

Aus der Klinik für Neurologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. D. Kömpf

Die *in vivo*-Wirkung von N-Methyl-Norsalsolinol auf das
dopaminerge und das serotonerge System der Ratte

Inauguraldissertation
Zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

Vorgelegt von
Konrad Mende
aus Berlin
Lübeck 2008

- 1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Moser**
- 2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Olaf Jöhren**

Tag der mündlichen Prüfung: 24.09.2008

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 24.09.2008

Gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

1.	EINLEITUNG	5
1.1.	Der Morbus Parkinson	5
1.2.	Neuroanatomie, -chemie und -pathologie des Morbus Parkinson	7
1.2.1.	Nigrostriatale dopaminerge Degeneration	7
1.2.2.	Lewykörperchen	10
1.2.3.	Beteiligung des serotoninergeren Systems	11
1.3.	Pathomechanismen des Morbus Parkinson	13
1.4.	Modelle des Morbus Parkinson	18
1.5.	Ätiologie des Morbus Parkinson und NMNorsal	21
1.6.	Das in dieser Arbeit verwendete Tiermodell	23
1.7.	Spezielle Neuroanatomie der Ratte	24
1.8.	Ziel und Fragestellung	27
2.	MATERIAL	29
2.1.	Stereotaktische Injektionen	29
2.2.	Transkardiale Perfusionsfixation	30
2.3.	Anfertigung von Kryoschnitten	31
2.4.	Nissl-Färbung mit Kresylviolett	31
2.5.	Immunhistochemie	32
2.6.	TUNEL	34
2.7.	Rechnerprogramme	37
2.8.	Versuchstiere	37
2.9.	Zulassung der Tierversuche	37
3.	METHODEN	38
3.1.	Versuchsablauf	38
3.2.	Gruppeneinteilung der Versuchstiere	38
3.3.	Stereotaktische Injektionen	38
3.4.	Transkardiale Perfusionsfixation der Hirne	39
3.5.	Anfertigung von Kryoschnitten	40
3.6.	Nissl-Färbung mit Kresylviolett	41
3.7.	Tyrosinhydroxylase (TH)-Immunhistochemie	42
3.8.	Tryptophanhydroxylase (TPH)-Immunhistochemie	42
3.9.	Serotonin-5HT _{2A} -Rezeptor-Immunhistochemie	43
3.10.	TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)	43
3.11.	Aktive Caspase 3-Immunhistochemie	44
3.12.	Auswertung der Immunhistochemie	45
3.13.	Statistik	47
3.14.	Auswertung für TUNEL und aktive Caspase 3	48
4.	ERGEBNISSE	49
4.1.	Injektionsort	49
4.2.	Untersuchungen im nigrostriatalen dopaminergen System	49
4.2.1.	Untersuchungen in der Substantia nigra	49
4.2.2.	Untersuchungen im Striatum	55
4.3.	Untersuchungen im serotonergen System	58
4.3.1.	Expression der Tryptophanhydroxylase im Medialen Vorderhirnbündel	58
4.3.2.	5HT _{2A} -Rezeptor im Striatum	60
5.	DISKUSSION	69
5.1.	Die Wirkung von N-Methyl-Norsalsolinol auf das dopaminerge System	70
5.1.1.	Histologische Untersuchungen	70
5.1.2.	Immunhistochemie der TH in SNpc und Striatum	72
5.1.3.	Art des Zelltodes	74

5.1.4.	Untersuchungen im serotoninergeren System	81
6.	ZUSAMMENFASSUNG	87
7.	ABKÜRZUNGEN	89
8.	LITERATURVERZEICHNIS	92
9.	DANKSAGUNG	114
10.	PUBLIKATIONSLISTE	116
11.	CURRICULUM VITAE	117

1. EINLEITUNG

Das endogen synthetisierte N-Methyl-Norsalsolinol (NMNorsal) liegt bei Patienten mit Morbus Parkinson in erhöhter Konzentration vor und könnte an der Ätiologie dieser Erkrankung beteiligt sein. Die vorliegende Arbeit untersucht die Auswirkungen von NMNorsal auf die Zellen des dopaminergen und serotoninergen Systems bei Ratten nach stereotaktischen Injektionen in das nigrostriatale System.

1.1. Der Morbus Parkinson

Die Parkinson-Krankheit (lat. Morbus Parkinson oder engl. *Parkinson's Disease*) beruht wesentlich auf dem progressiven Untergang dopaminproduzierender Neurone in der *Substantia nigra* im menschlichen Gehirn. Die heute angewandten Strategien zur medikamentösen Therapie behandeln letztendlich nur die Symptome, keine von ihnen kann die Erkrankung verhindern oder ihr Fortschreiten aufhalten. Das Verständnis der Ursachen und Mechanismen des Morbus Parkinson ist notwendig um zukünftig diese Krankheit verhindern, frühzeitig stoppen oder sogar heilen zu können.

Die klinischen Zeichen des Morbus Parkinson wurden erstmalig 1817 von James Parkinson in seinem klassischen *Essay on the shaking palsy* beschrieben und sind noch heute Kriterien zur Diagnosestellung. Morbus Parkinson ist eine fortschreitende Erkrankung mit einem mittleren Krankheitsbeginn von 55 Jahren, deren Inzidenz mit dem Alter steigt, von 20/100000 insgesamt bis zu 120/100000 mit 70 Jahren. In 95 % der Fälle findet sich keine genetische Grundlage, die verbleibenden 5 % sind ererbte Erkrankungen (Dauer und Przedborski, 2003).

Klinisch kann jede Erkrankung, die mit striatalem Dopaminmangel oder direkter Schädigung des *Striatums* (siehe 1.2) einhergeht, zu einem Parkinson-Syndrom führen, welches durch Ruhetremor, *Rigor*, Verlangsamung oder Abwesenheit von willkürlichen Bewegungen, posturaler Instabilität und *Freezing* charakterisiert ist. Der Morbus Parkinson ist mit 80 % die häufigste Ursache. Da die Ätiologie der Erkrankung unklar ist, spricht man auch von einem idiopathischen Parkinson-Syndrom. Davon abzugrenzen sind die symptomatischen Parkinson-Syndrome. Hierzu zählen das medikamenteninduzierte Parkinson-Syndrom (v.a. nach Gabe von Neuroleptika; Jiminez-Jiminez et al., 1997), ein vaskuläres Parkinson-Syndrom (v.a. bei zerebraler Mikroangiopathie; Sibon und Tison, 2004; Barcia et al., 2004), ein durch Kopftraumen ausgelöstes Parkinson-Syndrom (Stern, 1991; das bekannteste Beispiel ist der ehemalige Boxweltmeister Muhammad Ali) sowie postenzephalitische Parkinson-Syndrome (z.B. bei der seltenen Enzephalitis lethargica; von Economo, 1931).

Parkinson-Tremor tritt vorherrschend in Ruhe auf, vermindert sich typischerweise bei Willkürbewegungen und beeinträchtigt daher nicht die Alltagsaktivitäten. *Rigor* bedeutet erhöhten Widerstand (Steifheit) bei passiven Bewegungen der Gliedmaßen des Patienten. *Bradykinese* (Verlangsamung von Bewegungen), *Hypokinese* (Verminderung der Bewegungsamplitude) und *Akinese* (Abwesenheit normaler, unwillkürlicher Bewegungen, zum Beispiel das Pendeln der Arme beim Laufen) können sich in einer ganzen Reihe von weiteren Symptomen manifestieren, darunter eingeschränkte Mimik (*Hypomimie*), leise Sprache (*Hypophonie*), Schluckstörungen (Unfähigkeit zu schlucken ohne bewusst daran zu denken), verringerte Schriftgröße (*Mikrographie*) und Schreibgeschwindigkeit, verminderte Schrittlänge beim Laufen. *Bradykinese* kann das Alltagsleben der Patienten erheblich einschränken, da sie wesentlich länger für normale Tätigkeiten wie Anziehen, Essen, Trinken und so weiter brauchen. Die Patienten entwickeln eine typische gebückte Haltung und können verminderte posturale Reflexe aufweisen, was häufig zu Stürzen führt und Einschränkungen bis zur Rollstuhlpflichtigkeit mit sich bringen kann. *Freezing*, die Unfähigkeit eine Willkürbewegung wie Gehen zu beginnen (das heißt die betroffenen Patienten „kleben“ am Boden wenn sie anfangen wollen sich zu bewegen), ist ein häufiges Symptom von Parkinsonismus. Affektive und kognitive Störungen treten ebenfalls häufig auf, die Patienten werden passiv und ziehen sich zurück mit einem Mangel an Initiative, sie bleiben beispielsweise sitzen wenn sie aufgefordert werden, an Aktivitäten teilzunehmen. Antworten auf Fragen sind verzögert und kognitive Prozesse verlangsamt („*Bradyphrenie*“). Depression und Demenz kommen signifikant häufiger vor als in der gleichaltrigen Normalbevölkerung (Dauer und Przedborski, 2003).

