem wiesen dyskinetische Tiere eine erhöhte serotonerge Innervation des Striatums auf – Fasern, die mit ihrer aromatischen Aminosäure-Decarboxylase eine Konversion von L-DOPA in Dopamin vollführen können. Es ist also davon auszugehen, dass die TH-positiven Zellen synergistisch mit serotonergen Terminalen Dopamin synthetisieren und damit erhöhte extrazelluläre Dopaminkonzentrationen begünstigen. Dieser ursprünglich kompensatorische Mechanismus als Antwort auf das striatale dopaminerge Defizit beim Morbus Parkinson scheint im Rahmen einer L-DOPA-Therapie über das Ziel hinaus zu schießen und resultiert in der Entwicklung von LID. Zentraler Entstehungsort ist hierbei das laterale, dem menschlichen Putamen entsprechende Striatum, wohingegen ein prodyskinetischer Effekt der TH-Zellen im Nucleus accumbens und im Cortex ausgeschlossen werden konnte.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit tragen grundlegend zu einem besseren Verständnis über die Ätiopathogenese von LID und die Funktionalität der weitgehend unerforschten TH-positiven Neurone bei. Zukünftige Studien, die sich die TH-positiven Zellen für eine potentielle Parkinsontherapie zunutze machen wollen, sollten deren LID-provozierenden Effekt kritisch berücksichtigen. Auf der anderen Seite könnten diese Neurone langfristig einen hoffnungsvollen Ansatz für neue antidyskinetische Behandlungsstrategien liefern.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder worldwide. The gold standard of medication is the dopamine precursor L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA). However, long-term treatment is complicated by the induction of abnormal involuntary movements, so called L-DOPA-induced dyskinesias (LID), in the vast majority of patients. So far, little is known about the underlying mechanisms of LID pathogenesis. The aim of this thesis was to reveal a factor, which may be critically involved in the induction and severity of LID: the expression of tyrosine-hydroxylase(TH)-positive neurons, which are capable of producing L-DOPA in the denervated corpus striatum (striatum).

To address this issue, a daily L-DOPA dose was administered to 6-hydroxydopamine lesioned mice over the course of 15 days. The occurrence and severity of LID was determined and correlated with the number of striatal TH-positive cells. Remarkably, 70% of the animals developed severe LID, which was strongly associated with an increased expression of TH-positive neurons. According to these findings, the activity of Δ FosB as a valid molecular marker for LID was upregulated analogously. Furthermore, dyskinetic mice showed a marked augmentation of serotonergic fiber innervation in the striatum, enabling the conversion of L-DOPA to dopamine via the aromatic amino-acid decarboxylating enzyme. These lines of evidence support the assumption that TH-positive cells and serotonergic terminals synergistically synthesize dopamine and subsequently contribute to supraphysiological dopamine concentrations. This mechanism that initially compensates the striatal dopamine deficit in PD may be overregulated during L-DOPA treatment and hence lead to the generation of LID. The pivotal region of origin was the lateral striatum corresponding to the human putamen whereas TH-positive cells in nucleus accumbens and cortex did not show any prodyskinetic effect.

Overall, the findings of this study provide compelling information for a better understanding of LID pathogenesis and the functionality of enigmatic TH-positive neurons. Future studies, which favor TH-positive neurons as a potential cell-based therapy for PD, should critically consider its LID triggering effect. On the other hand, TH-positive neurons could become the basis of a promising new approach for antidyskinetic treatment strategies.

Abkürzungsverzeichnis

Sämtliche Maßeinheiten sind nach dem Internationalen Einheitssystem (SI) abgekürzt.

5-HT	5-Hydroxytryptamin = Serotonin
6-OHDA	6-Hydroxydopaminhydrochlorid
AADC	L-Aromatische-Aminosäure-Decarboxylase
ABC	Avidin-Biotin-Enzymkomplex
Acc	Nucleus accumbens
AIM	abnorme unfreiwillige Bewegungen (engl. abnormal involuntary movements)
AK	Antikörper
ANOVA	einfaktorielle Varianzanalyse (engl. analysis of variances)
ant	anterior
ax	axiale Dyskinesie
ax+ol+Vo	axiale, orolinguale und Vorderpfoten-Dyskinesien
CA	Commissura anterior
CC	Corpus callosum
COMT	Katechol-O-Methyl-Transferase
DA	Dopamin
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DAT	Dopamintransporter
DL	dorsolateral
DM	dorsomedial
ERK1/2	extrazelluläre signalregulierte Kinase 1 und 2
Δ FosB+	Δ FosB-positiv
FI	Fimbrien des Hippocampus
GABA	γ -Aminobuttersäure

GPe	Globus pallidus, pars externa
GPi	Globus pallidus, pars interna
GPL	lateraler Globus pallidus
H ₂ O dest.	destilliertes Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HVS	Homovanillinsäure
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
i. p.	intraperitoneal
IPS	idiopathisches Parkinson-Syndrom
KG	Körpergewicht
lat	lateral
LD-Dys	L-DOPA-behandelt und dyskinetische Mäuse
LD-Non-Dys	L-DOPA-behandelt und nicht-dyskinetische Mäuse
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
LID	L-DOPA-induzierte Dyskinesien
loko	lokomotorische Rotationen
m	monoklonal
med	medial
MAO	Mono-Aminooxidase
MFB	mediales Vorderhirnbündel (engl.: medial forebrain bundle)
MSN	striatale GABAerge Projektionsneurone (engl. medium-sized spiny neurons)
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
NaCl	Natriumchlorid
NDS	normales Eselserum (engl.: Normal Donkey Serum)
NeuN	Neuronal Nuclei
NGS	normales Ziegenserum (engl.: normal goat serum)

NHS	normales Pferdeserum (engl.: normal horse serum)
OD	optische Dichte
ol	orolinguale Dyskinesie
p	polyklonal
PB	Phosphat-Puffer (engl. phosphate buffer)
PBS	Phosphat-Puffer-Salz-Lösung
PFA	Paraformaldehyd
post	posterior
s. c.	subkutan
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (engl. standard error of the mean)
SERT	Serotonin-Transporter
SERT+	Serotonin-Transporter-positiv
SN	Substantia nigra
SNpc	Substantia nigra, pars compacta
SNpr	Substantia nigra, pars reticulata
STN	Nucleus subthalamicus
STR	Corpus striatum
TH	Tyrosinhydroxylase
TH+	Tyrosinhydroxylase-positiv
V3	Dritter Ventrikel
VL	ventrolateral
VLT	ventrolaterale Thalamuskern
VM	ventromedial
VMAT-2	vesikulärer Monoamin-Transporter 2
Vo	Vorderpfoten-Dyskinesie
VTA	ventrale tegmentale Region (engl. ventral tegmental area)

1 Einleitung

Die Parkinson-Krankheit ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung weltweit. Der Goldstandard zur symptomatischen Behandlung ist der Wirkstoff L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA), der im Verlauf jedoch bei vielen Patienten ausgeprägte motorische Nebenwirkungen in Form von L-DOPA-induzierten Dyskinesien (LID) hervorruft. Hierbei handelt es sich um abnorme unfreiwillige Bewegungen vom choreiformen und dystonen Charakter, die meist kurz nach der L-DOPA-Applikation als sogenannte „Peak-Dose“-Dyskinesien auftreten. Obwohl die genaue Ätiopathogenese noch im Dunkeln liegt, gelten als entscheidender Faktor für die Entstehung von LID unkontrolliert hohe und fluktuierende Dopaminkonzentrationen im Corpus striatum (Striatum).

In den letzten Jahren wurden striatale, monoenzymatische Zellen entdeckt, die mit ihrer Tyrosinhydroxylase (TH) zur Synthese von L-DOPA fähig sind und somit eine potentielle neue Dopaminquelle im denervierten Striatum darstellen. In dieser Arbeit soll nach einem Zusammenhang geforscht werden zwischen der Expression dieser TH-positiven Zellen im Striatum und der Entstehung und Ausprägung von LID. Im Folgenden sollen zunächst die Grundlagen dargestellt werden, die zum Verständnis der vorliegenden Arbeit wichtig sind.

1.1 Morbus Parkinson

Der Morbus Parkinson, auch idiopathisches Parkinson-Syndrom (IPS) oder Parkinson-Krankheit genannt, ist eine chronisch progrediente, neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems mit Störung der willkürlichen und unwillkürlichen Motorik. Das Parkinson-Syndrom ist ein klinisch definierter Symptomkomplex bestehend aus den motorischen Symptomen Bradykinese, Rigor, und Tremor. Das IPS zählt mit anteilig 75% zur größten der vier nach ätiologischen Gesichtspunkten unterteilten Gruppen der Parkinson-Syndrome (Eggert et al., 2012). Die anderen drei Gruppen betreffen familiäre, atypische sowie symptomatische (sekundäre) Parkinson-Syndrome. Die folgenden Betrachtungen haben ausschließlich das IPS zum Gegenstand.

Mit einer Prävalenz von 1% bei den über 60-Jährigen in den Industriestaaten (Tanner und Goldman, 1996; de Lau und Breteler, 2006) gilt das IPS als zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach dem Morbus Alzheimer. In Europa wird die Prävalenz

sogar auf 1,8% der über 65-Jährigen sowie 2,6% der 85- bis 89-Jährigen geschätzt (de Rijk et al., 2000). Die Inzidenz variierte in verschiedenen Studien zwischen 8 und 18 pro 100.000 Menschen pro Jahr (de Lau und Breteler, 2006). Aufgrund der eindeutig altersabhängig steigenden Prävalenz ist zu Zeiten des demographischen Wandels in den Industriestaaten mit einer enormen Zunahme an Patienten zu rechnen, was hohe medizinische wie auch ökonomische Herausforderungen mit sich bringt (Dodel et al., 1997; Lindgren et al., 2005).

Dem IPS wie auch den in späteren Kapiteln beschriebenen Dyskinesien liegen funktionelle Störungen der Basalganglien zugrunde. Zum besseren Verständnis der pathophysiologischen Veränderungen soll zunächst die funktionelle Architektur der Basalganglien beschrieben werden.

1.1.1 Funktionelle Anatomie der Basalganglien

Die Basalganglien sind eine Gruppe subcortikaler Kerngebiete bestehend aus Striatum, Globus pallidus mit einer pars externa (GPe) und einer pars interna (GPi), Nucleus subthalamicus (STN) und Substantia nigra mit einer pars compacta (SNpc) und einer pars reticularis (SNpr). Das Striatum, welches bei Nagetieren eine geschlossene Einheit darstellt, wird beim Menschen weiter in Nucleus caudatus und Putamen unterteilt. Ferner wird der GPe beim Nager als GP, der GPi als Nucleus endopeduncularis bezeichnet (Albin et al., 1989). Die Basalganglien bilden unter Einbezug von Cortex und Thalamus als Basalganglienschleife ein komplexes Netzwerk, das eine essenzielle Rolle bei der Ausführung korrekter Bewegungsabläufe spielt.

Grundsätzlich erhält das Striatum glutamaterge exzitatorische Afferenzen vom Cortex sowie regulatorische dopaminerge Afferenzen von der SNpc (s. Abb. 1.1A). Bei den weiteren, letztlich wieder am Cortex endenden Verschaltungswegen unterscheidet man einen direkten, bewegungsfördernden von einem indirekten, bewegungshemmenden Weg (Albin et al., 1989). Beim direkten Weg inhibieren striatale GABAerge Projektionsneurone (MSN, engl.: medium-sized spiny neurons) GPi und SNpr, den sogenannten Ausgangskomplex, der wiederum ventrolaterale Thalamuskern (VL) hemmt. Die doppelte Inhibition führt zu gesteigerter Aktivität des VL, der den Cortex via Glutamat erregt und somit die Motorik fördert. Beim indirekten Weg hingegen verlaufen die Bahnen zunächst über den GPe und den STN, bevor der Ausgangskomplex erreicht wird. Die MSN hemmen den GPe, der wiederum den STN inhibiert, wodurch dieser verstärkt Glutamat in GPi und

SNpr ausschüttet und somit zu deren Erregung führt. Konsekutiv wird der VL in seiner exzitatorischen Funktion auf den Cortex gedrosselt, was in einem bewegungshemmenden Effekt resultiert (Obeso et al., 2000b). Abgesehen vom direkten und indirekten Weg sei außerdem der hyperdirekte Weg erwähnt, bei dem das Striatum als cortico-subthalamico-pallidale Verbindung umgangen wird und somit motorische Abläufe weiter reguliert werden (Nambu et al., 2002).

Bei der genauen Modulation der vom Cortex initiierten Bewegungen spielt der Neurotransmitter Dopamin eine entscheidende Rolle. Die in der SNpc entspringenden dopaminergen Projektionen verlaufen durch das mediale Vorderhirnbündel (MFB, engl. medial forebrain bundle) zum Striatum, wo sie Dopamin ausschütten. Dies wirkt an den $D_1(D_5)$ -Rezeptor exprimierenden MSN des direkten, bewegungsfördernden Projektionssystems erregend, wohingegen es auf die $D_2(D_3,D_4)$ -Rezeptor exprimierenden MSN des indirekten Weges einen hemmenden Effekt hat. Es sorgt insgesamt für ein Gleichgewicht zwischen den beiden Wegen und ermöglicht damit die Ausführung flüssiger Bewegungsabläufe.

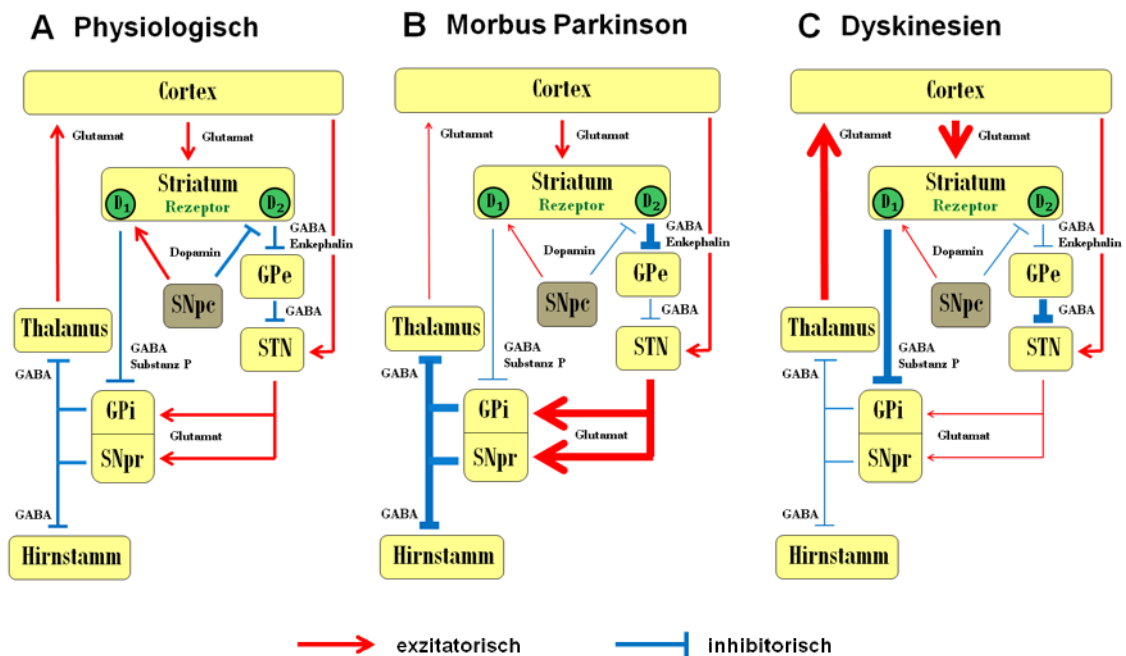


Abb. 1.1 Die Basalganglienschleife. (A) physiologisches Stadium, (B) Idiopathisches Parkinson-Syndrom und (C) L-DOPA-induzierte Dyskinesien. In Anlehnung an Guridi (2012), Obeso (2000b) sowie Lang und Lozano (1998). Die dargestellten Strukturen sind zur besseren Übersicht unvollständig. Erläuterungen siehe im Fließtext. *Abkürzungen:* GABA: γ -Aminobuttersäure, GPe: Globus pallidus externus, GPi: Globus pallidus internus, SNpc: Substantia nigra pars compacta, SNpr: Substantia nigra pars reticulata, Striatum: Corpus striatum.

1.1.2 Pathophysiologie des Morbus Parkinson

Wesentliches neuropathologisches Merkmal des IPS ist der Untergang neuromelaninhaltiger dopaminerger Nervenzellen der SNpc mit konsekutivem Dopaminmangel im Striatum (Hirsch et al., 1988; Fearnley und Lees, 1991; Pakkenberg et al., 1991). Dies hat in der Basalganglienschleife eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten des indirekten Weges mit resultierender motorischer Hemmung zur Folge, wodurch sich die charakteristischen Symptome Bradykinese und Rigor erklären lassen (s. Abb. 1.1B). Auch die zur SNpc benachbarte ventrale tegmentale Region (VTA) zeigt eine Degeneration dopaminerger Neurone auf bis zu 50% (Hirsch et al., 1988; German et al., 1989). Charakteristisch für das IPS ist zudem das Auftreten von Lewy-Körperchen: eosinophile Zytoplasmainschlüsse, bestehend aus Proteinaggregaten wie α -Synuclein, Ubiquitin oder Calbindin (Wakabayashi et al., 2007). Diese finden sich in den dopaminergen Neuronen der SNpc (Lewy, 1912), aber auch in anderen Lokalisationen des zentralen Nervensystems (Braak et al., 2003).

Trotz intensiver Forschung ist die Ätiologie des IPS bislang nicht eindeutig geklärt. Grundsätzlich wird von einem Zusammenspiel exogener, zu neuronalem Stress führender und endogener, vulnerabilitätssteigernder Faktoren ausgegangen (Sulzer, 2007).

1.1.3 Klinische Manifestation

Erstmals 1817 wurde die klassische Symptomatik der damals betitelten „Schüttellähmung“ (lat. *paralysis agitans*) in seinem „Essay on the shaking palsy“ von dem Londoner Arzt James Parkinson beschrieben, nach dem die Krankheit etwa 70 Jahre später durch Jean-Martin Charcot benannt wurde (Goetz, 1986). Zu den Kardinalsymptomen zählen Bradykinese, Rigor, Ruhetremor und die posturale Instabilität. Diese motorischen Symptome manifestieren sich bei einem Defizit des striatalen Dopamingehaltes von 60-80% und der nigralen dopaminergen Zellen von 50-60% (Bernheimer et al., 1973; Fearnley und Lees, 1991; Hornykiewicz, 1998). In der Regel zeigen sich die Symptome asymmetrisch mit einer stärker betroffenen Körperhälfte. Abgesehen von der motorischen Symptomatik können auch fakultative Begleitsymptome im Rahmen sensorischer, vegetativer, psychischer sowie kognitiver Störungen bestehen.

1.1.4 Grundzüge der derzeitigen Therapie

Die heutigen Therapieansätze des IPS stellen eine rein symptomatische Behandlung dar, die keinen kurativen oder neuroprotektiven Effekt aufweist. Der Schwerpunkt liegt hierbei auf der pharmakologischen Therapie, aber auch Begleitmaßnahmen wie psychosoziale Betreuung, Physiotherapie und Logopädie ergänzen ein ganzheitliches Behandlungskonzept, bei dem die Lebensqualität des Patienten im Vordergrund steht. In schweren Krankheitsfällen kann darüber hinaus die Tiefenhirnstimulation von STN oder GPi zu einer verbesserten Motorik beitragen (Deuschl et al., 2006; Follett et al., 2010).

Ziel der pharmakologischen Therapie ist die möglichst selektive Kompensation des striatalen Dopaminmangels. Hierzu stehen Dopamin-Agonisten sowie Inhibitoren der Dopamin abbauenden Enzyme Katechol-O-Methyl-Transferase (COMT) und Mono-Aminooxidase-B (MAO-B) zur Verfügung. Der therapeutische Goldstandard mit höchster Effektivität ist jedoch seit seiner revolutionären Erstanwendung in den 60er Jahren der Wirkstoff L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) (Cotzias et al., 1967; Birkmayer und Hornykiewicz, 1961), der leitliniengerecht bei allen älteren (über 75. Lebensjahr), multimorbiden Parkinson-Patienten eingesetzt wird sowie meist additiv bei Patienten mit frühem Krankheitsbeginn, sobald die Dopamin-Agonisten keine erwünschte Wirkung mehr zeigen oder zu Nebenwirkungen führen (Oertel et al., 2011; Eggert et al., 2012). In den folgenden Kapiteln sollen die pharmakologischen Eigenschaften sowie die mit der Langzeitanwendung von L-DOPA einhergehenden Probleme, speziell L-DOPA-induzierte Dyskinesien (LID), genauer thematisiert werden.

1.2 L-DOPA Pharmakotherapie

1.2.1 Metabolismus und Wirkmechanismus

Oral appliziertes L-DOPA gelangt über das Duodenum in die Blutbahn, von wo es mithilfe von Aminosäure-Transportern die Blut-Hirn-Schranke passieren kann (Wade und Katzman, 1975; Kageyama et al., 2000). Durch die kombinierte Applikation von peripher wirksamen Decarboxylase-Hemmern wie Benserazid oder Carbidopa wird der vorschnelle Abbau von L-DOPA im Blut verhindert und somit periphere Nebenwirkungen minimiert und außerdem

durch die längere Halbwertszeit eine effektivere Wirkung im Gehirn erreicht. In den verbliebenen nigrostriatalen dopaminergen Neuronen wird das L-DOPA nun durch das Enzym L-Aromatische-Aminosäure-Decarboxylase (AADC) zu dem aktiven Neurotransmitter Dopamin umgewandelt, dieser über den vesikulären Monoamin-Transporter 2 (VMAT-2) in synaptische Vesikel verpackt und bei physiologischen Stimuli in den Extrazellulärspalt ausgeschüttet (s. Abb. 1.2). Hier übt das aus L-DOPA konvertierte Dopamin seine bereits erläuterte Wirkung auf die MSN des Striatums aus (s. Abb. 1.1). Durch diesen Vorgang wird die mangelnde körpereigene, TH-abhängige Dopaminsynthese aus der Aminosäure L-Tyrosin kompensiert. Limitiert wird der dopaminerge Effekt durch eine Dopamintransporter(DAT)-vermittelte präsynaptische Wiederaufnahme (Miller und Abercrombie, 1999) sowie den enzymatischen Abbau durch MAO und COMT zu Homovanillinsäure.

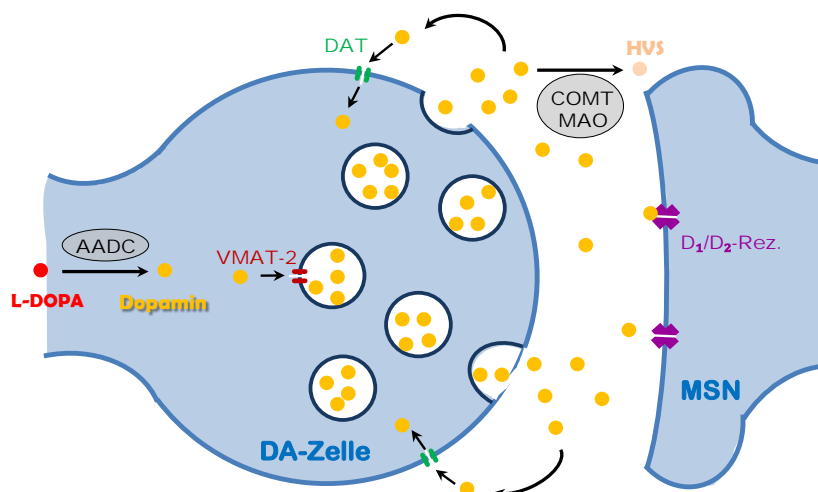


Abb. 1.2 Metabolismus von L-DOPA im Striatum. L-DOPA wird in den restlichen dopaminergen Neuronen (DA-Zelle) der Substantia nigra von der L-Aromatischen-Aminosäure-Decarboxylase (AADC) in Dopamin konvertiert, über den vesikulären Monoamin-Transporter 2 (VMAT-2) in Vesikel verpackt und bei physiologischen Stimuli in den Extrazellulärspalt ausgeschüttet. Hier wirkt es an den striatalen GABAergen Zielzellen (MSN) über den D₁- oder D₂-Rezeptor (D₁/D₂-Rez.). Anschließend wird das Dopamin über den Dopamintransporter (DAT) wieder in die präsynaptische Zellendigung aufgenommen oder durch die Enzyme Katechol-O-Methyl-Transferase (COMT) bzw. Mono-Aminooxidase-B (MAO) zu Homovanillinsäure (HVS) abgebaut.

Neben den dopaminergen Neuronen sind auch serotonerge (5-HT, 5-Hydroxytryptamin) Neurone in der Lage, Dopamin aus L-DOPA zu synthetisieren und auszuschütten, da sie ebenfalls das Enzym AADC (Arai et al., 1995; Tanaka et al., 1999) wie auch den VMAT-2 exprimieren (Peter et al., 1995). Die Rolle dieser vom Nucleus raphe zum Striatum

ziehenden Projektionen bei der L-DOPA-Konversion wurde eindrucksvoll von Tanaka et al. (1999) beleuchtet, der den extrazellulären striatalen Dopamingehalt von komplett 6-OHDA lädierten und L-DOPA-behandelten Ratten mit und ohne zusätzliche 5-HT Denervation verglich: die serotonerg lädierten Ratten wiesen hierbei ein deutliches Dopamindefizit von 79% im Vergleich zu denen mit normaler Innervation auf. Dies verdeutlicht, wie die 5-HT Neurone insbesondere bei zunehmender dopaminerg Degeneration im Rahmen eines fortgeschrittenen IPS als wichtige kompensatorische Struktur zur Umwandlung von L-DOPA an Bedeutung gewinnen.

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass neben dem dopaminergen und dem serotonergen System auch von weiteren zellulären Elementen im Striatum berichtet wurde, die mithilfe der AADC zur L-DOPA-Konversion fähig sein könnten. Hierzu gehören striatale non-aminerge Neurone (Melamed et al., 1980) sowie nicht-neuronale astrozytäre oder endotheliale Zellen (Hardebo et al., 1980; Juorio et al., 1993; Sarre et al., 1994). In vitro-Analysen weisen jedoch darauf hin, dass sie nur einen kleinen Anteil (6%) bei der Dopaminsynthese aus L-DOPA ausmachen (Björklund et al., 2010).

1.2.2 Limitierung und Probleme bei der Langzeitbehandlung

Obwohl L-DOPA nach wie vor als effektivste Substanz zur Behandlung des IPS gilt (Levine et al., 2003), entwickelt der Großteil der Patienten im Verlauf schwerwiegende motorische Komplikationen im Sinne von „On-Off“-Fluktuationen und abnormalen unfreiwilligen Bewegungen (AIM, engl. abnormal involuntary movements), sogenannte Dyskinesien (Obeso et al., 2000a). Hinzu kommen autonome sowie neuropsychiatrische Nebenwirkungen wie Halluzinationen und Psychosen (Nausieda et al., 1984). Im Fokus dieser Arbeit stehen die LID, die im Folgenden genauer beleuchtet werden sollen.

1.3 L-DOPA-induzierte Dyskinesien

Mit einem Auftreten von bereits 40% nach 5jähriger und nahezu 90% nach 10jähriger Behandlung stellen die LID eine äußerst relevante Komplikation der L-DOPA-Therapie im Rahmen des IPS dar (Ahlskog und Muentert, 2001). Diese abnormalen unfreiwilligen Bewegungen gehen mit einer starken Einschränkung der Lebensqualität einher, ganz abgesehen von steigenden Gesundheitskosten (Dodel et al., 2001). Bislang konnten in experimentellen wie auch klinischen Studien mehrere Risikofaktoren für die Entstehung von LID identifiziert werden: früher Krankheitsbeginn, starker Schweregrad der nigrostriatalen Degeneration sowie lange Dauer und hohe Dosis der L-DOPA-Behandlung (Blanchet et al., 1996; Di Monte et al., 2000; Schrag und Quinn, 2000; Linazasoro et al., 2004; Linazasoro, 2005; Ulusoy et al., 2010).

Klinisch manifestieren sich die Dyskinesien typischerweise als Kombination aus choreiformen und dystonen Bewegungen, die bereits in den 70er Jahren treffend von Mones beschrieben wurden (1971): irreguläre schnelle und langsame Bewegungen von Gesichtsmuskulatur, Zunge und Nacken, unfreiwillige dystone Motorik der Arme und Beine sowie abnormale Bewegungen des Stammes mit Wackeln von Hüfte und Schultern. Diese erscheinen zeitlich parallel zu der maximalen Wirkung von L-DOPA (etwa 40-80 Minuten nach Applikation), weswegen sie auch als On- oder „Peak-Dose“-Dyskinesien bezeichnet werden (Fahn, 2000). Seltener treten sogenannte biphasische Dyskinesien auf, die während des An- und Abflutens von L-DOPA durch oft dystone, aber auch ballistische Dyskinesien der Arme und Beine gekennzeichnet sind (Muentert et al., 1977; Luquin et al., 1992). Manche Patienten leiden zudem unter Off-Phasen-Dystonien mit meist schmerzhaften Muskelspasmen an Gliedern während niedriger L-DOPA-Konzentrationen.

1.3.1 Pathophysiologie – Teile des Puzzles

Obwohl LID in den letzten Jahren zunehmend Thema intensiver Forschung geworden sind, sind wir von einem ganzheitlichen Verständnis ihrer komplexen Ätiopathogenese noch weit entfernt. Hiermit soll zunächst ein grober Überblick über die bisher wichtigsten Erkenntnisse zur Entstehung von LID gegeben werden.

Grundsätzlich wird von einem Zusammenspiel prä- und postsynaptischer Mechanismen ausgegangen, die dauerhaft zu einer abnormal veränderten Plastizität der Basalganglien

führen (Cenci und Lundblad, 2006; Cenci und Lindgren, 2007; Calabresi et al., 2010; Guridi et al., 2012). Die präsynaptischen, vor der nigrostriatalen Synapse stattfindenden Veränderungen haben gemeinsam, dass sie die übermäßigen striatal-extrazellulären Dopaminkonzentrationen nach intermittierender L-DOPA-Applikation begünstigen, was eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der LID spielen soll (de la Fuente-Fernández et al., 2004; Meissner et al., 2006; Pavese et al., 2006; Lindgren et al., 2010). Zu den wichtigsten präsynaptischen Faktoren zählen somit (1) die Degeneration nigrostriataler Neurone mit konsekutivem Verlust der dopaminergen Speicherkapazität als Puffersystem (Abercrombie et al., 1990; Winkler et al., 2002; Troiano et al., 2009; Ulusoy et al., 2010) und (2) die Innervation serotonerger Fasern im Striatum, die mit ihrer AADC-Aktivität L-DOPA zu Dopamin decarboxylieren und dieses ohne einen autoregulatorischen Mechanismus unkontrolliert ausschütten (Arai et al., 1995; Carlsson et al., 2007; Carta et al., 2007; Carlsson et al., 2009; Rylander et al., 2010). Die enormen pulsatilen Schwankungen des extrazellulären Dopamingehalts haben postsynaptische, molekulare Veränderungen zur Konsequenz, die vornehmlich durch gesteigerte, D₁-Rezeptor-vermittelte Signalkaskaden der MSN des direkten Projektionssystems gekennzeichnet sind: die Aktivierung des kompensatorisch vermehrt exprimierten und hypersensitiven D₁-Rezeptors (Konradi et al., 2004; Aubert et al., 2005; Berthet et al., 2009; Darmopil et al., 2009) führt über eine ERK1/2-vermittelte Signalkaskade zur Hochregulation von FosB/ Δ FosB-verwandten¹ Transkriptionsfaktoren (Andersson et al., 1999; Santini et al., 2007; Westin et al., 2007; Lindgren et al., 2011). Die hierdurch geförderte Proteinbiosynthese resultiert in einer Überaktivität der MSN mit exzessiven GABAergen Entladungen zugunsten des direkten, bewegungsfördernden Weges (s. Abb. 1.1C, Seite 3) (Alonso-Frech et al., 2006; Meissner et al., 2006; Mela et al., 2007; Guridi et al., 2012; Halje et al., 2012).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die mit erhöhten Konzentrationen einhergehenden Fluktuationen des extrazellulären Dopamins den entscheidenden Trigger zur Entstehung von LID darstellen. Erst daraufhin kommt es zu den postsynaptischen plastischen Veränderungen. Diese Arbeit konzentriert sich daher auf weitere mögliche präsynaptische Mechanismen, die zu den unkontrollierten striatalen Dopaminspiegeln führen und somit ganz am Anfang der Entstehungskette von LID stehen.

¹ Diese Definition bezieht sich auf die vom FosB-Gen translatierten Proteine: FosB mit voller Länge (Molekulargewicht ~45 kDa), dessen Spleißvariante Δ FosB (~33 kDa) sowie post-translationale Derivate von Δ FosB (35-37 kDa) (Hiroi, 1998). Kommerzielle Antikörper erkennen alle Isoformen. Chronische L-DOPA-Behandlung führte zur Hochregulation in den Banden von 33-37 kDa (Anderson, 2001), weswegen in dieser Arbeit von nun an die Schreibweise Δ FosB gewählt wurde.

1.3.2 Therapieansätze

Die Behandlung von LID stellt eine große klinische Herausforderung dar und führt bei den meisten Patienten lediglich zu milden oder kurzzeitigen Verbesserungen (Guridi et al., 2012). Im Zentrum der Therapie steht der Versuch, insgesamt geringere Dosierungen und möglichst konstante L-DOPA-Spiegel mit konsekutiv kontinuierlicher Dopaminrezeptorstimulation zu erreichen. Hierzu werden als Komedikation MAO- oder COMT-Hemmer sowie Dopamin-Agonisten in Retard- oder Pflasterform verabreicht (Eggert et al., 2012). Es kann zudem der NMDA-Rezeptor-Antagonist Amantadin eingesetzt werden, der in klinischen Studien variable Ergebnisse erzielte (Crosby et al., 2003; Wolf et al., 2010). In ausgeprägten, therapieresistenten Fällen kann schließlich eine Reduktion der LID durch kontinuierliche jejunale L-DOPA-Infusion (Nyholm et al., 2005; Antonini et al., 2007; Devos und Group, 2009), subkutane Apomorphin-Injektion (Katzenschlager et al., 2005) oder Tiefenhirnstimulation von STN oder GPi (Deuschl et al., 2006; Follett et al., 2010) versucht werden.

Insgesamt ist eine effiziente Therapie der LID leider immer noch als problematisch einzustufen. Obwohl auf den bisherigen Erkenntnissen aufbauende präklinische Studien vielversprechende Ergebnisse bezüglich diverser antidyskinetischer Wirkstoffklassen zeigten (Henry et al., 1999; Bibbiani et al., 2001; van der Stelt et al., 2005; Grégoire et al., 2009), erwiesen sich die meisten Substanzen in anschließenden klinischen Studien als ineffektiv oder mit schweren Nebenwirkungen verbunden (Manson et al., 2000; Mesnage et al., 2004; Goetz et al., 2007; Goetz et al., 2008). Zur Entwicklung weiterer Behandlungsstrategien ist es daher essentiell, weitere pathophysiologische Mechanismen der LID als hoffnungsvolle neue Ansatzpunkte effektiver Therapeutika aufzudecken. Hierzu stehen mittlerweile einige Tiermodelle zur Verfügung, die es ermöglichen, ätiopathologische Elemente unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen. Im folgenden Abschnitt soll das 6-OHDA-induzierte Mausmodell für Dyskinesien erläutert werden, welches in dieser Arbeit Verwendung fand.