Mit Fortschreiten des Krankheitsprozesses verschlimmern sich die Symptome, und vor der Einführung der Levo-Dopa-Therapie war die Mortalität um das dreifache gegenüber der gleichaltrigen Normalbevölkerung erhöht. Obwohl Levo-Dopa die Lebensqualität von Parkinsonpatienten extrem verbessert hat, zeigen Studien doch eine eingeschränkte Lebenserwartung (Hely et al., 1989, 2005; Morgante et al., 2000; Levy et al., 2002). Darüber hinaus leiden die Patienten 5-10 Jahre nach Erkrankungsbeginn an wesentlichen motorischen Einschränkungen und dies trotz maximaler (symptomatischer) medikamentöser Therapie.

Von einigen wenigen Ausnahmefällen abgesehen (Patienten mit bekannter Genmutation oder Toxinexposition), ist die Ursache der Zelldegeneration, die zum Morbus Parkinson führt, weiterhin unbekannt. Aus heutiger Sicht handelt es sich wahrscheinlich um ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren, vor allem von Alterungsprozessen, genetischer Disposition und den Auswirkungen von Neurotoxinen (siehe 1.5).

1.2. Neuroanatomie, -chemie und -pathologie des Morbus Parkinson

Die Diagnose wird bei den erkrankten Personen auf Grundlage der genannten klinischen Zeichen und dem Ansprechen auf die Therapie mit Levodopa gestellt, die endgültige Bestätigung kann allerdings nur *post mortem* erfolgen. Die pathologischen Hauptmerkmale des Morbus Parkinson sind der Verlust nigrostriataler dopaminerges Neurone und die Anwesenheit intraneuronaler, cytoplasmatischer Proteineinschlüsse, sogenannter Lewy-Körperchen.

1.2.1. Nigrostriatale dopaminerge Degeneration

Die Auswirkungen des dopaminergen Zelluntergangs beim Morbus Parkinson werden verständlich, wenn man sich die neuroanatomische und neurophysiologische Bedeutung der *Substantia nigra* und der Basalganglien für das motorische System vor Augen führt. Die so genannten Basalganglien sind eine Gruppe tiefer subcorticaler Kerngebiete. Zu ihnen gehören der *Ncl. caudatus*, das *Putamen* und der *Globus pallidus*. *Putamen* und *Ncl. caudatus* werden gemeinsam auch als *Striatum* (oder *Corpus striatum*) bezeichnet. Die im Mittelhirn gelegene *Substantia nigra* sowie der *Nucleus subthalamicus* werden den Basalganglien funktionell hinzugerechnet, da sie eng in den striatopallidalen Kreislauf eingebunden sind.

Die Basalganglien erhalten motorische und nicht-motorische Informationen aus der Hirnrinde, aber auch aus dem limbischen System. Sie sind wichtiges Bindeglied in der Verarbeitung von Informationen und bewirken eine feine Abstimmung von Bewegungsabläufen. Störungen der Basalganglien führen somit zu Hypo- oder Hyperkinesien, je nachdem, welcher Anteil betroffen ist (Trepel, 1999; Braak et al., 2000).

Striatum

Sein dorsolateraler Anteil, der *Nucleus caudatus*, liegt beim Menschen am lateralen Rand des Seitenventrikels und legt sich ringförmig über das *Putamen*. Beide Anteile sind entwicklungsgeschichtlich und funktionell eng miteinander verwandt und werden bei Menschen, Primaten, Katzen, Hunden und vielen anderen Säugern durch die Fasern der *Capsula interna* getrennt. Dies imponiert makroskopisch als eine Streifung, daher der Name „Streifenkörper“ (lat. *striatum* = gestreift). Ein beim Menschen relativ kleiner Anteil des *Striatums*, der in seinem ventrorostralen Bereich an der Verschmelzungsstelle der beiden Kerngebiete gelegen ist, wird auch als *Nucleus accumbens* bezeichnet (Trepel, 1999).

Funktion des Striatums

Das Striatum bildet den wichtigsten Eingang in das System der Basalganglien. Die dorsalen und ventralen Anteile (u.a. der *Ncl. accumbens*) des Striatums sind funktionell verschieden. Das *dorsale Striatum* enthält Afferenzen vor allem aus den präfrontalen Assoziationsfeldern und beeinflusst eher die Willkürmotorik, während das *ventrale Striatum* sehr viele Afferenzen aus Anteilen des limbischen Systems erhält und somit wohl unter anderem die emotional geprägte Motorik koordiniert.

Die Neurone des Striatums haben unterschiedliche Effekte auf die Motorik. Einige Neurone erleichtern die Ausführung von Bewegungen, andere erschweren sie (Braak et al., 2000). Nach dem Eingang exzitatorischer glutamaterger Projektionen von der Hirnrinde in das Striatum projizieren GABAerge Neurone (GABA = γ -Aminobuttersäure, engl. *gamma-aminobutyric acid*) von hier aus in das innere und das äußere Pallidumglied und bauen dabei einen „langen“ oder einen „kurzen“ Weg auf. Der „kurze“ Weg erreicht über das innere Pallidumglied direkt die Zielgebiete im *ventrolateralen Thalamus*, während die des äußeren Pallidumgliedes im *Nucleus subthalamicus* endigen. Im Falle des „langen“ Weges wird erst über die erregenden Projektionen des *Nucleus subthalamicus* eine Verbindung zum inneren Pallidumglied und damit zum thalamischen Ziegebiet hergestellt. Die Thalamuskern projizieren mit aktivierender Funktion zur motorischen und präfrontalen Hirnrinde und beeinflussen so deren absteigende Signale (Braak et al., 2000; Parent et al., 2001).

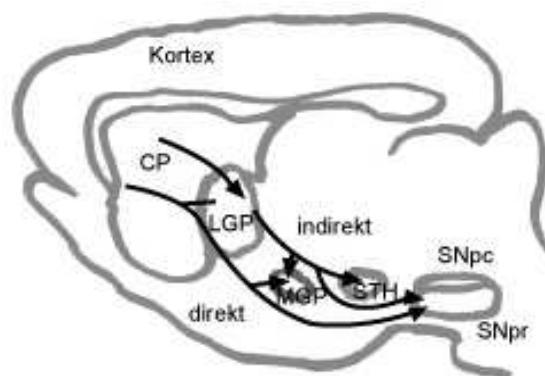


Abb. 1 Modell Rattenhirn: Verbindungen der Basalganglien: Informationen aus dem Neokortex bilden den hauptsächlichen Input in die Basalganglien und erreichen das Striatum (Caudatus-Putamen-Komplex, CP), dessen ventraler Teil mit dem *Ncl. accumbens* verschmilzt. Von hier werden die Signale zum inneren Pallidumglied (engl. *medial Globus pallidus*, MGP) und zur *Substantia nigra pars reticulata* (SNpr), welche funktionell und histologisch viele Gemeinsamkeiten aufweisen, gesendet. Dabei wird entweder ein langer, indirekter Weg über das äußere Pallidumglied (engl. *lateral Globus pallidus*, LGP) und den *Nucleus subthalamicus* (STH), oder aber ein kurzer, direkter Weg, beschritten. Ausgehende Signale aus den Basalganglien erreichen über GABAerge, inhibitorische Neurone schließlich die Thalamuskern (nicht eingezeichnet)

Für die Ausführung rascher und fein abgestufter Bewegungen wird vorübergehend der „kurze“ beziehungsweise direkte Weg aktiviert, während sonst der „lange“, indirekte Weg überwiegt. Dieses Wechselspiel wird wesentlich über die Einflüsse der dopaminergen Neurone der *Substantia nigra* und der großen cholinergen Interneurone innerhalb des *Striatums* gesteuert.