1.3.3 LID im unilateralen 6-OHDA Mausmodell

Als Tiermodell für das IPS wird seit der Erstbeschreibung von Ungerstedt (1968) die unilaterale 6-Hydroxydopamin (6-OHDA)-Läsion in Nagern vielfach genutzt. 6-OHDA ist ein Nervengift, welches aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Dopamin über den

DAT in dopaminerge Zellen aufgenommen wird und dort zu oxidativem Stress und damit einhergehender Zellschädigung führt (Przedborski und Ischiropoulos, 2005). Während man durch die 6-OHDA-Injektion in Striatum oder SNpc eine partielle Degeneration dopaminerg nigrostriataler Neurone hervorrufen kann (Ungerstedt, 1968; Sauer und Oertel, 1994; Lundblad et al., 2004; Francardo et al., 2011; Smith et al., 2012), bewirkt die Injektion in das MFB eine subtotale Denervation (Kirik et al., 1998; Lundblad et al., 2004), die ein späteres Krankheitsstadium des IPS repräsentiert. Letzteres Verfahren eignet sich daher gut für Therapiestudien und wurde in dieser Arbeit an der Maus eingesetzt. Infolge der Läsion entwickeln die Mäuse auf der kontralateralen Körperseite motorische Störungen wie Bradykinese der entsprechenden Vorderpfote sowie spontane, durch Amphetamin potenzierbare Rotationen ipsilateral zur lädierten Seite. Diese Parameter lassen sich mit dem Zylindertest und dem Amphetamin-induzierten Rotationstest im offenen Feld messen, wodurch eine Abschätzung des dopaminergen Läsionsgrades möglich wird (Lundblad et al., 2004; Francardo et al., 2011).

Die pulsatile, niedrigdosierte Standardtherapie mit L-DOPA führt bei MFB-lädierten 6-OHDA Mäusen zu AIMs, welche die Peak-Dose-Dyskinesien von Patienten widerspiegeln (Fasano et al., 2010; Francardo et al., 2011). Ähnlich wie beim Patienten erreichen sie etwa 60 Minuten nach L-DOPA-Applikation ihre maximale Ausprägung (Fahn, 2000; Lundblad et al., 2004). Die AIMs werden auf der läsionskontralateralen Körperhälfte in Form von hyperkinetischen Vorderpfoten- und orolingualen Dyskinesien sowie dystonen axialen Dyskinesien beobachtet. Zudem bestehen lokomotorische Rotationen kontralateral zur Läsionsseite (vgl. auch Tabelle 2.5, S. 27 und Abb. 3.5, S. 49). Bislang konnten mehrere molekulare Marker, deren Expressionen mit der Ausprägung von LID bei der Maus korrelieren, identifiziert werden: Prodynorphin mRNA, phosphorylierte extrazelluläre signalregulierte Kinase 1 und 2 (pERK1/2) sowie Δ FosB Proteine (vgl. Kap. 1.3.1) (Lundblad et al., 2004; Pavón et al., 2006; Fasano et al., 2010; Smith et al., 2012).

Mithilfe des unilateralen 6-OHDA Mausmodells wurde in dieser Arbeit ein entscheidender präsynaptischer Einflussfaktor zur Entstehung der LID untersucht: die Expression von TH-positiven Neuronen im denervierten Striatum. Diese sollen im Folgenden charakterisiert werden.

1.4 Striatale TH-positive Neurone

Zunächst sei ein gewöhnliches dopaminerges Neuron beschrieben, zum Beispiel eines der nigrostriatalen Projektion. Dieses besitzt alle nötigen Enzyme zur Synthese von Dopamin (s. Abb. 1.3): Die Aminosäure L-Tyrosin wird mithilfe des Enzyms TH zu L-DOPA hydroxyliert, welches wiederum durch die AADC zu Dopamin decarboxyliert wird. TH ist hierbei das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Katecholaminsynthese (Moore et al., 1985). Wie bereits beim L-DOPA-Metabolismus beschrieben, wird das Dopamin mittels VMAT-2 in Vesikel verpackt, bei physiologischen Stimuli (Aktionspotential) ausgeschüttet und über DAT wieder in die Zelle aufgenommen (vgl. Abb. 1.2). Die nigrostriatalen dopaminergen Neurone galten lange Zeit als einzige Dopaminquelle im Striatum.

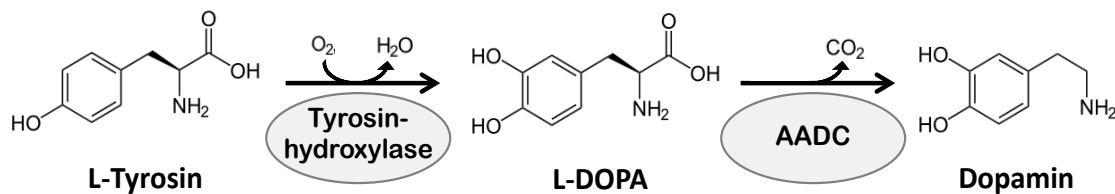


Abb. 1.3 Dopaminsynthese. Ein dopaminerges Neuron besitzt beide Enzyme zur vollständigen Synthese. DOPAerge Neurone exprimieren nur die Tyrosinhydroxylase. *Abkürzungen:* AADC: L-Aromatische-Aminosäure-Decarboxylase, L-DOPA: L-3,4-Dihydroxyphenylalanin.

In den letzten Jahren wurde allerdings die grundlegende Entdeckung gemacht, dass in den Striata von adulten Nagetieren (Tashiro et al., 1989; Lopez-Real et al., 2003), nicht-humanen Primaten (Dubach et al., 1987; Tandé et al., 2006) und Menschen (Cossette et al., 2005; Huot et al., 2007) zusätzlich Neurone existieren, die TH exprimieren, allerdings nicht oder nur anteilig AADC. Diese monoenzymatischen, TH-positiven Zellen werden daher auch als DOPAerg bezeichnet (Weihe et al., 2006; Ugrumov, 2013), ihre genaue Funktion ist allerdings bislang unbekannt. Sie scheinen keinen VMAT-2 zu besitzen (Weihe et al., 2006; Depboylu, 2014) und die Expression des DAT zeigt spezieabhängige Unterschiede: während dieser in humanen und nicht-humanen Primaten nachgewiesen wurde, konnte er in Nagern nicht gefunden werden (Betarbet et al., 1997; Cossette et al., 2005; Tandé et al., 2006; Darmopil et al., 2008; Depboylu, 2014). Zusätzlich lokalisiert sind diese TH-positiven Neurone im Ncl. accumbens und im Cortex (Mura et al., 1995; Ikemoto et al., 1998; Weihe et al., 2006; Depboylu, 2014).

Interessanterweise nehmen die striatalen TH-positiven Zellen in ihrer Zahl infolge einer nigrostriatalen Degeneration wie beim IPS bei Patienten und in entsprechenden Tiermodellen an Anzahl zu (Tashiro et al., 1989; Betarbet et al., 1997; Meredith et al., 1999; Porritt et al., 2000; Lopez-Real et al., 2003; Tandé et al., 2006; Depboylu, 2014). Dies wird als kompensatorischer Mechanismus bei funktioneller Insuffizienz dopaminerger Neurone gedeutet (Ugrumov, 2013), der potentiell bei der Bereitstellung von neuem Dopamin bzw. L-DOPA beteiligt sein könnte. Tandé et al. (2006) konnten an MPTP-behandelten Rhesusaffen nachweisen, dass die zunehmenden striatalen TH-positiven Zellen nicht völlig neu entstehen, sondern aus einem phänotypischen Shift bereits vorhandener GABAerger Interneurone resultieren. Möglich ist auch eine hochregulierte Translation bereits vorhandener mRNA in das TH-Protein (Huot und Parent, 2007). In Studien an 6-OHDA-lädierten Nagetieren wurden die TH-positiven Zellen hingegen als projizierende Neurone charakterisiert, von denen sogar etwa die Hälfte zusätzlich AADC exprimiert und somit eigens zur Dopaminsynthese fähig ist (Lopez-Real et al., 2003; Darmopil et al., 2008).

Insgesamt liegt die genaue Funktion dieser TH-positiven Zellen im Striatum noch im Dunkeln, weswegen ganz klar Bedarf an weiterer Forschung besteht. Ihre enzymatische Ausstattung sowie die reaktive Vermehrung infolge dopaminerger Degeneration legen jedoch nahe, dass diese Neurone eine potentielle Dopaminquelle im denervierten Striatum darstellen - entweder alleine oder als funktionelle Einheit mit AADC-exprimierenden Zellen oder AADC-enhaltenden Fasern. Dies könnte sich einerseits positiv kompensierend auf die Symptomatik des IPS auswirken, andererseits aber lokal auch zu unkontrolliert hohen und fluktuierenden Dopaminkonzentrationen führen. Letztere stellen einen ganz entscheidenden Faktor bei der Entstehung von LID dar. In dieser Arbeit sollen die TH-positiven Neurone erstmals in Verbindung gebracht werden mit der Entstehung und dem Ausmaß von LID.

1.5 Ziele der Arbeit

Das zentrale Ziel dieser Arbeit ist es, den Zusammenhang zwischen den TH-positiven Zellen des Striatums und der Entstehung und Ausprägung von LID am 6-OHDA Mausmodell zu untersuchen. Dieser Analyse liegt die Hypothese zugrunde, dass die TH-positiven Zellen als potentielle L-DOPA- bzw. Dopaminquelle im denervierten Striatum zu hohen und fluktuierenden Dopaminspiegeln beitragen und somit einen entscheidenden Trigger bei der Entstehung von LID darstellen. Um der Hypothese nachzugehen, sollen MFB-6-OHDA-lädierte Mäuse mit L-DOPA behandelt, das Auftreten von AIMs charakterisiert und anschließend mit der immunhistochemisch bestimmten Anzahl TH-positiver Zellen im Striatum korreliert werden. Hierbei wird ergänzend geprüft, ob die Anzahl TH-positiver Zellen im Einklang steht mit der Expression von Δ FosB als molekularem Marker für LID. Darüber hinaus soll untersucht werden, ob sich die Ausprägungen einzelner Dyskinesie-Subtypen auf vermehrte TH-positive Zellen in bestimmten striatalen Subregionen zurückführen lassen.

Supplementär zu der oben genannten Hauptfragestellung sollen folgende Punkte Beachtung finden:

- 1) Handelt es sich bei den TH-positiven Zellen phänotypisch tatsächlich um Neurone?
- 2) Welchen Einfluss hat die L-DOPA-Therapie auf die numerische Expression der TH-positiven Zellen?
- 3) Wie verändert sich die striatale serotonerge Innervation als Einflussfaktor von LID infolge der L-DOPA-Behandlung und bei Dyskinesien?
- 4) Gehen die L-DOPA-Therapie und LID zusätzlich mit einer veränderten Anzahl TH-positiver Neurone in den Regionen Ncl. accumbens und Cortex einher?

Die Untersuchung dieser Fragen sowie der Versuchshypothese soll sowohl wichtige Hinweise auf Funktionalität der TH-positiven Neurone im Striatum geben, als auch zu einem tieferen pathophysiologischen Verständnis der LID beitragen. Schließlich könnten die gewonnenen Erkenntnisse einen neuen, hoffnungsvollen Ansatzpunkt für zukünftige antidyskinetische Behandlungsstrategien liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Übersicht über die Versuchsanordnung

Um die Relevanz TH-positiver Zellen in L-DOPA-induzierten Dyskinesien am 6-OHDA Mausmodell untersuchen zu können, wurde ein Versuchsaufbau konstruiert, der den Ablauf von stereotaktischer Operation, Verhaltenstests und die L-DOPA-Behandlungen zeitlich fest definiert und dem sich die immunhistochemische Bearbeitung und Auswertung anschließt. Abbildung 2.1 gibt einen Überblick über den zeitlichen Verlauf des Experiments. Zunächst wurden 50 adulte Mäuse der operativen 6-OHDA-Injektion in das MFB unterzogen, um unilateral ein dopaminerges Defizit im Striatum zu induzieren. Drei Wochen post operationem wurde die Qualität der Läsion mithilfe des Zylindertests und des Amphetamin-induzierten Rotationstests im offenen Feld beurteilt. Auf Basis der erhaltenen Daten dieser beiden Verhaltenstests wurden die 24 bestlädierten Tiere ausgewählt und in zwei Gruppen mit vergleichbarem mittleren Läsionsgrad eingeteilt:

Therapiegruppe: 18 Tiere – Behandlung mit L-DOPA

Kontrollgruppe: 6 Tiere – Behandlung mit 0,9% NaCl

Die tägliche Behandlung begann sechs Wochen postoperativ und wurde 15 Tage durchgeführt. An den Behandlungstagen 1, 7 und 15 fand die Schweregradbeurteilung und Klassifizierung der LID (AIM Scoring) statt. Unmittelbar nach der Behandlungsperiode wurden die Mäuse nach einer tiefen Sedierung durch transkardiale Perfusion exekutiert, die Gehirne vorsichtig aus der Schädelkalotte herauspräpariert und für immunhistochemische Analysen aufgearbeitet.

Histologisch wurde zunächst der Grad der rechtsseitigen Läsion bestimmt durch die Ermittlung von Seitenunterschieden bezüglich (1.) der Anzahl TH-positiver Zellkörper in SNpc und VTA, (2.) der Innervation TH-positiver Fasern in Striatum und Ncl. accumbens, sowie (3.) der TH-positiven Faserinnervation und Anzahl TH-positiver Zellen im Cortex. Der Schwerpunkt der immunhistochemischen Auswertung lag nachfolgend auf der Quantifizierung TH-positiver Zellen im lädierten Striatum und Ncl. accumbens. Hierzu wurden die striatalen und accumbalen TH-positiven Zellen stereologisch ausgezählt. Als

qualitativer Nachweis zum neuronalen Phänotyp dieser Zellen wurde eine TH/NeuN-Doppelimmunfluoreszenzfärbung durchgeführt und die zelluläre Koexpression beider Proteine ermittelt.

Ferner wurden in Striatum und Ncl. accumbens immunhistochemisch die Expression von Δ FosB als valider molekularer Marker für LID sowie die serotonerge Faserinnervation quantifiziert.

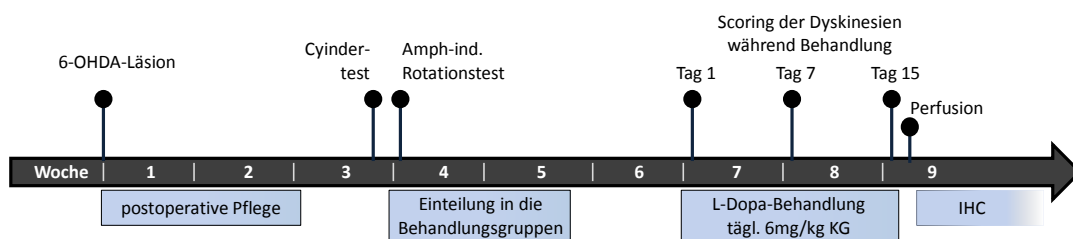


Abb. 2.1 Überblick über den Versuchsablauf. Drei Wochen postoperativ wurden zur Abschätzung der Läsionslast die Verhaltenstests Zylindertest und Amphetamin-induzierter Rotationstest im offenen Feld durchgeführt. Sechs Wochen postoperativ begann für die Versuchsgruppen die tägliche Behandlung mit L-DOPA bzw. 0,9% NaCl (Kontrollen) für 15 Tage. *Abkürzungen:* IHC: Immunhistochemie; tägl.: täglich.

2.2 Materialien und Bezugsquellen

2.2.1 Chemikalien

Tabelle 2.1 Übersicht über die verwendeten Chemikalien.

Reagenz	Hersteller
3,3-Diaminobenzidin	Serva – Heidelberg, DE
3,4-Dihydroxy-L-Phenylalanin (L-DOPA)	Sigma-Aldrich - St.Louis, MO, USA
6-Hydroxydopaminhydrochlorid (6-OHDA)	Sigma-Aldrich - St.Louis, MO, USA
ABC-Kit (Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex)	Vector – Burlingame, CA, USA
Ampuwa (H ₂ O)	Fresenius Kabi – Bad Homburg, DE
Benserazid	Sigma-Aldrich – St. Louis, MO, USA

Chromalaun (Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat)	Carl Roth – Karlsruhe, DE
Corbit (Anthrachinon)	Kobe - Marburg, DE
D-Amphetaminsulfat	Sigma-Aldrich – St. Louis, MO, USA
Desipramin	Sigma-Aldrich - St.Louis, MO, USA
Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck – Darmstadt, DE
Ethylenglykol	Merck - Darmstadt, DE
Ethanol	Otto Fischar – Saarbrücken, DE
Gelatine, gepulvert	Sigma-Aldrich - St.Louis, MO, USA
Glyzerin 86-88%	Acros Organics - Geel, Belgien
Ketamin (Ketavet®)	Pfizer – Karlsruhe, DE
L-Ascorbinsäure	Merck - Darmstadt, DE
Natriumdihydrogenphosphatdihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck – Darmstadt, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich - St.Louis, MO, USA
Natriumhypochlorid (NaClO)	Merck - Darmstadt, DE
Natronlauge (NaOH)	Merck - Darmstadt, DE
Nickel-Ammoniumsulfat	Sigma-Aldrich - St.Louis, MO, USA
Normal Donkey Serum	Millipore - Billerica, MA, USA
Normal Goat Serum	Vector Laboratories – Burlingame, CA, USA
Normal Horse Serum	Vector Laboratories – Burlingame, CA, USA
Methanol	Sigma-Aldrich - St.Louis, MO, USA
Pentobarbital – 300mg/ml	WDT – Garbsen, DE
Paraformaldehyd (PFA)	Merck - Darmstadt, DE
Sucrose 99,5%	Sigma-Aldrich - St.Louis, MO, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich - St.Louis, MO, USA
Wasserstoffperoxid 30% (H_2O_2)	Merck - Darmstadt, DE
Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2%)	Bayer Healthcare - Leverkusen, DE
Xylol	Mallinckrodt Baker – Deventer, NL

2.2.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.2 Verwendete Puffer und Lösungen sowie deren Herstellung.

Puffer / Lösung	Zusammensetzung und Herstellung		
Antifreeze	Na ₂ HPO ₄		5,18g
1l	NaH ₂ PO ₄		1,57g
	Ethylenglycol		300ml
	Glycerin		300ml
	H ₂ O dest.	ad	1000ml
0,05%	DAB		10mg
3,3-Diaminobenzidin(DAB)-	0,2M PB		20ml
Färbelösung	30% H ₂ O ₂		6,7µl
20ml			
DAB-Nickel-Färbelösung	DAB		12mg
20ml	Nickel-Ammoniumsulfat		75mg
	0,1M PB		20ml
	30% H ₂ O ₂		7,5 µl
	<i>DAB und Nickel-Ammoniumsulfat in 0,1M PB lösen und Gemisch anschließend filtrieren. Unmittelbar vor Verwendung H₂O₂ hinzugeben. Unter dem Abzug mit Handschuhen arbeiten.</i>		
Gelatine	Gelatine		7g
300ml	Chromalaun		0,18g
	H ₂ O dest.	ad	300ml
	<i>Gelatine in H₂O dest. 1h quellen lassen. Anschließend Chromalaun hinzugeben und zum Lösen auf 40°C erwärmen. Objektträger eintauchen und über Nacht unter dem Abzug trocknen lassen.</i>		

0,2 M Phosphat-Puffer (PB)	NaH ₂ PO ₄	23g
1l Stammlösung	Na ₂ HPO ₄	5,2g
	H ₂ O dest.	ad 1l
0,1 M PB-Salz-Lösung (PBS)	0,2 M PB	500ml
1l Gebrauchslösung	NaCl	9g
	H ₂ O dest.	ad 1000ml

4% PFA	H ₂ O dest.	483,32ml
1l	0,2M PB-Puffer	500ml
	Paraformaldehyd (PFA)	40g
	30% NaOH	1-4 Tropfen

H₂O dest. auf 60°C erwärmen und PFA 5-10min einrühren. Wenige Tropfen 30% NaOH zugeben, bis die Lösung aufklart. Anschließend filtrieren und im Verhältnis 1:1 mit 0,2M PB-Puffer mischen. Unter dem Abzug mit Handschuhen arbeiten.

30% Sucrose-Lösung	Sucrose	300g
1l	0,1M PB	1l

0,3% Triton	Triton X-100	3ml
1l	0,2M PB	500ml
	H ₂ O dest.	500ml

2.2.3 Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.3 Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Material	Bezugsquelle
Bechergläser – 10ml bis 1000ml	Schott – Mainz, DE
Bepanthen-Salbe (Dexpanthenol)	Bayer – Leverkusen, DE
Betaisodona-Salbe (Poridon-Iod)	Mundi-Pharma GmbH – Limburg, DE
Cryo Tubes 1.5ml	Sarstedt – Nümbrecht, DE
Deckgläser 24x50 mm	Menzel-Gläser - Braunschweig, DE
Kryoflaschen	Scherf Präzision Europa - Meiningen, DE
Filterpapier MN 615	Machery-Nagel – Düren, DE
Immersionsöl	Merck – Darmstadt, DE
Kanülen Sterican - 24Gx1“ / 27Gx3/4“	Braun – Melsungen, DE
Mikrotomklingen – S35	Feather – Osaka, Japan
Objektträger 26 x 76 x 1 mm	Menzel-Gläser - Braunschweig, DE
Parafilm 4“	Kobe – Marburg, DE
Petrischale 10x10cm	Bibby Sterilin – Stone, Staffordshire, UK
Pinsel Da Vinci 245* / 275*	Defet – Nürnberg, DE
Pipettenspitzen – 1µl bis 1000µl	Eppendorf – Hamburg, DE
Skalpell-Klingen Präzisa Fig.10	P.J. Dahlhausen & Co. GmbH – Köln, DE
Spritzen – 1ml / 10ml	Braun - Melsungen, DE
Sterilium classic pure	Bode – Marburg, DE
Tissue Freezing Medium	Jung – Nussloch, DE
Trockeneis	Apotheke Philipps-Universität – Marburg, DE
Wattestäbchen Rotilabo	Carl Roth & Co. KG - Karlsruhe, DE
Zellkulturplatte Costar 12-well	Corning – Corning, NY, USA
Zellkultursiebeinsätze Netwell 74µm	Corning – Corning, NY, USA
Zylindergefäße – 50ml bis 500ml	Schott – Mainz, Germany

2.2.4 Geräte

Tabelle 2.4 Übersicht über die verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller
Feinbohrschleifer Micromot 40/E	Proxxon - Föhren, DE
Konfokal-Laser-Scan Mikroskop LSM 510	Zeiss – Jena, DE
Kryostat CM3050 S	Leica – Wetzlar, DE
Lampe Flexilux 300 Longlife	Schölly Fiberoptic - Denzlingen, DE
Leuchttisch Copylizer eVision exe.cutive	Kaiser Fototechnik – Buchen, DE
Luxmeter MS-1500, digital	Voltcraft, Conrad Electronic SE – Hirschau, DE
Magnetrührer MR 3001	Heidolph – Schwabach, DE
Mikroskop-Digitalkamera CX9000	MicroBrightField Inc. - Williston, VT, USA
Mikroskop Leitz DMRB	Zeiss – Jena, DE
Mikroskop Microphot-FX	Nikon - Tokio, Japan
Micro-Injektions-Pumpe Ump2	World Precision Instruments – Sarasota, USA
Mikro-Injektions-Nadel Nanofil 33G	World Precision Instruments – Sarasota, USA
Mikro-Injektions-Spritze Nanofil 10ul	World Precision Instruments – Sarasota, USA
Objektiv Componon-S 2.8/50	Jos. Schneider Optische Werke – Bad Kreuznach, DE
Operationsbesteck	Braun – Melsungen, DE
Perfusionspumpe MasterFlex Pump Controller	Cole Parmer Instrument - Vernon Hills, IL, USA
pH-Meter Ultra basic UB 10	Denver Instrument – Bohemia, NY, USA
Pipetten – Multipette plus	Eppendorf – Hamburg, DE
Pipetten – Reference 5-20µl, 10-100µl, 200-1000µl	Eppendorf – Hamburg, DE
Plattformschüttler Unimax 1010, Polymax 2040	Heidolph – Schwabach, DE
Spiegelreflexkamera E330	Olympus - Shinjuku, Tokyo, Japan
Stereotaxie-Mikroskop Nikon SMZ-2T	Nikon - Nikkei, Japan

Stereotaxierahmen Lab Standard	Stoelting Co. - Wood Dale, IL, USA
Stereotaxic Single	
Stoppuhr	TFA Dostmann – Wertheim, DE
Vortex Genie 2	Bender & Hohlbein - Zürich, Schweiz
Analysewaage Kern 770	Kern & Sohn - Balingen, DE
Präzisionswaage 440-47N	Kern & Sohn - Balingen, DE
Wasserbad GFL 1083	Kobe – Marburg, DE
Videokamera TRV 30E	Sony – New York, USA

2.3 Methoden - Tierversuche

Die Tierversuche wurden von der zuständigen Tierschutzbehörde genehmigt (Regierungspräsidium Gießen, Ordnungsnummer 60/2010) und entsprechend der European Council Directive (2010/63/EU) in den Räumen des Biomedizinischen Forschungszentrums (BMFZ) in Marburg, DE, durchgeführt.

2.3.1 Versuchstiere

Für den Versuch wurden 50 adulte männliche Mäuse des Hintergrundes C57Bl/6 (Charles River, Sulzfeld, DE) verwendet. Sie wurden im Alter von 8-10 Wochen mit einem Ausgangsgewicht von 30-40g dem ersten Experiment, der stereotaktischen 6-OHDA-Injektion, unterzogen.

Die Mäuse wurden zu maximal 6 Tieren in Macrolonkäfigen Typ 2 (Firma Ehret GmbH - Emmendingen, DE) unter folgenden Standardbedingungen gehalten: Der Licht-/Dunkel-Zyklus lag bei 12/12 Stunden mit einer Lichtphase von 7.00 bis 19.00Uhr. Die Raumtemperatur betrug konstant 24°C und die Luftfeuchtigkeit 40-60%. Die Versuchstiere hatten ad libidum Zugang zu Futter und Wasser. Die Versorgung der Mäuse sowie die Reinigung der Käfige erfolgten nach Bedarf freundlicherweise durch die Tierpfleger des Tierstalls.

2.3.2 Stereotaktische 6-Hydroxydopamin-Läsion

Um unilateral ein dopaminerges Defizit im Striatum zu induzieren, wurden die Mäuse durch stereotaktische Injektion von 6-OHDA in das rechte MFB lädiert. 6-OHDA ist ein Nervengift, welches aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Dopamin via DAT in dopaminerge Zellen aufgenommen wird und dort zu oxidativem Stress und damit einhergehender Zellschädigung führt (Przedborski und Ischiropoulos, 2005).

Unmittelbar präoperativ wurde zum Schutz noradrenerger Neurone und Fasern der Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer Desipramin i.p. verabreicht (25mg pro kg Körpergewicht, gelöst als 2,5mg/ml in NaCl (0,25%)). Für den operativen Eingriff wurden die Tiere durch ein Gemisch von Ketamin (8ml/kg Körpergewicht) und Xylazin (2ml/kg Körpergewicht) durch i.p. Injektion analgosediert. Die Tiefe der Analgosedierung wurde anhand von Schmerzreflexen überprüft. Um das Austrocknen der Augen zu verhindern, wurden diese mit Bepanthen®-Salbe benetzt.

Hierauf wurden die Mäuse in einem stereotaktischen Operationsrahmen (Stoelting Co., Wood Dale, USA) fixiert, die Kopfhaut wurde desinfiziert und durch einen sagittalen Schnitt inzisiert. Unter Schonung der Dura wurde mithilfe eines Feinbohrers die Schädelkalotte trepaniert, sodass die 33G (=0,18mm) Injektionsnadel der NanoFil Spritze gezielt nach folgenden Koordinaten eingeführt werden konnte:

anterior-posterior	-0,82mm	relativ zu Bregma*
lateral	-1mm	relativ zu Bregma*
dorso-ventral	-4,8mm	relativ zur Dura*

* basierend auf dem Mausatlas von Paxinos und Franklin (2001)

Insgesamt wurden 2µl 6-OHDA (2µg/µl; mit 0,02% L-Ascorbinsäure als Anti-Oxidanz) mit einer Injektionsgeschwindigkeit von 200nl/min über zehn Minuten appliziert. Dieser kontrolliert langsame Injektionsfluss sollte einer Gewebeschädigung durch zu rasche Injektion entgegenwirken. Anschließend verblieb die Kanüle weitere fünf Minuten am Ort, bevor sie langsam zurückgezogen wurde. Die Wunde wurde in wenigen Stichen vernäht und mit Betaisodona®-Salbe versorgt. Die 6-OHDA-Lösung wurde während der Operationen abgedunkelt, auf Eis gelagert und spätestens nach drei Stunden frisch angesetzt.

Zur Prävention von postoperativer Dehydrierung und Unterkühlung erhielten die Mäuse unmittelbar nach der Operation 2ml 0,9% NaCl i.p. und wurden für eine Stunde unter einer Infrarotlampe gewärmt.

Postoperative Versorgung

In den ersten postoperativen Wochen leiden die Tiere infolge des plötzlichen unilateralen Dopaminverlustes unter ausgeprägten Dystonien, die eine suffiziente Flüssigkeits- und Nahrungsaufnahme erschweren und in massivem Gewichtsverlust und Dehydratation resultieren. Die postoperative Mortalität nach einer MFB-Läsion lag daher in vorherigen Publikationen bei rund 80% (Lundblad et al., 2004; Grealish et al., 2010). Um dieser hohen Mortalität im Vorfeld entgegenzuwirken, wurden die Tiere für zwei Wochen postoperativ intensiv beobachtet und gepflegt. In der ersten Woche postoperativ wurde ihr Futter zum Ausgleich der defizienten Nahrungsaufnahme 30 Minuten in Wasser eingeweicht und täglich frisch zur Verfügung gestellt. Um eine Konkurrenz um das Futter zu minimieren, wurden schwächere Mäuse in Käfigen mit vergleichbar schwachen Tieren gehalten. Außerdem erhielten die Tiere täglich subkutan (s.c.) Injektionen von 2ml (bei einem Gewicht <20g) bzw. 1ml (bei einem Gewicht >20g) 0,9% NaCl zur Aufrechterhaltung eines gesunden Flüssigkeitshaushalts. In der zweiten Woche postoperativ wurde nur noch den schwachen Mäusen mit einem Gewicht unter 25g jeweils 1ml 0,9% NaCl appliziert.

2.3.3 Zylindertest

Mithilfe des erstmals 1990 von Schallert und Lindner beschriebenen Zylindertestes lässt sich das Ausmaß von läSIONSbedingten Akinesien der vorderen Extremitäten ermitteln. Hierzu wurden die Tiere drei Wochen post operationem einzeln und ohne vorherige Gewöhnung solange in einem 10,5cm durchmessenden Becherglas platziert, bis 20 gewichtstragene Berührungen mit den Vorderpfoten der aufgerichteten Maus an der Glaswand des Becherglases ausgeführt wurden (Schallert und Tillerson, 1999; Kirik et al., 2000). Unterstützt von zwei vertikal hinter dem Becherglas aufgestellten Spiegeln, die eine 360° Ansicht aller Berührungen ermöglichten, wurde das Szenario mit einer digitalen Videokamera (Sony – New York, USA) zur späteren Auswertung aufgenommen. Bei Zeitlupenwiedergabe der Tapes wurde die Anzahl voller Berührungen der zur Läsion ipsi-

und kontralateralen Vorderpfoten ermittelt. Die Daten wurden angegeben als prozentuales Verhältnis der Berührungen der läSIONskontralateralen (linken) Pfote zur Gesamtzahl aller Vorderpfotenberührungen.

2.3.4 Amphetamin-induzierter Rotationstest im offenen Feld

Um zusätzlich die Qualität der unilateralen striatalen Dopaminverarmung zu überprüfen, wurde drei Wochen nach der 6-OHDA-Läsion der Amphetamin-induzierte Rotationstest im offenen Feld in Anlehnung an Ungerstedt and Arbuthnott (1970) durchgeführt. Der Versuch wurde bei 25-30Lux (Dämmerlicht) mit jeweils acht Tieren gleichzeitig umgesetzt. Hierzu wurde den Mäusen 5mg D-Amphetaminsulfat (gelöst zu 0,05% in 0,9% NaCl) pro kg Körpergewicht i.p. appliziert, bevor sie für 30 Minuten in 52x52cm große, von 40cm hohen Wänden begrenzte Arenen („offene Felder“) gesetzt wurden. Während dieser Zeit wurde die Aktivität der Tiere erfasst durch ein Videoaufspürsystem, welches mithilfe von Kameras und Infrarotsensoren die Position von Kopf, Körper und Schwanz der Mäuse detektieren kann. Mit der Software Viewer II (Biobserve, Bonn, DE) wurden volle Umdrehungen der Körperachse gemessen. Als Nettorotationswert wurde die Differenz aus der Anzahl ipsilateraler und kontralateraler Umdrehungen pro Minute ermittelt, wobei für Rotationen zur lädierten Seite positive Werte vergeben wurden.

2.3.5 L-DOPA-Behandlung

Sechs Wochen post operationem startete die pulsatile Behandlung von 18 Tieren mit L-DOPA für 15 Tage. L-DOPA (6mg/kg KG) und der periphere Dopa-Decarboxylase-Inhibitor Benserazid (12mg/kg KG) wurden unmittelbar vor Gebrauch in physiologischem NaCl gelöst und in einem Volumen von 0,1ml/10g KG einmal täglich subkutan (s.c.) appliziert. Diese Injektionsform wurde gewählt, da sie bei Nagetieren im Gegensatz zu i.p. Injektionen geringere interindividuelle Schwankungen der Plasmakonzentrationen hervorruft (Lindgren et al., 2007). Sechs Kontrolltiere wurden in gleicher Weise und mit entsprechender Menge täglich s.c. mit reinem 0,9% NaCl behandelt.

2.3.6 AIM-Scoring

An Tag eins, acht und 15 der Behandlungsphase wurden die AIMs der behandelten Mäuse anhand des L-DOPA-induzierten Dyskinesie-Tests bezüglich Subtypen, Frequenz und Amplitude klassifiziert. An den Testtagen wurden die Tiere mindestens zehn Minuten vor Medikamentenapplikation einzeln in einen transparenten, leeren Plastikkäfig (Macrolonkäfig Typ 2, Firma Ehret GmbH, Emmendingen, DE) gesetzt. Nach der Injektion von L-DOPA (Versuchstiere) bzw. NaCl (Kontrollen) wurde das motorische Verhalten über drei Stunden alle 20 Minuten jeweils eine Minute lang beobachtet, bis keine AIMs mehr verzeichnet werden konnten. Die Klassifizierung der unfreiwilligen Bewegungen orientierte sich an zuvor publizierten Skalen für Dyskinesien bei Ratten (Cenci et al., 1998; Lee et al., 2000; Lundblad et al., 2002), die geringfügig modifiziert wurden (Winkler et al., 2002; Carlsson et al., 2006). Demnach wurden die AIM in vier **charakteristische Subtypen** eingeteilt (s. Tabelle 2.5a und Abb. 3.5, S. 49): (1) Vorderpfotenbewegungen, (2) orolinguale, (3) axiale sowie (4) lokomotorische Bewegungen. Während die ersten beiden Typen vornehmlich Ausdruck hyperkinetischer Bewegungen sind und lokomotorische Bewegungen sich in exzessiven Rotationen kontralateral zur Läsionsseite manifestieren, ist die axiale Komponente meist von dystonischem Charakter. Nicht einbezogen in die Beurteilung der AIM wurden übermäßige Ausführungen normaler Verhaltensweisen wie Putzen, Nagen, Aufrichten und Schnuppern. Das **Ausmaß der Dyskinesien** wurde basierend auf der folgenden Skala zur Frequenz der AIM mit 0 bis 4 Punkten evaluiert (Tabelle 2.5b): (0) keine AIM (1) gelegentlich, <50% der Beobachtungszeit vorhanden; (1,5) häufig, während 50% der Beobachtungszeit vorhanden; (2) häufig, >50% der Beobachtungszeit vorhanden; (2,5) häufig, überwiegend vorhanden mit nur kurzen nicht-dyskinetischen Episoden; (3) kontinuierlich, aber durch starken sensorischen Stimulus wie plötzlicher Lärm oder Öffnen des Käfigdeckels zu unterbrechen; (3,5) kontinuierlich, aber inkonsistent durch starken sensorischen Stimulus zu unterbrechen; (4) kontinuierlich, nicht durch starken sensorischen Stimulus zu unterbrechen. Schließlich wurde noch die **Amplitude** von Vorderpfoten- und axialen Bewegungen mit 1 bis 4 Punkten gewichtet (Tabelle 2.5c). Die verwendeten Daten dieses Tests setzen sich zusammen aus der Summe der Vorderpfoten-, axialen und orolingualen AIM-Frequenzraten. Die lokomotorischen Bewegungen gelten als nicht spezifisch zur Klassifizierung der AIM (Lundblad et al., 2002) und wurden somit separat ausgewertet.