Substantia nigra

Die *Substantia nigra* (SN) liegt im Mittelhirn an der Grenze zwischen den *Crura cerebri* und dem *Tegmentum mesencephali*. Mikroskopisch kann man in ihr eine dorsal gelegene, zellreiche *Pars compacta* (SNpc) und eine ventrale, etwas voluminösere und zellärmere *Pars reticulata* (SNpr) unterscheiden. Die beiden Zonen sind auch funktionell und hinsichtlich ihrer Faserverbindungen sehr unterschiedlich. Die SNpc enthält dichtgedrängt die großen dopaminergen, neuromelaninhaltigen Neurone (Trepel, 1999). Neuromelanin, welches der SN ihre dunkle Pigmentierung gibt, ist ein Polymer, das aus Dihydroxyphenylalanin (DOPA) gebildet wird, einem Vorläufer des Dopamins. Dopamin wird aus der proteinogenen Aminosäure Tyrosin synthetisiert, wobei die Decarboxylierung von Tyrosin zu L-Dopa durch die Tyrosinhydroxylase (TH) den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt (Nagatsu et al., 1964). Die dickere, ventral gelegene SNpr besteht aus viel weiter auseinander liegenden Zellen, enthält nur vereinzelt dopaminerge Neurone und hat histologisch und funktionell viele Gemeinsamkeiten mit dem inneren Pallidumsegment. Der vorherrschende Neurotransmitter in der SNpr ist GABA.

Funktion der Substantia nigra

Die dopaminergen Projektionen aus der SNpc erreichen über das mediale Vorderhirnbündel (engl. *medial forebrain bundle*, MFB) das *Striatum*. Dort ermöglichen und erleichtern sie die Passage über den „kurzen“ Weg, während der Einfluß der striatalen cholinergen Interneurone zu einer Lenkung der Datenströme über den „langen“ Weg führt (Braak et al., 2000). Das heißt: über die nigrostriatalen Bahnen hemmen die dopaminergen Fasern aus der SNpc die Aktivität der Neurone des *Striatums*, welche einen inhibitorischen Effekt auf motorische Impulse des Großhirns haben. Außerdem gibt es dopaminerge Efferenzen in die *Formatio reticularis* des Hirnstamms, die den generellen Muskeltonus beeinflussen, sowie zum limbischen System (Trepel, 1999).

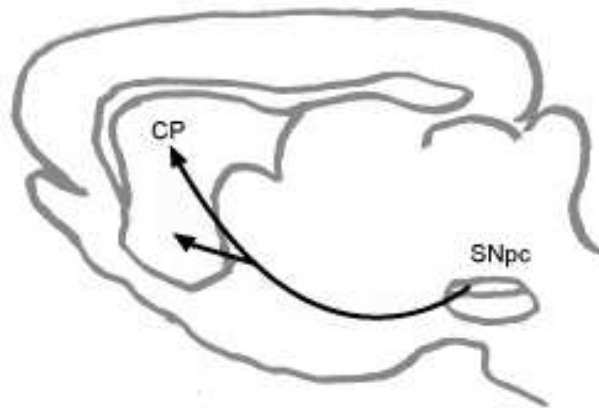


Abb. 2 Modell Rattenhirn: Über das mediale Vorderhirnbündel sendet die *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) dopaminerge Projektionen zum *Striatum* (CP)

Pathologie beim Morbus Parkinson und deren Auswirkungen

Bei Auftreten der ersten klinischen Symptome des Morbus Parkinson ist der Dopamingehalt im *Putamen* auf etwa 80 % abgesunken, der Zellverlust in der SNpc liegt bei 60 %. Die Degeneration dopaminergener Neurone in der SNpc beim Morbus Parkinson unterscheidet sich von dem Muster welches beim normalen Alterungsvorgang beobachtet wird. Beim Morbus Parkinson ist der Zellverlust besonders auf die ventrolateralen und kaudalen Anteile der SNpc konzentriert, während beim normalen Altern eher der dorsomediale Aspekt betroffen ist (Fearnley and Lees, 1991).

Durch die Degeneration der dopaminergen Neurone der SNpc beim Morbus Parkinson überwiegt die tonisch-inhibitorische Wirkung des „langen“ Weges auf die thalamischen Projektionsneurone, es kommt zur brady- und hypokinetischen Bewegungsstörung.

Der *Rigor* wird dagegen auf eine mangelnde dopaminerge Hemmung von Motoneuronen der *Formatio reticularis* des Hirnstammes zurückgeführt. Diese nun enthemmten Motoneurone projizieren ins Rückenmark und sorgen so möglicherweise für den bei Morbus Parkinson erhöhten Muskeltonus (Trepel, 1999).

Für den *Tremor* könnte eine mangelhafte dopaminerge Inhibition von Bereichen der *Formatio reticularis* verantwortlich sein, die in rhythmischen Abständen spontan aktivierende Signale in den *Thalamus* und den motorischen Kortex senden (Trepel, 1999).

1.2.2. Lewykörperchen

Während die Diagnosestellung bei erkrankten Personen wie oben beschrieben anhand klinischer Kriterien erfolgt, erfordert die definitive Bestätigung *post mortem* den Nachweis von dopaminergem Zellverlust sowie auch von Lewykörperchen (engl. *Lewy bodies*, LB). LB sind runde, eosinophile, zytoplasmatische Aggregate aus Proteinen, darunter *alpha*-

Synuclein, Parkin, Ubiquitin und Neurofilamente, welche in allen betroffenen Hirnregionen gefunden werden (Forno 1996, Spillantini et al., 1998). Sie haben einen Durchmesser von ca. 15 µm und setzen sich aus einem dichten hyalinen Kern und einer helleren Umgebung, dem so genannten Halo, zusammen. LB sind zwar charakteristisch, aber nicht spezifisch für Morbus Parkinson, kommen auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer vor und treten bei einigen Parkinsonformen nicht auf. Ihre Bedeutung bezüglich des Zelluntergangs ist kontrovers.

1.2.3. Beteiligung des serotoninergen Systems

Die Neurodegeneration beschränkt sich nicht ausschließlich auf dopaminerge Neurone. Zelluntergang und LB finden sich gleichfalls im Bereich der serotoninergen Raphekerne, darüber hinaus auch im noradrenergen (*Locus coeruleus*) und cholinergen System (*Nucleus basalis Meynert*) sowie im zerebralen Kortex, *Bulbus olfactorius* und autonomen Nervensystem. Die Läsionen im serotoninergen System sind allerdings nicht so klar charakterisiert wie die im dopaminergen. Veränderungen des Serotoninstoffwechsels könnten an der Entstehung von Depression, Schlafstörungen und visuellen Halluzinationen bei Morbus Parkinson beteiligt sein (Yamamoto 2001; Zoldan et al., 1993; Cheng et al., 1991; Becker et al., 1997).

Serotonin

Serotonin oder 5-Hydroxytryptamin (5-HT) wird von Tryptophan ausgehend synthetisiert, einer neutralen Aminosäure, welche mit der Nahrung aufgenommen wird und die Blut-Hirn-Schranke passiert. Die Tryptophanhydroxylase (TPH), ein zytoplasmatisches Enzym, katalysiert die Reaktion, in der Tryptophan zu 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) hydroxyliert wird (Lovenberg et al., 1967; Jéquier et al., 1967). Durch Decarboxylierung entsteht aus 5-HTP schließlich 5-HT.

5-HT ist ein Indolamin-Neurotransmitter, der im zentralen Nervensystem wichtig für eine Vielzahl physiologischer Funktionen ist, unter anderem, Kontraktion der glatten Muskulatur, Appetit, Schlaf, Kognition, Perzeption, Stimmung und andere zentralnervöse Funktionen (Hoeyer et al., 1994; Roth, 1994).

Anatomie

Die Mehrheit 5-HT-produzierender Zellen des ZNS ist in den Raphe-Kernen in der Mittellinie des Hirnstammes lokalisiert (Törk, 1990). Diese serotoninergen Neurone des Hirnstammes haben umfangreiche Projektionen in praktisch alle Hirnregionen und das Rückenmark (Steinbusch, 1981; Törk, 1990). Die rostralen Gruppen der 5-HT-Neurone

(B5-B9) geben vor allem aufsteigende Fasern ab, während von den kaudalen Gruppen (B1-B4) die Mehrheit der absteigenden Fasern ausgeht (Aitken und Törk, 1988). Die aufsteigenden Projektionen sammeln sich im MFB und divergieren dann in verschiedene Faserwege zu ihren Zielstrukturen im Vorderhirn. Der *Nucleus dorsalis raphe* (DR, Gruppe B7) bildet den größten und 5-HT-dichtesten Zellverband und ist im periaquäduktalen Grau des Mittelhirns gelegen. Das *Striatum* erhält über das MFB eine dichte Innervierung aus dem DR (Vertes, 1991,1999). Die serotoninergen Strukturen können durch die immunhistochemische Markierung des 5-HT synthetisierenden Enzyms Tryptophanhydroxylase (TPH) nachgewiesen werden (Weissmann et al., 1987).

Rezeptoren

Zur Vermittlung der vielfältigen Funktionen von 5-HT existieren mehr als 15 unterschiedliche Rezeptoren, welche von unterschiedlichen Genen codiert werden. 5-HT-Rezeptoren werden nach molekularbiologischen Kriterien in sieben Hauptklassen unterteilt: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ und 5-HT₇ (Hoyer et al., 1997), mit mindestens 15 Untergruppen (Barnes und Sharp 1999; Kroeze et al., 2002). Mit der Ausnahme des 5-HT₃-Rezeptors, der ein Liganden-vermittelter Ionenkanal ist (Maricq et al., 1991), gehören 5-HT-Rezeptoren zu den G-Protein-vermittelten Rezeptoren (Kroeze et al., 2002).

Zusammenspiel von DA und 5-HT

Es wurde gezeigt, dass 5-HT die Freisetzung von Dopamin im *Striatum* fördert (Benloucif et al., 1993; Galloway et al., 1993; Yadid et al., 1994) und die Aktivität der Neurone in der *Substantia nigra* reguliert (Kelland et al., 1990). Umgekehrt sind Dopamin-Afferenzen dazu in der Lage, die 5-HT-Freisetzung im *Nucleus raphe dorsalis* zu fördern und gleichzeitig diese Freisetzung im *Striatum* zu hemmen (Lee und Geyer, 1984; Ferré und Artigas, 1993; Ferré et al., 1994).

Eine Interaktion zwischen dopaminergen und serotonergen Eingängen zum *Striatum* ist in Ratten, welchen als Neugeborenen 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) injiziert wurde, nachgewiesen worden. Diese Ratten zeigen einen bedeutenden Rückgang der Anzahl dopaminergere Afferenzen und gleichzeitig eine gesteigerte Dichte von 5-HT-Axonon im *Striatum*, vor allem in dessen rostralen Anteilen (Stachowiak et al., 1984; Berger et al., 1985; Snyder et al., 1986; Descarries et al., 1992).

Die 5-HT-Hyperinnervation nach dem Absinken der Dopaminkonzentration im *Striatum* unter Verwendung von 6-OHDA wird begleitet von einem Anstieg des striatalen 5-HT-Gehaltes und der 5-HT-Wiederaufnahme (Luthman et al., 1987; Molina-Holgado et al. 1993,1994). Neonatale 6-OHDA-Läsionen induzieren außerdem eine erhöhte

Ligandenbindung an striatale 5-HT_{1B}-, 5-HT_{1nonAB}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren (Radja et al., 1993) sowie erhöhtes Ansprechen auf 5-HT-Rezeptor-Agonisten (El Mansari et al., 1994). Der Gehalt an mRNA des 5-HT_{2A}-Rezeptors im *anterioren Corpus striatum* ist deutlich erhöht (Laprade et al., 1996). Die erhöhten 5-HT_{2A}-Rezeptor mRNA-Level beziehungsweise die gesteigerte Biosynthese von 5-HT_{2A}-Rezeptoren im Striatum Dopamin-verarmter Ratten sind unabhängig von der nachfolgenden 5-HT-Hyperinnervation und stehen möglicherweise in Beziehung zur Dopamin-D₁-Rezeptoraktivität (Basura und Walker, 1999).

Diese Versuche zeigen die zerebrale Plastizität des Dopamin- und des Serotoninsystems während der Entwicklung und legen die Hypothese nahe, dass eine ähnliche Kompensation auch im reifen Nervensystem sowie bei pathologischen Prozessen wie im Falle des MP beim Menschen stattfinden könnte.

1.3. Pathomechanismen des Morbus Parkinson

Aufgrund noch ungeklärter Ursachen kommt es beim Morbus Parkinson zur irreversiblen Degeneration dopaminerger Neurone in der SNpc. Unterschieden werden im wesentlichen zwei Formen des Zelluntergangs, Nekrose und Apoptose (siehe unten), mit jeweils charakteristischen biochemischen und morphologischen Veränderungen an Zellkern, Zytoplasma und Zellmembran sowie unterschiedlicher Reaktion des umliegenden Gewebes (Cotran 1999; Majno and Joris, 1995). Die Erforschung der Zelltodmechanismen hat hauptsächlich das Ziel, neue therapeutische Optionen zu eröffnen um diese degenerativen Prozesse beeinflussen zu können.

Untersuchungen von Toxin- und genetischen Modellen zeigen, dass Defekte in der mitochondrialen Atmungskette mit nachfolgendem oxidativen Stress einschließlich toxischer oxidierten Dopaminderivate sowie atypisch gefaltete und aggregierte Proteine am Untergang dopaminerger Neurone in der SNpc beteiligt sind (Dauer und Przedborski, 2003).

Die abnormale Ablagerung von Proteinen im Hirngewebe ist ein Charakteristikum des Morbus Parkinson und mehrerer altersabhängiger neurodegenerativer Erkrankungen. Die Zusammensetzung und Lokalisation dieser Einschlüsse ist unterschiedlich, aber dieses gemeinsame Merkmal suggeriert, dass die Proteinablagerung direkt oder indirekt an der Neurotoxizität beteiligt ist. Im Falle des Morbus Parkinson enthalten die Lewykörperchen oxydativ verändertes α -Synuklein, welches *in vitro* stärker zur Aggregation neigt als nicht modifiziertes α -Synuklein (Giasson et al., 2000). Bei vererbten Parkinsonformen werden pathogene Mutationen für die Produktion abnormaler und möglicherweise toxischer Proteinkonformationen verantwortlich gemacht. Zwei *missense*-Mutationen für α -Synuklein führen beispielsweise zu einer dominant vererbten Parkinsonerkrankung. Ein

Auslöser für den veränderten Proteinmetabolismus beim Morbus Parkinson könnte oxidativer Stress sein (Dauer und Przedborski, 2003). Zellen reagieren auf atypisch konfigurierte Proteine durch Produktion so genannter *chaperons*. Wenn diese atypischen Proteine nicht durch die *chaperons* korrigiert werden können, werden sie durch *Proteasomen* abgebaut. Veränderungen in der *chaperon*- und *Proteasom*-Funktion könnten an der Akkumulation toxischer Proteinaggregate beteiligt sein (Sherman and Goldberg, 2001).

Inhibition des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette steigert die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS). Diese Moleküle können mit DNA, Proteinen und Lipiden reagieren und so Zellen schädigen. Ein Ziel dieser reaktiven Spezies ist die Elektronentransportkette selber, was mitochondriale Störungen und weitere ROS-Produktion bewirkt (Cohen, 2000). Mehrere Marker oxidativer Schädigungen sind in den SNpc-Zellen im Gehirn von Parkinsonpatienten erhöht (Dauer und Przedborski, 2003). Auch der Gehalt des Antioxidans Glutathion ist in den Zellen der SNpc beim Morbus Parkinson erniedrigt (Sian, 1994). Die Gegenwart von ROS kann wiederum den Gehalt an atypisch gefalteten Proteinen erhöhen, was das Proteasomensystem verstärkt beansprucht. Dopaminerge Neurone neigen in besonderem Maße zur Bildung von ROS. Der Metabolismus dieser Zellen produziert Wasserstoffperoxid- und Superoxidradikale, und Autoxidation von Dopamin führt zur Bildung von Dopaminquinon (Graham, 1978), ein Molekül welches Proteine über Reaktion mit Cysteinresten schädigen kann. Mitochondrial bedingter Energiemangel kann vesikulär gespeichertes Dopamin freisetzen und damit die intrazelluläre Dopaminkonzentration erhöhen. Durch die verstärkte Aktivierung dopaminvermittelter Reaktionen können Makromoleküle geschädigt werden. Dopamin selbst könnte somit daran beteiligt sein, dass die Zellen der SNpc besonders vulnerabel für oxidative Schädigungen sind (Dauer und Przedborski, 2003).

Die aufgeführten pathologischen Prozesse beim Morbus Parkinson, oxidativer Stress, verminderte antioxidative Mechanismen, mitochondriale Defekte mit konsekutiv reduziertem ATP und Veränderungen der Protonenpumpen mit resultierendem Nachlass des mitochondrialen Membranpotentials können Apoptose auslösen. Insbesondere freie Radikale und die Erschöpfung der Glutathion-Vorräte sind als Trigger aktiven Zelltodes in Neuronen beschrieben worden (Merad-Boudia et al., 1998). Eine Verminderung des mitochondrialen Membranpotentials ist möglicherweise einer der wichtigsten Auslöser für Apoptose (Jacotot et al., 1999; Martinou, 1999; Desagher und Martinou, 2000). Apoptose ist eine Form programmierten Zelltodes, die sich anhand bestimmter Kriterien von Nekrose unterscheiden lässt.