Tabelle 2.5 Klassifizierung Abnormer unfreiwilliger Bewegungen (AIM) in Mäusen: Subtypen und Skala des Schweregrads in Frequenz und Amplitude. In Anlehnung an Carlsson (2007).

a) AIMs:

Vorderglied	Bewegungen der vorderen Extremität oder Vorderpfote kontralateral zur Läsionsseite. Sie zeigen sich sowohl in sagittaler (Flexion-Extension) als auch frontaler Ebene (Abduktion-Adduktion). Pronation-Supination des Handgelenks sowie Öffnen/Schließen der Finger kann ebenfalls beobachtet werden. Die Bewegungen können ruckartige, choreiforme oder dystone Eigenschaften haben. (Vorderpfoten-AIMs sind überwiegend Ausdruck hyperkinetischer Bewegungen).
orolingual	Dieser Subtyp beinhaltet Kaubewegungen, Zungenprotrusionen und Gesichtsverziehungen. Die Bewegungen werden vorherrschend kontralateral zur Läsionsseite ausgeführt, haben aber bilateralen Charakter. Diese AIMs sind gewöhnlicherweise mit Beißen von Haut und Fell der läsionskontralateralen Vorderpfote assoziiert. (Orolinguale AIMs sind überwiegend Ausdruck hyperkinetischer Bewegungen).
axial	Laterale Deviation/Torsion von Kopf, Nacken und Körperstamm in Richtung kontralateral zur Läsion. Die Deviation ist meistens anhaltend, kann aber gelegentlich choreiformen Drehcharakter haben. (Axiale AIMs sind überwiegend Ausdruck Dystonie-ähnlicher Bewegungen).
lokomotorisch	Kreisende Bewegungen kontralateral zur Läsionsseite. Die lokomotorischen AIMs können als enge sowie weitere Rotationen zutage treten.

b) Frequenz-Skala

0	Keine.
1	Gelegentlich, weniger als 50% der Beobachtungszeit vorhanden
1.5	Häufig, zu 50% der Beobachtungszeit vorhanden
2	Häufig, über 50% der Beobachtungszeit vorhanden
2.5	Häufig, überwiegend vorhanden mit nur kurzen nicht-dyskinetischen Episoden
3	Kontinuierlich, aber durch starken sensorischen Stimulus zu unterbrechen
3.5	Kontinuierlich, aber inkonsistent durch starken sensorischen Stimulus zu unterbrechen
4	Kontinuierlich, nicht durch starken sensorischen Stimulus zu unterbrechen

c) Amplituden-Skala

Vorderglied

- 1 klopfende oder zarte oszillatorische Bewegungen der vorderen Extremität / Vorderpfote um einen fixierten Punkt
- 2 Bewegungen mit niedriger Amplitude, die eine milde Positionsänderung distaler und proximaler Muskeln hervorrufen
- 3 Positionsänderung des gesamten Vorderglieds mit sichtbarer Kontraktion der Schultermuskulatur
- 4 lebhafte (ballistische) Bewegungen von Vorderglied und Schulter mit maximaler Amplitude

Axial

- 1 Konsistente laterale Deviation in longitudinaler Axe, mit einem $\sim 30^\circ$ Winkel
- 2 Konsistente laterale Deviation in longitudinaler Axe, mit $30^\circ - 60^\circ$ Winkel
- 3 Konsistente laterale Deviation in longitudinaler Axe, mit $60^\circ - 90^\circ$ Winkel
- 5 Konsistente laterale Deviation in longitudinaler Axe, mit $>90^\circ$ Winkel, durch den das Tier das Gleichgewicht verliert

2.4 Histologische Methoden

2.4.1 Perfusions- und Immersionsfixierung sowie Gewebeaufbereitung

48 Stunden nach Durchführung des letzten Verhaltensexperimentes wurden die Gehirne vorbereitend für die Immunhistochemie perfusionsfixiert. Hierzu wurden die Tiere mit Pentobarbital (Release®) in einer Dosis von 100mg/kg Körpergewicht (gelöst zu 3% in 0,9% NaCl) tief anästhesiert. Die Narkosetiefe, Schmerzfreiheit und Relaxierung wurde durch Ausbleiben der Schmerzreflexe kontrolliert. Nach Sternotomie und Abklemmung der Aorta descendens wurden die Mäuse zuerst mit 50ml physiologischer Kochsalzlösung (Raumtemperatur) und anschließend mit 150ml 4°C-kaltem 4% PFA (gelöst in 0,1M PB

mit pH 7,4) bei einer Flussrate von 15ml/min transkardial perfundiert. Das 0,9% NaCl dient der Ausschwemmung des Blutes, woraufhin PFA die Gewebefixierung herbeiführt. Eine erfolgreiche Fixierung des Tieres während der Perfusion ließ sich bereits dadurch erahnen, dass die oberen Extremitäten sowie der Schwanz des Tieres sich streckten. Nach der Perfusion wurden die Gehirne vorsichtig aus der Schädelkalotte herauspräpariert und für 24h in 4% PFA nachfixiert. Zu diesem Zeitpunkt waren die Gehirne auf den Gefäßboden abgesunken, was eine vollständige Nachfixierung indizierte. Anschließend wurden sie für 48h in 25% Sucrose (in 0,1M PB) dem Prinzip der Osmose ausgesetzt, um beim späteren Einfrieren irreversible Zellschädigungen zu verhindern, die aus einer Expansion der physiologischerweise flüssigkeitsgefüllten Zellen durch Kristallbildung resultieren würden. Die Gehirne wurden in pulverisiertem Trockeneis gefroren und bei -22°C im Kryostat koronar in zehn Serien zu einer Schichtdicke von 30µm geschnitten. Die Schnitte wurden bis zur immunhistochemischen Färbung in einer Gefrierschutzlösung (Antifreeze) in zwei Tubes pro Serie bei -20°C gelagert.

2.4.2 Immunhistochemie

Zur immunhistochemischen Detektion der Zielantigene wurden die in Tabelle 2.6 aufgelisteten primären Antikörper (AK) verwendet. Diese binden an ein (monoklonaler AK) oder mehrere (polyklonaler AK) Epitope des darzustellenden Antigens. Die Visualisierung der gewebegebundenen Antikörper erfolgte entweder über einen enzymatischen Nachweis mithilfe von biotinylierten Sekundärantikörpern, Avidin-Biotin-Peroxidasen (Hsu et al., 1981), DAB und ggf. Nickel, oder durch die Verwendung der Fluorochrome Cy3 (rote Fluoreszenz) oder Alexa 488 (grüne Fluoreszenz), die direkt an den Sekundärantikörper gekoppelt waren (Tabelle 2.6).

Tabelle 2.6 Verwendete primäre und sekundäre Antikörper.

Primärantikörper	Spezies	Verdün- nung	Hersteller
Anti-Tyrosin-Hydroxylase IgG	Schaf, p	1:500	Millipore - Billerica, MA, USA
Anti-Tyrosin-Hydroxylase IgG	Kaninchen, p	1:1000	Millipore - Billerica, MA, USA
Anti- Δ FosB	Kaninchen, p	1:2000	Santa Cruz - California, USA
Anti-NeuN IgG (MsX NeuN)	Maus, m	1:1000	Millipore - Billerica, MA, USA
Anti-5-HT-Transporter IgG	Kaninchen, p	1:2000	Immunostar - Hudson, USA
Sekundärantikörper	Donor-spezies	Verdün- nung	Hersteller
Biotinylierter Anti-Ziege IgG	Esel	1:200	Dianova - Hamburg, DE
Biotinylierter Anti-Kaninchen IgG	Esel	1:500	Jackson ImmunoResearch - West Grove, USA
Anti-Kaninchen IgG Alexa-488-gekoppelt	Ziege	1:400	Invitrogen GmbH - Karlsruhe, DE
Anti-Maus IgG Cy-3-gekoppelt	Esel	1:500	Dianova - Hamburg, DE

Abkürzungen: p = polyklonal; m = monoklonal

2.4.2.1 Einfache enzymatische DAB-IHC

Im Allgemeinen erfolgte das Färbeverfahren in 12-Well-Zellkulturschalen mit Netzeinsätzen unter ständigem Schütteln. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt. Zu Beginn und nach jedem Inkubationsschritt wurden die Schnitte dreimal zehn Minuten in 0,1M PB gewaschen. Die Inkubationen wurden wie folgt ausgeführt:

Inhibition der endogenen Peroxidase	0,1M PB 10% Methanol 3% H ₂ O ₂	30min
Präinkubation: Blockierung und Membranpermeabilisierung	0,1M PB 5% Normalserum 0,3% Triton X 100	1h
Inkubation des Primär-AK bei 4°C	0,1M PB 5% Normalserum Primärantikörper	24 / 48h
Inkubation des Sekundär-AK	0,1M PB 2% Normalserum Sekundärantikörper	1h
Amplifikation	0,1M PB 2% Normalserum ABC-Kit (1:500)	1h
DAB-(Nickel-)Färbereaktion	0,1M PB 0,06% DAB (6mg/ml) 0,38% Nickel (3,75mg/ml) 0,75% H ₂ O ₂	5min

Das ABC-Kit (Vector – Burlingame, CA, USA) besteht aus Avidin und biotinylierter Peroxidase, was als Avidin-Biotin-Enzymkomplex an den biotinylierten Sekundärantikörper bindet und so eine kaskadenartige Signalverstärkung herbeiführt. Für die DAB-Nickel-Färbereaktion wurden chromogenes DAB und ggf. farbintensivierendes Nickel-Ammoniumsulfat in 0,1M PB gelöst, die Mischung wurde filtriert und zum Start der Reaktion H_2O_2 zugefügt. Nach fünf Minuten kräftigen Schüttelns wurde die Färbereaktion durch drei weitere Waschungen in 0,1M PB gestoppt. Anschließend wurden die gefärbten Schnitte auf gelatinierte Objektträger gezogen, über Nacht bei Raumtemperatur vorgetrocknet, in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 80%, 96%; je 10min) und Xylol (2x10min) entwässert und schließlich in Corbit eingedeckt. Eine erfolgreiche DAB-Immunhistochemie führte zu einer Braunfärbung und die zusätzliche Nickel-Zugabe bewirkte eine dunkelblau-schwarze Färbung der Zielstrukturen.

Im Einzelnen zeichnen sich die drei durchgeführten Proteinfärbungen durch folgende Kriterien aus:

1. *TH-Färbung*

Das Enzym TH hydroxyliert die Aminosäure Tyrosin zu L-DOPA, welches nachfolgend von der AADC zu Dopamin decarboxyliert werden kann. Somit ist TH spezifisch für monoaminerge Zellen. Als Primärantikörper wurde das Schaf anti-TH IgG in einer Konzentration von 1:500 bei einer Inkubationszeit von 48h verwendet. Als Sekundärantikörper diente das biotinylierte anti-Ziege IgG in einer Konzentration von 1:200. Dieser bindet auch an einen primären Schaf-Antikörper. Zur Farbintensivierung wurde Nickel-Ammoniumsulfat eingesetzt. Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, wurde außerdem normales Pferdeserum (NHS, engl.: Normal Horse Serum) nach dem obigen Protokoll verwendet.

2. *Δ FosB-Färbung*

Das Protein Δ FosB ist Bestandteil des nukleären Transkriptionsfaktor-Komplexes AP1. Damit dient es im Allgemeinen als Marker für Zellproliferation, -differenzierung und -transformation, im Speziellen als molekularer Marker für Dyskinesien. Als Primärantikörper wurde das Kaninchen anti- Δ FosB IgG in einer Konzentration von 1:2000 verwendet und über Nacht inkubiert. Als Sekundärantikörper diente das biotinylierte anti-Kaninchen IgG in einer Konzentration von 1:500. Zur Farbintensivierung wurde

Nickel-Ammoniumsulfat eingesetzt. Für die Blockierungsreaktion wurde weiterhin normales Eselserum (NDS, engl.: Normal Donkey Serum) beigefügt. Die Waschungen erfolgten jeweils mit 0,3% Triton/0,1M PB, um eine optimale Membranpermeabilität von Zelle und Zellkern zu gewährleisten.

3. SERT-Färbung

Der Serotonin-Transporter (SERT) ist ein Transmembranprotein, das die Wiederaufnahme von Serotonin, und in geringerem Ausmaß auch Dopamin, aus dem synaptischen Spalt in das Neuron und in seine Fortsätze bewirkt. Aufgrund seiner axonalen Lokalisation kann es zur spezifischen immunhistochemischen Visualisierung serotonerger Fasern in Zielgebieten genutzt werden. Als Primärantikörper wurde das Kaninchen anti-5-HT Transporter IgG in einer Konzentration von 1:2000 verwendet und über Nacht inkubiert. Als Sekundärantikörper diente das biotinylierte anti-Kaninchen IgG in einer Konzentration von 1:500. Auf den Einsatz von Nickel-Ammoniumsulfat wurde verzichtet. Für die Blockierungsreaktion wurde normales Eselserum beigefügt.

2.4.2.2 Doppelte Fluoreszenz-IHC

Um nachzuweisen, dass es sich bei den TH-gefärbten Zellen im Striatum um Neurone handelt, wurde eine doppelte Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung von TH und NeuN durchgeführt. NeuN steht für Neuronal Nuclei und ist ein an diesem Ort exprimiertes neuronenspezifisches Protein. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Schritte bei Raumtemperatur mit Waschungen à dreimal zehn Minuten zu Beginn sowie nach jedem Inkubationsschritt durchgeführt. Um eine optimale Membranpermeabilität auch der Zellkerne zu gewährleisten, wurde von der Präinkubation bis zur Inkubation des Sekundär-AK in die Waschlösung 0,3% Triton X 100 zugegeben. Die einzelnen Inkubationsschritte wurden nach dem folgenden Protokoll umgesetzt:

Präinkubation:	0,1M PB	1h
Blockierung und	0,3% Triton X 100	
Membranpermeabilisierung	5% NGS	

Inkubation der Primär-AKs bei 4°C	0,1M PB 0,3% Triton X 100 5% NGS Kaninchen anti-TH (1:1000) Maus anti-NeuN (1:1000)	24h
Inkubation der Sekundär-AKs abgedunkelt	0,1M PB 0,3% Triton X 100 5% NGS Alexa-488 Ziege anti-Kaninchen (1:400) Cy-3 Esel anti-Maus (1:500)	2h

Die gefärbten Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und nach leichtem Antrocknen ohne Alkoholreihe in Polyvinyl-Alkohol-Medium eingedeckt.

2.4.3 Auswertung der Histologie

2.4.3.1 Quantifizierung von Zellen – Stereologie und ImageJ

Stereologie

Die TH-positiven Zellkörper wurden an dem Lichtmikroskop Mikrophot-FX (Nikon, Tokyo, Japan) unter Verwendung der computergestützten Stereologie-Software Stereoinvestigator 8.10.2 (MicroBrightField, Williston, USA) gezählt. Diese Kombination von Mikroskop, Videokamera (CX9000 MicroBrightField, Williston, USA) und Computer ermöglichte es, über einen Joy Stick (99S100 Ludl Electronics, Hawthorne, USA) unmittelbar im mikroskopischen Bild histologische Strukturen virtuell nachzuzeichnen und zu markieren. Die Ermittlung der Zellzahl beruhte auf dem von West (1999) beschriebenen Prinzip der optischen Fraktionierung.

Bei einer niedrigen (4x) Vergrößerung wurden in Anlehnung an den Mausatlas von Paxinos und Franklin (2001) die zu analysierenden Regionen als Zählbereich gekennzeichnet. Innerhalb dieses Bereiches bewegt sich der quadratische Zählrahmen, in welchem die Neurone bei höherer (20x1,6) Vergrößerung gezählt wurden. Das Größenverhältnis von

Zählrahmen zur Gesamtregion wurde so gewählt, dass mindestens 100 Zellen in derselben Region pro Seite und Gehirn markiert wurden. Die Kriterien, um als TH-positive Zelle gezählt zu werden, waren (1.) deutliche Abhebung vom Hintergrund durch dunkelbraune (DAB) bis schwarze (DAB+Nickel) Anfärbung, (2.) rundliches bis polygonales Soma mit großem, helleren Nucleus und schmalen Zytoplasma, (3.) Abgänge von Dendriten oder Axons, (4.) Vorkommen innerhalb des Zählrahmens oder die obere/rechte Rahmenlinie berührend, nicht aber die linke/untere Rahmenbegrenzung.

Die Quantifizierung TH-positiver Zellen wurde für die Regionen SNpc, VTA, Striatum, Ncl. accumbens und Cortex durchgeführt. Die Tabelle der Appendix (S. 98) gibt einen Überblick über Anzahl und Periode der ausgezählten Schnitte, anatomische Begrenzungen des Zählbereichs sowie Software-Konfigurationen, die für die Auswertung der jeweiligen Region verwendet wurden. SNpc und VTA wurden bilateral in voller rostrokaudaler Ausdehnung in jedem 5. Schnitt (alle 150µm) mit einer Fraktion, sprich mit einem Anteil des Zählrahmens am Zählrahmen, von 25% ausgezählt.

Die Auszählung TH-positiver Neurone in Striatum und Ncl. accumbens wurde hingegen ausschließlich auf der Läsionsseite durchgeführt, da die starke TH-positive Faserdichte in der intakten Kontrollseite sämtliche TH-positive Zellkörper überdeckte und somit eine verlässliche Quantifizierung TH-positiver Neurone unmöglich machte.

Für die Auszählung des lädierten Striatums wurden sieben Schnitte an genau definierten Koronarebenen zwischen +1,1mm und -0,7mm relativ zu Bregma im Abstand von 300µm ausgewählt (vgl. Abb. 2.2). Die Striata der Schnitte 1-5 wurden in vier Subregionen unterteilt: dorsomedial (DM), dorsolateral (DL), ventromedial (VM) und ventrolateral (VM). Schnitt 6 wurde in einen lateralen und einen medialen Part gegliedert und der siebte Schnitt als Ganzes ausgezählt. Zusätzlich wurde beim Striatum zwischen dessen Schwanz (+1,1mm bis +0,2mm relativ zu Bregma) und Schweif (-0,1mm bis -0,7mm relativ zu Bregma) unterschieden.

Auf denselben Schnittebenen 1-4 (+1,1mm bis +0,2mm relativ zu Bregma) wurde der lädierte Ncl. accumbens als Ganzes ausgewertet; auf den Schnittebenen 2-6 (+0,8mm bis -0,4mm relativ zu Bregma) bilateral der gesamte Cortex (Abb. 2.2). Sowohl die striatalen Subregionen und der Ncl. accumbens als auch der Cortex wurden mit einer Fraktion von 100% und somit vollständig ausgezählt. Um eine optimale Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die Schnittebenen und die Einteilung von Striatum, Ncl. accumbens und Cortex einheitlich für alle entsprechenden Zellzählungen (TH, ΔFosB) und

Dichtemessungen (TH, SERT) dieser Regionen verwendet. Die Auswertung fand grundsätzlich verblindet statt. Die erhaltenen Daten wurden als absolute Zellzahlen angegeben.

ImageJ

Als weitere Quantifizierungsmethode angefärbter Zellen wurden die Hirnschnitte auf einem Leuchttisch platziert, mit einer Spiegelreflexkamera (Olympus E330, Shinjuku, Tokyo, Japan) deren lädierte Striata abfotografiert und mit der Software Image J 1.43 (National Institute of Health, Bethesda, USA, 2007; kostenloser Download unter <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) am Computer ausgezählt. Mit diesem Verfahren wurden Δ FosB-markierte Zellkerne und somit Zellen unilateral in Striatum und Ncl. accumbens der lädierten Seite gezählt. Die Anzahl der Schnitte, Auswahl der Schnittebenen sowie die Einteilung in die Subregionen erfolgten gemäß der oben beschriebenen einheitlichen Charakteristika für die quantitative Auswertung von Striatum und Ncl. accumbens (s. Abb. 2.2). Die erhaltenen Daten wurden als absolute Zellzahlen angegeben.

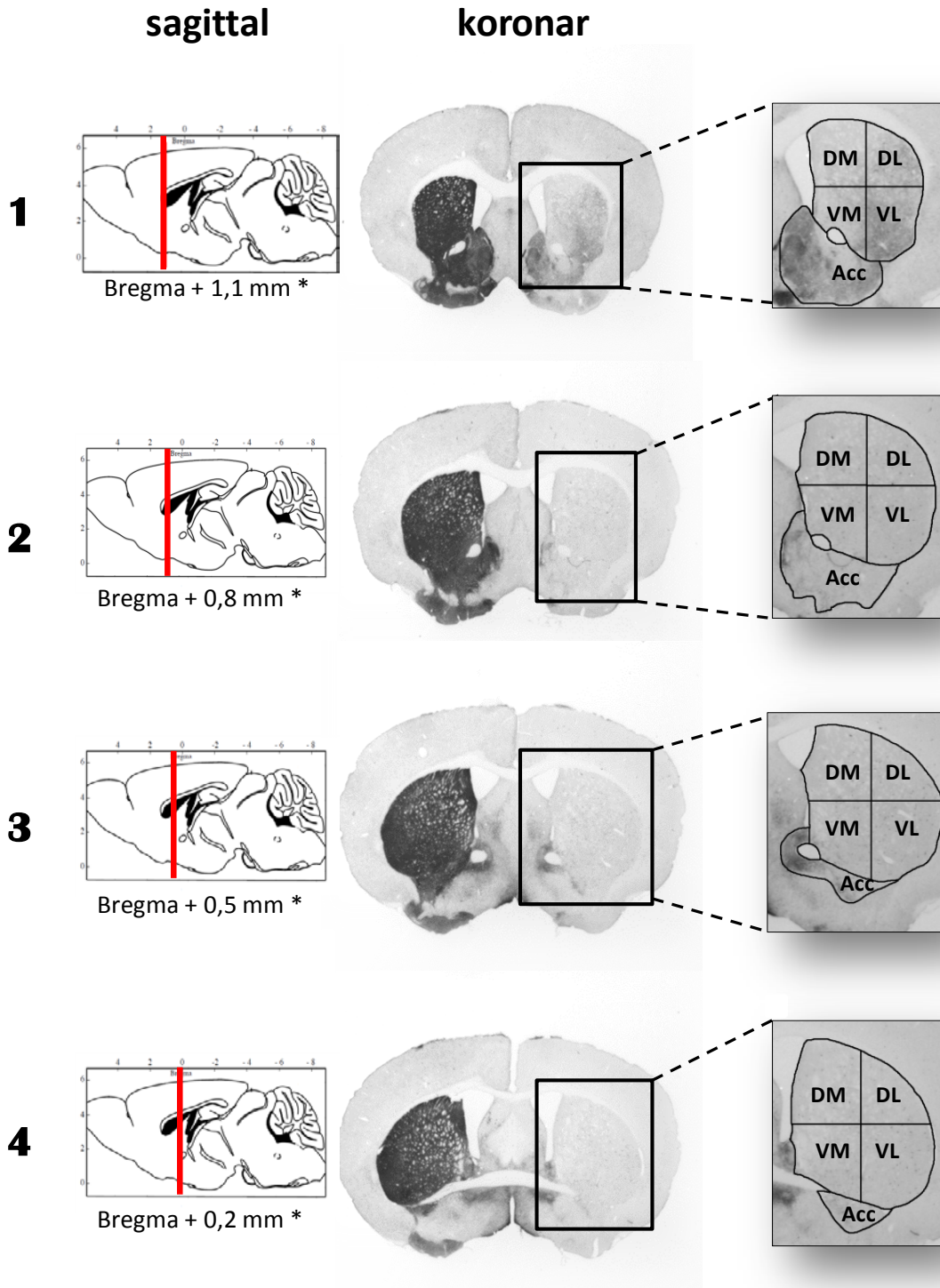


Abb. 2.2 Darstellung der sieben fest definierten Schnittebenen und Subregionen des Corpus striatum am Beispiel TH-gefärbter Hirnschnitte.

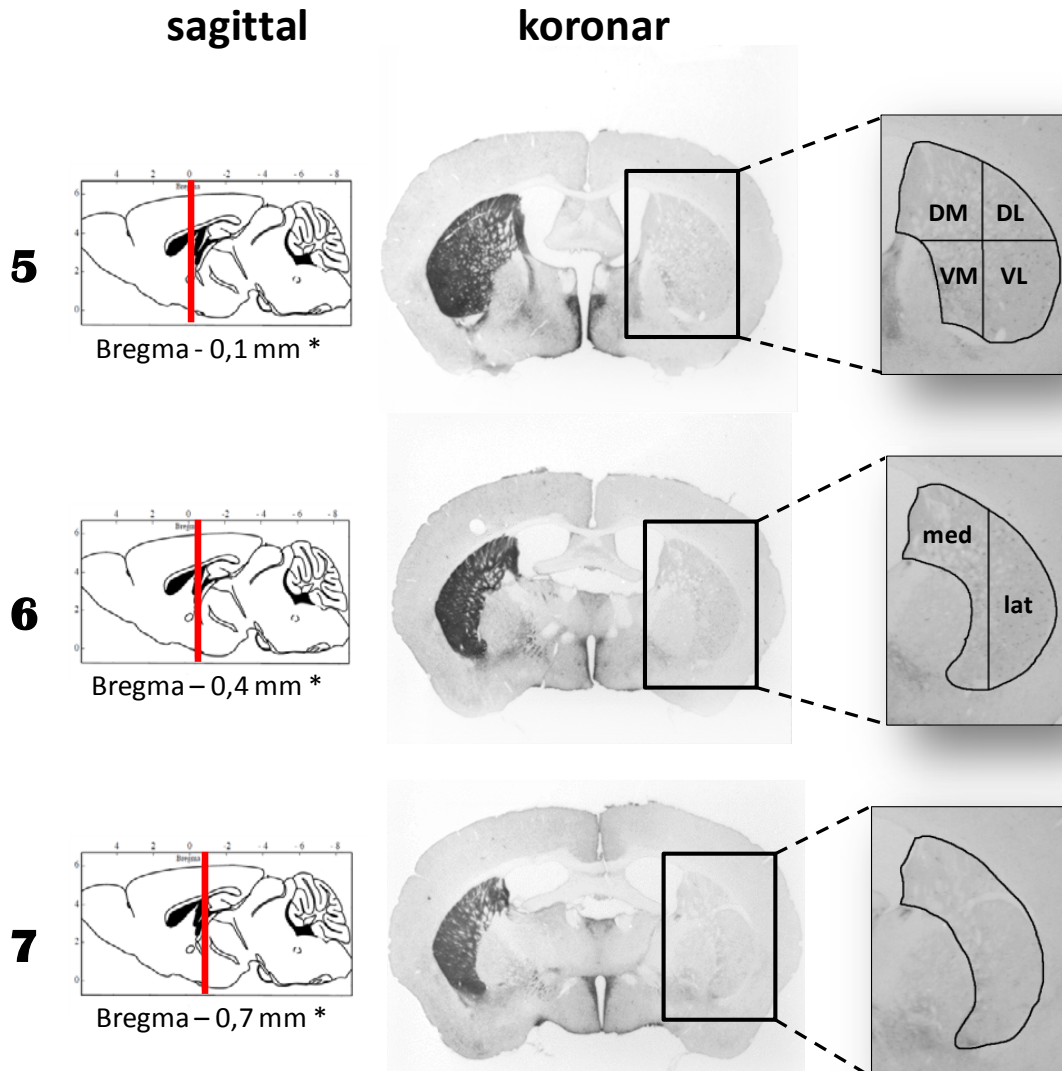


Abb. 2.2 (Fortsetzung) Auf Basis dieses Standards wurden Zellzahlen (TH-positiv, Δ FosB-positiv) und Optische Dichte (TH-positiv, SERT-positiv) in Corpus striatum und Nucleus accumbens bestimmt. Zur Auswahl sieben einheitlicher Schnittebenen dienten die oben definierten Abstände zu Bregma* an folgenden anatomischen Landmarken: 1: CC beider Hemisphären gerade fusioniert und kantig auf Septumhöhe; 2: CC-Form septumnah abgerundet; 3: CC verschmälert sich, CA liegen medial auf Höhe der Seitenventrikel, ohne sich zu treffen; 4: Längsanschnitt der hemisphären-kreuzenden CA; 5: Auftauchen des GPL ventromedial des Striatums, Seitenventrikel sind über den dritten Ventrikel verbunden; 6: FI erweitern sich nach lateral; 7: FI trennen den V3 von Seitenventrikel. *Abkürzungen:* CA: Comissura anterior, CC: Corpus callosum, DL: dorsolateral, DM: dorsomedial, FI: Fimbrien des Hippocampus, GPL: lateraler Globus pallidus, V3: dritter Ventrikel, VL: ventrolateral, VM: ventromedial. * in Anlehnung an Paxinos und Franklin (2001).

2.4.3.2 Phänotypisierung von Zellen - Immunfluoreszenzmikroskopie

Um sicherzustellen, dass es sich bei den TH-positiven Zellen in Striatum, Ncl. accumbens und Cortex um Neurone handelt, wurden die doppelt TH/NeuN immunfluoreszent gefärbten Hirnschnitte am konfokalen Laserscanmikroskop LSM 510 (Zeiss - Jena, DE) nach zellulären Koexpressionen dieser beiden Proteine untersucht. Die konfokale Mikroskopie ermöglicht es, nur jeweils eine Schichtaufnahme anzufertigen und Signale außerhalb der Fokusebene auszublenden. Dies ergibt nicht nur eine optimale Tiefenschärfe, sondern zudem die Möglichkeit, rechnergestützt dreidimensionale Rekonstruktionen durch Schichtung dieser Aufnahmen zu entwickeln.

Für diese qualitative Auswertung der striatalen Zellen wurde in 7 Hirnschnitten von +1,1mm bis -0,7mm relativ zu Bregma ein jeweils 0,2mm² großes Areal lateral des Seitenventrikels ausgewählt. Innerhalb dieses Areals wurden mit dem 40x Objektiv alle grün fluoreszierenden TH-positiven Zellen auf eine Koexpression des rot fluoreszierenden NeuN-Proteins untersucht. Diese Koexpression gilt als Beweis für den neuronalen Phänotyp TH-positiver Zellen. Gleiches geschah in einem Areal derselben Größe für den Ncl. accumbens ventral des Striatums an vier Schnitten von Bregma +1,1mm bis +0,2mm sowie für den Cortex septal an fünf Schnitten zwischen Bregma +0,8mm und -0,4mm. Exemplarisch geschossene Bilder wurden mit dem LMS Image Browser V420.2.0.121 (Zeiss, Jena, DE) nachbearbeitet.

2.4.3.3 Quantifizierung der Faserinnervation – Optische Dichte

Zur bilateralen Quantifizierung der Faserinnervation TH-positiver und serotonerger Fasern in Striatum und Ncl. accumbens sowie TH-positiver Fasern im Cortex wurde die optische Dichte der entsprechend immunhistochemisch angefärbten Regionen bestimmt. Hierzu wurden wie oben beschrieben Fotos der Hirne gemacht und mit einem Bildbearbeitungsprogramm (Microsoft Office Picture Manager 12.0.6413.1000, 2006, Microsoft Corporation) in den Graustufenmodus prozessiert. Die jeweiligen Ebenen der Hirnschnitte wurden identisch zu den quantitativen Zellauswertungen relativ zu Bregma gewählt (vgl. Abb. 2.2):

- (1) Für das Striatum sieben Schnitte von +1,1mm bis -0,7mm.
- (2) Für den Ncl. accumbens vier Schnitte von +1,1mm bis +0,2mm .

(3) Für den Cortex fünf Schnitte von +0,8mm bis -0,4mm.

Mithilfe der Software Image J wurde beidseits jeweils die gesamte Interessensregion markiert und dessen mittlere optische Dichte (OD) in Pixeln bestimmt. Unspezifische Hintergrundanfärbung wurde durch Subtraktion der OD des unspezifisch farbbindenden Corpus Callosum relativiert. Die Faserinnervation wurde angegeben als prozentualer Anteil der optischen Dichte der lädierten zur intakten Seite.

2.5 Statistische Methoden

Bei allen durchgeführten Versuchen wurde zur Analyse von Gruppenunterschieden eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA, engl.: analysis of variances), gefolgt von einem Student-Newman-Keuls Post-hoc Test durchgeführt. Lineare Regressionsanalysen dienten der Bestimmung von Korrelationen. Als statistisch signifikant wurde $p < 0,05$ behandelt. Die Darstellung aller Daten erfolgt als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM, engl.: standard error of the mean). Die graphische Darstellung der statistischen Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism Version 5.0 (GraphPad Software Inc. - La Jolla, CA, USA) ausgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Effekte der 6-OHDA-Läsion

Um unilateral ein dauerhaftes, ausgedehntes dopaminerges Defizit im Striatum wie im Spätstadium beim IPS zu induzieren, wurde stereotaktisch 6-OHDA in das MFB injiziert. Zur Untersuchung der Auswirkungen dieser 6-OHDA-Injektion auf das motorische Verhalten und auf neurochemische Veränderungen, wurden die Mäuse im Zylindertest und im Amphetamin-induzierten Rotationstest in ihrem Verhalten beobachtet. Zum anderen wurden deren Gehirne immunhistochemisch auf den Läsionsgrad dopaminergener Neurone hin analysiert in Bezug auf TH-positive Zellkörper in SNpc und VTA sowie TH-positive axonale Fasern in Striatum, sowie in Ncl. accumbens und Cortex. Zusätzlich wurden die striatalen serotonergen Fasern quantifiziert.

3.1.1 Postoperativer Verlauf

Zur postoperativen Kontrolle der stereotaktischen 6-OHDA-Injektion in das MFB als hier angewandte Methodik wurde die postoperative Sterblichkeit erfasst. Mit 38 überlebenden von 50 operierten Tieren ergab sich eine Mortalitätsrate von 24%. Hiervon starben drei Viertel in der ersten Woche und ein Viertel in der zweiten Woche post operationem.

3.1.2 Zylindertest

Zur Abschätzung des unilateralen Läsionsgrades und als Basis für die Versuchsgruppeneinteilung wurde die Einschränkung der spontanen Vorderpfotenbenutzung drei Wochen postoperativ anhand des Zylindertests bewertet (s. Abb. 3.1A). Hierbei zeigten sich klare motorische Defizite, die sich durch deutlich weniger Berührungen der Becherglaswand mit der linken, zur Hirnläsionsseite kontralateralen Pfote im Vergleich zur rechten intakten Pfote ausdrückten ($35,2 \pm 2,9\%$ Berührungen der linken Pfote von allen Berührungen). Hierauf basierend wurden die 24 motorisch bestlädierten Tiere für das

Experiment ausgewählt, die nun durchschnittlich $18,1 \pm 2,2\%$ Berührungen der lädierten Pfote von allen Berührungen aufwiesen. Es ist hervorzuheben, dass sich die zwei Behandlungsgruppen in ihrem motorischen Verhalten im Zylindertest nicht wesentlich unterschieden ($19,9 \pm 3,3\%$ L-DOPA-Gruppe vs. $15,8 \pm 3,7\%$ NaCl-Gruppe).

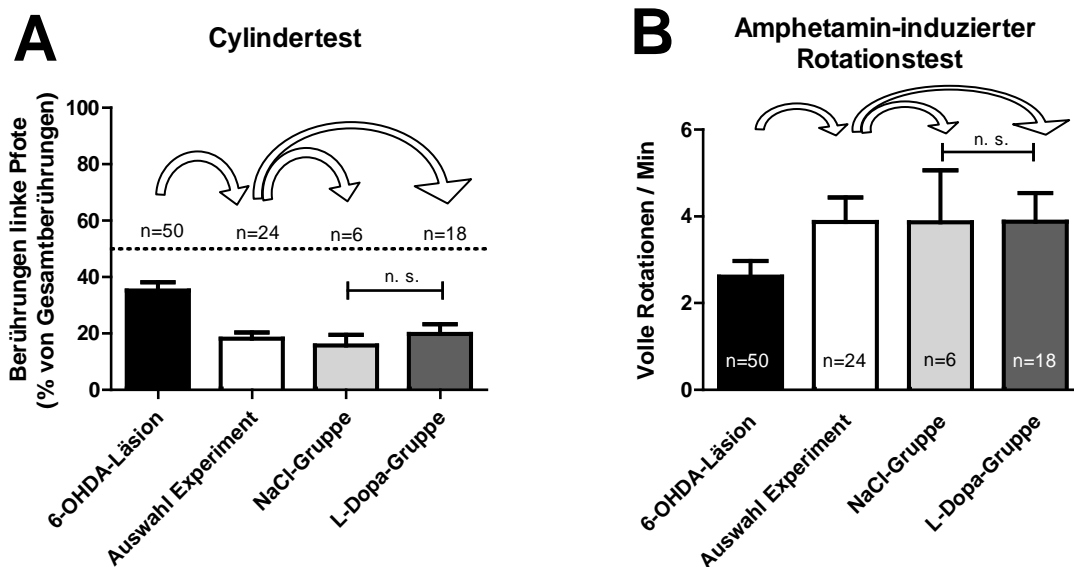


Abb. 3.1 Effekt der unilateralen 6-OHDA-Läsion auf das motorische Verhalten der Mäuse und die darauf basierende Auswahl der Versuchstiere. (A) Spontangebrauch der Vorderpfoten im Zylindertest. Die Daten sind angegeben als prozentuales Verhältnis der Berührungen der lädierten (linken) Pfote zur Gesamtzahl aller Vorderpfotenberührungen an der Becherglaswand. Die gestrichelte Linie (bei 50%) repräsentiert die symmetrische Vorderpfotenbenutzung wie bei gesunden Mäusen. Die weißen Pfeile verbildlichen die Auswahl der ins Experiment eingeschlossenen Mäuse und deren Gruppeneinteilung. (B) Anzahl voller Rotationen pro Minute zur lädierten Seite im offenen Feld nach i. p. Applikation von 5mg/kg KG Amphetamin. Die unilaterale, rechtsseitige 6-OHDA-Läsion des MFB führte zu einer ausgeprägten Reduktion von Becherglasberührungen der linken Pfote sowie zu vermehrten Rotationen zur lädierten Hemisphärenseite.

3.1.3 Amphetamin-induzierter Rotationstest im offenen Feld

Zur Validierung der im Zylindertest erhobenen Daten zum Läsionsgrad infolge der 6-OHDA-Injektion wurden drei Wochen postoperativ im Amphetamin-induzierten Rotationstest im offenen Feld volle Rotationen nach rechts, zur lädierten Hemisphärenseite hin, ausgezählt (s. Abb. 3.1B). Alle operierten Mäuse wiesen durchschnittlich $2,6 \pm 0,4$ Nettorotationen pro Minute zur lädierten Seite als Zeichen motorischer Einschränkungen auf, wovon die 24 bestlädierten Tiere mit viermal mehr Rotationen zur lädierten als zur

intakten Seite für das Experiment ausgewählt wurden ($3,9 \pm 0,6$ Nettorotationen/Min nach rechts). Die beiden Behandlungsgruppen wiesen diesbezüglich vergleichbare Mittelwerte auf ($3,9 \pm 0,7$ Rot/min L-DOPA-Gruppe vs. $3,9 \pm 1,2$ Rot/min NaCl-Gruppe)

3.1.4 Untergang dopaminergener Neurone

Um die durch die MFB-Läsion bedingte retrograde Degeneration der dopaminergen Neurone in der SNpc und VTA quantitativ zu beurteilen, wurden die Mittelhirnschnitte immunhistochemisch gegen TH gefärbt. Demzufolge führte die Injektion von 6-OHDA in das MFB bei 92% der Mäuse zu einer suffizienten, den Einschlusskriterien des Experiments entsprechenden Degeneration der dopaminergen Neurone. Diese präsentierte sich zum einen durch den Untergang der TH-positiven Zellkörper in SNpc (<25% intakt) und VTA, zum anderen durch den Verlust der ascendierenden Fasern in Striatum (<25% intakt), Ncl. accumbens und Cortex. Dies entspricht einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium bei Parkinson-Patienten. Lediglich zwei Tiere, ein L-DOPA-behandeltes Tier und ein Kontrolltier, mussten aufgrund einer zu schlechten Läsion aus den Analysen ausgeschlossen werden. Die restlichen Mäuserne zeigten folgende Läsionscharakteristika:

3.1.4.1 TH-positive Zellkörper im Mittelhirn: SNpc und VTA

Die lädierte SNpc zeigte mikroskopisch einen ausgeprägten Untergang TH-positiver Zellkörper auf $14,8 \pm 1,0\%$ der Zellzahl der intakten Seite (s. Abb. 3.2E+F und Abb. 3.3A). Hierbei fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen ($14,5 \pm 1,2\%$ L-DOPA-Gruppe vs. $15,5 \pm 2,3\%$ NaCl-Gruppe), die L-DOPA-Behandlung hatte somit keinen toxischen oder regenerativen Effekt auf die TH-positiven Neurone der SNpc.

In der VTA stellte sich auf der lädierten Seite ein Absterben der TH-positiven Zellen auf etwa die Hälfte der Zellzahl der intakten Hemisphäre dar ($48,7 \pm 1,9\%$) (s. Abb. 3.2E+F und Abb. 3.3A). Auch dieses Läsionsausmaß war in beiden Behandlungsgruppen vergleichbar stark ausgeprägt ($50,1 \pm 2,2\%$ L-DOPA-Gruppe vs. $44,0 \pm 3,8\%$ NaCl-Gruppe), sodass sich infolge der L-DOPA-Applikation keine weitere schädliche oder wachstumsfördernde Wirkung auf die TH-positiven Neurone in der VTA nachweisen ließ.

3.1.4.2 TH-positive Fasern in Striatum, Ncl. accumbens und Cortex

Dem Untergang der Zellkörper entsprechend führte die 6-OHDA-Läsion zu einer enormen Abnahme der Dichte TH-positiver Fasern im Striatum und, in leichterer Ausprägung, in Ncl. accumbens und Cortex. Die striatale Faserdichte der lädierten Seite reduzierte sich entscheidend um fast 90% auf $12,2 \pm 1,0\%$ (s. Abb. 3.2A-D und Abb. 3.3B), ohne dass sich die Behandlungsgruppen diesbezüglich signifikant unterschieden ($12,7 \pm 1,1\%$ L-DOPA-Gruppe vs. $10,3 \pm 2,3\%$ NaCl-Gruppe).

Im lädierten Ncl. accumbens war eine TH-Faser-Degeneration von über zwei Dritteln auf $28,6 \pm 2,3\%$ der Fasern der intakten Seite zu erkennen (s. Abb. 3.2A+B und Abb. 3.3B). Dieses Läsionsausmaß präsentierte sich wieder in beiden Behandlungsgruppen gleichermaßen ($28,8 \pm 2,6\%$ L-DOPA-Gruppe vs. $27,8 \pm 6,3\%$ NaCl-Gruppe).

Im Cortex, von dem in rostrokaudaler Ausdehnung der Bereich um das Striatum ausgewertet wurde, zeigte sich nach der 6-OHDA-Injektion lediglich eine mäßiggradige Reduktion TH-positiver Fasern auf $63,8 \pm 3,2\%$ der Faserdichte der intakten Hemisphäre (s. Abb. 3.2G+H und Abb. 3.3B). Wieder sei erwähnt, dass sich die Behandlungsgruppen diesbezüglich nicht signifikant unterschieden ($63,5 \pm 3,8\%$ L-DOPA-Gruppe vs. $64,7 \pm 6,0\%$ NaCl-Gruppe).

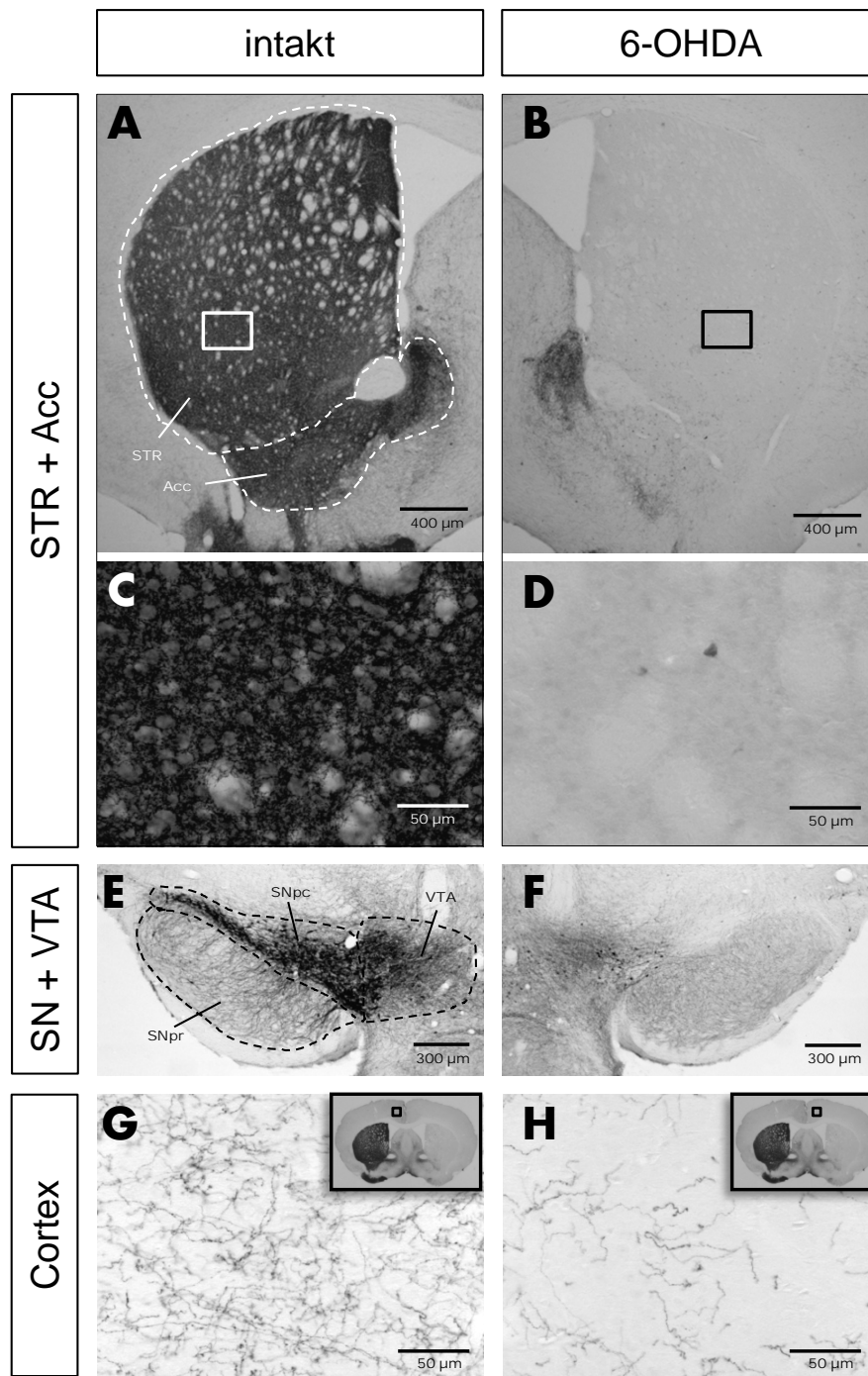


Abb. 3.2 TH-positive Immunohistochemie zur Darstellung des Untergangs dopaminerger Zellkörper im ventralen Mittelhirn und ihrer Projektionen sechs Wochen nach unilateraler 6-OHDA-Injektion in das MFB. In A-D erkennt man den ausgeprägten Faserverlust in STR und Acc auf der lädierten (B+D) im Vergleich zur intakten Seite (A+C). C und D sind zeigen hierbei die jeweiligen Vergrößerungen von A und B. Im lädierten Striatum zeigen sich zwei TH-positive Zellen (D), die auf der Kontrollseite nicht zu identifizieren sind (B). Zudem erkennt man eine deutliche Reduktion der TH+ Zellkörper in SNpc und VTA im Seitenvergleich (E+F) sowie eine verminderte Faserdichte im lädierten Cortex (G+H). Vgl. auch Abb. 3.3. *Abkürzungen:* Acc: Nucleus accumbens, MFB: mediales Vorderhirnbündel (engl. medial forebrain bundle), 6-OHDA: 6-Hydroxy-Dopamin, SNpc: Substantia nigra pars compacta, SNpr: Substantia nigra pars reticulata, STR: Corpus striatum, TH+: Tyrosinhydroxylase-positiv, VTA: Ventrale tegmentale Region.

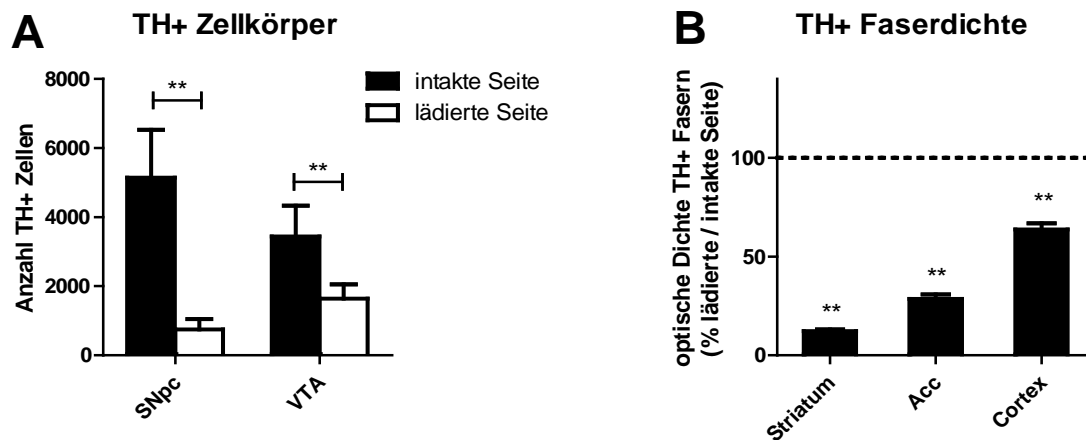


Abb. 3.3 Effekte der 6-OHDA-Läsion auf die TH-positive Zellzahl und Faserdichte. (A) Die Grafik illustriert die absolute Anzahl TH+ Zellkörper der SNpc und VTA auf der lädierten (weiß) oder intakten (schwarz) Seite. Man erkennt auf der lädierten Seite eine ausgeprägte Abnahme nigraler und ventrotergmentaler TH+ Zellkörper. (B) Die optische Dichte TH+ Fasern zeigte sich in Striatum, Acc und Cortex auf der lädierten Seite deutlich vermindert im Vergleich zur intakten Seite. Vgl. auch Abb. 3.2. ** signifikanter Unterschied zur intakten Seite $p < 0,001$. *Abkürzungen:* Acc: Nucleus accumbens, SNpc: Substantia nigra pars compacta, Striatum: Corpus striatum, TH+: Tyrosinhydroxylase-positiv, VTA: ventrale tegmentale Region.

3.1.5 Zunahme serotonerger Fasern im Striatum

Ein dopaminerges Defizit im Striatum kann zusätzlich auf die serotonerge Faserdichte innerhalb dieser Region Einfluss nehmen. Um die Veränderungen der striatalen serotonergen Faserinnervation sechs Wochen nach der 6-OHDA-Läsion zu untersuchen, wurde die optische Dichte der SERT-positiven Axone im Seitenvergleich bestimmt. Hierbei zeigte sich eine auffällige Zunahme serotonerger Fasern im gesamten Striatum auf $151,4 \pm 4,7\%$, im posterioren Teil des Striatums mit $189,5 \pm 12,3\%$ sogar auf fast das Doppelte (s. Abb. 3.4). Entscheidend ist, dass auch hier weder im gesamten Striatum, noch im anterioren und noch im posterioren Bereich des Striatums signifikante Behandlungsgruppenunterschiede bezüglich der Faserdichte herrschten (Striatum gesamt $153,0 \pm 5,8\%$ L-DOPA-Gruppe vs. $145,8 \pm 6,2\%$ NaCl-Gruppe), sodass kein toxischer oder regenerativer Effekt von L-DOPA auf die serotonergen Fasern festzustellen war. Es zeigte sich lediglich die statistisch nicht relevante Tendenz zu einer stärkeren serotonergen Innervation bei den L-DOPA-behandelten Mäusen.

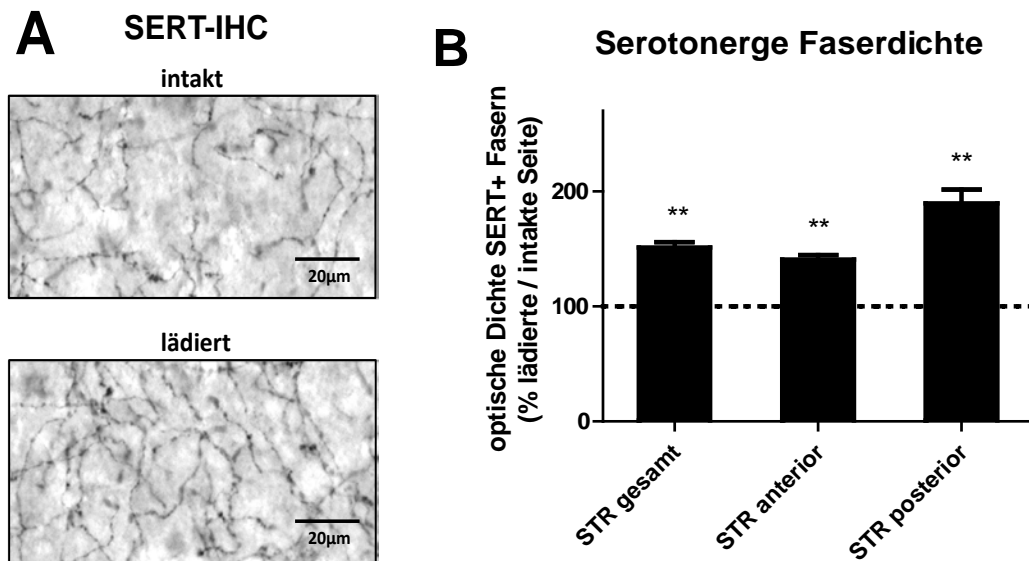


Abb. 3.4 Effekt der 6-OHDA-Läsion auf die serotonerge Faserinnervation im Striatum. (A) SERT-Immunhistochemie abgebildet vom anterioren dorsomedialen Striatum am Beispiel einer L-DOPA-behandelten dyskinetischen Maus. Sechs Wochen postoperativ zeigte sich auf der Läsionsseite insgesamt eine Zunahme der serotonergen Fasern im Vergleich zur intakten Seite. (B) Optische Dichte der SERT+ Fasern abgebildet sowohl vom gesamten Striatum als auch unterteilt in den anterioren und posterioren striatalen Bereich. ** signifikanter Unterschied zur intakten Seite $p < 0,001$. Abkürzungen: IHC: Immunhistochemie, SERT: Serotonintransporter, STR bzw. Striatum: Corpus striatum.

In Bezug auf den Läsionsgrad der TH-positiven Fasern im Striatum ergab sich keine direkte Korrelation mit der hier gemessenen relativen serotonergen Faserdichte ($R^2=0,1$; $p=0,15$).

3.2 L-DOPA-induzierte Dyskinesien

Zur Qualifizierung und Quantifizierung von LID wurden die Versuchstiere an Tag eins, acht und 15 ihrer L-DOPA-Behandlungsperiode jeweils für drei Stunden unmittelbar nach der Injektion bezüglich auftretender AIMs eingestuft. Die Dyskinesien wurden hierbei untergliedert in eine Gruppe bestehend aus axialen, Vorderpfoten- und orolingualen AIMs sowie in die unspezifischen und somit separat ausgewerteten lokomotorischen Rotationen (s. Abb. 3.5D).

3.2.1 Dauer und Ausprägung der L-DOPA-induzierten Dyskinesien

Die pulsatile L-DOPA-Injektion führte bei zwölf von 17 behandelten Mäusen (71%) zu deutlichen Dyskinesien in Form von axialen, Vorderpfoten- und orolingualen AIMs. Vier der fünf nicht-dyskinetischen Mäuse (80%) zeigten zumindest lokomotorische Rotationen. Die mit NaCl-behandelten Kontrolltiere wiesen keinerlei AIMs auf.

Im Verlauf einer Testsitzung setzten die AIMs wenige Minuten nach der L-DOPA-Injektion ein, erreichten nach einer Stunde ihre maximale Ausprägung und fielen nach 100 Minuten stark ab bis zum völligen Verschwinden nach 160 Minuten an Tag eins bzw. 140 Minuten an Tag acht und 15 (s. Abb. 3.5A). Locomotorische Rotationen traten parallel in einer plateauförmigen Ausprägung zwischen 20 und 100 Minuten auf. Im Gegensatz zu den L-DOPA-behandelten Mäusen zeigten die Tiere der Kontrollgruppe keinerlei AIMs.

Im Verlauf der Behandlungsperiode entwickelten die L-DOPA-behandelten Tiere bereits am ersten Tag charakteristische axiale, orolinguale und Vorderpfoten-Dyskinesien, die nach einer Woche in ihrer Ausprägung gleichbleibend waren (integrierter AIM Score 549 ± 106) und nach 15 Tagen aufgrund kürzerer Dauer um 22% des vorherigen Maximums abnahmen (s. Abb. 3.5B). Locomotorische Rotationen traten zum Ende der Behandlungszeit etwas weniger auf als in den ersten beiden Testsitzungen. Anders als bei den L-DOPA-induzierten Dyskinesien waren nach NaCl-Applikation während der gesamten Behandlungsperiode keine AIMs zu verzeichnen.

In Bezug auf die Verteilung der AIM-Subtypen zeigten die dyskinetischen Tiere jeweils alle vier Ausprägungen während der Beobachtungsperiode (s. Abb. 3.5C+D). Knapp die Hälfte der verzeichneten Dyskinesien wurde hierbei durch hyperkinetische Bewegungen in Form von Vorderpfoten- und orolingualen AIMs bestimmt. Etwa ein Drittel war durch axiale Dyskinesien, und somit vorwiegend Dystonien, vertreten. Locomotorische Rotationen hatten einen Anteil von 20% aller dyskinetischen Bewegungsformen.

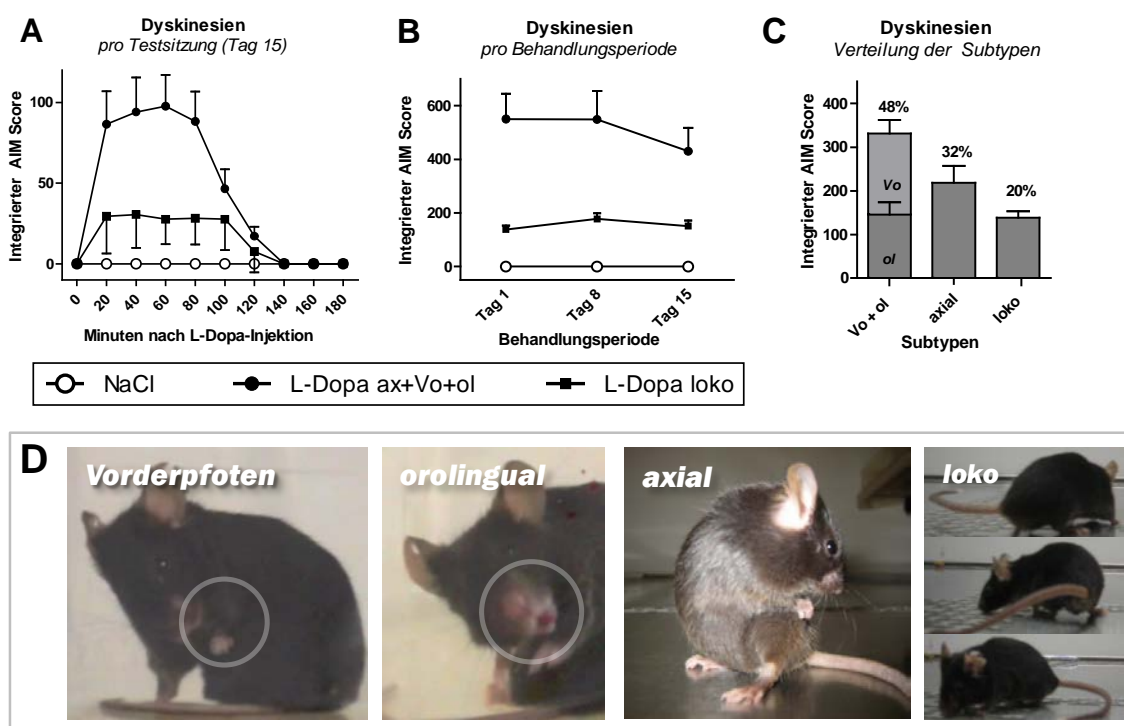


Abb. 3.5 L-DOPA-induzierte Dyskinesien. Dauer und Ausprägung von Dyskinesien nach s.c. Applikation von täglich 6mg/kg KG L-DOPA bzw. NaCl im Verlauf unmittelbar nach der Injektion (A) sowie während der gesamten Behandlungsperiode (B). Die Werte geben die Summe von axialen, Vorderpfoten- und orolingualen AIMs wieder (●), sowie als separaten Graphen lokomotorische Rotationen (▲). Während die mit NaCl-behandelte Kontrollgruppe keine Dyskinesien aufwies, zeigten sich in der L-DOPA-Behandlungsgruppe ausgeprägte AIMs in Form aller vier Subtypen (C+D). *Abkürzungen:* ax: axial, loko: lokomotorische Rotationen, ol: orolingual, Vo: Vorderglied-Dyskinesien.

3.2.2 Korrelation der Dyskinesien zum Läsionsgrad

Um sicherzustellen, dass die beobachteten Dyskinesien nicht auf die 6-OHDA-Läsion als solche zurückzuführen sind, wurden die Gruppe der L-DOPA-behandelten dyskinetischen Mäuse (LD-Dys) und die Gruppe der L-DOPA-behandelten nicht-dyskinetischen Mäuse (LD-Non-Dys) bezüglich ihres dopaminergen Zelluntergangs statistisch analysiert und verglichen. Hierbei sei daran erinnert, dass sich diese Analysen auf Mäuse mit nigralen und striatalen Läsionen < 25% der lädierten zur intakten Seite beziehen.

Weder die absolute Anzahl TH-positiver Zellkörper in SNpc und VTA noch die prozentuale Läsion dieser Regionen unterschied sich signifikant zwischen dyskinetischen und nicht-dyskinetischen L-DOPA-behandelten Tieren (s. Abb. 3.6A). Auch in Bezug auf den

Läsionsgrad der TH-positiven axonalen Fasern fanden sich weder im gesamten Striatum noch im Cortex signifikante Gruppenunterschiede (s. Abb. 3.6B).

Lediglich im Ncl. accumbens und im Cortex zeigten sich die dyskinetischen Mäuse mit einer Läsion von $25,1 \pm 2,4\%$ bzw. $58,4 \pm 4,4\%$ moderat stärker lädiert als die nicht-dyskinetischen Tiere mit $37,7 \pm 3,8\%$ bzw. $75,9 \pm 3,7\%$ (jeweils $p < 0,001$).

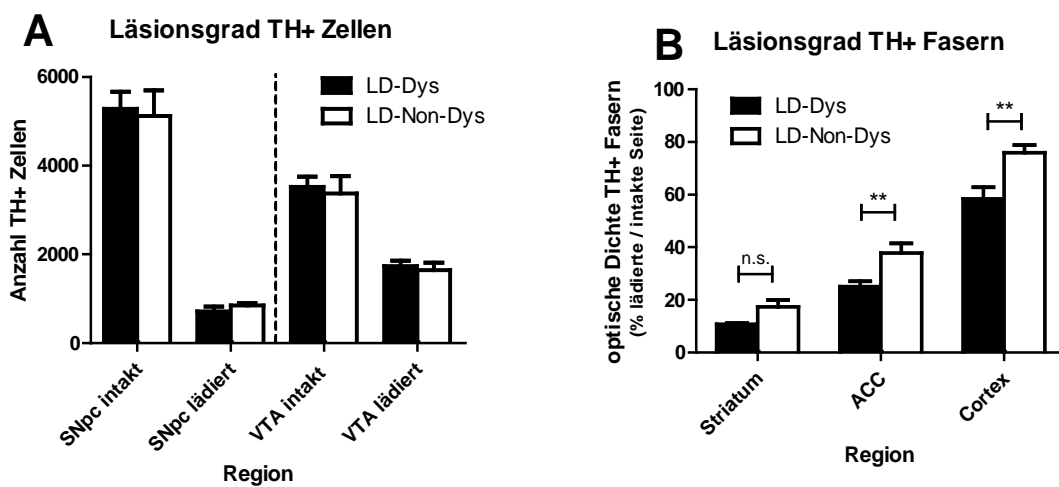


Abb. 3.6 Zusammenhang der Dyskinesien zu der 6-OHDA-Läsion TH-positiver Neurone. Die dyskinetischen Tiere (LD-Dys, schwarze Balken) unterschieden sich von den nicht-dyskinetischen (LD-Non-Dys, weiße Balken) weder bezüglich der Anzahl TH-positiver Zellkörper der SNpc und der VTA im ventralen Mittelhirn (A) noch in Bezug auf die relative TH-positive Faserdichte im Striatum (B), womit die beiden Gruppen den gleichen Läsionsgrad aufwiesen. Lediglich im Acc und Cortex fand sich ein signifikant stärkerer Faserverlust bei den dyskinetischen Mäusen (B). *Abkürzungen:* Acc: Nucleus accumbens, SNpc: Substantia nigra pars compacta, Striatum: Corpus striatum. TH+: Tyrosinhydroxylase-positiv, VTA: ventrale tegmentale Region.

3.3 Serotonerge Fasern im Striatum

Wie bereits erwähnt, zeigte sich infolge der 6-OHDA-Läsion insgesamt eine Zunahme auf rund 150% serotonerger Fasern sowohl bei der NaCl- als auch bei der L-DOPA-Behandlungsgruppe (s. Abb. 3.4). Von entscheidendem Interesse war darüber hinaus die Frage, ob die striatale serotonerge Faserinnervation bei L-DOPA-behandelten dyskinetischen Tieren im Vergleich zu L-DOPA-behandelten nicht-dyskinetischen Tieren verändert war. Die diesbezüglichen Analysen offenbarten, dass die relative Faserdichte in

der LD-Dys-Gruppe um ein Fünftel höher war als in der LD-Non-Dys-Gruppe ($163,4 \pm 5,8\%$ vs. $128,1 \pm 3,6\%$, $p < 0,05$), wobei sich jedoch keine der beiden Gruppen erheblich von der Kontrollgruppe unterschied (s. Abb. 3.7A+B). Die signifikant stärkere Faserdichtezunahme der dyskinetischen im Vergleich zu den nicht-dyskinetischen Tieren fand sich sowohl in dem striatalen anterioren als auch posterioren Anteil, wobei der Unterschied posterior besonders ins Auge fiel ($213,2 \pm 18,4\%$ LD-Dys vs. $139,6 \pm 7,1\%$ LD-Non-Dys, $p < 0,05$).

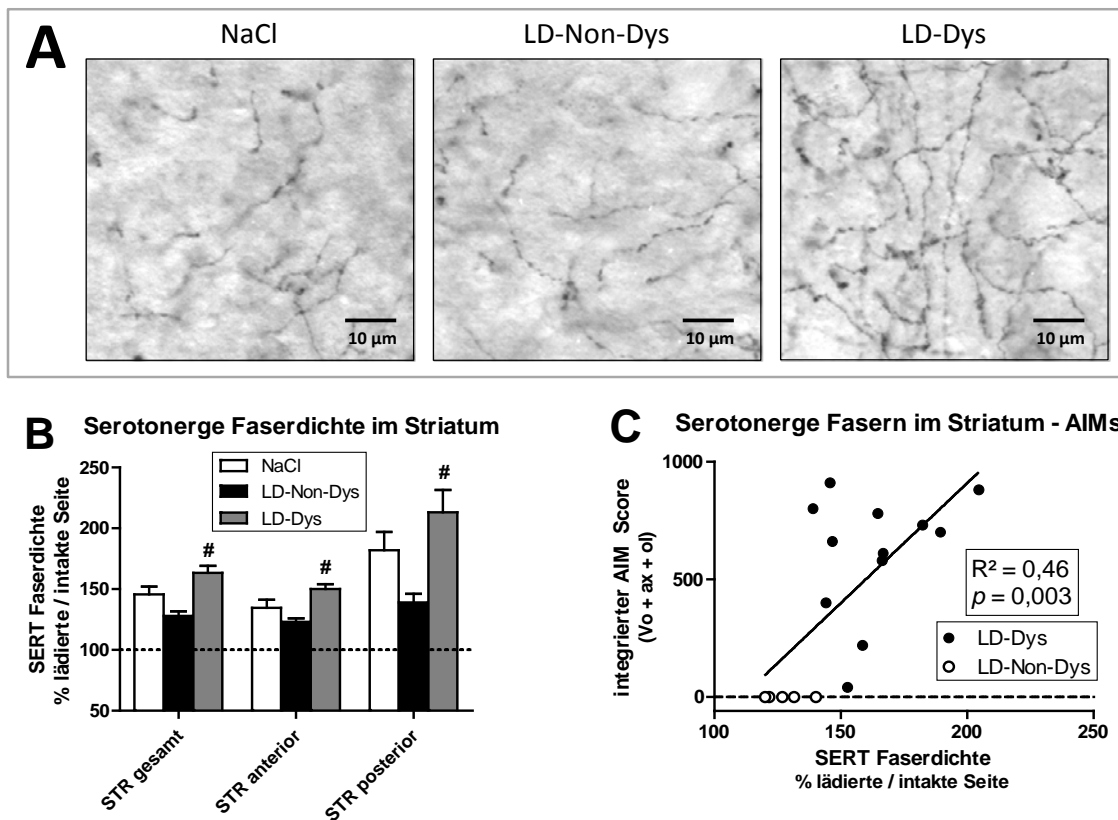


Abb. 3.7 Dichte serotonerger Fasern im Striatum und deren Zusammenhang mit L-DOPA-induzierten Dyskinesien. (A) SERT-Immunhistochemie abgebildet vom dorsomedialen Striatum der lädierten Hemisphäre (posteriorer Bereich). (B) Die Balken illustrieren im Gruppenvergleich die relative serotonerge Faserdichte des gesamten Striatums, des striatalen anterioren Anteils (Bregma +1,1 bis +0,2 mm) sowie des posterioren Bereichs (Bregma -0,1 bis -0,7mm). Dyskinetische Tiere (LD-Dys) wiesen eine erhöhte striatale Faserdichte im Vergleich zu nicht-dyskinetischen Tieren (LD-Non-Dys) auf. (C) Die lineare Regressionsanalyse zeigt eine moderate positive Korrelation der serotonergen striatalen Faserdichte zum integrierten AIM Score an Behandlungstag 15. # signifikanter Unterschied zur LD-Non-Dys-Gruppe $p < 0,05$. *Abkürzungen:* AIM: abnorme unfreiwillige Bewegungen (engl. abnormal involuntary movements), ax: axial, NaCl: Natriumchlorid-Kontrollgruppe, ol: orolingual, SERT: Serotonintransporter, STR bzw. Striatum: Corpus striatum, Vo: Vorderglied-AIM.

Die Analyse zur Korrelation der striatalen serotonergen Faserdichtezunahme mit der Ausprägung der LID aller L-DOPA-behandelten Tiere brachte einen moderaten Zusammenhang von statistischer Relevanz hervor ($R^2 = 0,46$; $p < 0,05$): bei zunehmender serotonerger Faserdichte im Striatum stieg tendenziell auch der Schweregrad der LID (s. Abb. 3.7C).

3.4 Δ FosB-positive Zellen

Eine gesteigerte Expression der Transkriptionsfaktoreinheit Δ FosB gilt im Allgemeinen als Indikator für chronische Perturbationen und wurde im Speziellen bereits in Verbindung mit L-DOPA-Behandlungen und LID gebracht. So gilt die Induktion von Δ FosB als striataler Marker für Dyskinesien (s. Kap. 1.3.3). Zum Nachweis eines Zusammenhangs zwischen Δ FosB-positiven Zellen und LID wurden Δ FosB-positive Zellkerne im Striatum und dessen Subregionen sowie im Ncl. accumbens immunhistochemisch gefärbt, quantifiziert und anschließend mit Dyskinesien korreliert. Da es sich bei dieser Auswertung um striatale Zellen handelt, die jeweils einen Nucleus besitzen, ist im Folgenden ein Δ FosB-immunreaktiver Zellkern mit einer Δ FosB-positiven Zelle gleichzusetzen.