Nekrose

Nekrose ist definiert als intravitale morphologische Veränderung einer Zelle oder eines Gewebes nach irreversiblen Ausfall der Zellfunktion bei schwerwiegender bzw. anhaltender Noxe („Point of no return“). Die Nekrose stellt nach heutigem Verständnis einen der Zelle von aussen aufgezwungenen Tod dar und ist durch folgende morphologische Veränderungen charakterisiert (Bartling et al., 1998; Cotran, 1999):

- Kern: Chromatinkondensation und DNA-Fragmentation in Bruchstücke zufälliger Größe; Karyopyknose, -lyse, oder -rrhexis
- Zytoplasma: Degradation von Funktions- und Strukturproteinen (Koagulation); irreversible mitochondriale Läsionen
- Membran: protrahierte Schwellung führt zur Membranruptur mit Verlust zytosolischer, chemotaktisch aktiver Substanzen in die Umgebung
- Konsekutive exsudative Gewebsreaktion: Inflammation und Defektheilung

Apoptose

Bei der Apoptose handelt sich um eine distinkte Form des Untergangs einzelner Zellen bzw. kleiner Zellgruppen mit charakteristischen histomorphologischen und biochemischen Merkmalen (Bartling et al., 1998; Kerr et al., 1972; Wyllie, 1980). Die Apoptose ist ein programmierter, streng regulierter, Energie verbrauchender Vorgang. Die Befähigung einer Zelle zur Apoptose scheint konstitutionell, die Mechanismen zellinhärent zu sein. Eine weitgehend intakte Zellfunktion und -struktur (Proteinbiosynthese, Enzymausstattung, Energieniveau, Kompartimentierung) sind eine Voraussetzung für die Apoptose (Bartling et al., 1998; Leist et al., 1997). Diese Erkenntnisse führten zur Prägung der heute weitgehend synonym verwendeten Bezeichnung „programmierter Zelltod“ (engl. *programmed cell death*, PCD).

Fundamentaler Prozess der Apoptose ist die Aktivierung einer intrazellulären Enzymkaskade. Die beteiligten Enzyme sind Kalzium-abhängige, hochspezifische Cystein-Proteasen, die an Aspartat spalten, sog. „Caspasen“ (*Cystein mediated Aspartat directed Proteases*). Die proteolytische Spaltung der inaktiven Caspasen führt zur Freilegung ihres katalytischen Zentrums. Durch den Kaskadencharakter werden Regulation und Amplifikation des Apoptoseprogramms ermöglicht. Der Ablauf lässt sich in 3 Phasen gliedern: Initiation, Exekution, Abräumung. Je nach Funktion und Position in der Kaskade werden Initiator(2,8,9,10)-, Exekutions(3,6,7)- und Inflammations(1,4,5)-Caspasen unterschieden (Cotran, 1999; Thornberry und Lazebnik, 1998).

Verschiedene Trigger für die Initiation von Apoptose sind bekannt. Als pathogenetisch bedeutsam für Morbus Parkinson (sowie bestimmter endogener und exogener Toxine, siehe 1.4, 1.5) sind wie oben beschrieben oxidativer Stress, verminderte antioxidative Mechanismen, mitochondriale Defekte mit konsekutiv reduziertem ATP und Veränderungen der Protonenpumpen mit resultierendem Nachlass des mitochondrialen Membranpotentials.

Nach gegenwärtigem Erkenntnisstand wird davon ausgegangen, dass die unterschiedlichen Initiationswege der Apoptose in einen gemeinsamen Exekutionsmechanismus münden (Bartling et al., 1998; Cotran, 1999; Thornberry und Lazebnik, 1998). Den Exekutions-Caspasen kommt somit eine Schlüsselposition zu; der Nachweis aktivierter Caspasen gilt als Beweis für die Apoptose (Saraste and Pulkki, 2000; Scarabelli et al., 2001). Effekte der Caspasen-Aktivierung sind:

- Kern: Proteolytische Spaltung von Lamin führt zur Chromatindesintegration und – kondensation entlang des Kardiolemms; Inaktivierung der DNA-Reparatur; Fragmentierung der DNA durch internukleosomale Spaltung in Stücke von $n \times 180\text{-}200\text{bp}$ Länge.
- Zytoplasma: Proteolytische Desintegration von Zytoskelett und Aktin führt zur Zellschrumpfung, Membranblasenbildung (sog. „blebbing“) und Verlust des interzellulären Kontakts mit Abschnürung membranumschlossener Apoptosekörperchen, sog. „*apoptotic bodies*“; die Organellen bleiben weitgehend intakt
- Membran: Expression neuer Epitope auf der Außenseite (z.B. Annexin V) als Trigger für rezeptorvermittelte Phagozytose
- Abräumung der „*apoptotic bodies*“ mittels Phagozytose durch benachbarte Zellen

Die morphologischen Veränderungen sind mit der Aktivierung einer spezifischen Endonuklease assoziiert, welche Brüche im DNA-Doppelstrang des Chromatins in den Internukleosomalregionen verursacht (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980, 1985). 1992 etablierten Gavrieli et al. ein System, welches TdT-vermittelt mit dUTP-Biotin freie Schnittenden markiert, um DNA-Strangbrüche apoptotischer Zellen *in situ* zu detektieren (TUNEL, *TdT mediated dUTP nick end labeling*). Diese Methode basiert auf der spezifischen Bindung von Terminaler Desoxynucleotidyltransferase (TdT) an 3'-Hydroxy-Enden von DNA mit anschließender Synthese eines biotinylierten Polydesoxinukleotid-Polymers. Die Signale können mit einem Peroxidase-konjugierten Avidin verstärkt werden, was die konventionelle histochemische Identifizierung mittels Lichtmikroskopie erlaubt (Gavrieli et al., 1992). Auch bei Nekrose kommt es in den späteren Stadien zu

(allerdings ungeordneter) nukleärer DNA-Degradation. TUNEL färbt deshalb auch freie Enden von Kernsubstanz bei nekrotischen Zellen an und ist deswegen nur in Verbindung mit anderen Apoptosekennzeichen spezifisch.

Der Nachweis von Apoptose mittels Lichtmikroskopie ist schwierig, außerdem wurden auch Formen von PCD beschrieben die keine apoptosetypische Morphologie aufweisen (Clarke, 2002; Sperandio et al., 2000; Otsuki et al., 2003). Bei der Untersuchung von Zelltodmechanismen werden deshalb für den Nachweis von PCD spezifische molekulare Komponenten gemessen. Im Hirngewebe von Parkinsonpatienten wurde *post mortem* beispielsweise eine vermehrte Anzahl Bax-positiver dopaminergere SNpc-Neurone (ein PCD assoziiertes Molekül) nachgewiesen (Hartmann et al., 2001a), ausserdem eine erhöhte neuronale Bax-Genexpression (Tatton, 2000) sowie eine verminderte Expression des Anti-PCD-Proteins Bcl-xL, so dass eine Beteiligung von PCD naheliegt.

Für die dopaminergen Neurone der SNpc bei Morbus Parkinson wurde außerdem in gesteigertem Maß die Effektorprotease Caspase 3 (Hartmann et al., 2000, 2002) sowie anderer PCD-assoziierter Caspasen nachgewiesen (Hartmann et al., 2001b; Viswanath et al., 2001). Eine Methode für die *in situ*-Immunodetektierung aktiver Caspase 3 in apoptotischen Neuronen, basierend auf einem polyklonalen Antiserum, welches spezifisch die aktivierte Form der Caspase erkennt, nicht aber das inaktive Zymogen, wurde von Srinivasan et al. (1998) beschrieben.

Aufgrund der Vielschichtigkeit der apoptotischen bzw. nekrotischen Veränderungen auf DNA-, Protein- und morphologischer Ebene existieren diverse Nachweis- und Differenzierungsmethoden. Die Limitierung der einzelnen Methoden hinsichtlich Spezifität und Sensitivität führten zum gegenwärtig geforderten Konzept der kombinierten Anwendung unterschiedlicher Nachweisverfahren (sog. „multiple approach“) (u.a. Vila und Przedborski, 2003; Jellinger, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Methoden angewendet, um bei den Untersuchungen zu NMNorsal (siehe 1.5) Zelltodmechanismen zu untersuchen:

- Auf morphologischer Ebene: Lichtmikroskopie mit Nissl-Färbung zu Markierung von Neuronen (Kresylviolett); Methylgrün-Färbung zu Nachweis apoptotischer Veränderungen der Kernstruktur gesucht, nämlich Kondensation, Fragmentierung und Anlagerung des Chromatins an die Kernmembran
- Auf Nukleinsäuren-Ebene: TUNEL-Färbung zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen
- Auf Proteinebene: Immunhistochemie zum Nachweis der aktiven Form der Effektor-Caspase 3

1.4. Modelle des Morbus Parkinson

Untersuchungen an Tieren erlauben Erkenntnisse über die Mechanismen der verschiedenen Aspekte der Krankheit und sind deshalb ein unentbehrliches Werkzeug bei der Erforschung der Parkinsonkrankheit.

6-OHDA

6-Hydroxydopamin (6-OHDA), das älteste Tiermodell für Morbus Parkinson das mit dopaminergem Zelltod in der SNpc assoziiert ist, wurde schon vor weit über 30 Jahren etabliert (Ungerstedt, 1968). Obwohl die durch 6-OHDA induzierte Pathologie sich in wesentlichen Punkten vom Morbus Parkinson unterscheidet ist es immer noch weit verbreitet. 6-OHDA induzierte Toxizität ist relativ selektiv für monoaminerge Neurone, da es von Dopamin- und noradrenergen Transportern in die Zelle aufgenommen wird (Luthman et al., 1989). Innerhalb der Neurone akkumuliert 6-OHDA im Zytosol, führt zur Bildung von ROS und deaktiviert biologische Makromoleküle durch Generierung von Quinonen, welche wiederum nukleophile Gruppen angreifen (Cohen und Werner, 1994).

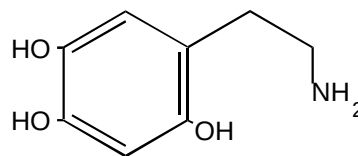


Abb. 3 6-Hydroxydopamin (6-OHDA)

Weil 6-OHDA die Blut-Hirn-Schranke nicht durchqueren kann, muss es stereotaktisch in die *Substantia nigra*, das MFB oder direkt ins Striatum injiziert werden (Javoy et al., 1976; Jonsson, 1983). Unilaterale Injektionen erlauben den quantitativen Vergleich mit der Kontrollseite (Ungerstedt, 1971). Nach 6-OHDA-Injektionen in die SN oder ins MFB beginnt der dopaminerge Neurodegenerationsprozess binnen 24 Stunden (Jeon et al., 1995), nach striataler Injektion bewirkt 6-OHDA eine längerdauernde retrograde Degeneration nigrostriataler Neurone über 1- 3 Wochen (Sauer und Oertel, 1994). Ob der durch 6-OHDA ausgelöste Zelltod nekrotisch ist, oder eine Art von PCD ist wird widersprüchlich diskutiert. Keines der verschiedenen 6-OHDA-Modelle führt zur Bildung von Lewy-Körperchen. Ratten und andere Nagetiere entwickeln phänotypisch kein exakt dem Menschen vergleichbares Parkinsonsyndrom. Nach bilateralen Injektionen sterben die Tiere häufig frühzeitig aufgrund ausgeprägter Aphagie, Adypsie und Krampfanfällen. Meist werden einseitige Läsionen angewendet, die ein asymmetrisches Rotationsverhalten hervorrufen, dessen Intensität mit dem Ausmaß der nigrostriatalen Schädigung korreliert (Przedborski et al., 1995). Dieses spezifische Verhalten wird vor

allem nach Gabe von Substanzen deutlich, welche die Dopaminrezeptoren stimulieren, wie z.B. Apomorphin (Rotation zur Läsionsseite), oder Substanzen welche die Dopaminfreisetzung fördern, z.B. Amphetamin (Rotation entgegengesetzt der Läsion). In den letzten Jahren wurden Tests entwickelt, welche parkinsonähnliche motorische Veränderungen wie Akinese und Dyskinesien bei Ratten nach 6-OHDA-Läsion nachweisen sollen (Cenci et al., 2002).

Trotz phänotypischer Unterschiede zur Erkrankung beim Menschen und widersprüchlichen Ergebnissen zu den Mechanismen des Zelltodes löst 6-OHDA molekulare Veränderungen vergleichbar derer beim Morbus Parkinson aus und ist darum eines der am meisten verwendeten Tiermodelle für diese Erkrankung.

MPTP

Im Jahre 1982 entwickelten junge kalifornische Drogenkonsumenten ein rasch fortschreitendes Parkinsonsyndrom, welches auf die intravenöse Verabreichung von illegal synthetisiertem 1-Methyl-4-Phenyl-4-Propionoxyperidin (MPPP, ein Analogon des Narkotikums Meperidin) zurückgeführt werden konnte (Langston et al., 1983). 1-Methyl-4-Phenyl-Tetrahydro-Pyridin (MPTP) war bei dieser verbotenen MPPP-Herstellung in einem Kellerlabor die unbeabsichtigt produzierte verantwortliche Kontaminationssubstanz. Bei Mensch und Affen bewirkt MPTP ein irreversibles, schweres Parkinsonsyndrom, welches alle klinischen Eigenschaften (*Tremor*, *Rigor*, *Hypokinese*, posturale Instabilität und *Freezing*) des Morbus Parkinson aufweist. Wie beim Morbus Parkinson reagieren Mensch und Affen sehr gut auf L-DOPA und entwickeln unter dieser Behandlung quasi identische motorische Langzeitkomplikationen (Dauer und Przedborski, 2003).

Neuropathologisch zeigen bei mit MPTP behandelten Affen ein Muster der nigrostriatalen Neurodegeneration analog zum Morbus Parkinson (Moratalla et al., 1992; Varastet et al., 1994). Wie beim Morbus Parkinson sind dopaminerge Zellen, die Neuromelanin enthalten, anfälliger für die durch MPTP induzierte Degeneration. Neuromelanin kann beim Morbus Parkinson und bei mit MPTP behandelten Affen durch ROS-Bildung über eine Interaktion mit Eisen zur Neurodegeneration selektiv in pigmentierten Zellen beitragen (Zecca et al., 2001). Das MPTP-Affen-Modell zeigt im Unterschied zum Morbus Parkinson in anderen, nicht dopaminergen monoaminergen Kernen keinen mit diesem übereinstimmenden Zelluntergang und außerdem keine klassischen Lewy-Körperchen (Forno et al., 1993). Das MPTP-Affen-Modell ist trotz dieser neuropathologischen Differenzen Goldstandard vor allem für die Untersuchung neuer Strategien für die symptomatische Behandlung des Morbus Parkinson. Auch in anderen Säugerspezies, vor allem Mäusen, wird MPTP verwendet. Nagetiere entwickeln als Verhaltenskorrelat allerdings keinen typischen Parkinsonismus, da die motorischen Systeme bei Mensch und Nagern verschieden

1.5. Ätiologie des Morbus Parkinson und NMNorsal

Die Tatsache, dass Menschen unter MPTP ein dem Morbus Parkinson nahezu identisches Syndrom entwickeln (Langston et al., 1983) ist ein prototypisches Beispiel dafür wie ein *exogenes* Toxin klinische und pathologische Eigenschaften des Morbus Parkinson imitieren kann. Weitere Exotoxine sind zum Beispiel Paraquat, welches strukturell ähnlich zu MPP⁺ ist und als Herbizid benutzt wurde und das als Insektizid eingesetzte Rotenon, ein ebenfalls in der Umwelt vorhandenes Mitochondriengift. Dennoch gibt es keine sicheren Daten für die Beteiligung eines spezifischen Umweltgiftes an der Entstehung von Morbus Parkinson. Dagegen sind *endogene* Toxine, das heißt Stoffe, welche im Gehirn erkrankter Personen produziert werden, möglicherweise entscheidend mitverantwortlich für die Entstehung des Morbus Parkinson. Veränderungen des normalen Metabolismus aufgrund von Umwelt- und/ oder genetischen Faktoren könnte zur Bildung toxischer Substanzen im betroffenen Organismus selbst führen.

Vertreter aus der Stoffgruppe der Tetrahydroisochinoline (TIQs) werden aufgrund Ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu MPTP mit der Ätiologie des Morbus Parkinson in Verbindung gebracht. TIQs kommen vielfach in der Umwelt vor, für einige von ihnen wurde jedoch speziell die *endogene* Synthese im menschlichen Hirn nachgewiesen. Mehrere Studien haben sich in den letzten Jahren mit den strukturellen Eigenschaften beschäftigt, die Voraussetzung dafür sind, dass einige der TIQs selektiv toxisch auf dopaminerge Zellen sind. Eine Methylgruppe in N-Position (in Analogie zu MPTP) und zwei Hydroxylgruppen in Position 6 und 7 scheinen wahrscheinlich für die besondere, selektiv dopaminerge Toxizität wie im speziellen Falle von NMNorsal verantwortlich zu sein (Maruyama et al., 1993; Yoshida et al., 1993; Naoi et al., 1993; Takahashi et al., 1997; Storch et al., 2002).