3.4.1 Quantifizierung im gesamten Striatum

Die durchschnittliche Anzahl Δ FosB-positiver Zellen im lädierten Striatum stieg nach L-DOPA-Behandlung signifikant auf fast das Doppelte (44%) der NaCl-Kontrollgruppe (11850 ± 1026 vs. 6684 ± 1075 , $p < 0,05$) (s. Abb. 3.11H, S. 56).

Von entscheidendem Interesse war darüber hinaus die Anzahl Δ FosB-positiver Zellen im Striatum von dyskinetischen im Vergleich zu nicht-dyskinetischen L-DOPA-behandelten Tieren. Während sich die LD-Non-Dys-Gruppe mit 7996 ± 1895 Δ FosB+ Zellen nicht signifikant von der Kontrollgruppe unterschied, zeigte die LD-Dys-Gruppe mit 13450 ± 910 Zellen eine auffällige Zellvermehrung um ein Drittel (32%) im Vergleich zur LD-Non-Dys-Gruppe ($p < 0,05$) und um das Doppelte im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,001$) (s. Abb. 3.11D-F,H, S. 56).

3.4.2 Verteilung in den striatalen Subregionen

Im Hinblick auf die striatalen Subregionen wurden die oben genannten Gruppenunterschiede insbesondere durch die Δ FosB-positive Zellzahl im lateralen Striatum bestimmt (s. Abb. 3.8 und Tabelle 3.1, S. 60). Hier zeigten sich die Δ FosB-Zellzahlen der LD-Non-Dys-Gruppe und der Kontrollgruppe vergleichbar, wohingegen die der LD-Dys-Gruppe deutlich erhöht waren: **dorsolateral** um mehr als das Dreifache der Kontrollgruppe (3063 ± 217 vs. 911 ± 170 , $p < 0,001$) und **ventrolateral** um das Doppelte (51%) der Kontrollgruppe (2831 ± 262 versus 1399 ± 338 , $p < 0,001$). Entscheidend ist, dass in beiden lateralen Subregionen der dyskinetischen Tiere signifikant mehr Δ FosB-positive Zellen vorhanden waren als in denen der nicht-dyskinetischen Tiere. Im **dorsomedialen** Striatum präsentierte die LD-Dys-Gruppe mit 4029 ± 209 Δ FosB-positiven Zellen zwar signifikant höhere Werte als die Kontrollgruppe ($p < 0,001$), nicht jedoch als die LD-Non-Dys-Gruppe. Auch **ventromedial** zeigten sich keinerlei signifikante Gruppenunterschiede zwischen dyskinetischen und nicht-dyskinetischen Tieren. Bei Unterteilung in den striatalen **anterioren** (Bregma +1,1 bis + 0,2mm) und in den striatalen **posterioren** Bereich (Bregma -0,1 bis -0,7mm) fand sich die gleiche Gruppenverteilung wie im Gesamtstriatum.

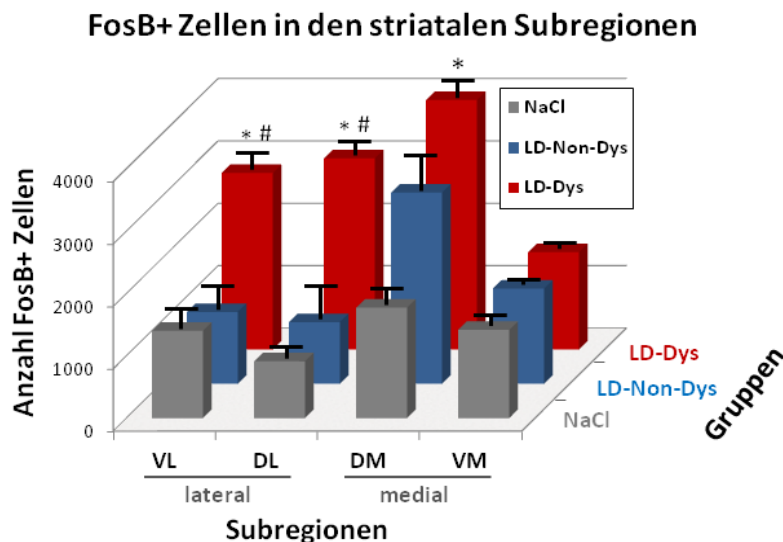


Abb. 3.8 Verteilung der Δ FosB Zellen in den vier Subregionen des Striatums. In den beiden lateralen Subregionen zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Anzahl Δ FosB+ Zellen zwischen dyskinetischen (LD-Dys) und nicht-dyskinetischen Tieren (LD-Non-Dys). Die Zellzahl dyskinetischer Tiere war VL, DL und DM deutlich erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe (NaCl), wohingegen sich die LD-Non-Dys-Gruppe in keiner der Subregionen signifikant von der Kontrollgruppe unterschied. * signifikanter Unterschied zur NaCl-Kontrollgruppe $p < 0,001$, # signifikanter Unterschied zu LD-Non-Dys-Gruppe $p < 0,001$. *Abkürzungen:* DL: dorsolateral, DM: dorsomedial, Δ FosB+: Δ FosB-positiv, Striatum: Corpus striatum, VL: ventrolateral, VM: ventromedial.

3.4.3 Korrelation zu L-DOPA-induzierten Dyskinesien

Die Anzahl Δ FosB-positiver Zellen in den lädierten Striata der L-DOPA-behandelten Tiere korrelierte positiv mit dem integrierten AIM Score ($R^2=0,64$; $p < 0,001$), wobei das laterale Striatum den stärksten Zusammenhang zu den Dyskinesien zeigte ($R^2=0,75$, $p < 0,001$) (s. Abb. 3.9). Das Bestimmtheitsmaß war hierbei ventrolateral etwas ausgeprägter als dorsolateral (VL $R^2=0,74$; DL $R^2=0,69$, jeweils $p < 0,001$). Dagegen bestand im medialen striatalen Teil nur ein sehr schwacher Zusammenhang mit LID ($R^2=0,36$; $p < 0,05$).

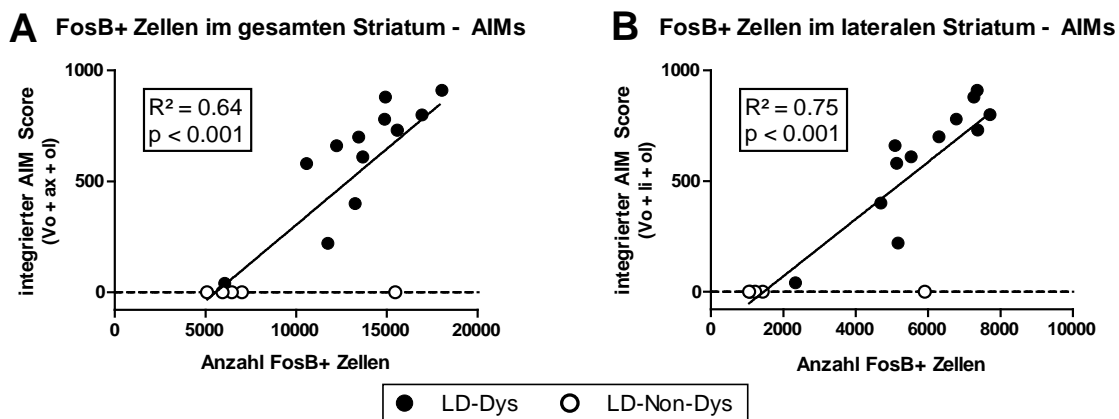


Abb. 3.9 Korrelation der Δ FosB Zellen im Striatum mit L-DOPA-induzierten Dyskinesien. Die absolute Δ FosB+ Zellzahl in den lädierten Striata aller L-DOPA-behandelten Tiere korrelierte positiv mit dem integrierten AIM-Score am Behandlungstag 15, welcher axiale, orolinguale und Vorderpfoten-AIMs einschließt (A). Im Hinblick auf die striatalen Subregionen fand sich der stärkste Zusammenhang im lateralen Striatum (B). *Abkürzungen:* AIM: abnorme unfreiwillige Bewegungen (engl. abnormal involuntary movements), ax: axial, Δ FosB+: Δ FosB-positiv, LD-Dys: L-DOPA-behandelt und dyskinetisch, LD-Non-Dys: L-DOPA-behandelt und nicht-dyskinetisch, ol: orolingual, Striatum: Corpus striatum, Vo: Vorderglied-AIM.

3.4.4 Δ FosB-positive Zellen im Ncl. accumbens

Im Ncl. accumbens war die Δ FosB-positive Zellzahl der dyskinetischen Tiere interessanterweise um ein Drittel (36%) vermindert im Vergleich zu der der nicht-dyskinetischen Tiere (613 ± 68 vs. 965 ± 72 , $p < 0,05$). Die LD-Non-Dys-Gruppe unterschied sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Statistisch fand sich außerdem kein signifikanter Zusammenhang der accumbalen Δ FosB-positiven Zellen mit dem integrierten AIM-Score ($R^2=0,18$; $p=0,09$).

3.5 TH-positive Zellen

Im Fokus dieser Arbeit stand unter anderem die qualitative und quantitative Analyse TH-positiver Zellen im Striatum, um anschließend eine mögliche Assoziation dieser Zellen mit L-DOPA-induzierten Dyskinesien aufzudecken. Im folgenden Abschnitt werden die immunhistochemischen Charakteristika bezogen auf das Striatum und dessen Subregionen illustriert sowie statistische Zusammenhänge zu Δ FosB-positiven Zellen, dopaminergen und serotonergen Faserinnervationen des Striatums, zur L-DOPA-Behandlung und letztlich zu den LID dargestellt. Darüber hinaus werden die Eigenschaften der TH-positiven Zellen in Ncl. accumbens und Cortex in Kürze beleuchtet.

3.5.1 Phänotypisierung

Um sicherzustellen, dass es sich bei den TH-positiven Zellen in Striatum, Ncl. accumbens und Cortex um Neurone handelt, wurde eine TH/NeuN-Doppel-Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt und die Schnitte mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie ausgewertet. Hierbei zeigten ausnahmslos alle untersuchten TH-positiven Zellen eine Koexpression mit dem neuronalen Marker NeuN (vgl. Abb. 3.10): Während sich TH im gesamten Neuron inklusive seiner Fortsätze anfärbt, bleiben die NeuN-gekoppelten Fluorochrome überwiegend im Nucleus bzw. im Zellkörper lokalisiert. Viele NeuN-positive Neurone sind TH-negativ, werden aber von TH-positiven Fasern kontaktiert.

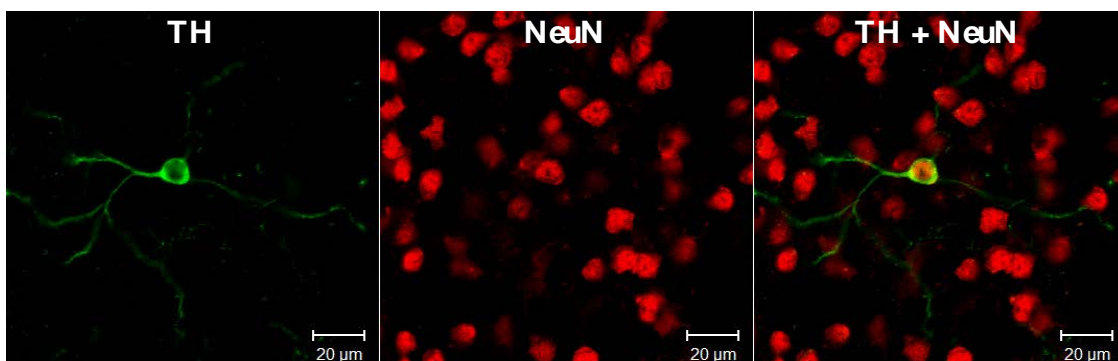


Abb. 3.10 TH/NeuN-Doppel-Immunfluoreszenz. Exemplarische Darstellung einer striatalen Zelle, die sowohl TH (grün, links) als auch NeuN (rot, Mitte) exprimiert und nach Überlagerung der Fluoreszenzsignale am Zellkörper gelblich erscheint (rechts). Viele NeuN-positive Neurone sind TH-negativ, werden aber von TH-Fasern kontaktiert. Die Bilder stammen aus dem medialen Corpus striatum nahe dem Seitenventrikel.

3.5.2 Quantifizierung im gesamten Striatum

Von entscheidendem Interesse war die Veränderung der Anzahl TH-positiver Zellen im denervierten Striatum infolge der L-DOPA-Behandlung sowie im Kontext mit Dyskinesien. Immunhistochemische Auswertungen offenbarten diesbezüglich in den lädierten Striata der L-DOPA-behandelten Tiere durchschnittlich ein Drittel (29%) mehr TH-positive Zellen als in denen der NaCl-behandelten Kontrolltiere (721 ± 52 vs. 512 ± 38 , $p < 0,05$) (s. Abb. 3.11G).

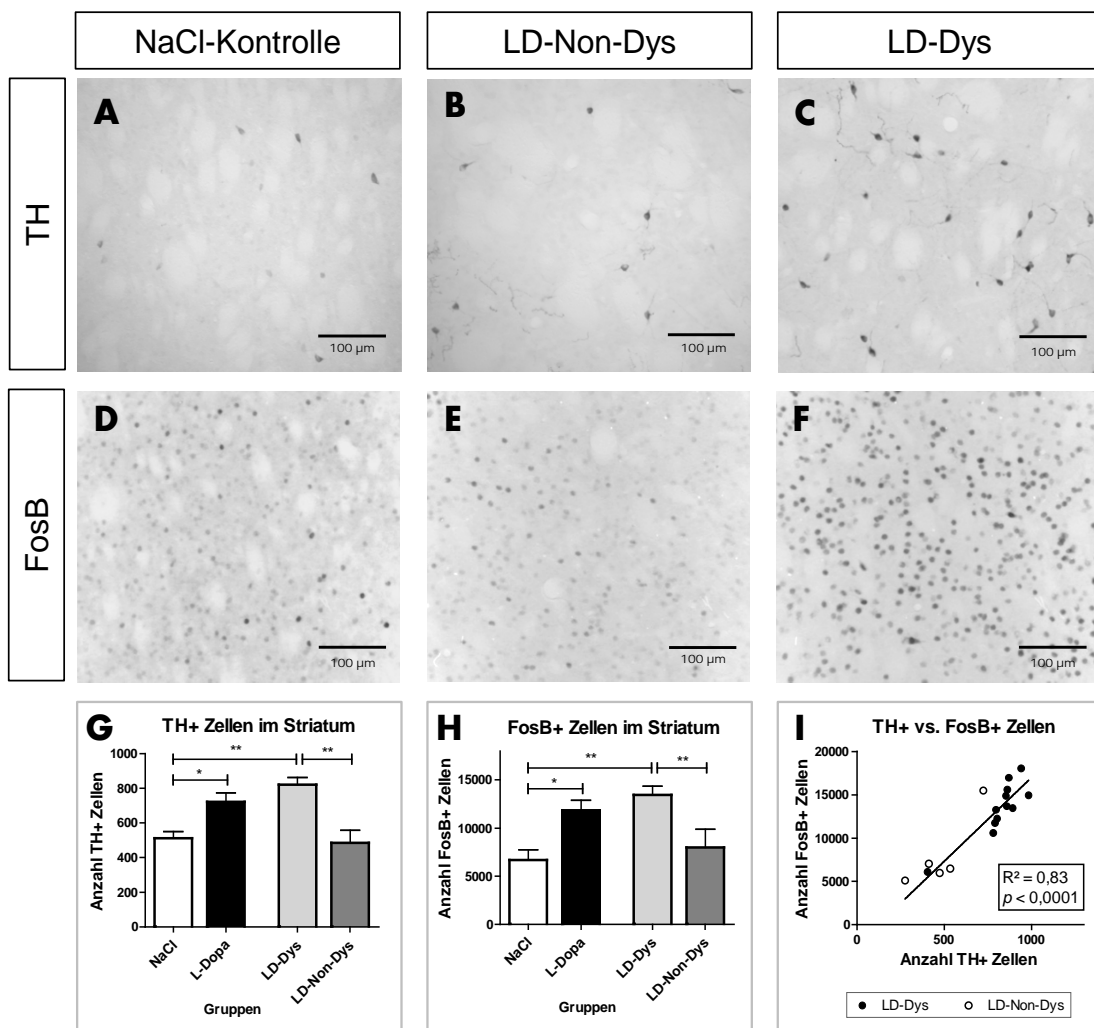


Abb. 3.11 TH und Δ FosB Zellen im lädierten Striatum. Die repräsentativen immunhistochemischen Bilder (A-F) wurden vom anterioren dorsolateralen Striatum aufgenommen. Sowohl die Anzahl TH+ Zellen (A-C,G) als auch Δ FosB+ Zellen (D-F,H) nahm bei Tieren mit LID (LD-Dys) deutlich zu, wohingegen sie bei nicht-dyskinetischen Tieren (LD-Non-Dys) im Vergleich zur Kontrollgruppe konstant blieb. Es zeigte sich zudem eine enge positive Korrelation zwischen der Anzahl striataler TH+ und Δ FosB+ Zellen (I). Fehlerbalken repräsentieren SEM. * signifikanter Unterschied $p < 0,05$, ** signifikanter Unterschied $p < 0,001$. *Abkürzungen:* NaCl: Natriumchlorid = Kontrollgruppe, Striatum: Corpus striatum, TH+: Tyrosinhydroxylase-positiv.

In Bezug auf LID fand sich bei den dyskinetischen Mäusen eine auffällige Zunahme der TH-positiven Zellen um 41% im Vergleich zu den nicht-dyskinetischen Tieren (820 ± 42 vs. 484 ± 74 , $p < 0,001$) (s. Tabelle 3.1). Somit unterschied sich die LD-Dys-Gruppe im Gegensatz zur LD-Non-Dys-Gruppe auch signifikant von der Kontrollgruppe ($p < 0,001$) (s. Abb. 3.11A-C,G).

3.5.3 Zusammenhang zu Δ FosB-positiven Zellen

Nachdem sich mit den bisherigen Ergebnissen eine den Δ FosB-positiven Zellen ähnelnde Gruppenverteilung der TH-positiven Zellzahl im Striatum abzeichnete, wurde zur Beleuchtung eines Zusammenhangs zwischen den beiden immunreaktiven Zelltypen eine Regressionsanalyse durchgeführt. Diese bestätigte eine enge positive Korrelation zwischen der Anzahl TH-positiver und Δ FosB-positiver Zellen im Striatum ($R^2=0,83$; $p < 0,001$) (s. Abb. 3.11I).

3.5.4 Zusammenhang zu TH-positiven und serotonergen Fasern

Um mögliche Zusammenhänge der gesamtstriatalen Anzahl TH-positiver Zellen zu weiteren im Striatum lokalisierten histologischen Elementen einzubeziehen, wurden die TH-positiven Zellen der L-DOPA-behandelten Tiere in Bezug gesetzt zu TH- und SERT-positiven Fasern. Zum einen zeigte sich hierbei eine negative Korrelation zwischen TH-positiven Fasern und TH-positiven Zellen: je geringer die relative TH-positiven Faserdichte, desto mehr TH-positiv Zellen fanden sich im Striatum ($R^2=0,58$, $p < 0,001$) (s. Abb. 3.12A). In Bezug auf die serotonerge Faserinnervation offenbarte sich ein umgekehrtes Bild: Bei höherer serotonerger Faserdichte nahm auch die Anzahl TH-positiver Zellen tendenziell zu ($R^2=0,45$, $p < 0,05$) (s. Abb. 3.12B).

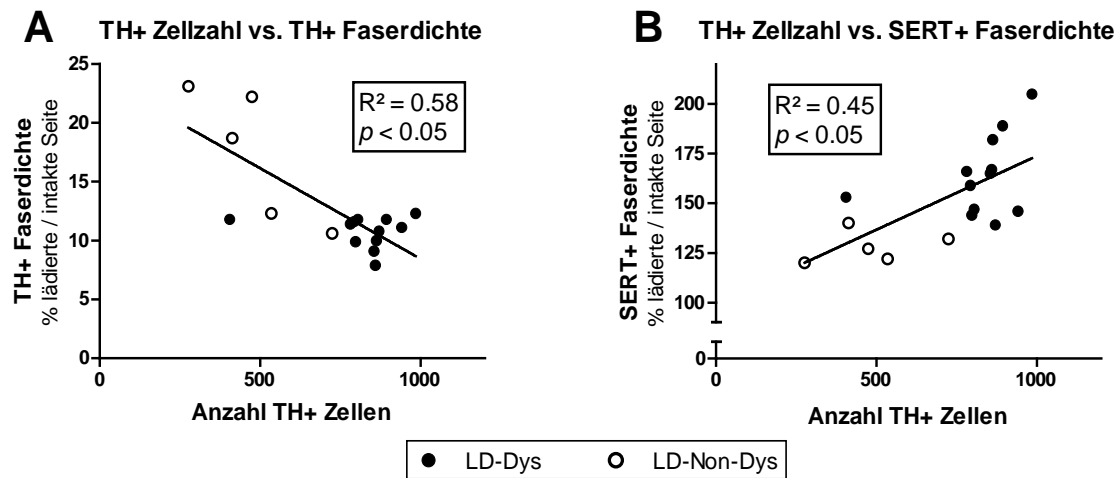


Abb. 3.12 Zusammenhang der TH Zellzahl zur TH und serotonergen Faserdichte im lädierten Striatum L-DOPA-behandelter Mäuse. Bei steigender Anzahl striataler TH+ Neurone zeigten sich die TH+ axonalen Fasern vermindert (A), wohingegen die SERT+ Faserdichte tendenziell zunahm (B). *Abkürzungen:* LD-Dys: L-DOPA-behandelt und dyskinetisch, LD-Non-Dys: L-DOPA-behandelt und nicht-dyskinetisch, SERT: Serotonintransporter, Striatum: Corpus striatum, TH+: Tyrosinhydroxylase-positiv.

3.5.5 Verteilung TH-positiver Zellen in den striatalen Subregionen

Um der Frage nachzugehen, ob die Anzahl TH-positiver Zellen der dyskinetischen Tiere vorwiegend in bestimmten Teilen des Striatums zunahm, wurden die vier striatalen Subregionen auf Gruppenunterschiede hin untersucht. Hierbei wurde deutlich, dass die Zellzahl dyskinetischer Tiere im Vergleich zu den nicht-dyskinetischen und den Kontrolltieren in jeder einzelnen Subregion erhöht war, darunter am auffälligsten im **lateralen** Striatum (s. Abb. 3.13 und Tabelle 3.1): dorso- wie ventrolateral auf etwa das Doppelte der LD-Non-Dys-Gruppe (DL 102 ± 7 vs. 46 ± 11 ; VL 261 ± 16 vs. 142 ± 25 , jeweils $p < 0,001$) sowie **dorsolateral** auf beinahe das Dreifache der Kontrollgruppe (102 ± 7 vs. 35 ± 4 , $p < 0,0001$) und **ventrolateral** auf 139% der Kontrollgruppe (261 ± 16 vs. 158 ± 19 , $p < 0,001$). Nicht-dyskinetische Tiere wiesen in keiner der Subregionen einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe auf. Im **dorsomedialen** Striatum zeigte die LD-Dys-Gruppe mit 120 ± 7 Zellkörpern signifikant mehr Zellen als die LD-Non-Dys-Gruppe ($p < 0,05$) und als die Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Einzig **ventromedial** zeigten die dyskinetischen Tiere keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Dennoch waren auch hier die TH-positiven Zellen der LD-Dys-Gruppe um

35% im Vergleich zur LD-Non-Dys-Gruppe erhöht (223 ± 11 vs. 145 ± 24 , $p < 0,001$). Unterteilt auf den striatalen **anterioren** (Bregma +1,1 bis +0,2mm) bzw. **posterioren** Bereich (Bregma -0,1 bis -0,7mm) fand sich die gleiche Gruppenverteilung wie im Gesamtstriatum.

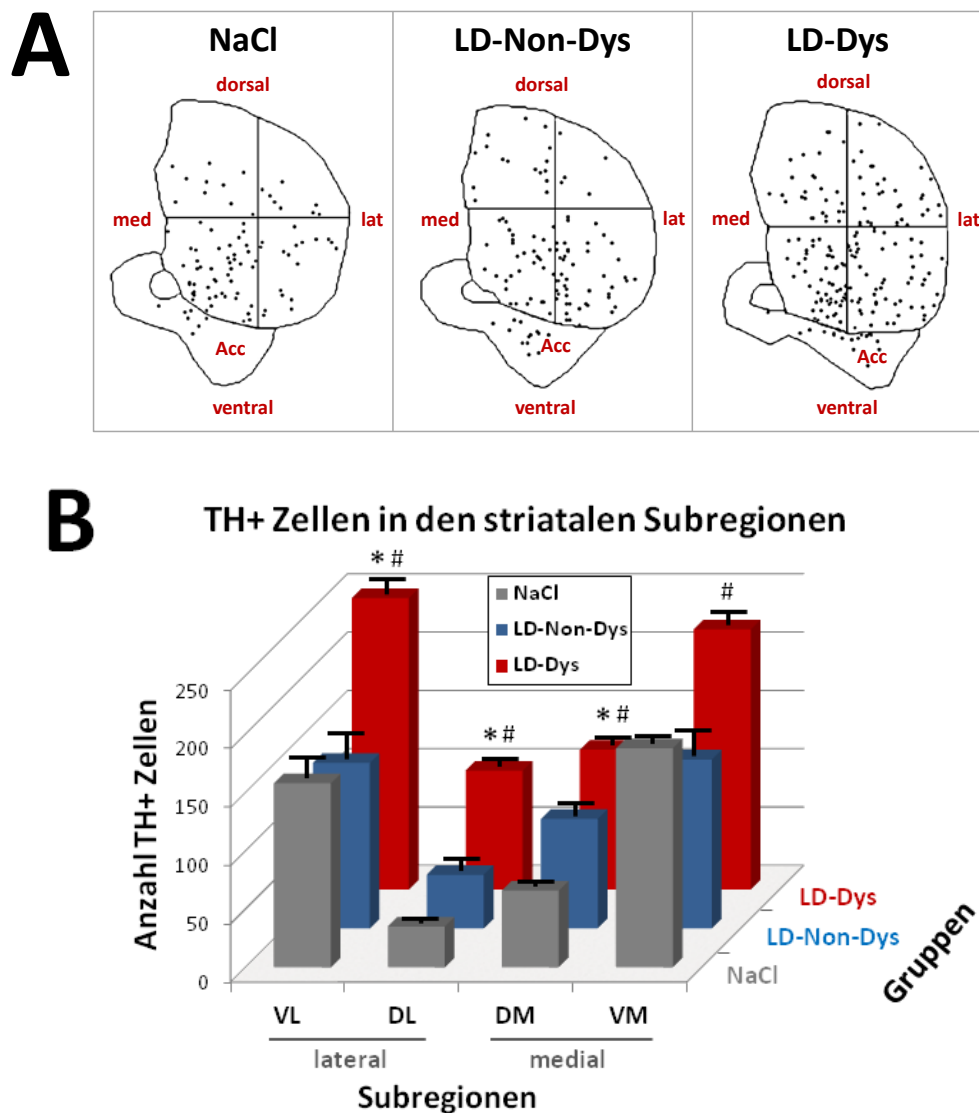


Abb. 3.13 Verteilung der TH Zellen in den vier Subregionen des lädierten Striatums. (A) Illustration der Zellverteilung basierend auf den stereologischen Auszählungen bei Bregma 0,5mm. (B) Angabe der absoluten TH+ Zellzahlen der striatalen Subregionen bezogen auf die verschiedenen Gruppen. Die Zellzahl in den Striata dyskinetischer Tiere (LD-Dys) war in allen vier Subregionen, schwerpunktmäßig lateral, deutlich erhöht im Vergleich zu denen der nicht-dyskinetischen Tiere (LD-Non-Dys). * signifikanter Unterschied zur NaCl-Kontrollgruppe $p < 0,001$, # signifikanter Unterschied zu LD-Non-Dys-Gruppe $p < 0,05$. *Abkürzungen:* DL: dorsolateral, DM: dorsomedial, lat: lateral, med: medial, NaCl: Natriumchlorid, TH+: Tyrosinhydroxylase-positiv, Striatum: Corpus striatum, VL: ventrolateral, VM: ventromedial.

Tabelle 3.1 Stereologische Auszählungen der immunreaktiven Δ FosB- und TH-positiven Zellen im lädierten Striatum, Nucleus accumbens und Cortex.

		NaCl	LD-Non-Dys	LD-Dys
FosB+ Zellen	Striatum			
	<i>gesamt</i>	6684 ± 1075	7996 ± 1895	13450 ± 910 ** ##
	<i>lateral</i>	2311 ± 503	2142 ± 994	5895 ± 448 ** ##
	<i>ventrolateral</i>	1399 ± 338	1152 ± 396	2831 ± 262 ** ##
	<i>dorsolateral</i>	911 ± 170	990 ± 560	3063 ± 217 ** ##
	<i>medial</i>	3187 ± 408	4592 ± 623	5589 ± 337 **
	<i>dorsomedial</i>	1770 ± 277	3064 ± 574	4029 ± 304 **
	<i>ventromedial</i>	1416 ± 173	1528 ± 84	1560 ± 99
	Ncl. accumbens	925 ± 125	965 ± 72	612 ± 68 * #
	TH+ Zellen	Striatum		
<i>gesamt</i>		512 ± 38	484 ± 74	820 ± 42 ** ##
<i>lateral</i>		194 ± 22	188 ± 36	363 ± 21 ** ##
<i>ventrolateral</i>		158 ± 43	142 ± 57	261 ± 54 ** ##
<i>dorsolateral</i>		35 ± 4	46 ± 11	101 ± 7 ** ##
<i>medial</i>		254 ± 9	239 ± 35	344 ± 16 ** ##
<i>dorsomedial</i>		65 ± 4	94 ± 12	120 ± 7 ** #
<i>ventromedial</i>		187 ± 6	145 ± 24	223 ± 11 ##
Ncl. accumbens		123 ± 22	77 ± 17	126 ± 12
Cortex		388 ± 21	411 ± 20	379 ± 23

Die Zahlen repräsentieren die Mittelwerte ± SEM der absoluten Zellauszählungen von sieben (Striatum) beziehungsweise vier (Nucleus accumbens) Hirnschnitten pro Tier. * signifikanter Unterschied zur NaCl-Kontrollgruppe $p < 0,05$ bzw. ** $p < 0,001$, # signifikanter Unterschied zur LD-Non-Dys-Gruppe $p < 0,05$ bzw. ## $p < 0,001$. *Abkürzungen:* LD-Dys: L-DOPA-behandelt und dyskinetisch, LD-Non-Dys: L-DOPA-behandelt und nicht-dyskinetisch, NaCl: Natriumchlorid = Kontrollgruppe, Striatum: Corpus striatum.

3.5.6 Korrelation zu L-DOPA-induzierten Dyskinesien

Die Anzahl TH-positiver Zellen im gesamten lädierten Striatum korrelierte stark positiv mit dem Schweregrad der LID ($R^2=0,76$; $p < 0,001$) (s. Abb. 3.14A). Im Hinblick auf die striatalen Subregionen brachte insbesondere die Zellzahl im lateralen Striatum mit $R^2=0,75$ ($p < 0,001$) einen deutlich positiven Zusammenhang mit dem integrierten AIM-Score

(s.-Abb. 3.14B) hervor, welcher ventrolateral am stärksten ausgeprägt war (VL $R^2=0,76$; DL $R^2=0,60$, jeweils $p < 0,001$). Dagegen zeigte sich zwischen den medial gelegenen TH-positiven Zellen und den LID lediglich eine milde positive Korrelation (medial $R^2=0,56$; VM $R^2=0,52$; DM $R^2=0,44$, jeweils $p < 0,05$).

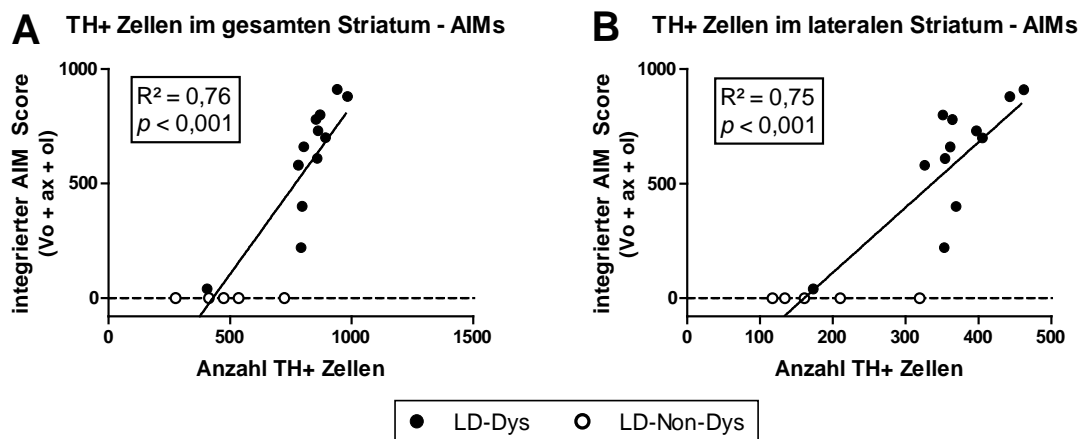


Abb. 3.14 Korrelation der TH Neurone im Striatum mit L-DOPA-induzierten Dyskinesien. Die absolute Anzahl TH+ Zellen in den lädierten Striata aller L-DOPA-behandelten Tiere korrelierte stark positiv mit dem integrierten AIM-Score am Behandlungstag 15, welcher axiale, orolinguale und Vorderpfoten-AIMS impliziert (A). Im Hinblick auf die striatalen Subregionen fand sich der stärkste Zusammenhang im lateralen Striatum (B). *Abkürzungen:* AIM: abnorme unfreiwillige Bewegungen (engl. abnormal involuntary movements), ax: axial, LD-Dys: L-DOPA-behandelt und dyskinetisch, LD-Non-Dys: L-DOPA-behandelt und nicht-dyskinetisch, Striatum: Corpus striatum, TH+: Tyrosinhydroxylase-positiv, Vo: Vorderglied-AIM.

3.5.7 TH-positive Zellen im Ncl. accumbens und Cortex

Im Gegensatz zum Striatum fanden sich in Ncl. accumbens und Cortex bezüglich der Anzahl striataler TH-positiver Zellen keine signifikanten Gruppenunterschiede, weder im Vergleich der L-DOPA-Behandlungsgruppe zur NaCl-Behandlungsgruppe, noch zwischen dyskinetischen und nicht-dyskinetischen Tieren (s. auch Tabelle 3.1).

3.6 Striatale Lokalisation der LID-Subtypen

Um der Frage nachzugehen, ob die vier Subtypen der LID jeweils von der Anzahl TH-positiver bzw. Δ FosB-positiver Zellen in bestimmten striatalen Subregionen beeinflusst sein könnten, wurden die entsprechenden Zellzahlen mit den jeweiligen AIM-Subtypen korreliert und die engsten Zusammenhänge ermittelt (s. Abb. 3.15).

Axiale Dyskinesie

Axiale Dyskinesien standen am deutlichsten und fast gleichermaßen stark mit der Zahl TH-positiver Zellen in den beiden lateralen Subregionen in Verbindung (s. Abb. 3.15A): dorsolateral mit einem hohen Bestimmtheitsmaß von $R^2=0,79$ sowie ventrolateral mit $R^2=0,77$ (jeweils $p < 0,001$). Der Zusammenhang zeigte sich anterior ($R^2=0,74$, $p < 0,001$) noch ausgeprägter als posterior ($R^2=0,52$, $p < 0,001$). Die Anzahl Δ FosB-positiver Zellen entspricht diesem Verhältnis zu den axialen Dyskinesien mit dorsolateral $R^2=0,66$ sowie ventrolateral $R^2=0,60$ (jeweils $p < 0,001$).