N-Methyl-Norsalsolinol (NMNorsal)

2(N)-Methyl-6,7-Dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (N-Methyl-Norsalsolinol, NMNorsal) ist ein Dopaminderivat, welches strukturelle Analogien mit MPTP aufweist. NMNorsal wurde erstmalig 1991 *post mortem* im Gehirn von Parkinsonpatienten und gesunden Personen identifiziert (Niwa et al., 1991). NMNorsal wurde dann im lumbalen zerebrospinalen Liquor von Patienten, die an Morbus Parkinson litten, nicht aber bei gesunden Kontrollpersonen, nachgewiesen (Moser und Kömpf, 1992).

NMNorsal kann *endogen* durch die nichtenzymatische Ringzyklisierung von Dopamin mit Aldehyden oder 2-Oxosäuren in einer sogenannten Pictet-Spengler-Reaktion (Collins, 1980; Niwa, 1998) und anschließender N-Methylierung durch eine N-Methyltransferase (Naoi et al., 1998; Niwa et al., 1992), deren Aktivität in der SN am höchsten ist (Maruyama et al., 1992), gebildet werden. NMNorsal kann die Blut-Hirn-Schranke

zumindest im Tierversuch bei der Ratte in gewissem Umfang überschreiten (Thümen et al., 2002). Somit ist prinzipiell auch eine *exogene* Zufuhr ins Hirn möglich. Wahrscheinlich dürfte die *endogene* Synthese von NMNorsal im Hirn aber trotzdem größere Bedeutung besitzen. NMNorsal kann über das Dopamin-Transportsystem selektiv in die dopaminergen Neurone aufgenommen werden und wird innerhalb der Axone retrograd in die in der SN gelegenen Perikaryen transportiert. Durch anterograden Transport werden auch die axonalen Enden im Striatum erreicht, wo die Tyrosinhydroxylase hauptsächlich lokalisiert ist und somit auch der größte Teil der Dopaminsynthese stattfindet.

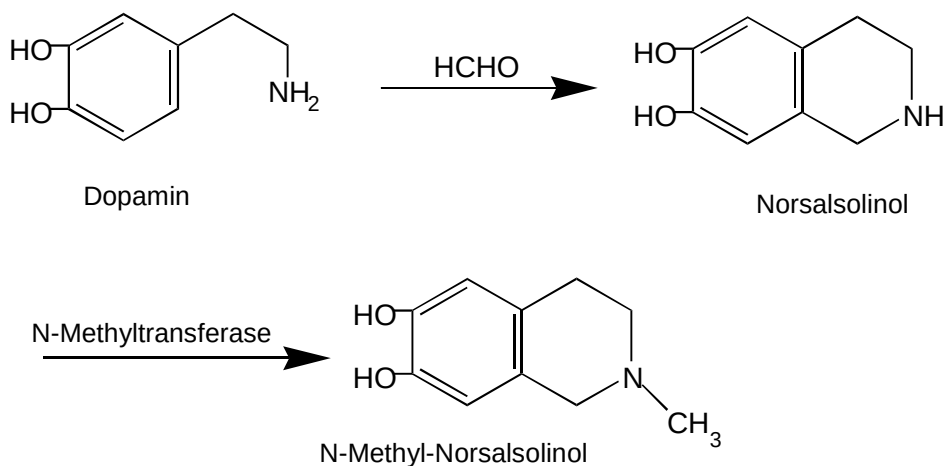


Abb. 5 Vermutlicher endogener Syntheseweg für NMNorsal im Hirn. Zuerst erfolgt die Pictet-Spengler-Kondensation von Dopamin und Formaldehyd (HCHO) zu Norsalsolinol, anschließend die Methylierung von Norsalsolinol zu NMNorsal.

Die *endogene* Produktion von NMNorsal könnte durch einen veränderten, kompensativ gesteigerten Dopaminstoffwechsel in den bei der Parkinsonkrankheit durch Neurodegeneration reduzierten SN-Neuronen ausgelöst sein (Scholz et al., 1997). Der Dopaminumsatz ist in Gegenwart von NMNorsal gesteigert, was auf eine Wechselwirkung dieser Substanz mit dem Dopaminstoffwechsel hinweist (Moser et al., 1995).

Tatsächlich haben *in vitro* Untersuchungen einen starken Einfluß von NMNorsal auf wichtige Enzyme des Dopaminmetabolismus nachweisen können. NMNorsal hemmt potent die Aktivität der TH im *Nucleus accumbens* der Ratte (Scholz et al., 1997) und die Monoaminoxidase (MAO) im *Nucleus caudatus* (Moser et al., 1996a). Ein inhibitorischer Effekt auf die TH ist auch bei MPTP bekannt (Hirata und Nagatsu, 1985). NMNorsal kann ähnlich wie MPTP durch die MAO zu einem positiv geladenen Ion oxidiert werden, im Falle des MPTP eine wichtige Voraussetzung für seine toxische Wirkung (Moser und Kömpf, 1992).

Als Schlussfolgerung könnte NMNorsal ein Marker eines bei der Parkinsonkrankheit veränderten Stoffwechsels sein und umgekehrt wiederum selber zu weiteren Störungen des Dopaminmetabolismus führen und einen toxischen Effekt auf dopaminerge Neurone haben.

Im Rahmen von *in vivo* Versuchen mit Ratten untersuchten Moser et al. (1996) die Effekte von NMNorsal nach unilateraler stereotaktischer Injektion von NMNorsal in das MFB auf das nigrostriatale System. Hierbei konnten allerdings keine signifikanten Wirkungen von NMNorsal auf die Zahl der dopaminergen Neurone und auf die Konzentrationen von Dopamin und seinen Metaboliten in den Basalganglien festgestellt werden (Moser et al., 1996c). Nach Gabe von S(+)-Amphetamin zeigten die Tiere ein starkes Rotationsverhalten ipsilateral zur Läsion ähnlich wie bei Verwendung von 6-OHDA, allerdings ohne 6-OHDA-äquivalente histologische und metabolische Veränderungen (Moser et al., 1996c).

Tetrahydroisochinolinderivate wie NMNorsal scheinen in Ratten mit dem Serotoninstoffwechsel zu interagieren (siehe 1.5) und stehen beim Menschen möglicherweise in Verbindung mit den neuropsychiatrischen Symptomen beim Morbus Parkinson. Die Auswirkungen von NMNorsal auf den Serotoninstoffwechsel der Ratte wurden bereits *in vivo* untersucht. 48 Stunden nach intraperitonealer Gabe von NMNorsal wurden erhöhte 5-HT-Spiegel im *Nucleus caudatus* der Ratte festgestellt (Thümen et al., 2003). Parallel dazu zeigten die Tiere eine Veränderung im Tag-/ Nachtrhythmus mit einer signifikanten Verstärkung der lokomotorischen Aktivität tagsüber mit einem Maximum nach 48 h (Thümen et al., 2003). Diese Effekte sind möglicherweise auf eine Veränderung von Serotonin-/ Opioid-Rezeptoren zurückzuführen. Tatsächlich beobachteten Moser et al. 2003 einen deutlichen Anstieg von 5-HT_{2A}- und Δ -Opioid-Rezeptor-mRNA im *Nucleus caudatus* von Ratten mit einem Maximum nach 48 h.

1.6. Das in dieser Arbeit verwendete Tiermodell

In der vorliegenden Arbeit wurde die Substanz NMNorsal in Analogie zu den Vorversuchen von Moser et al. stereotaktisch einseitig in das linke MFB von Ratten injiziert (Moser et al., 1986; Moser et al., 1996c). Die Aufnahme in die dopaminergen Neurone wurde wie in 1.5 erläutert nachgewiesen. Der Vorteil dieses Injektionsortes ist es, eine direkte Schädigung der untersuchten Regionen im *Striatum* und der SNpc zu vermeiden.

Eine einseitige Injektion wurde vorgenommen, um die Messergebnisse auf der operierten Seite mit denen der gesunden Seite besser vergleichen zu können. Da die Fasern des MFB kaum auf die Gegenseite kreuzen, sind Effekte der injizierten Toxine ausschließlich auf der operierten Seite zu erwarten.