Vorderpfoten-Dyskinesie

Diese Dyskinesie-Form war ebenfalls primär mit der Zunahme TH-positiver Zellen in den lateralen Subregionen assoziiert, vor allem dorsolateral ($R^2=0,83$; $p < 0,001$), aber auch ventrolateral ($R^2=0,77$; $p < 0,001$) (s. Abb. 3.15B). Auch hier war im striatalen anterioren Anteil eine engere Korrelation als im posterioren Teil zu finden ($R^2=0,72$ anterior vs. $R^2=0,63$ posterior, jeweils $p < 0,001$). Relationsgetreu präsentierte sich der Zusammenhang der lateral gelegenen Δ FosB-positiven Zellen zu den Vorderpfoten-Dyskinesien mit deutlichen Bestimmtheitsmaßen von dorsolateral $R^2=0,68$ und ventrolateral $R^2=0,67$ (jeweils $p < 0,001$).

orolinguale Dyskinesie

Orolinguale Dyskinesien zeigten im Bezug auf die Subregionen mit einer moderaten Korrelation von $R^2=0,48$ ($p < 0,05$) die engste Verbindung zur Anzahl ventrolateral

gelegener TH-positiver Zellen (s. Abb. 3.15C) und noch deutlicher zur Anzahl ventrolateraler Δ FosB-positiver Zellen ($R^2=0,73$; $p < 0,001$). Einzig diese Dyskinesie-Form korrelierte stärker mit der posterioren TH-positiven Zellzahl ($R^2=0,61$, $p < 0,001$) als mit der im anterioren Striatum ($R^2=0,40$, $p < 0,05$).

lokomotorische Rotationen

Lokomotorische Rotationen schienen mit einem größten Bestimmtheitsmaß von $R^2=0,55$ ($p < 0,001$) vorwiegend mit der TH-positiven Zellzahl in der dorsomedialen Subregion verknüpft zu sein (s. Abb. 3.15D). Der Zusammenhang zeigte sich im anterioren Striatum mit $R^2=0,54$ ($p < 0,001$) statistisch relevant im Gegensatz zur Zellzahl im posterioren Anteil ($R^2=0,17$, $p > 0,05$). Die engste Korrelation lokomotorischer Rotationen zur dorsomedialen Subregion galt auch in Bezug auf die hier gelegenen Δ FosB-positiven Zellen ($R^2=0,44$, $p < 0,05$).

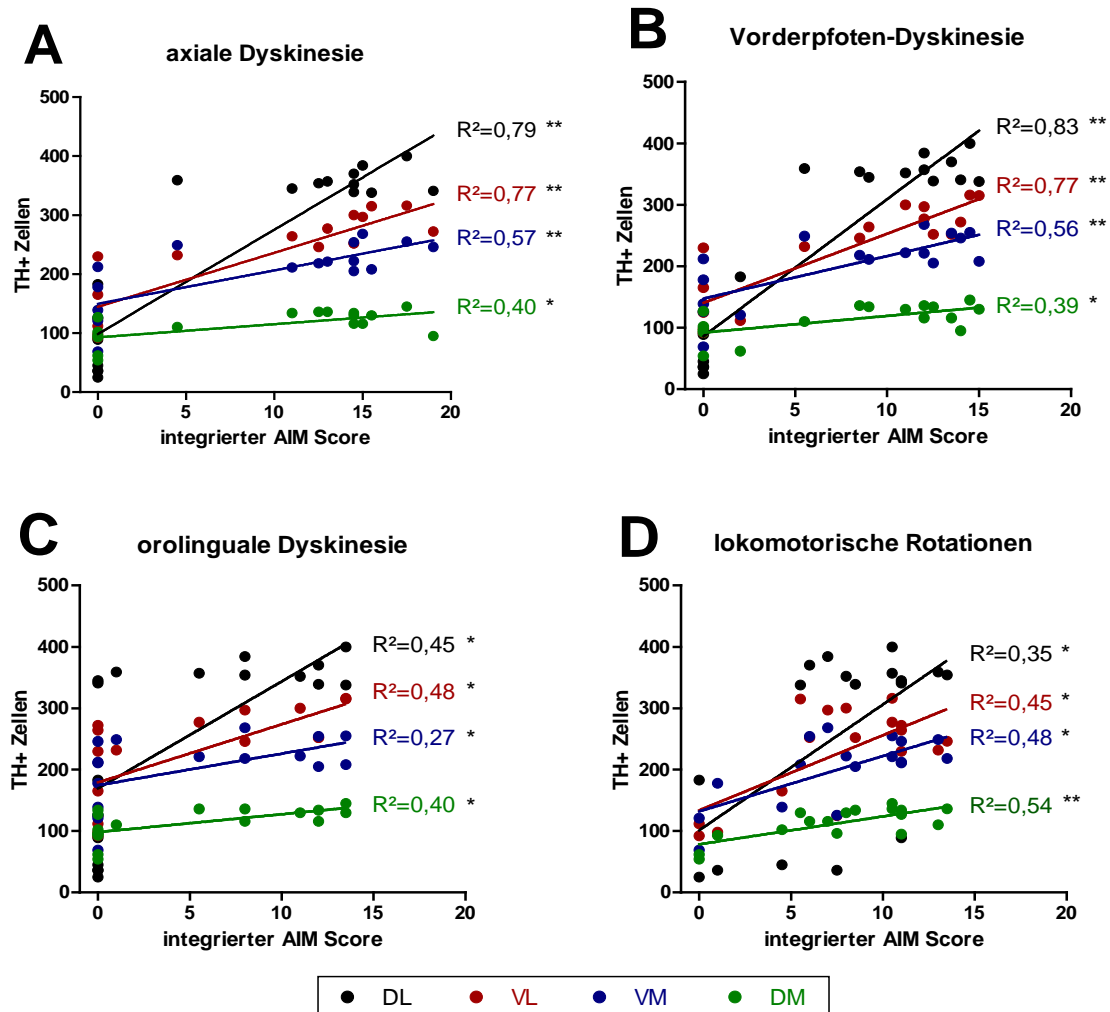


Abb. 3.15 Zusammenhang der Dyskinesie-Subtypen zu den TH Neuronen der vier striatalen Subregionen. Angegeben ist die absolute Anzahl TH+ Zellen in den lädierten Striata aller L-DOPA-behandelten Tiere sowie deren integrierter AIM Score am Behandlungstag 15. Sowohl axiale (A) als auch Vorderpfoten-Dyskinesien (B) zeigten enge positive Korrelationen zu der TH+ Zellzahl beider lateraler Subregionen, wohingegen orolinguale Dyskinesien moderat mit der VL gelegenen Zellzahl verknüpft schienen (C) und lokomotorische Rotationen am deutlichsten mit den TH+ Zellen der DM Subregion (D). * signifikant mit $p < 0,05$, ** signifikant mit $p < 0,001$. *Abkürzungen:* DL: dorsolateral, DM: dorsomedial, Striatum: Corpus striatum, TH+: Tyrosinhydroxylase-positiv, VL: ventrolateral, VM: ventromedial.

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend ist es in diesem Experiment gelungen, mit der 6-OHDA-Injektion in das MFB eine hochgradige Läsion der hier verlaufenden dopaminergen Neurone hervorzurufen, die sich durch den Verlust der in Striatum, Ncl. accumbens und Cortex projizierenden axonalen Fasern sowie durch den Untergang der in SNpc und VTA lokalisierten Zellkörper manifestierte. Dies entspricht einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium bei Parkinson-Patienten. Gleichzeitig nahm die striatale serotonerge Faserdichte infolge der Läsion zu.

Die anschließende Applikation von L-DOPA hatte weder einen toxischen noch einen regenerativen Effekt auf die im Mittelhirn entspringenden dopaminergen Neurone, da sich das Ausmaß der Degeneration bei L-DOPA-behandelten Tieren nicht zu dem bei den NaCl-behandelten Kontrolltieren unterschied. Auch eine schädliche oder wachstumsfördernde Wirkung von L-DOPA auf die striatale serotonerge Faserdichte konnte aufgrund vergleichbarer Innervationen der L-DOPA- und der Kontrollgruppe weitgehend ausgeschlossen werden. Hier zeigte sich lediglich eine Tendenz höherer serotonerger Faserdichten bei L-DOPA-behandelten Tieren.

Bei etwa 70% der lädierten und somit unilateral parkinsonoiden Mäuse löste die pulsatile L-DOPA-Behandlung Dyskinesien in Form von axialen, orolingualen und Vorderglied-AIMs aus. Immunhistochemische Analysen ergaben, dass die relative serotonerge Faserdichte im Striatum bei dyskinetischen im Vergleich zu nicht-dyskinetischen Tieren deutlich erhöht war. Zudem zeigte sich unter den Mäusen mit LID eine auffällige Zunahme striataler Δ FosB+ Zellen mit größter Ausprägung im lateralen Striatum, die darüber hinaus eng positiv mit dem integrierten AIM Score korrelierte. Im Hinblick auf die TH-positiven Zellen, die hier eindeutig als Neurone klassifiziert werden konnten, offenbarten unsere Ergebnisse einen deutlichen Zusammenhang zwischen deren Anzahl im lädierten Striatum und der Ausprägung von LID. Hierbei schienen vorwiegend axiale und Vorderglied-Dyskinesien mit den TH-positiven Zellen der beiden lateralen Subregionen in Beziehung zu stehen, während die orolingualen Dyskinesien am engsten mit der Zellzahl der ventrolateralen Subregion und lokomotorische Rotationen mit der der dorsomedialen Subregion assoziiert waren.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen TH-positiven Zellen im Striatum und der Entstehung von LID zu erforschen. Hierzu wurden 6-OHDA-lädierte Mäuse für 15 Tage mit L-DOPA behandelt und das Auftreten von LID untersucht. Anschließend wurden immunhistochemische Analysen zu den TH-positiven Zellen in Striatum, Ncl. accumbens und Cortex durchgeführt. Hierbei wurden weiterhin Δ FosB-positive Zellen und serotonerge Fasern im Striatum ausgewertet, die bekanntermaßen histologische Korrelate von LID sind. Die erhaltenen Ergebnisse legen nahe, dass die Expression striataler TH-positiver Zellen in der Tat bei der Ätiopathogenese der Dyskinesien eine Rolle spielt. In diesem Kapitel sollen zunächst das unilaterale MFB-6-OHDA-Mausmodell validiert und die hierbei auftretenden LID charakterisiert werden. Im Anschluss werden die Effekte der L-DOPA-Therapie sowie die zelluläre Plastizität im Rahmen der LID beleuchtet. Dabei wird die Funktionalität der TH-positiven Neurone diskutiert und zuletzt ein ganzheitliches, die Ergebnisse dieser Arbeit integrierendes Modell der Pathogenese von LID entworfen.

4.1 LID im unilateralen 6-OHDA Mausmodell

In dieser Arbeit wurde an Mäusen durch die unilaterale Injektion von 6-OHDA in das MFB eine subtotale Läsion dopaminerger nigrostriataler Neurone hervorgerufen, welche ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium des IPS repräsentiert und sich damit insbesondere für präklinische Therapie- und Dyskinesiastudien eignet. Durch die pulsatile L-DOPA-Behandlung wurde die Entstehung von LID provoziert und die AIMS wurden genau charakterisiert. Obwohl ein Großteil der Studien zu LID bislang am gut validierten Rattenmodell ausgeführt wurde (Cenci et al., 2002), haben Mäuse in den letzten Jahren mit ihrer starken Homologie zum menschlichen Genom und der Möglichkeit zur Schaffung genetisch veränderter Stämme als Spezies zur Erforschung von Dyskinesien an Beliebtheit gewonnen (Bradley, 2002; Iderberg et al., 2012). Zudem sind sie kosten- und zeitsparender in der Handhabung. Im Folgenden sollen die unilaterale MFB-6-OHDA-Läsion sowie die LID im Mausmodell diskutiert werden.

4.1.1 Die unilaterale MFB-6-OHDA-Läsion als Modell für das späte IPS

Das MFB eignete sich in dieser Arbeit aus mehreren Gründen als Zielstruktur für die 6-OHDA-Injektion. Zunächst wird hier im Unterschied zu anderen Injektionslokalisationen das höchste Ausmaß an nigrostriataler Degeneration verursacht, ohne dass eine injektionsbedingte Entzündungsreaktion und Vernarbung in den histologisch zu untersuchenden Hirnregionen, insbesondere im Striatum, entsteht. Das macht das Modell einerseits mit einem fortgeschrittenen IPS vergleichbar, andererseits liefert es für die immunhistochemischen Auswertungen von striatalen TH-positiven Zellen perfekte Bedingungen durch die fehlende Überlagerung durch TH-positive Fasern und den damit entstandenen „leeren Hintergrund“ im Striatum. Eine unilaterale Läsion bringt den Vorteil mit sich, dass die intakte Hemisphäre bei den IHC-Auswertungen als interne Kontrolle verwendet werden kann. Darüber hinaus wurde die MFB-Läsion als solche charakterisiert, infolge derer am meisten Mäuse LID entwickelten (Francardo et al., 2011; Smith et al., 2012). Dies steht im Einklang mit der zuvor publizierten Rolle der nigrostriatalen dopaminergen Degeneration als Risikofaktor für die Entstehung von LID (Di Monte et al., 2000; Linazasoro et al., 2004; Linazasoro, 2005; Ulusoy et al., 2010). Die genauen Koordinaten, die die effektivste Läsion hervorriefen, wurden in Vorversuchen ermittelt und führten in diesem Experiment schließlich zu einer immunhistochemisch validierten Depletion von 85% der dopaminergen nigralen Zellkörper sowie 88% der striatalen TH-positiven Fasern. Somit konnte eine hochgradige Läsion von gleicher Qualität erreicht werden wie sie in bisherigen Studien an der MFB-6-OHDA-Maus beschrieben wurde (Lundblad et al., 2004; Fasano et al., 2010). Die Läsion schließt auch die partielle Degeneration der kortikalen und der accumbalen Afferenzen aus dem ventralen Mittelhirn ein (hier je etwa 40% und 70% Läsion), was an 6-OHDA-behandelten Nagetieren ein bekannter Effekt ist (Kirik et al., 1998; Andersson et al., 1999) und auch bei IPS-Patienten beobachtet wurde (Uhl et al., 1985; Hirsch et al., 1988; German et al., 1989). Damit konnte in dieser Arbeit auch die Untersuchung dieser beiden Hirnregionen gewährleistet werden.

Als größter Unterschied dieses Modells zum Patienten sei an dieser Stelle der akut eintretende Effekt der 6-OHDA-Läsion im Gegensatz zu dem chronisch-progressiven Verlauf des IPS erwähnt. Auch bleibt das Auftreten von IPS-charakteristischen Lewy-Körperchen aus. Neben den beschriebenen degenerativen Effekten führte die 6-OHDA-Injektion bei der

Maus außerdem zu einer deutlichen Zunahme der serotonergen Faserinnervation im Striatum auf etwa 150%. Dieses Ergebnis scheint in Kontrast zu stehen zu dem Verlust serotonerger Projektionen, der in manchen Patienten mit fortgeschrittenem IPS beobachtet wurde (Bernheimer et al., 1961; Scatton et al., 1983; Kish et al., 2008). Auch in bisherigen Tierstudien wurden auf Basis einer nigrostriatalen Degeneration konträre Ergebnisse erzielt, die entweder 5-HT-Hypoinnervationen (Iwamoto et al., 1976; Breese et al., 1984; Rylander et al., 2010) oder serotonerges Wachstum im Striatum zeigten (Zhou et al., 1991; Maeda et al., 2003; Zeng et al., 2010). Hierbei ist zu beachten, dass solche Beobachtungen meist auf biochemischen Analysen des 5-HT-Gewebegehalts beruhten und somit nicht unmittelbar mit der hier immunhistochemisch bestimmten Dichte der Serotoninterminalen übereinstimmen müssen. Es könnte also auch zu einem Sprießen der 5-HT-Axone kommen, ohne dass das Endprodukt 5-HT konsekutiv vermehrt synthetisiert wird. Ein entscheidender Einflussfaktor für eine serotonerge Faserzunahme scheint ein niedriger striataler Dopaminspiegel im Rahmen der nigrostriatalen Depletion zu sein (Zhou et al., 1991), wohingegen die anderen Parameter, die zu solch unterschiedlichen Resultaten führten, weiterer Nachforschung bedürfen. In der Zusammenschau könnte man die Hypothese aufstellen, dass es infolge der dopaminergen Degeneration reaktiv zu einer Zunahme serotonerger Fasern im Striatum kommt, die das wahre Ausmaß der degenerierten serotonerger Projektionen bei IPS-Patienten maskiert (Kish et al., 2008). Funktionelle Bedeutung gewinnen die 5-HT-Projektionen in diesem Kontext durch ihre AADC, mit der sie durch die Umwandlung von L-DOPA in Dopamin an einer kompensatorischen Dopaminsynthese beteiligt sein könnten (Arai et al., 1995). Von der serotonergen Faserinnervation und den Lewy-Körperchen abgesehen, führte die hier angewandte 6-OHDA-Injektion in das MFB der Maus insgesamt zu einem nigrostriatalen Läsionsmuster, welches durchaus mit dem des humanen IPS im fortgeschrittenen Stadium vergleichbar und somit als Modell für dieses geeignet ist.

Ein weiterer Nutzen bei der Verwendung 6-OHDA-lädierter Nagetiere ist die Möglichkeit der nicht-invasiven Abschätzung des Läsionsgrades durch die beiden lange etablierten motorischen Verhaltenstests Zylindertest und Amphetamin-induzierter Rotationstest im offenen Feld (Ungerstedt und Arbuthnott, 1970; Schallert und Lindner, 1990). Auch in dieser Studie erwiesen sich die Tests als zweckmäßig, da die Tiere mit der oben genannten hochgradigen nigrostriatalen Depletion zuvor durch <20% Vorderpfotenberührungen der läSIONSKONTRALATERALEN, lädierten Pfote sowie durchschnittlich vier Nettorotationen pro

Minute zur lädierten Hemisphäre auffielen. Damit wurden sie in das Experiment aufgenommen.

Ein limitierendes Problem bei der MFB-Läsion an Mäusen stellte bisher die enorm hohe postoperative Mortalität von rund 80% dar (Lundblad et al., 2004; Grealish et al., 2010). Ursächlich hierfür scheinen primär die Dehydratation, eine hypokalorische Ernährung sowie die Hypothermie im Rahmen der hemiparkinsonoid eingeschränkten Beweglichkeit zu sein. Zusätzlich könnte die Motivation zur Nahrungsaufnahme durch die partielle Läsion der mesolimbischen, motivationssteuernden Projektionsbahn von VTA zum Ncl. accumbens beeinträchtigt sein. Um der hohen Sterblichkeit entgegenzuwirken, wurden in dieser Arbeit supportive Maßnahmen wie die postoperative Wärmezufuhr unter Infrarotlicht, die subkutane NaCl-Applikation und das Aufweichen der Nahrungspellets (für Details s. Kap. 2.3.2) durchgeführt. Hiermit konnte die postoperative Mortalität deutlich gesenkt werden, womit ein großer Nachteil des MFB-Mausmodells beseitigt wurde und dieses insgesamt zugänglicher gemacht wird.

4.1.2 L-DOPA-induzierte Dyskinesien im 6-OHDA Mausmodell

Die tägliche s.c. L-DOPA-Behandlung über 15 Tage führte bei etwa 70% der Mäuse zu LID in Form von axialen, orolingualen und Vorderpfoten(ax+ol+Vo)-Dyskinesien sowie lokomotorischen Rotationen, die wenige Minuten nach Applikation auftraten, nach einer Stunde ihr Maximum erreichten und 140 Minuten post injectionem wieder verschwanden. Die Entstehung und Ausprägung der LID zeigte sich unabhängig von dem Läsionsgrad der nigrostriatalen Neurone, der bei allen Versuchstieren >75% lag. Dies legt die Vermutung nahe, dass trotz vielfach beschriebener positiver Korrelation der dopaminergen Degeneration zu der Entstehung von LID (Winkler et al., 2002; Ulusoy et al., 2010) feine Abstufungen innerhalb einer ausgeprägten Depletion keinen Unterschied mehr für die Prädisposition zu Dyskinesien machen. Zudem scheint es einzelne Mäuse zu geben, die trotz starker Läsion nicht dyskinetisch werden. Letzteres Phänomen ist bei Nagetieren und Menschen bekannt und wird auf individuell variierende Suszeptibilität zurückgeführt (Calon et al., 2003; Linazasoro, 2005; Monville et al., 2009). In dieser Studie ermöglichte die fehlende Korrelation der nigrostriatalen Läsion mit den LID, die dopaminerge Degeneration

als direkten Einflussfaktor für AIMs auszuschließen und somit andere Parameter unabhängig von der Läsion untersuchen zu können.

Um eine zuverlässige Auswertung der AIMs zu gewährleisten, wurden die behandelten Mäuse 180 Minuten lang nach L-DOPA-Applikation gefilmt und die Dyskinesien nach der ersten „live-Analyse“ ein zweites Mal beurteilt und bestätigt. Die Validität dieses Dyskinesiomodells an sich ergab sich zum einen aus der Entstehung von LID infolge der L-DOPA-Therapie, zum anderen aus den Expressionsveränderungen von Δ FosB als etabliertem molekularem Marker für LID. So korrelierte die Anzahl Δ FosB-positiver Zellen im Striatum deutlich positiv mit der Entstehung und dem Ausmaß von AIMs und reproduzierte damit die Ergebnisse zahlreicher Studien an Mäusen (Lundblad et al., 2004; Pavón et al., 2006; Fasano et al., 2010), Ratten (Andersson et al., 1999; Winkler et al., 2002), nicht-humanen Primaten (Berton et al., 2009; Fasano et al., 2010) und IPS-Patienten (Lindgren et al., 2011).

Ein entscheidender Diskussionspunkt ist, inwiefern die LID von Mäusen diejenigen der IPS-Patienten repräsentieren können. Mit ihrem zeitlichen Verlauf spiegeln sie die menschlichen Peak-Dose-Dyskinesien wieder. In Bezug auf die motorischen Eigenschaften muss man natürlich die anatomischen Unterschiede berücksichtigen, die die Bewegungen von Maus und Mensch nicht exakt identisch erscheinen lassen. Dennoch sind die choreatoformen orolingualen und Vorderpfoten-AIMs sowie die dystonen axialen Bewegungen der Maus durchaus mit den dyskinetischen Bewegungsmustern des Menschen vergleichbar. Die lokomotorischen Rotationen können den humanen LID hingegen nicht unmittelbar zugeordnet werden und könnten auch lediglich aus einer asymmetrischen, sonst aber normalen lokomotorischen Aktivität resultieren. Die hieraus hervorgehende Annahme, dass murine ax+ol+Vo-AIMs ein funktionelles Äquivalent zu den LID bei IPS-Patienten darstellen, während lokomotorische Rotationen kritisch und separat bewertet werden sollten, wird von verschiedenen Beobachtungen gestützt. Zunächst wurde hier erfasst, dass vier von fünf Tieren, die keine ax+ol+Vo-Dyskinesien hatten, trotzdem lokomotorisch aktiv waren. Außerdem zeigten die Daten dieser und anderer Arbeiten klare anatomische Unterschiede in der Distribution Δ FosB-positiver Zellen bei ax+ol+Vo-AIMs im Vergleich zu lokomotorischen Rotationen: die ersten drei Bewegungsmuster gingen mit einer Zellvermehrung im lateralen, sensomotorischen Teil des Striatums einher, wohingegen die Lokomotorik mit den Δ FosB-positiven Zellen im dorsomedialen Anteil verknüpft war (Andersson et al., 1999; Lundblad et al., 2004). Interessanterweise entspricht das

sensomotorische Striatum von Nagetieren dem humanen Putamen, welches als motorischer Anteil des Striatums beim IPS sowohl mehr von der dopaminergen Degeneration betroffen ist als der Nucleus caudatus (Kish et al., 1988), als auch bei dyskinetischen Patienten erhöhte Δ FosB-Expressionen zeigte (Lindgren et al., 2011). Beachtenswert ist zudem die Tatsache, dass im 6-OHDA-Modell von Nagetieren verschiedene antidyskinetische Wirkstoffe die ax+ol+Vo-AIMs abmildern konnten, gegen lokomotorische Rotationen jedoch keinen Effekt hatten (Lundblad et al., 2002; Lundblad et al., 2005). Alles in allem sprechen diese Punkte also dafür, dass das Dyskinesie-Mausmodell mit den drei genannten AIM-Subtypen, jedoch exklusive der lokomotorischen Rotationen, die klinischen Hauptcharakteristika der menschlichen LID reproduzieren kann und damit ein potentielles Werkzeug für die Erforschung von LID darstellt.

Trotz der oben genannten Ähnlichkeiten bleibt die Diskrepanz zwischen den positiven Ergebnissen präklinischer Untersuchungen und den enttäuschenden Resultaten klinischer Studien bezüglich verschiedener antidyskinetischer Wirkstoffe (vgl. Kap. 1.3.2) ein kritischer Punkt. Mögliche Ursachen hierfür sind Unterschiede in der Dosierung von L-DOPA und den zu testenden Substanzen, Unterschiede des Alters und des genetischen Hintergrundes, die im murinen Modell meist unilaterale statt der humanen bilateralen Läsion sowie die lediglich beim Menschen mögliche Placebo-assoziierte Verbesserung der LID (Goetz et al., 2008; Calabresi et al., 2010). Hieraus wird deutlich, dass die Daten aus Studien mit Dyskinesie-Tiermodellen wie diesem trotz ihrer Vorteile vorsichtig zu bewerten sind. Zudem ergibt sich die Notwendigkeit, die Parameter von präklinischen Studien in Zukunft möglichst genau denen klinischer Studien anzugleichen, um prädiktiv valide und übertragbare Ergebnisse zu erhalten.

4.2 Neuronale Plastizität infolge der L-DOPA-Therapie

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass eine pulsatile L-DOPA-Therapie zentralnervöse Effekte im Sinne plastischer Veränderungen neuronaler striataler Strukturen herbeiführt. So ergaben die histologischen Analysen der Striata von L-DOPA-behandelten Mäusen eine tendenzielle, statistisch aber nicht signifikante Zunahme serotonerger Fasern sowie eine signifikant erhöhte Anzahl Δ FosB- und TH-positiver Zellen im Vergleich zu den mit NaCl behandelten Kontrolltieren. Auf die nigrostriatalen dopaminergen Projektionen hatte die L-DOPA-Therapie hingegen keinen Einfluss. Im Folgenden sollen diese Ergebnisse im Kontext der bisherigen Literatur diskutiert und die daraus hervorgehenden funktionellen Bedeutungen der jeweiligen Kompartimente beleuchtet werden.

4.2.1 Einfluss von L-DOPA auf die nigrostriatalen Projektionen

Die Ergebnisse zeigten, dass die L-DOPA-Behandlung keinen Einfluss auf das Ausmaß der nigrostriatalen dopaminergen Degeneration hatte. Hierdurch konnte nicht nur ein regenerativer, sondern auch ein toxischer Effekt ausgeschlossen werden, welcher der Substanz zuvor im Rahmen von in-vitro-Analysen durch seinen autooxidativen Metabolismus zugeschrieben wurde (Mytilineou et al., 1993; Pardo et al., 1995; Olanow et al., 2004). Das Ergebnis kann also weder den in der ELLDOPA-Studie klinisch determinierten protektiven Effekt von L-DOPA, noch die dort und in anderen SPECT- bzw. PET-Analysen beschriebene mögliche toxische Wirkung bestätigen (Guttman et al., 2001; Parkinson Study Group, 2002; Fahn et al., 2004). Es steht dafür im Einklang mit den Untersuchungen an post mortem Gehirnen, an denen keine re- bzw. degenerationsfördernde Wirkung von L-DOPA nachgewiesen werden konnte (Parkkinen et al., 2011).

Der entscheidende Unterschied, der zu den kontroversen Ergebnissen geführt haben könnte, liegt möglicherweise im Grad der IPS-bedingten nigrostriatalen Degeneration. Die drei zitierten Studien, die eine L-DOPA-getriggerte Denervation feststellten, untersuchten IPS-Patienten im frühen Krankheitsbeginn, wohingegen die post mortem Analysen wie auch die hiesigen Forschungen bei fortgeschrittenen Stadien stattfanden. Diese Abweichung zusammen mit der Beobachtung, dass L-DOPA bei gesunden Nagetieren zu einer

signifikanten Abnahme striataler TH-positiver Fasern führt (Fang et al., 2011; Depboylu et al., 2013), legt die Vermutung nahe, dass eine externe L-DOPA-Substitution bei weitgehend erhaltener nigrostriataler Innervation zu dopaminergem Überstimulierung führt. Zum Erhalt eines physiologischen Dopaminspiegels wird daraufhin adaptiv die endogene Produktion mittels TH reduziert. Von der Faserreduktion abgesehen geschieht dies womöglich über einen inhibitorischen D₂-Autorezeptor-vermittelten Feedbackmechanismus (Wolf und Roth, 1990) bei gleichzeitig gesteigerter präsynaptischer Wiederaufnahme durch den DAT (Schmitt und Reith, 2010; Depboylu et al., 2013). Im Gegensatz dazu kommt es bei einem fortgeschrittenen IPS mit ausgeprägter striataler Deafferenzierung wie in dieser Arbeit kaum mehr zu einer dopaminergen Überstimulierung, sodass der beschriebene Kompensationsmechanismus und eine weitere Abnahme nigrostriataler Projektionen ausbleiben. Alles in allem lässt sich also sagen, dass eine pulsatile L-DOPA-Therapie beim fortgeschrittenen IPS keinen Einfluss auf die nigrostriatalen Projektionen hatte. In Bezug auf die Klinik impliziert dies durch den starken symptomlindernden Effekt einen generell größeren Nutzen als Schaden einer L-DOPA-Behandlung bei langjährigen IPS-Patienten.

4.2.2 Einfluss von L-DOPA auf die striatale serotonerge Faserinnervation

Auch die 5-HT-Faserinnervation im Striatum unterschied sich nicht signifikant zwischen L-DOPA- und NaCl-behandelten Tieren, es fand sich jedoch eine leichte Tendenz zur Faserzunahme infolge der L-DOPA-Therapie. Diese macht die Ergebnisse anderer Studien an Nagetieren sowie nicht-humanen und humanen Primaten besser nachvollziehbar, bei denen nach chronischer L-DOPA-Applikation ein axonales Sprießen serotonerger Fasern beobachtet und der Substanz damit ein wachstumsfördernder Effekt zugesprochen wurde (Rylander et al., 2010; Zeng et al., 2010). Interessanterweise führte eine L-DOPA-Therapie bei parkinsonoiden Nagetieren gleichzeitig zu einer Reduktion der 5-HT-Konzentration im striatalen Gewebe (Everett und Borcharding, 1970; Carta et al., 2007; Smith et al., 2012) bzw. im Extrazellulärraum (Nicholas et al., 2008; Navailles et al., 2011). In Anbetracht der Tatsache, dass der striatale Dopaminspiegel parallel anstieg, scheint es wahrscheinlich, dass die serotonergen Fasern mit ihrer AADC auf Kosten der 5-HT-Synthese das applizierte L-DOPA zu Dopamin konvertieren. Die resultierenden erniedrigten Serotoninkonzentrationen sind wiederum Grundlage der Hypothese, dass eine

L-DOPA-Therapie häufig auftretende Ängstlichkeit oder Depressionen bei Parkinson-Patienten verstärken kann (Melamed et al., 1996; Eskow Jaunarajs et al., 2011; Navailles et al., 2011). Auch in dieser Arbeit wäre die Messung der 5-HT-Gewebskonzentration interessant gewesen, jedoch lässt sich die Methodik biochemischer und immunhistochemischer Analysen an einer begrenzten Anzahl von Versuchstieren und Geweben schwer vereinbaren. Wie bereits erwähnt zeigten die Daten dieser Arbeit eine veränderte 5-HT-Faserinnervation im Striatum, die jedoch nicht statistisch signifikant war. Somit konnte L-DOPA hier als alleiniger Trigger einer serotonergen Plastizität ausgeschlossen werden. Umso mehr in den Vordergrund rückt damit die Funktion striataler 5-HT-Projektionen im Kontext mit LID, welche noch in späteren Abschnitten durch den Vergleich L-DOPA-behandelter dyskinetischer und L-DOPA-behandelter nicht-dyskinetischer Tiere diskutiert werden soll.

4.2.3 Einfluss von L-DOPA auf striatale TH-positive Zellen

In dieser Arbeit führte die pulsatile L-DOPA-Therapie zu einer 30%igen Zunahme der TH-positiven Zellen im lädierten Striatum, die mit der gleichzeitig gesteigerten Δ FosB-Expression als allgemeinem Indikator für chronische Perturbationen korrelierte. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Beobachtungen vorheriger Studien an Nagetieren und nicht-humanen Primaten (Andersson et al., 2001; Jollivet et al., 2004; Darmopil et al., 2008; DiCaulo et al., 2012; Espadas et al., 2012). Auf der anderen Seite berichteten Huot et al. (2007; 2008) von einer Reduktion striataler TH-positiver Zellen infolge einer L-DOPA-Behandlung bei Primaten. Diese konträren Ergebnisse lassen sich am wahrscheinlichsten auf Unterschiede in Tiermodell und Therapieschema zurückführen. Insbesondere die bei Huot et al. im Vergleich zu dieser und anderen Studien eingesetzte höhere L-DOPA-Dosis könnte eine Zellreduktion begünstigt haben. Denn davon ausgehend, dass die TH-positiven Zellen durch das Dopamindefizit im Rahmen der nigrostriatalen Degeneration zahlenmäßig vermehrt und für eine kompensatorische striatale L-DOPA-Synthese verantwortlich sind (Tashiro et al., 1989; Betarbet et al., 1997; Meredith et al., 1999; Porritt et al., 2000; Lopez-Real et al., 2003; Tandé et al., 2006; Depboylu, 2014), scheint zunächst die Erklärung einleuchtend, dass sie infolge einer hochdosierten L-DOPA-Therapie ihre funktionelle Relevanz verlieren und somit wieder weniger exprimiert werden. Bei einer niedrigeren Dosis von L-DOPA könnte diese Reduktion ausbleiben.

Außerdem gilt zu bedenken, dass zumindest bei Nagetieren ein Teil der TH-positiven Zellen zusätzlich das Enzym AADC besitzt und damit eigens zur vollständigen Dopaminsynthese fähig sein könnte (Lopez-Real et al., 2003; Darmopil et al., 2008). Somit sind sie bei bestehender Depletion nigrostriataler dopaminerger Neurone selbst bei gleichzeitig externer Substitution von L-DOPA funktionell sinnvoll, was die hier beobachtete gesteigerte Zellzahl im Striatum erklären könnte. Hinzu kommt ein möglicher wachstumsfördernder Effekt von L-DOPA selbst (s. u.).

Viel diskutiert wurde die Frage nach dem Ursprung der vermehrten TH-positiven Neurone im Striatum. Diesbezüglich konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass verschiedene wachstumsfördernde Signalmoleküle wie der gliale und der hirneigene neurotrophe Faktor sowie der neuronale und der saure fibroblastische Wachstumsfaktor zu einer Zunahme an TH-positiven Zellen führten (Palfi 2002, Jollivet, 2004, Du 1995, Bjugstad 2005). Interessanterweise wird auch L-DOPA ein wachstumsstimulierender Effekt zugesprochen, indem es die Synthese und Ausschüttung von neurotrophen Faktoren im murinen Striatum stimuliert (Okazawa 1992) und zu einer Zunahme neuronaler Prekursorzellen in der benachbarten subventrikulären Zone führt (O'Sullivan 2011, Höglinger 2004). Die hier gefundene gesteigerte Expression TH-positiver Neurone könnte somit durch einen synergistischen neurotrophen Effekt durch die oben diskutierte nigrostriatale Degeneration selbst sowie durch die L-DOPA-Therapie entstanden sein. Im Einklang mit einer wachstumsfaktor-abhängigen Zellzunahme wurde zunächst die Idee der Neurogenese TH-positiver Neurone favorisiert. Mittlerweile konnte jedoch gezeigt werden, dass deren gesteigerte Expression auf einem phänotypischen Shift der striatalen GABAergen Interneurone in Richtung TH-positiver Zellen beruht (Tandé et al., 2006; Darmopil et al., 2008) oder durch eine hochregulierte Translation bereits vorhandener TH-mRNA in das TH-Protein zustande kommt (Huot und Parent, 2007). Dieser Prozess könnte durch die neurotrophen Signalmoleküle angestoßen werden, die genauen molekularen Signalwege bedürfen allerdings weiterer Forschung.

Über die Quantifizierung hinaus wurde in dieser Arbeit die neuronale Natur der TH-positiven Zellen mittels der TH/NeuN-Doppelimmunfluoreszenzfärbung bestätigt. Dies brachte auch den methodischen Vorteil mit sich, dass die Zellkörper eindeutig von ihren axonalen Varikositäten oder den nigrostriatalen Projektionen abgegrenzt werden konnten. Da die letztliche stereologische Quantifizierung TH-positiver Zellen allerdings an TH-gefärbten Hirnschnitten vollzogen wurde, kann eine leichte Verzerrung der Ergebnisse

durch Überlagerung TH-positiver nigrostriataler Projektionen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die hohen Läsionsgrade und die deutliche zelluläre Morphologie der TH-positiven Neurone machen eine Verwechslung jedoch unwahrscheinlich.

4.2.4 Einfluss auf accumbale und kortikale TH- und Δ FosB-positive Zellen

In den Regionen Ncl. accumbens und Cortex zeigte sich infolge der L-DOPA-Therapie keine Veränderung in der Expression TH-positiver Zellen, es waren allerdings vermehrt Δ FosB-positive Zellen im Ncl. accumbens aufzufinden. L-DOPA scheint also auch einen transkriptionsfördernden, sensitivierenden Effekt auf die accumbalen Zellen als Zentrum für Stimmung und Motivation zu haben (Zahm, 1999; Smith et al., 2012), was möglicherweise eine weitere Verbindung zu den neuropsychiatrischen Nebenwirkungen darstellen könnte. In Bezug hierauf könnten zukünftige L-DOPA-Therapiestudien mit psychologischen Verhaltenstests am Tiermodell weitere Erkenntnisse liefern.

4.3 Neuronale Plastizität bei LID

Im Fokus dieser Arbeit stand die Untersuchung der neuronalen, vorwiegend im Striatum lokalisierten präsynaptischen Veränderungen, die mit der Entstehung von LID einhergehen. Hierfür wurden insbesondere die TH-positiven Zellen bislang unbekannter Funktionalität analysiert, aber auch die Δ FosB-Expression als valider molekularer Marker sowie die serotonerge Faserdichte als bekannter Einflussfaktor von LID wurde ermittelt. Infolge der L-DOPA-Therapie zeigten 70% der Mäuse ausgeprägte AIMs. Diese dyskinetischen Tiere zeigten im Vergleich zu den nicht-dyskinetischen Mäusen eine signifikant erhöhte serotonerge Faserinnervation sowie eine deutliche Zunahme TH- und Δ FosB-positiver Zellen. Beide Zellzahlen korrelierten eng positiv sowohl miteinander, als auch jeweils mit den AIMs. Die Rolle dieser striatalen, präsynaptischen Strukturen bei der Entstehung von LID soll nun im Einzelnen diskutiert werden.

4.3.1 LID und die striatale serotonerge Faserinnervation

Vor einigen Jahren wurden serotonerge Projektionen im Striatum erstmals als präsynaptischer Einflussfaktor für die Entstehung von LID am 6-OHDA-Rattenmodell verantwortlich gemacht (Carta et al., 2007) und dessen spezieübergreifende Rolle seitdem in weiteren Studien an dyskinetischen Nagetieren, nicht-humanen Primaten und IPS-Patienten belegt (Lindgren et al., 2010; Rylander et al., 2010; Zeng et al., 2010; Smith et al., 2012). Eindrucksvoll sind diesbezüglich die Versuche an hemiparkinsonoiden Tiermodellen, die einerseits durch das funktionelle Ausschalten des serotonergen Systems im Rahmen von 5-HT-spezifischen Läsionen oder Applikation von 5-HT-Rezeptor-Agonisten bereits vorhandene LID eindämmen konnten (Carta et al., 2007; Eskow et al., 2009; Munoz et al., 2009), andererseits durch intrastriatale Implantation embryonaler serotonerger Neurone das Auftreten von Dyskinesien potenzierten (Carlsson et al., 2007). Als grundlegender Mechanismus, der die sprießenden 5-HT-Axone mit LID verknüpft, wird die hier stattfindende, AADC-abhängige Umwandlung von L-DOPA in Dopamin postuliert (Arai et al., 1995; Tanaka et al., 1999; Navailles et al., 2010). Da im Gegensatz zu den nigrostriatalen Neuronen ein autoregulatorischer Mechanismus wie durch den D₂-Rezeptor oder eine DAT-abhängige Wiederaufnahme fehlt, wird das Dopamin als sogenannter „falscher Transmitter“ unkontrolliert ausgeschüttet und es resultieren daraus hohe, fluktuierende extrazelluläre Dopaminspiegel (de la Fuente-Fernández et al., 2004; Pavese et al., 2006; Lindgren et al., 2010) – ein entscheidender Trigger für LID durch die supraphysiologische Stimulation und konsekutive Sensitivierung postsynaptischer D₁-Rezeptoren (Konradi et al., 2004; Aubert et al., 2005).

Auch in dieser Arbeit wurde bei dyskinetischen Tieren eine signifikant erhöhte 5-HT-Faserinnervation betont im posterioren Striatum beobachtet, die durchaus mit den Hypothesen vorheriger Studien vereinbar ist und die Rolle serotonerger Projektionen bei der Entstehung von LID unterstreicht. Gleichzeitig sollte man vorsichtig sein, dieses präsynaptische Kompartiment als einzigen und entscheidenden Einflussfaktor anzunehmen. So konnte in dieser Studie eine eher milde Korrelation ($R^2 = 0,46$; $p < 0,05$) zwischen SERT-positiven Fasern und AIMs gefunden werden. Beachtenswert sind auch die enttäuschenden Ergebnisse klinischer Studien zu 5-HT-Rezeptor-Agonisten als antidyskinetische Wirkstoffe (Goetz et al., 2007; Goetz et al., 2008), die darauf schließen lassen, dass von einer multifaktoriellen Genese auszugehen ist und noch weitere bedeutsame

Trigger für LID existieren. Zu diesen scheinen potentiell die TH-positiven Zellen im Striatum zu gehören, auf die im nächsten Abschnitt ausführlich eingegangen werden soll.

4.3.2 LID und TH-positive Zellen im Striatum

Das zentrale Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob die striatalen TH-positiven Zellen mit der Entstehung und Ausprägung von LID am 6-OHDA-Mausmodell zusammenhängen und als potentielle L-DOPA- bzw. Dopaminquelle im denervierten Striatum einen entscheidenden präsynaptischen Einflussfaktor für Dyskinesien darstellen könnten. Unsere Hypothese konnte durch die Ergebnisse dieser Arbeit eindrucksvoll bestätigt werden. So war nicht nur im Gruppenunterschied die Anzahl TH-positiver Zellen bei dyskinetischen im Vergleich zu nicht-dyskinetischen Tieren deutlich erhöht, sie korrelierte zudem eng mit den AIMS und mit der Anzahl Δ FosB-positiver Zellen als validem molekularen Marker für LID. Auch die intrastriatale Verteilung der TH-positiven Neurone spricht für deren ätiopathologische Rolle bei LID. Im lateralen Striatum war der Zusammenhang zu ax+ol+Vo-AIMS am stärksten ausgeprägt, wohingegen die Zellzahl im dorsomedialen Striatum am engsten mit den lokomotorischen Rotationen verknüpft zu sein schien. Diese Distribution korrespondiert mit der bereits beschriebenen Verteilung Δ FosB-positiver Zellen bei dyskinetischen Nagetieren und Patienten (s. Kap. 4.1.2), nach der das tierische laterale Striatum bzw. das diesem entsprechende humane Putamen als primärer Entstehungsort für Dyskinesien gilt. Es ist davon auszugehen, dass die TH-positiven Zellen gleichzeitig auch Δ FosB-positiv und somit transkribierend aktiv sind, was zuvor durch eine TH/ Δ FosB-Doppelimmunfluoreszenzfärbung bestätigt werden konnte (Darmopil et al., 2008).

Zu Beginn dieser Arbeit war unbekannt, ob die Expression striataler TH-positiver Zellen mit der Entstehung von LID zusammenhängt. Während der experimentellen Durchführung sind Francardo et al. (2011) und Smith et al. (2012) der gleichen Fragestellung am 6-OHDA-Mausmodell nachgegangen und wiesen eine enge Korrelation jeweils zwischen der Anzahl striataler TH-positiver Zellen, Δ FosB-positiver Zellen und der Ausprägung von AIMS nach. Die Reproduktion deren Ergebnisse durch diese Arbeit verleiht den TH-positiven Zellen als Faktor für die Entstehung von LID weiteren Nachdruck. Es verdeutlicht außerdem, dass nicht nur ein vergleichbares Studiendesign (Francardo et al.,

2011), sondern auch methodische Unterschiede wie eine deutlich höhere L-DOPA-Dosis im supratherapeutischen Bereich (25mg/kg KG), eine später einsetzende und längere Behandlungsdauer und eine SN-lokalisierte 6-OHDA-Injektion (Smith et al., 2012) ebenfalls zu erhöhten Zellzahlen bei dyskinetischen Tieren führen. Beide Arbeiten haben aber weder eine Unterteilung des Striatums in mediale und laterale Subregionen vorgenommen, noch den neuronalen Phänotyp der TH-positiven Zellen gesichert. Auch die Rolle dieser Zellen in Ncl. accumbens und Cortex blieb unbeleuchtet. Dafür lieferten die Resultate dieser Arbeit diesbezüglich weiterführende Informationen.

Von nicht unerheblichem Interesse im Hinblick auf die Funktion der TH-positiven Zellen und deren Rolle bei LID ist deren zelluläre Ausstattung zur Transmitterbereitstellung. Hierzu wären zusätzliche doppel-immunfluoreszenzgestützte Analysen zur Koexpressionen der Zellen mit DAT, VMAT-2 und AADC interessant gewesen. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf anderen Analysen lag, wird sich im Folgenden auf die Erkenntnisse vorheriger Studien berufen. Der DOPAerge Charakter der TH-positiven Neurone ist durch die Expression von TH gegeben, mit der sie L-DOPA aus L-Tyrosin produzieren können. Darüber hinaus wurde von Untersuchungen an Nagetieren und non-humanen Primaten berichtet, bei denen bis zu 50% dieser Zellen im Striatum zusätzlich AADC exprimieren und somit zur vollständigen Dopaminsynthese fähig sind (Lopez-Real et al., 2003; Weihe et al., 2006; Darmopil et al., 2008).

Neben der enzymatischen Ausstattung ist auch der Mechanismus der Transmitterausschüttung von Bedeutung. Hierüber besteht allerdings Ungewissheit, da die TH-positiven Neurone keinen VMAT-2 exprimieren und somit nicht in der Lage sind, die Katecholamine in Vesikel zu verpacken und exozytotisch auszuschütten (Hoffman et al., 1998; Weihe et al., 2006; Depboylu, 2014). Dies lässt eine klassische monoaminerge Exozytose ausschließen und stattdessen eine non-exozytotische Abgabe vermuten, wie sie beispielsweise DAT-vermittelt bei VMAT-2-defizienten dopaminergen Zellen des murinen Mittelhirns beschrieben wurde (Fon et al., 1997). Diese Annahme ist jedoch nur für DAT-exprimierende DOPAerge Zellen anzuwenden und begrenzt insofern, als die TH-positiven Neurone bei Nagetieren keinen DAT zu besitzen scheinen (Darmopil et al., 2008; Depboylu, 2014), sondern dieser vorwiegend in den striatalen TH-positiven Zellen von humanen und nicht-humanen Primaten nachgewiesen werden konnte (Cossette et al., 2005; Tandé et al., 2006; Huot et al., 2007). Eine andere Möglichkeit wäre eine Vesikel-abhängige Exozytose gemeinsam mit GABA durch den vesikulären inhibitorischen

Aminosäuretransporter, wie sie in den ursprünglich GABAergen Neuronen vor ihrem phänotypischen Shift in TH-positive Zellen stattfindet (McIntire et al., 1997; Omote und Moriyama, 2013). Insgesamt bleibt der genaue Mechanismus der Katecholaminabgabe unklar und gibt Anlass zu weiteren Nachforschungen. Soweit lässt sich allerdings sagen, dass die TH-positiven Neurone durch ihre Fähigkeit zur Synthese von L-DOPA oder Dopamin und deren vermutlich unkontrollierte Ausschüttung im Striatum durchaus einen potentiellen Trigger für die Entstehung von LID darstellen.

4.3.3 Die Rolle von Ncl. accumbens und Cortex bei LID

Zum einen zeigten die histologischen Untersuchungen des Cortex und Ncl. accumbens eine signifikant stärkere Läsion TH-positiver Fasern bei dyskinetischen im Vergleich zu nicht-dyskinetischen Tieren. Eine kortikale dopaminerge Degeneration wurde auch in einer kürzlich durchgeführten Studie, bei der Oszillationen des Cortex gemessen wurden, als wichtiger Einflussfaktor für LID postuliert (Halje et al., 2012). Dies regt dazu an, diesem relativ neu beschriebenen Zusammenhang in weiteren Studien, vor allem auch an humanen post mortem Gehirnen, nachzugehen.

In Bezug auf die TH-positiven Neurone gingen die Dyskinesien weder im Cortex noch im Ncl. accumbens mit einer veränderten Zellzahl einher. Zudem war die Anzahl accumbaler FosB-positiver Zellen bei dyskinetischen Tieren sogar niedriger als bei nicht-dyskinetischen. Somit können diese Zelltypen im Cortex und Ncl. accumbens als Trigger für die Entstehung der LID zumindest in dieser Arbeit ausgeschlossen werden, was auch im Einklang steht mit den Untersuchungen FosB-positiver Zellen des Ncl. accumbens bei dyskinetischen Ratten (Andersson et al., 1999). Die Abgrenzung des Ncl. accumbens von LID ist insofern nachvollziehbar, als er bisher als Struktur für limbische Funktionen eingeordnet wurde (Zahm, 1999) und somit keine große Rolle bei motorischen Mustern wie Dyskinesien zu spielen scheint. Lediglich der Zusammenhang zu Lokomotorik und Kiefernbeugungen konnte bisher nachgewiesen werden (Prinssen et al., 1994; Zahm, 1999). Dies könnte auch der Grund dafür sein, dass in Kontrast zu den bisher geschilderten Daten eine einzelne Studie an 6-OHDA-lädierten Mäusen mit gleicher L-DOPA-Dosis, jedoch fast dreifacher Behandlungsdauer eine moderate Korrelation zwischen der Anzahl Δ FosB-positiver Zellen im Ncl. accumbens und AIMS aufzeigen konnte (Smith et al., 2012). Die Kaubewegungen

könnten hier als orolinguale Dyskinesien gedeutet worden sein und den AIM-Score somit erhöht haben. In der Studie wurde der Zusammenhang zu der Zellzahl außerdem nicht im gesamten Ncl. accumbens, sondern in dessen Kern gefunden, der gleichzeitig vulnerabler für eine 6-OHDA-Läsion sein soll als dessen Schale (Lancia et al., 2004). Eine Unterteilung des Ncl. accumbens nach Kern und Schale wäre zum besseren Vergleich auch in dieser Arbeit interessant gewesen.

Zusammenfassend lässt sich nun sagen, dass entsprechend den Daten dieser Arbeit zwar die dopaminerge Faserdichte in Cortex und Ncl. accumbens, jedoch weder kortikale noch accumbale TH-positive Zellen Einfluss auf die Entstehung von LID zu haben scheinen. Die Rolle des Ncl. accumbens, vor allem für orolinguale AIMS, ist allerdings noch nicht endgültig geklärt und bedarf zukünftiger Untersuchungen.

4.4 Synopsis: TH-positive Zellen als präsynaptischer Einflussfaktor bei der Entstehung von LID

Auf dem Boden der Ergebnisse dieser Arbeit lässt sich im Zusammenspiel mit der bisherigen Literatur ein integrativer Erklärungsansatz zur Ätiopathogenese von LID entwerfen (s. Abb. 4.16). Die Schlüsselrolle spielt hierbei die fluktuierend erhöhte extrazelluläre Dopaminkonzentration des Striatums infolge der L-DOPA-Applikation (de la Fuente-Fernández et al., 2004; Meissner et al., 2006; Pavese et al., 2006; Lindgren et al., 2010). Zu Beginn der Parkinson-Krankheit sind die verbliebenen nigrostriatalen dopaminergen Projektionen noch in der Lage, das L-DOPA mit seiner kurzen Halbwertszeit in Dopamin zu konvertieren, dieses zu speichern und reguliert auszuschütten, womit eine exzessive Dopaminrezeptor-Stimulation und dessen Sensitivierung verhindert werden kann. Mit zunehmender nigrostriataler Degeneration entfällt diese Pufferkapazität. Gleichzeitig werden vermehrt TH-positive Zellen exprimiert, vermutlich als reaktiver Mechanismus beim IPS zur kompensatorischen Bereitstellung von L-DOPA bzw. Dopamin. Dies geschieht wahrscheinlich durch Induktion GABAerger striataler Interneurone in Richtung eines DOPAergen oder dopaminergen Phänotyps (Tandé et al., 2006) oder durch hochregulierte

Translation bereits vorhandener TH-mRNA in das TH-Protein (Huot und Parent, 2007). Die parallel sprießenden serotonergen Terminale im Striatum decarboxylieren sowohl das extern zugeführte als auch das in TH-positiven Zellen gebildete L-DOPA zu Dopamin und schütten es unreguliert aus. Es besteht also eine synergistische Aktivität monoenzymatischer TH-positiver Neurone und serotonerger AADC-exprimierender Fasern im Striatum für eine kooperative Dopaminsynthese (Ugrumov, 2013). Auch andere Zelltypen mit AADC können hierzu in kleinerem Rahmen beisteuern (Hardebo et al., 1980; Melamed et al., 1980; Juorio et al., 1993). Die Dopaminproduktion kann sich einerseits positiv auf den absoluten Dopaminmangel im Rahmen des IPS auswirken, andererseits aber im Verlauf verheerende Konsequenzen haben. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass dyskinetische Mäuse eine deutlich erhöhte Zahl TH-positiver Zellen und eine erhöhte Dichte serotonerger Fasern im Striatum aufwiesen, sodass der Versuch, das dopaminerge Defizit des IPS zu kompensieren, bei diesen Tieren über das Ziel hinausschoss und in Kombination mit einer L-DOPA-Therapie Dyskinesien herbeiführte. Die erhöhten und schwankenden extrazellulären Dopaminspiegel bewirken eine supraphysiologische D₁-Rezeptorstimulation mit konsekutiv postsynaptischen Veränderungen (vgl. Kap. 1.3.1), die schließlich in einer Überaktivität der GABAergen MSN mit exzessiven Entladungen zugunsten des direkten, bewegungsfördernden Wegs münden (s. Abb. 1.1C). Das Resultat ist die unkontrollierte Ausführung dyskinetischer Bewegungsmuster nach L-DOPA-Applikation.

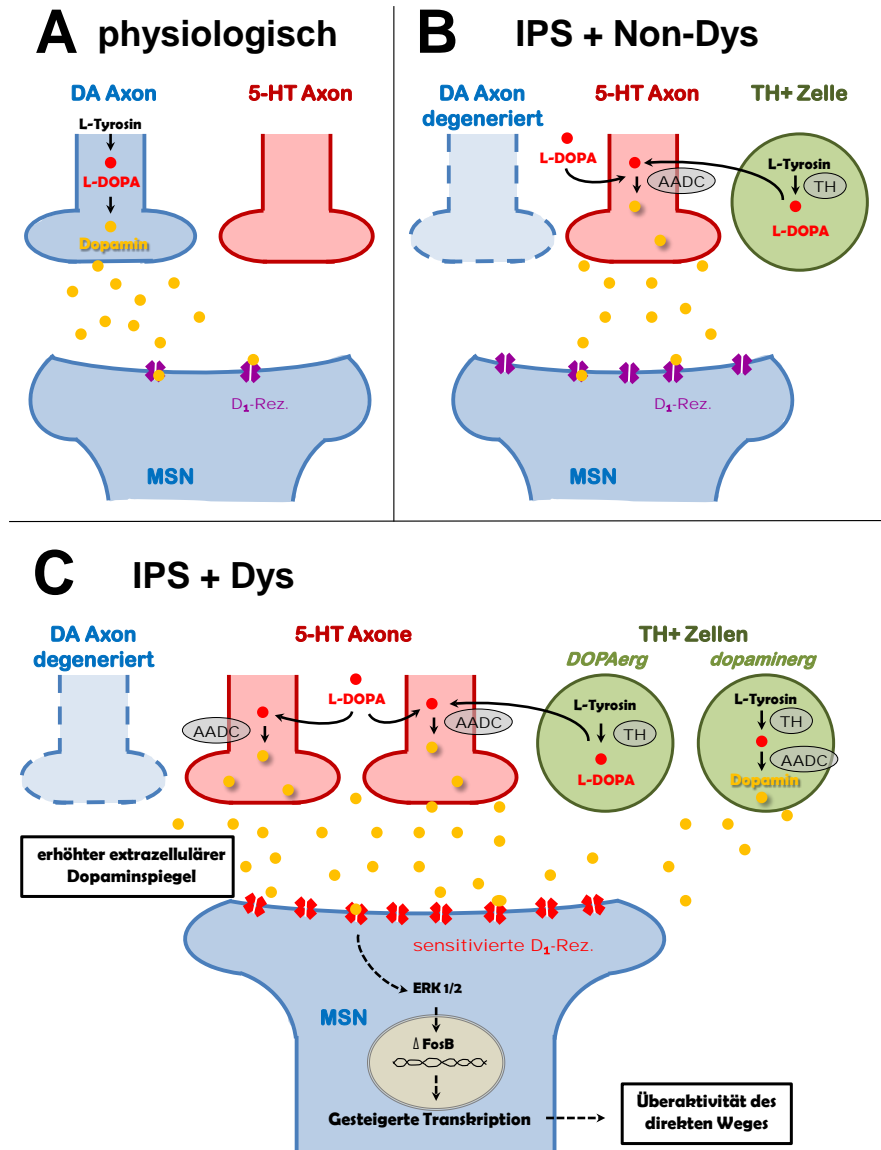


Abb. 4.16 Ätiopathogenese der L-DOPA-induzierten Dyskinesien. Das Schema illustriert vereinfacht prä- und postsynaptische Zellen des Striatums im gesunden Gehirn (A) sowie die neuronalen plastischen Veränderungen beim IPS ohne Dyskinesien (B) und beim IPS mit Dyskinesien (C). Während im gesunden Zustand die nigrostriatalen dopaminergen Neurone (DA Axon) ausreichend Dopamin produzieren (A), muss beim IPS oral L-DOPA zugeführt werden, welches zunehmend in serotonergen Fasern (5-HT Axone) zu Dopamin decarboxyliert und unreguliert ausgeschüttet wird. Zum geringen Teil findet diese Konversion auch in AADC-positiven Neuronen und evtl. auch in Endothelien statt (zur besseren Übersicht hier nicht abgebildet). Zudem tragen Tyrosinhydroxylase-positive (TH+) Zellen kompensatorisch zur L-DOPA- bzw. Dopaminsynthese bei (B). Im dyskinetischen Zustand sind diese TH+ Neurone sowie die 5-HT-Fasern so stark vermehrt, dass deren kooperative Dopaminsynthese in Kombination mit der externen L-DOPA-Gabe zu erhöhten extrazellulären Dopaminkonzentrationen führt (C). Manche TH+ Zellen produzieren möglicherweise auch eigens Dopamin. Das pulsatil übermäßige Dopamin bewirkt eine Sensitivierung der postsynaptischen D₁-Rezeptoren (D₁-Rez.) der GABAergen Projektionsneurone des Striatums (MSN). Die dadurch gesteigerten Signalkaskaden münden letztlich in einer Überaktivität des direkten Weges mit ausgeprägten LID. *Abkürzungen:* AADC: L-Aromatische-Aminosäure-Decarboxylase, ERK1/2: extrazelluläre signalregulierte Kinase 1 und 2 Striatum: Corpus striatum.

4.5 Ausblick und klinische Implikationen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass striatale TH-positive Zellen durch ihre Fähigkeit zur eigenen oder kooperativen Dopaminsynthese einen entscheidenden präsynaptischen Trigger zur Entstehung von LID darstellen. Bislang weckten diese Neurone weitgehend unklarer Funktionalität bei Forschern Ideen für neue therapeutische Optionen des IPS. So könnte deren genetische Manipulation hin zu einem dopaminergen Phänotyp und deren Stimulation durch Wachstumsfaktoren eine kompensatorische intrastriatale Dopaminquelle darstellen. Aus unseren Ergebnissen geht jedoch klar hervor, dass sie als Kehrseite LID hervorrufen können. Dies ist bei zukünftigen Studien, die sich diese DOPAergen Neurone zunutze machen wollen, kritisch zu beachten.

Auf der anderen Seite könnte die hier gewonnene tiefere Erkenntnis zur Pathogenese der LID innovative Möglichkeiten für antidyskinetische Therapien bieten. Haben die bisherigen diversen Wirkstoffklassen in klinischen Studien wenig Wirkung gezeigt, so könnten die hier charakterisierten TH-positiven Zellen des Striatums einen hoffnungsvollen Ansatzpunkt für zukünftige Behandlungen von LID liefern. Dafür müsste deren synthetisierende Funktion eingedämmt werden. Einen ersten Schritt zur Erforschung der resultierenden Effekte könnten Studien an TH-knock-out-Mäusen liefern. Accumbale und kortikale TH-positive Neurone müssen gegebenenfalls als nebenwirkungsfördernde Regionen bei einer solchen antidyskinetischen Therapie berücksichtigt werden. Entsprechende Verhaltensanalysen zu deren Funktion, wie sie hier zu den striatalen DOPAergen Zellen mittels Dyskinesie-Scoring durchgeführt wurden, fehlen bis dato.

Darüber hinaus ist noch einige Forschung zu der Funktion TH-positiver Zellen nötig. Insbesondere deren genauer Ursprung und Phänotyp, die speziesabhängige Enzymausstattung sowie der Mechanismus der Transmitterausschüttung sind bisher noch nicht vollständig geklärt. Wichtig wären Untersuchungen an non-humanen Primaten, die die neuronalen Strukturen des Menschen am ehesten widerspiegeln. Hier müssten auch unsere Ergebnisse, sowie die von Smith und Francardo, reproduziert werden, bevor sie auf den Menschen zu übertragen sind.

Alles in allem tragen die Resultate dieser Arbeit zu einem besseren Verständnis der Ätiopathogenese von LID bei, indem sie die TH-positiven Zellen des Striatums als zuvor unbekanntem präsynaptischen Einflussfaktor am 6-OHDA-Mausmodell identifizieren

konnten. Damit liefert diese Studie einen neuen Aspekt für die weitere Erforschung von LID und einen möglichen Grundstein für zukünftige antidyskinetische Therapieansätze.

Literaturverzeichnis

- Abercrombie ED, Bonatz AE, Zigmond MJ (1990) Effects of L-dopa on extracellular dopamine in striatum of normal and 6-hydroxydopamine-treated rats. *Brain Res* 525:36-44.
- Ahlskog JE, Muentner MD (2001) Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov Disord* 16:448-458.
- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366-375.
- Alonso-Frech F, Zamarbide I, Alegre M, Rodríguez-Oroz MC, Guridi J, Manrique M, Valencia M, Artieda J, Obeso JA (2006) Slow oscillatory activity and levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Brain* 129:1748-1757.
- Andersson M, Hilbertson A, Cenci MA (1999) Striatal fosB expression is causally linked with L-DOPA-induced abnormal involuntary movements and the associated upregulation of striatal prodynorphin mRNA in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 6:461-474.
- Andersson M, Konradi C, Cenci MA (2001) cAMP response element-binding protein is required for dopamine-dependent gene expression in the intact but not the dopamine-denervated striatum. *J Neurosci* 21:9930-9943.
- Antonini A, Isaias IU, Canesi M, Zibetti M, Mancini F, Manfredi L, Dal Fante M, Lopiano L, Pezzoli G (2007) Duodenal levodopa infusion for advanced Parkinson's disease: 12-month treatment outcome. *Mov Disord* 22:1145-1149.
- Arai R, Karasawa N, Geffard M, Nagatsu I (1995) L-DOPA is converted to dopamine in serotonergic fibers of the striatum of the rat: a double-labeling immunofluorescence study. *Neurosci Lett* 195:195-198.
- Aubert I, Guigoni C, Håkansson K, Li Q, Dovero S, Barthe N, Bioulac BH, Gross CE, Fisone G, Bloch B, Bezard E (2005) Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. *Ann Neurol* 57:17-26.
- Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O (1961) [Distribution of 5-hydroxytryptamine (serotonin) in the human brain and its behavior in patients with Parkinson's syndrome]. *Klinische Wochenschrift* 39:1056-1059.
- Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F (1973) Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci* 20:415-455.
- Berthet A, Porras G, Doudnikoff E, Stark H, Cador M, Bezard E, Bloch B (2009) Pharmacological analysis demonstrates dramatic alteration of D1 dopamine receptor neuronal distribution in the rat analog of L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurosci* 29:4829-4835.
- Berton O, Guigoni C, Li Q, Bioulac BH, Aubert I, Gross CE, Dileone RJ, Nestler EJ, Bezard E (2009) Striatal overexpression of DeltaJunD resets L-DOPA-induced dyskinesia in a primate model of Parkinson disease. *Biol Psychiatry* 66:554-561.
- Betarbet R, Turner R, Chockkan V, DeLong MR, Allers KA, Walters J, Levey AI, Greenamyre JT (1997) Dopaminergic neurons intrinsic to the primate striatum. *J Neurosci* 17:6761-6768.
- Bibbiani F, Oh JD, Chase TN (2001) Serotonin 5-HT1A agonist improves motor complications in rodent and primate parkinsonian models. *Neurology* 57:1829-1834.

- Birkmayer W, Hornykiewicz O (2001) The effect of l-3,4-dihydroxyphenylalanine (= DOPA) on akinesia in parkinsonism. 1961. *Wien Klin Wochenschr* 113:851-854.
- Björklund T, Carlsson T, Cederfjäll EA, Carta M, Kirik D (2010) Optimized adeno-associated viral vector-mediated striatal DOPA delivery restores sensorimotor function and prevents dyskinesias in a model of advanced Parkinson's disease. *Brain* 133:496-511.
- Blanchet PJ, Allard P, Grégoire L, Tardif F, Bédard PJ (1996) Risk factors for peak dose dyskinesia in 100 levodopa-treated parkinsonian patients. *Can J Neurol Sci* 23:189-193.
- Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24:197-211.
- Bradley A (2002) Mining the mouse genome. *Nature* 420:512-514.
- Breese GR, Baumeister AA, McCown TJ, Emerick SG, Frye GD, Crotty K, Mueller RA (1984) Behavioral differences between neonatal and adult 6-hydroxydopamine-treated rats to dopamine agonists: relevance to neurological symptoms in clinical syndromes with reduced brain dopamine. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 231:343-354.
- Calabresi P, Di Filippo M, Ghiglieri V, Tambasco N, Picconi B (2010) Levodopa-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease: filling the bench-to bedside gap. *Lancet Neurol* 9:1106-1117.
- Calon F, Morissette M, Rajput AH, Hornykiewicz O, Bedard PJ, Di Paolo T (2003) Changes of GABA receptors and dopamine turnover in the postmortem brains of parkinsonians with levodopa-induced motor complications. *Mov Disord* 18:241-253.
- Carlsson T (2007) Cell and Gene Therapy for Parkinson's Disease: Therapeutic Effect and Modulation of Dyskinesias in the 6-OHDA Rat Model. Lund, Sweden: Grahns Tryckeri AB.
- Carlsson T, Carta M, Muñoz A, Mattsson B, Winkler C, Kirik D, Björklund A (2009) Impact of grafted serotonin and dopamine neurons on development of L-DOPA-induced dyskinesias in parkinsonian rats is determined by the extent of dopamine neuron degeneration. *Brain* 132:319-335.
- Carlsson T, Carta M, Winkler C, Björklund A, Kirik D (2007) Serotonin neuron transplants exacerbate L-DOPA-induced dyskinesias in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 27:8011-8022.
- Carlsson T, Winkler C, Lundblad M, Cenci MA, Björklund A, Kirik D (2006) Graft placement and uneven pattern of reinnervation in the striatum is important for development of graft-induced dyskinesia. *Neurobiol Dis* 21:657-668.
- Carta M, Carlsson T, Kirik D, Björklund A (2007) Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. *Brain* 130:1819-1833.
- Cenci MA, Lee CS, Björklund A (1998) L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA. *Eur J Neurosci* 10:2694-2706.
- Cenci MA, Lindgren HS (2007) Advances in understanding L-DOPA-induced dyskinesia. *Curr Opin Neurobiol* 17:665-671.
- Cenci MA, Lundblad M (2006) Post- versus presynaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurochem* 99:381-392.
- Cenci MA, Whishaw IQ, Schallert T (2002) Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nat Rev Neurosci* 3:574-579.
- Cossette M, Lecomte F, Parent A (2005) Morphology and distribution of dopaminergic neurons intrinsic to the human striatum. *J Chem Neuroanat* 29:1-11.

- Cotzias GC, Van Woert MH, Schiffer LM (1967) Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *N Engl J Med* 276:374-379.
- Crosby NJ, Deane KH, Clarke CE (2003) Amantadine for dyskinesia in Parkinson's disease. *Cochrane Database Syst Rev* CD003467.
- Darmopil S, Martín AB, De Diego IR, Ares S, Moratalla R (2009) Genetic inactivation of dopamine D1 but not D2 receptors inhibits L-DOPA-induced dyskinesia and histone activation. *Biol Psychiatry* 66:603-613.
- Darmopil S, Muñetón-Gómez VC, de Ceballos ML, Bernson M, Moratalla R (2008) Tyrosine hydroxylase cells appearing in the mouse striatum after dopamine denervation are likely to be projection neurons regulated by L-DOPA. *Eur J Neurosci* 27:580-592.
- de la Fuente-Fernández R, Sossi V, Huang Z, Furtado S, Lu JQ, Calne DB, Ruth TJ, Stoessl AJ (2004) Levodopa-induced changes in synaptic dopamine levels increase with progression of Parkinson's disease: implications for dyskinesias. *Brain* 127:2747-2754.
- de Lau LM, Breteler MM (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. In: *Lancet Neurol*, vol. 5, pp 525-535 England.
- de Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, Fratiglioni L, Lobo A, Martinez-Lage J, Trenkwalder C, Hofman A (2000) Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Neurology* 54:S21-23.
- Depboylu C (2014) Non-serine-phosphorylated tyrosine hydroxylase expressing neurons are present in mouse striatum, Ncl. accumbens and cortex that increase in number following dopaminergic denervation. *J Chem Neuroanat* 56C:35-44.
- Depboylu C, Maurer L, Matusch A, Hermanns G, Windolph A, Behe M, Oertel WH, Hoglinger GU (2013) Effect of long-term treatment with pramipexole or levodopa on presynaptic markers assessed by longitudinal [¹²³I]FP-CIT SPECT and histochemistry. *NeuroImage* 79:191-200.
- Deuschl G, Schade-Brittinger C, Krack P, Volkmann J, Schäfer H, Bötzel K, Daniels C, Deuschländer A, Dillmann U, Eisner W, Gruber D, Hamel W, Herzog J, Hilker R, Klebe S, Kloss M, Koy J, Krause M, Kupsch A, Lorenz D, Lorenzl S, Mehdorn HM, Moringlane JR, Oertel W, Pinski MO, Reichmann H, Reuss A, Schneider GH, Schnitzler A, Steude U, Sturm V, Timmermann L, Tronnier V, Trottenberg T, Wojtecki L, Wolf E, Poewe W, Voges J, German Parkinson Study Group NuS (2006) A randomized trial of deep-brain stimulation for Parkinson's disease. *N Engl J Med* 355:896-908.
- Devos D, Group FDS (2009) Patient profile, indications, efficacy and safety of duodenal levodopa infusion in advanced Parkinson's disease. *Mov Disord* 24:993-1000.
- Di Monte DA, McCormack A, Petzinger G, Janson AM, Quik M, Langston WJ (2000) Relationship among nigrostriatal denervation, parkinsonism, and dyskinesias in the MPTP primate model. *Mov Disord* 15:459-466.
- DiCaudo C, Riverol M, Mundiñano IC, Ordoñez C, Hernández M, Marcilla I, Luquin MR (2012) Chronic levodopa administration followed by a washout period increased number and induced phenotypic changes in striatal dopaminergic cells in MPTP-monkeys. *PLoS One* 7:e50842.
- Dodel RC, Berger K, Oertel WH (2001) Health-related quality of life and healthcare utilisation in patients with Parkinson's disease: impact of motor fluctuations and dyskinesias. *Pharmacoeconomics* 19:1013-1038.

- Dodel RC, Singer M, Köhne-Volland R, Selzer R, Scholz W, Rathay B, Oertel WH (1997) [Cost of illness in Parkinson disease. A retrospective 3-month analysis of direct costs]. *Nervenarzt* 68:978-984.
- Dubach M, Schmidt R, Kunkel D, Bowden DM, Martin R, German DC (1987) Primate neostriatal neurons containing tyrosine hydroxylase: immunohistochemical evidence. *Neurosci Lett* 75:205-210.
- Eggert KM, Oertel WH, Reichmann H (2012) Parkinson-Syndrome - Diagnostik und Therapie. In: Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, vol. 5 (Diener, H. C. and Weimar, C., eds) Stuttgart: Kommission "Leitlinien" der Deutschen Gesellschaft für Neurologie.
- Eskow Jaunarajs KL, Angoa-Perez M, Kuhn DM, Bishop C (2011) Potential mechanisms underlying anxiety and depression in Parkinson's disease: consequences of l-DOPA treatment. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 35:556-564.
- Eskow KL, Dupre KB, Barnum CJ, Dickinson SO, Park JY, Bishop C (2009) The role of the dorsal raphe nucleus in the development, expression, and treatment of L-dopa-induced dyskinesia in hemiparkinsonian rats. *Synapse (New York, NY)* 63:610-620.
- Espadas I, Darmopil S, Vergaño-Vera E, Ortiz O, Oliva I, Vicario-Abejón C, Martín ED, Moratalla R (2012) L-DOPA-induced increase in TH-immunoreactive striatal neurons in parkinsonian mice: insights into regulation and function. *Neurobiol Dis* 48:271-281.
- Everett GM, Borcherding JW (1970) L-dopa: effect on concentrations of dopamine, norepinephrine, and serotonin in brains of mice. *Science (New York, NY)* 168:849-850.
- Fahn S (2000) The spectrum of levodopa-induced dyskinesias. *Ann Neurol* 47:S2-9; discussion S9-11.
- Fahn S, Oakes D, Shoulson I, Kieburtz K, Rudolph A, Lang A, Olanow CW, Tanner C, Marek K, Parkinson Study G (2004) Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N Engl J Med* 351:2498-2508.
- Fang C, Yin J, Xu Z, Wang Y, Xu H, Zhou H, Gao C (2011) Striatal dopaminergic fiber recovery after acute L-DOPA treatment in 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesioned rats. *Cell biochemistry and biophysics* 59:49-56.
- Fasano S, Bezard E, D'Antoni A, Francardo V, Indrigo M, Qin L, Doveró S, Cerovic M, Cenci MA, Brambilla R (2010) Inhibition of Ras-guanine nucleotide-releasing factor 1 (Ras-GRF1) signaling in the striatum reverts motor symptoms associated with L-dopa-induced dyskinesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:21824-21829.
- Fearnley JM, Lees AJ (1991) Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114 (Pt 5):2283-2301.
- Follett KA, Weaver FM, Stern M, Hur K, Harris CL, Luo P, Marks WJ, Rothlind J, Sagher O, Moy C, Pahwa R, Burchiel K, Hogarth P, Lai EC, Duda JE, Holloway K, Samii A, Horn S, Bronstein JM, Stoner G, Starr PA, Simpson R, Baltuch G, De Salles A, Huang GD, Reda DJ, Group CS (2010) Pallidal versus subthalamic deep-brain stimulation for Parkinson's disease. *N Engl J Med* 362:2077-2091.
- Fon EA, Pothos EN, Sun BC, Killeen N, Sulzer D, Edwards RH (1997) Vesicular transport regulates monoamine storage and release but is not essential for amphetamine action. *Neuron* 19:1271-1283.
- Francardo V, Recchia A, Popovic N, Andersson D, Nissbrandt H, Cenci MA (2011) Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 42:327-340.

- German DC, Manaye K, Smith WK, Woodward DJ, Saper CB (1989) Midbrain dopaminergic cell loss in Parkinson's disease: computer visualization. *Ann Neurol* 26:507-514.
- Goetz CG (1986) Charcot on Parkinson's disease. *Mov Disord* 1:27-32.
- Goetz CG, Damier P, Hicking C, Laska E, Müller T, Olanow CW, Rascol O, Russ H (2007) Sarizotan as a treatment for dyskinesias in Parkinson's disease: a double-blind placebo-controlled trial. *Mov Disord* 22:179-186.
- Goetz CG, Laska E, Hicking C, Damier P, Müller T, Nutt J, Warren Olanow C, Rascol O, Russ H (2008) Placebo influences on dyskinesia in Parkinson's disease. *Mov Disord* 23:700-707.
- Grealish S, Mattsson B, Draxler P, Bjorklund A (2010) Characterisation of behavioural and neurodegenerative changes induced by intranigral 6-hydroxydopamine lesions in a mouse model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 31:2266-2278.
- Grégoire L, Samadi P, Graham J, Bédard PJ, Bartoszyk GD, Di Paolo T (2009) Low doses of sarizotan reduce dyskinesias and maintain antiparkinsonian efficacy of L-Dopa in parkinsonian monkeys. *Parkinsonism Relat Disord* 15:445-452.
- Group PS (2002) Dopamine transporter brain imaging to assess the effects of pramipexole vs levodopa on Parkinson disease progression. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 287:1653-1661.
- Guridi J, González-Redondo R, Obeso JA (2012) Clinical features, pathophysiology, and treatment of levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis* 2012:943159.
- Guttman M, Stewart D, Hussey D, Wilson A, Houle S, Kish S (2001) Influence of L-dopa and pramipexole on striatal dopamine transporter in early PD. *Neurology* 56:1559-1564.
- Halje P, Tamtè M, Richter U, Mohammed M, Cenci MA, Petersson P (2012) Levodopa-induced dyskinesia is strongly associated with resonant cortical oscillations. *J Neurosci* 32:16541-16551.
- Hardebo JE, Emson PC, Falck B, Owman C, Rosengren E (1980) Enzymes related to monoamine transmitter metabolism in brain microvessels. *J Neurochem* 35:1388-1393.
- Henry B, Fox SH, Peggs D, Crossman AR, Brotchie JM (1999) The alpha2-adrenergic receptor antagonist idazoxan reduces dyskinesia and enhances anti-parkinsonian actions of L-dopa in the MPTP-lesioned primate model of Parkinson's disease. *Mov Disord* 14:744-753.
- Hirsch E, Graybiel AM, Agid YA (1988) Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 334:345-348.
- Hoffman BJ, Hansson SR, Mezey E, Palkovits M (1998) Localization and dynamic regulation of biogenic amine transporters in the mammalian central nervous system. *Front Neuroendocrinol* 19:187-231.
- Hornykiewicz O (1998) Biochemical aspects of Parkinson's disease. *Neurology* 51:S2-9.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 29:577-580.
- Huot P, Lévesque M, Morissette M, Calon F, Dridi M, Di Paolo T, Parent A (2008) L-Dopa treatment abolishes the numerical increase in striatal dopaminergic neurons in parkinsonian monkeys. *J Chem Neuroanat* 35:77-84.
- Huot P, Lévesque M, Parent A (2007) The fate of striatal dopaminergic neurons in Parkinson's disease and Huntington's chorea. *Brain* 130:222-232.

- Huot P, Parent A (2007) Dopaminergic neurons intrinsic to the striatum. *J Neurochem* 101:1441-1447.
- Iderberg H, Francardo V, Pioli EY (2012) Animal models of L-DOPA-induced dyskinesia: an update on the current options. *Neuroscience* 211:13-27.
- Ikemoto K, Nagatsu I, Kitahama K, Jouvet A, Nishimura A, Nishi K, Maeda T, Arai R (1998) A dopamine-synthesizing cell group demonstrated in the human basal forebrain by dual labeling immunohistochemical technique of tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase. *Neurosci Lett* 243:129-132.
- Iwamoto ET, Loh HH, Way EL (1976) Circling behavior in rats with 6-hydroxydopamine or electrolytic nigral lesions. *Eur J Pharmacol* 37:339-356.
- Jollivet C, Montero-Menei CN, Venier-Julienne MC, Sapin A, Benoit JP, Menei P (2004) Striatal tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons are induced by L-dihydroxyphenylalanine and nerve growth factor treatment in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Neurosci Lett* 362:79-82.
- Juorio AV, Li XM, Walz W, Paterson IA (1993) Decarboxylation of L-dopa by cultured mouse astrocytes. *Brain Res* 626:306-309.
- Kageyama T, Nakamura M, Matsuo A, Yamasaki Y, Takakura Y, Hashida M, Kanai Y, Naito M, Tsuruo T, Minato N, Shimohama S (2000) The 4F2hc/LAT1 complex transports L-DOPA across the blood-brain barrier. *Brain Res* 879:115-121.
- Katzenschlager R, Hughes A, Evans A, Manson AJ, Hoffman M, Swinn L, Watt H, Bhatia K, Quinn N, Lees AJ (2005) Continuous subcutaneous apomorphine therapy improves dyskinesias in Parkinson's disease: a prospective study using single-dose challenges. *Mov Disord* 20:151-157.
- Kirik D, Rosenblad C, Björklund A (1998) Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol* 152:259-277.
- Kirik D, Rosenblad C, Bjorklund A, Mandel RJ (2000) Long-term rAAV-mediated gene transfer of GDNF in the rat Parkinson's model: intrastriatal but not intranigral transduction promotes functional regeneration in the lesioned nigrostriatal system. *J Neurosci* 20:4686-4700.
- Kish SJ, Shannak K, Hornykiewicz O (1988) Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. *N Engl J Med* 318:876-880.
- Kish SJ, Tong J, Hornykiewicz O, Rajput A, Chang LJ, Guttman M, Furukawa Y (2008) Preferential loss of serotonin markers in caudate versus putamen in Parkinson's disease. *Brain* 131:120-131.
- Konradi C, Westin JE, Carta M, Eaton ME, Kuter K, Dekundy A, Lundblad M, Cenci MA (2004) Transcriptome analysis in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia. *Neurobiol Dis* 17:219-236.
- Lancia AJ, Williams EA, McKnight LV, Zahm DS (2004) Vulnerabilities of ventral mesencephalic neurons projecting to the nucleus accumbens following infusions of 6-hydroxydopamine into the medial forebrain bundle in the rat. *Brain Res* 997:119-127.
- Lang AE, Lozano AM (1998) Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med* 339:1130-1143.
- Lee CS, Cenci MA, Schulzer M, Bjorklund A (2000) Embryonic ventral mesencephalic grafts improve levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Brain* 123 (Pt 7):1365-1379.

- Levine CB, Fahrbach KR, Siderowf AD, Estok RP, Ludensky VM, Ross SD (2003) Diagnosis and treatment of Parkinson's disease: a systematic review of the literature. *Evid Rep Technol Assess (Summ)* 1-4.
- Lewy FH (1912) Paralysis agitans. I Pathologische Anatomie. In: *Handbuch der Neurologie*, vol. 3 (Lewandowski, M., ed), pp 920-933 Berlin: Springer.
- Linazasoro G (2005) New ideas on the origin of L-dopa-induced dyskinesias: age, genes and neural plasticity. *Trends Pharmacol Sci* 26:391-397.
- Linazasoro G, Antonini A, Maguire RP, Leenders KL (2004) Pharmacological and PET studies in patient's with Parkinson's disease and a short duration-motor response: implications in the pathophysiology of motor complications. *J Neural Transm* 111:497-509.
- Lindgren HS, Andersson DR, Lagerkvist S, Nissbrandt H, Cenci MA (2010) L-DOPA-induced dopamine efflux in the striatum and the substantia nigra in a rat model of Parkinson's disease: temporal and quantitative relationship to the expression of dyskinesia. *J Neurochem* 112:1465-1476.
- Lindgren HS, Rylander D, Iderberg H, Andersson M, O'Sullivan SS, Williams DR, Lees AJ, Cenci MA (2011) Putaminal upregulation of FosB/ Δ FosB-like immunoreactivity in Parkinson's disease patients with dyskinesia. *J Parkinsons Dis* 1:347-357.
- Lindgren HS, Rylander D, Ohlin KE, Lundblad M, Cenci MA (2007) The "motor complication syndrome" in rats with 6-OHDA lesions treated chronically with L-DOPA: relation to dose and route of administration. *Behav Brain Res* 177:150-159.
- Lindgren P, von Campenhausen S, Spottke E, Siebert U, Dodel R (2005) Cost of Parkinson's disease in Europe. *Eur J Neurol* 12 Suppl 1:68-73.
- Lopez-Real A, Rodriguez-Pallares J, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2003) Localization and functional significance of striatal neurons immunoreactive to aromatic L-amino acid decarboxylase or tyrosine hydroxylase in rat Parkinsonian models. *Brain Res* 969:135-146.
- Lundblad M, Andersson M, Winkler C, Kirik D, Wierup N, Cenci MA (2002) Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 15:120-132.
- Lundblad M, Picconi B, Lindgren H, Cenci MA (2004) A model of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned mice: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiol Dis* 16:110-123.
- Lundblad M, Usiello A, Carta M, Hakansson K, Fisone G, Cenci MA (2005) Pharmacological validation of a mouse model of l-DOPA-induced dyskinesia. *Exp Neurol* 194:66-75.
- Luquin MR, Scipioni O, Vaamonde J, Gershanik O, Obeso JA (1992) Levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: clinical and pharmacological classification. *Mov Disord* 7:117-124.
- Maeda T, Kannari K, Shen H, Arai A, Tomiyama M, Matsunaga M, Suda T (2003) Rapid induction of serotonergic hyperinnervation in the adult rat striatum with extensive dopaminergic denervation. *Neurosci Lett* 343:17-20.
- Manson AJ, Iakovidou E, Lees AJ (2000) Idazoxan is ineffective for levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Mov Disord* 15:336-337.
- McIntire SL, Reimer RJ, Schuske K, Edwards RH, Jorgensen EM (1997) Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* 389:870-876.
- Meissner W, Ravenscroft P, Reese R, Harnack D, Morgenstern R, Kupsch A, Klitgaard H, Bioulac B, Gross CE, Bezard E, Boraud T (2006) Increased slow oscillatory activity in substantia nigra pars reticulata triggers abnormal involuntary movements in the 6-

- OHDA-lesioned rat in the presence of excessive extracellular striatal dopamine. *Neurobiol Dis* 22:586-598.
- Mela F, Marti M, Dekundy A, Danysz W, Morari M, Cenci MA (2007) Antagonism of metabotropic glutamate receptor type 5 attenuates l-DOPA-induced dyskinesia and its molecular and neurochemical correlates in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 101:483-497.
- Melamed E, Hefti F, Wurtman RJ (1980) Nonaminergic striatal neurons convert exogenous L-dopa to dopamine in parkinsonism. *Ann Neurol* 8:558-563.
- Melamed E, Zoldan J, Friedberg G, Ziv I, Weizmann A (1996) Involvement of serotonin in clinical features of Parkinson's disease and complications of L-DOPA therapy. *Adv Neurol* 69:545-550.
- Meredith GE, Farrell T, Kellaghan P, Tan Y, Zahm DS, Totterdell S (1999) Immunocytochemical characterization of catecholaminergic neurons in the rat striatum following dopamine-depleting lesions. *Eur J Neurosci* 11:3585-3596.
- Mesnager V, Houeto JL, Bonnet AM, Clavier I, Arnulf I, Cattelin F, Le Fur G, Damier P, Welter ML, Agid Y (2004) Neurokinin B, neurotensin, and cannabinoid receptor antagonists and Parkinson disease. *Clin Neuropharmacol* 27:108-110.
- Miller DW, Abercrombie ED (1999) Role of high-affinity dopamine uptake and impulse activity in the appearance of extracellular dopamine in striatum after administration of exogenous L-DOPA: studies in intact and 6-hydroxydopamine-treated rats. *J Neurochem* 72:1516-1522.
- Mones RJ, Elizan TS, Siegel GJ (1971) Analysis of L-dopa induced dyskinesias in 51 patients with Parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 34:668-673.
- Monville C, Torres EM, Pekarik V, Lane EL, Dunnett SB (2009) Genetic, temporal and diurnal influences on L-dopa-induced dyskinesia in the 6-OHDA model. *Brain Res Bull* 78:248-253.
- Moore KE, Riegle GD, Demarest KT (1985) Regulation of tuberoinfundibular dopaminergic neurons: prolactin and inhibitory neuronal influences. In: *Catecholamines as Hormone Regulators*, pp 31-48 New York: Raven Press.
- Muentner MD, Sharpless NS, Tyce GM, Darley FL (1977) Patterns of dystonia ("I-D-I" and "D-I-D") in response to l-dopa therapy for Parkinson's disease. *Mayo Clin Proc* 52:163-174.
- Munoz A, Carlsson T, Tronci E, Kirik D, Bjorklund A, Carta M (2009) Serotonin neuron-dependent and -independent reduction of dyskinesia by 5-HT1A and 5-HT1B receptor agonists in the rat Parkinson model. *Exp Neurol* 219:298-307.
- Mura A, Jackson D, Manley MS, Young SJ, Groves PM (1995) Aromatic L-amino acid decarboxylase immunoreactive cells in the rat striatum: a possible site for the conversion of exogenous L-DOPA to dopamine. *Brain Res* 704:51-60.
- Mytilineou C, Han SK, Cohen G (1993) Toxic and protective effects of L-dopa on mesencephalic cell cultures. *J Neurochem* 61:1470-1478.
- Nambu A, Tokuno H, Takada M (2002) Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal 'hyperdirect' pathway. *Neurosci Res* 43:111-117.
- Nausieda PA, Glantz R, Weber S, Baum R, Klawans HL (1984) Psychiatric complications of levodopa therapy of Parkinson's disease. *Adv Neurol* 40:271-277.
- Navailles S, Bioulac B, Gross C, De Deurwaerdere P (2010) Serotonergic neurons mediate ectopic release of dopamine induced by L-DOPA in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 38:136-143.

- Navailles S, Bioulac B, Gross C, De Deurwaerdere P (2011) Chronic L-DOPA therapy alters central serotonergic function and L-DOPA-induced dopamine release in a region-dependent manner in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 41:585-590.
- Nicholas AP, Buck K, Ferger B (2008) Effects of levodopa on striatal monoamines in mice with levodopa-induced hyperactivity. *Neurosci Lett* 443:204-208.
- Nyholm D, Nilsson Remahl AI, Dizdar N, Constantinescu R, Holmberg B, Jansson R, Aquilonius SM, Askmark H (2005) Duodenal levodopa infusion monotherapy vs oral polypharmacy in advanced Parkinson disease. *Neurology* 64:216-223.
- Obeso JA, Olanow CW, Nutt JG (2000a) Levodopa motor complications in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 23:S2-7.
- Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Rodríguez M, Lanciego JL, Artieda J, Gonzalo N, Olanow CW (2000b) Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 23:S8-19.
- Oertel W, Berardelli A, Bloem B, Bonuccelli U, Burn D, Deuschl G, Dietrichs E, Fabbrini G, Ferreira J, Friedman A, Kanovsky P, Kostic V, Nieuwboer A, Odin P, Poewe W, Rascol O, Sampaio C, Schüpbach M, Tolosa E, Trenkwalder C (2011) Review of the therapeutic management of Parkinson's disease. In: *European Handbook of Neurological Management*, vol. 1 (Gilhus, N. B., MP. Brainin, M., ed), pp 217-236 Oxford: Wiley-Blackwell.
- Olanow CW, Agid Y, Mizuno Y, Albanese A, Bonuccelli U, Damier P, De Yebenes J, Gershanik O, Guttman M, Grandas F, Hallett M, Hornykiewicz O, Jenner P, Katzenschlager R, Langston WJ, LeWitt P, Melamed E, Mena MA, Michel PP, Mytilineou C, Obeso JA, Poewe W, Quinn N, Raisman-Vozari R, Rajput AH, Rascol O, Sampaio C, Stocchi F (2004) Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: current controversies. *Mov Disord* 19:997-1005.
- Omote H, Moriyama Y (2013) Vesicular neurotransmitter transporters: an approach for studying transporters with purified proteins. *Physiology (Bethesda, Md)* 28:39-50.
- Pakkenberg B, Møller A, Gundersen HJ, Mouritzen Dam A, Pakkenberg H (1991) The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 54:30-33.
- Pardo B, Mena MA, Casarejos MJ, Paino CL, De Yebenes JG (1995) Toxic effects of L-DOPA on mesencephalic cell cultures: protection with antioxidants. *Brain Res* 682:133-143.
- Parkinson J (2002) An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14:223-236; discussion 222.
- Parkkinen L, O'Sullivan SS, Kuoppamaki M, Collins C, Kallis C, Holton JL, Williams DR, Revesz T, Lees AJ (2011) Does levodopa accelerate the pathologic process in Parkinson disease brain? *Neurology* 77:1420-1426.
- Pavese N, Evans AH, Tai YF, Hotton G, Brooks DJ, Lees AJ, Piccini P (2006) Clinical correlates of levodopa-induced dopamine release in Parkinson disease: a PET study. *Neurology* 67:1612-1617.
- Pavón N, Martín AB, Mendiáldua A, Moratalla R (2006) ERK phosphorylation and FosB expression are associated with L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. *Biol Psychiatry* 59:64-74.
- Paxinos G, Franklin KB (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, California: Academic Press.

- Peter D, Liu Y, Sternini C, de Giorgio R, Brecha N, Edwards RH (1995) Differential expression of two vesicular monoamine transporters. *J Neurosci* 15:6179-6188.
- Porritt MJ, Batchelor PE, Hughes AJ, Kalnins R, Donnan GA, Howells DW (2000) New dopaminergic neurons in Parkinson's disease striatum. *Lancet* 356:44-45.
- Prinssen EP, Balestra W, Bemelmans FF, Cools AR (1994) Evidence for a role of the shell of the nucleus accumbens in oral behavior of freely moving rats. *J Neurosci* 14:1555-1562.
- Przedborski S, Ischiropoulos H (2005) Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* 7:685-693.
- Rylander D, Parent M, O'Sullivan SS, Dovero S, Lees AJ, Bezard E, Descarries L, Cenci MA (2010) Maladaptive plasticity of serotonin axon terminals in levodopa-induced dyskinesia. *Ann Neurol* 68:619-628.
- Santini E, Valjent E, Usiello A, Carta M, Borgkvist A, Girault JA, Hervé D, Greengard P, Fisone G (2007) Critical involvement of cAMP/DARPP-32 and extracellular signal-regulated protein kinase signaling in L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurosci* 27:6995-7005.
- Sarre S, De Klippel N, Herregodts P, Ebinger G, Michotte Y (1994) Biotransformation of locally applied L-dopa in the corpus striatum of the hemi-parkinsonian rat studied with microdialysis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 350:15-21.
- Sauer H, Oertel WH (1994) Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* 59:401-415.
- Scatton B, Javoy-Agid F, Rouquier L, Dubois B, Agid Y (1983) Reduction of cortical dopamine, noradrenaline, serotonin and their metabolites in Parkinson's disease. *Brain Res* 275:321-328.
- Schallert T, Lindner MD (1990) Rescuing neurons from trans-synaptic degeneration after brain damage: helpful, harmful, or neutral in recovery of function? *Canadian journal of psychology* 44:276-292.
- Schallert T, Tillerson JL (1999) Intervention strategies for degeneration of dopamine neurons in Parkinsonism: optimizing behavioral assessment of outcome. In: *Central Nervous System Disease: Innovative Animal Models from Lab to Clinic* (Emerich, D. F. et al., eds), pp 131-151 Totowa, New Jersey 07512: Humana Press Inc.
- Schmitt KC, Reith ME (2010) Regulation of the dopamine transporter: aspects relevant to psychostimulant drugs of abuse. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1187:316-340.
- Schrag A, Quinn N (2000) Dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. A community-based study. *Brain* 123 (Pt 11):2297-2305.
- Smith GA, Heuer A, Dunnett SB, Lane EL (2012) Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice II: predicting l-DOPA-induced dyskinesia. *Behav Brain Res* 226:281-292.
- Sulzer D (2007) Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 30:244-250.
- Tanaka H, Kannari K, Maeda T, Tomiyama M, Suda T, Matsunaga M (1999) Role of serotonergic neurons in L-DOPA-derived extracellular dopamine in the striatum of 6-OHDA-lesioned rats. *Neuroreport* 10:631-634.
- Tandé D, Höglinger G, Debeir T, Freundlieb N, Hirsch EC, François C (2006) New striatal dopamine neurons in MPTP-treated macaques result from a phenotypic shift and not neurogenesis. *Brain* 129:1194-1200.
- Tanner CM, Goldman SM (1996) Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin* 14:317-335.

- Tashiro Y, Sugimoto T, Hattori T, Uemura Y, Nagatsu I, Kikuchi H, Mizuno N (1989) Tyrosine hydroxylase-like immunoreactive neurons in the striatum of the rat. *Neurosci Lett* 97:6-10.
- Troiano AR, de la Fuente-Fernandez R, Sossi V, Schulzer M, Mak E, Ruth TJ, Stoessl AJ (2009) PET demonstrates reduced dopamine transporter expression in PD with dyskinesias. *Neurology* 72:1211-1216.
- Ugrumov MV (2013) Brain neurons partly expressing dopaminergic phenotype: location, development, functional significance, and regulation. *Adv Pharmacol* 68:37-91.
- Uhl GR, Hedreen JC, Price DL (1985) Parkinson's disease: loss of neurons from the ventral tegmental area contralateral to therapeutic surgical lesions. *Neurology* 35:1215-1218.
- Ulusoy A, Sahin G, Kirik D (2010) Presynaptic dopaminergic compartment determines the susceptibility to L-DOPA-induced dyskinesia in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:13159-13164.
- Ungerstedt U (1968) 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* 5:107-110.
- Ungerstedt U, Arbuthnott GW (1970) Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 24:485-493.
- van der Stelt M, Fox SH, Hill M, Crossman AR, Petrosino S, Di Marzo V, Brotchie JM (2005) A role for endocannabinoids in the generation of parkinsonism and levodopa-induced dyskinesia in MPTP-lesioned non-human primate models of Parkinson's disease. *FASEB J* 19:1140-1142.
- Wade LA, Katzman R (1975) Synthetic amino acids and the nature of L-DOPA transport at the blood-brain barrier. *J Neurochem* 25:837-842.
- Wakabayashi K, Tanji K, Mori F, Takahashi H (2007) The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. *Neuropathology* 27:494-506.
- Weihe E, Depboylu C, Schütz B, Schäfer MK, Eiden LE (2006) Three types of tyrosine hydroxylase-positive CNS neurons distinguished by dopa decarboxylase and VMAT2 co-expression. *Cell Mol Neurobiol* 26:659-678.
- West MJ (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends Neurosci* 22:51-61.
- Westin JE, Vercaamen L, Strome EM, Konradi C, Cenci MA (2007) Spatiotemporal pattern of striatal ERK1/2 phosphorylation in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia and the role of dopamine D1 receptors. *Biol Psychiatry* 62:800-810.
- Winkler C, Kirik D, Bjorklund A, Cenci MA (2002) L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiol Dis* 10:165-186.
- Wolf E, Seppi K, Katzenschlager R, Hochschorner G, Ransmayr G, Schwingenschuh P, Ott E, Kloiber I, Haubenberger D, Auff E, Poewe W (2010) Long-term antidyskinetic efficacy of amantadine in Parkinson's disease. *Mov Disord* 25:1357-1363.
- Wolf ME, Roth RH (1990) Autoreceptor regulation of dopamine synthesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 604:323-343.
- Zahm DS (1999) Functional-anatomical implications of the nucleus accumbens core and shell subterritories. *Annals of the New York Academy of Sciences* 877:113-128.
- Zeng BY, Irvani MM, Jackson MJ, Rose S, Parent A, Jenner P (2010) Morphological changes in serotonergic neurites in the striatum and globus pallidus in levodopa primed MPTP treated common marmosets with dyskinesia. *Neurobiol Dis* 40:599-607.

Zhou FC, Bledsoe S, Murphy J (1991) Serotonergic sprouting is induced by dopamine-lesion in substantia nigra of adult rat brain. *Brain Res* 556:108-116.

	SN	VTA	STR	Acc	Cortex
Anzahl d. Schnitte	9	7	7	4	5
Subregionen	keine	keine	4 (DM, DL, VM, VL)	keine	keine
Hemisphäre	bilateral	bilateral	unilateral (lädierte Seite)	unilateral (lädierte Seite)	bilateral
Schnittperiode	5	5	10	10	10
Zählrahmen	22.500 μm^2	22.500 μm^2	40.000 μm^2	40.000 μm^2	40.000 μm^2
Zählraster	5625 μm^2	5625 μm^2	40.000 μm^2	40.000 μm^2	40.000 μm^2
Objektiv	20x	20x	20x	20x	20x
Begrenzungen <i>rostral*</i>	-2,57mm	-2,87mm	+1,1mm	+1,1mm	+0,8mm
<i>kaudal*</i>	-3,92mm	-3,92mm	-0,7mm	+0,2mm	-0,4mm
<i>medial</i>	VTA	Hemisphären- Mittellinie	Seitenventrikel	Septumkerne und lateraler Hypothalamus (Ncl. Praeopticus)	kontralat. Cortex, CC, STR, Acc., Tuberculum olfactorium
	Trennung zwischen SN und VTA: Vertikallinie durch medialen Ausläufer der Pedunculus cerebri und medialen terminalen Ncl. des Ncl. Accessorius der Sehbahn				
<i>lateral</i>	Hippocampus CA3	SNpc	Capsula externa	Area piriformis (olfakt. Cortex)	Außenseite
<i>dorsal</i>	Ncl. Ruber	Ncl. Ruber	Cortex	STR	Außenseite
<i>ventral</i>	Ncll. Mamillari und Ncl. Interfaszikularis	Ncll. Mamillari und Ncl. Interfaszikularis	Verbindungslinie ventraler Seitenventrikelauslauf - Comissura anterior - Capsula externa	ventrales Pallidum und Tuberculum olfactorium	CC

* relativ zu Bregma in Anlehnung an den Mausatlas von Paxinos und Franklin (2001). **Abkürzungen:** Acc: Nucleus accumbens; CA3: Cornu ammonis 3; CC: Corpus callosum; Ncl.: Nucleus; olfakt.: olfaktorisch; SN: Substantia Nigra; STR: Striatum

Curriculum vitae

Die Seiten 99-100 (Lebenslauf) enthalten persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

Die Seiten 99-100 (Lebenslauf) enthalten persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen / Herren

Aumüller	Kircher	Renz
Basler	Klose	Richter
Bartsch	König	Röhm
Barth	Koolman	Ruchholtz
Baum	Lill	Schäfer
Becker	Löffler	Schütz
Becker	Lohoff	Schmidt
Cordes	Maier	Schofer
Czubayko	Maisch	Schoner
Daut	Mandrek	Seifart
Eberhart	Maschuw	Sekundo
Elsässer	Moll	Sommer
Feuser	Moosdorf	Suske
Giese	Mueller	Tackenberg
Gress	Mutters	Vogelmeier
Grzeschik	Neubauer	Wagner
Hertl	Neumüller	Weihe
Hilt	Oertel	Werner
Hofmann	Pagenstecher	Wulff
Hoyer	Plant	

Meine akademischen Lehrer in Dunedin, Neuseeland, waren die Damen / Herren

Anderson	Goodin	McComb
Baird	Hillman	Napper
Frew	Hageman	Rosengren
Giles	Kerr	Williams

Danksagung

Mein aufrichtiger Dank geht an

PD Dr. med. Candan Depboylu für die Bereitstellung des Themas, die kontinuierliche wissenschaftliche Betreuung und die motivierende Unterstützung in praktischen wie in theoretischen Fragen.

Thomas Carlsson, PhD, für die hervorragende Betreuung im Labor und die kompetente Unterstützung während der experimentellen Durchführung dieser Arbeit.

Prof. Dr. med. Guenter Hoeglinger für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit in seiner AG „Experimentelle Neurologie“ im BMFZ durchgeführt haben zu können.

Prof. Dr. Dr. Wolfgang Oertel, der meine Begeisterung für die Parkinson-Forschung geweckt hat und mich auf die AG Experimentelle Neurologie aufmerksam machte.

Meinen Laborkollegen Wei-Hua Chiu, bei dem ich die stereotaktischen Operationen erlernt habe, Oscar Arias-Carion für die Einführung in die konfokale Mikroskopie, Martin Klietz für die kollegiale Zusammenarbeit im Rahmen des Dys1-Projekts und Robert Rotscholl, der insbesondere zu Beginn der Arbeit stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Außerdem danke ich Martin Arend für die stete freundschaftliche Begleitung in guten wie in frustrierenden Zeiten und die damit verbundene Aufwertung der Laboratmosphäre.

Silke Caspari und Sabine Antimov für die Einweihung in die Kunst der Immunhistochemie und der Gewebeaufbereitung sowie die Bereitschaft, mich von ihrem Ehrfahrungsschatz profitieren zu lassen. Susanne Stei für die Mithilfe bei der Stereologie.

Meiner Familie, die mich geduldig und ausnahmslos seit ich denken kann unterstützt hat und stets das Gefühl gibt, stolz auf ihre ‚Strebärlin‘ zu sein.

Meinen Liebsten, die mir nicht nur während der Durchführung dieser Arbeit mit ihrer Gesellschaft in der Bib, mit Korrekturlesen und hilfreichen Anmerkungen oder mit ausgleichendem Freizeitprogramm zur Seite standen, sondern auch mein Leben lebenswert machen: Käthe, Gundi, Anne, Danni, Lisa, Corinna und Nico.

Veröffentlichungen im Zusammenhang mit der hier vorliegenden Dissertation

Wissenschaftliche Vorträge

Brain Awareness Week - Dissertationswettbewerb (1. Preis), März 2014 in Marburg:
 „Die Rolle striataler Tyrosinhydroxylase-positiven Zellen bei L-DOPA-induzierten Dyskinesien der Maus“

Publikationen [in Erst- bzw. Zweitrevision]

Keber U, Klietz M, Carlsson C, Oertel WH, Weihe E, Schäfer M, Höglinger GU, Depboylu C (2014). Striatal tyrosine hydroxylase-positive neurons are associated with L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. *Neuropharmacology*.

Höglinger GU, Alvarez-Fischer D, Arias-Carrion O, Djufri M, Windolph A, Keber U, Chiu W-H, Borta A, Ries V, Schwarting RKW, Scheller D, Oertel WH (2014). A dopaminergic projection from the substantia nigra to the olfactory bulb. *Nature Communications*.

Abstracts

Keber U, Klietz M, Oertel WH, Hoeglinger G, Carlsson C, Depboylu C (2014). Striatal tyrosine hydroxylase-positive neurons trigger L-DOPA-induced dyskinesia in mice. *Neurowoche 2014, München*.

Klietz M, Keber U, Carlsson T, Chiu WH, Schaefer M, Depboylu C (2012). Striatal tyrosine hydroxylase expressing interneurons are regulated in a mouse model of L-DOPA-induced dyskinesia. *FENS, Forum of European Neuroscience, Barcelona, Spanien*.

Arias-Carrión O, Djufri M, Windolph A, Borta A, Nordmeyer M, Keber U, Oertel WH, Scheller D, Hoeglinger GU (2011). Dopaminergic modulation of olfactory perception in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience, Washington DC, USA*.

Arias-Carrion O, Djufri M, Borta A, Nordmeyer M, Keber U, Oertel WH, Hoglinger G (2011) Rotigotine activates neurogenesis and improves hyposmia in a PD model. *Basal Ganglia* 1:41-42. + Nachmittag der Wissenschaft, 2010, Philipps-Universität Marburg.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Die Rolle von striatalen Tyrosinhydroxylase-positiven Neuronen bei L-DOPA-induzierten Dyskinesien der Maus“

in der Klinik für Neurologie unter Leitung von PD Dr. med. Candan Depboylu mit Unterstützung durch Thomas Carlsson, PhD, ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 14.09.2014