Als negative Kontrolle wurde einigen Tieren lediglich sterile NaCl-Lösung stereotaktisch injiziert. Damit sollte festgestellt werden, welche Veränderungen allein durch die stereotaktische Operation entstehen.

In diesem Projekt wurde 6-OHDA als Testsubstanz verwendet, um sicherzustellen, dass die Versuchsbedingungen dazu geeignet sind, eventuelle toxische Effekte von NMNorsal auch tatsächlich nachzuweisen. Wenn es bei dem hier verwendeten Tiermodell gelingt, bei den mit 6-OHDA behandelten Tieren eine deutliche Läsion der nigrostriatalen dopaminergen Bahn zu erzeugen und somit die vielfachen Vorergebnisse (s.o.) zu bestätigen, dann ist davon auszugehen, dass die Versuche valide durchgeführt und somit die Ergebnisse verwertbar sind.

1.7. Spezielle Neuroanatomie der Ratte

Striatum der Ratte

Bei Ratten und vielen anderen Säugern ist die *Capsula interna* nur sehr schwach ausgebildet, was sich eher als einzelne Faserbündel denn als einheitliche Schicht darstellt. Ein beim Menschen relativ kleiner Anteil des *Striatums*, der in seinem ventro-rostralen Bereich an der Verschmelzungsstelle der beiden Kerngebiete gelegen ist, wird auch als *Nucleus accumbens* bezeichnet (Trepel, 1999). In Nissl-Färbungen stellt sich das *Striatum* der Ratte sehr einheitlich dar. 90-95% der striatalen Neurone sind mittelgroße „dornige“ Projektionsneurone, deren Perikarya einen Durchmesser zwischen 12 und 18 µm aufweisen. Die verbleibenden striatalen Neurone sind Interneurone (Paxinos, 2005).

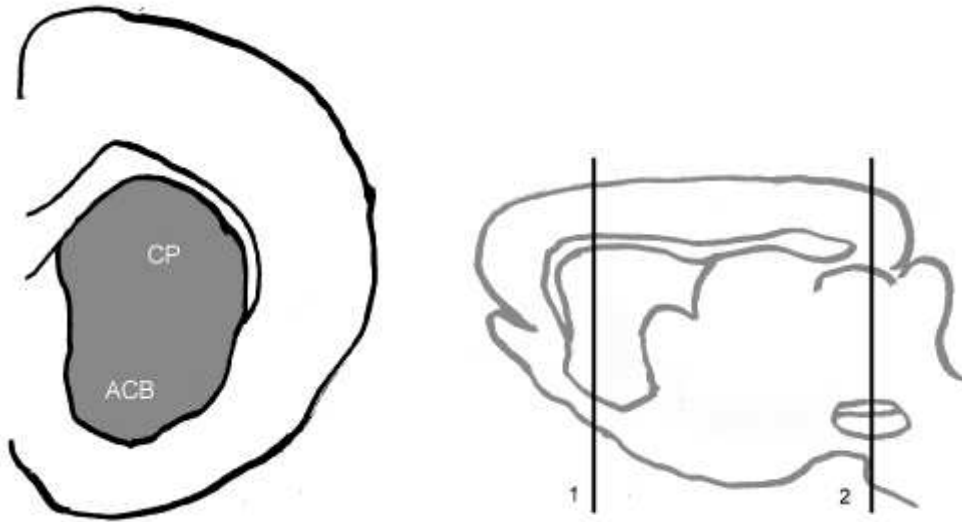


Abb. 6 Rattenhirn: Frontalschnitt durch das linke *Striatum* (CP, *Caudatus-Putamen*), im ventralen Bereich übergehend in den *Ncl. Accumbens* (ACB); rechts Lage des *Striatums* im Sagittalschnitt (1); (2) bezeichnet die Lage der Schnittebene durch die *Substantia nigra* (SN), siehe Abb. 7

Trotz der einheitlichen Darstellung in der Histologie ist das *Striatum* kein homogen organisiertes Gewebe. Es lassen sich zwei Hauptanteile (*dorsales* und *ventrales Striatum*) abgrenzen, welche unter zytologischen und neurochemischen Gesichtspunkten sowie in den Afferenzen zwar viele Gemeinsamkeiten aufweisen, sich allerdings in der Art verarbeiteten Informationen unterscheiden.

Das *dorsale Striatum* erhält kortikostriatale Afferenzen aus dem Neokortex, das *ventrale Striatum* hauptsächlich aus dem *Allocortex*, wobei die Übergänge fließend sind und eine genaue Grenze nicht zu ziehen ist. Zum ventralen Striatum werden unter funktionellen sowie zytologischen Gesichtspunkten der *Nucleus accumbens* sowie das *Tuberculum olfactorium* hinzugerechnet, welche bei Ratten im Gegensatz zum Menschen besonders stark ausgeprägt sind. *Ventrales* und *dorsales Striatum* weisen außerdem große Unterschiede bezüglich ihrer Efferenzen auf.

Durch die Anwendung neurochemischer Markierungen können weitere Organisationsformen nachgewiesen werden. Man spricht von *Patches* oder *Striosomen* innerhalb einer Umgebung, welche als *Matrix* bezeichnet wird. In dreidimensionalen Rekonstruktionen formen diese *Patches* labyrinthartige Gebilde innerhalb der *Matrix*. Die funktionelle Bedeutung dieses *Patch-Matrix*-Aufbaus ist nicht vollständig geklärt. Bekannt sind Unterschiede zwischen beiden Anteilen hinsichtlich ihrer Efferenzen und Afferenzen. Beispielsweise projiziert das *Matrix*-Kompartiment in die SNpr, während Projektionen der *Patches* in die SNpc reichen. Umgekehrt projiziert der ventrale Anteil der Zellen in der

SNpc in die *Striosomen (Patches)*, während Nervenendigungen aus dem dorsalen Drittel vorzugsweise die *Matrix* erreichen.

Diese Afferenzen aus den dopaminergen Zellen des Mittelhirns (SNpc und *Area tegmentalis ventralis*, VTA) bilden synaptische Kontakte mit den mittelgroßen „dornigen“ Projektionsneuronen und den Interneuronen des *Striatums*. Nachweisbar sind diese im *Striatum* durch immunhistochemische Lokalisierung des Dopamin synthetisierenden Enzyms Tyrosinhydroxylase (Arulison et al., 1984).

Substantia nigra der Ratte

Die SN der Ratte liegt im ventralen Bereich des *Mesencephalon*. Zusammen mit der medial angrenzenden VTA bildet sie ein in rostro-kaudaler Ausdehnung 2,5 mm langes, an dopaminergen Zellkernen reiches Gebiet. Dieses wird ventral von den *Pedunculi cerebri* und *mammillaria*, medial von der Mittellinie, anterior von den *Corpora mammillaria*, lateral vom *Hypothalamus*, posterior vom *mesopontinen Tegmentum* und dorsal von *Lemniscus medialis*, *Zona Giolli*, *Nucleus retroethmoidalis*, *Nucleus intralaminaris posterior*, *Nucleus peripeduncularis*, *Nucleus mesencephalicus profundus* und *Pedunculus cerebelli superior* begrenzt. Die SN der Ratte gliedert sich in eine *Pars compacta* (SNpc), *Pars reticularis* (SNpr) und *Pars lateralis* (SNpl). Die SNpc liegt in einer Schicht von dopaminergen Neuronen dorso-ventral über die SNpr. Die SNpr ist eine pallidale Struktur (zum *Globus pallidus* gehörig) die hauptsächlich aus GABAergen Neuronen besteht und eine Hauptausgangsstation der Basalganglien darstellt. Eine laterale Erweiterung der SNpc ist die SNpl, welche große Ähnlichkeiten sowohl zu SNpc als auch SNpr aufweist. Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit beziehen sich auf die SNpc, auch als Area 9 dopaminhaltiger Zellen bezeichnet.

Die SNpc der Ratte hat ein Volumen von 0,3 mm³ und enthält 10000-12000 Neurone auf jeder Seite (Halliday und Törk, 1986). Darunter sind dicht gepackte, mittelgroße dopaminerge Neurone, deren Zellkörper ungefähr 11 x 20 µm groß sind und einen exzentrisch platzierten Kern enthalten. Diese Neurone liegen in den ventralen Anteilen der SNpc und geben ein oder zwei Dendriten in die SNpr ab. Ein weiterer Zelltyp, der sich vor allem in den dorsalen Anteilen der SNpc findet, sind fusiforme dopaminerge Neurone mittlerer Größe, deren Dendriten nicht in die SNpr reichen, sondern sich nach medio-lateral ausbreiten. Bis zu 10 % der Neurone in der SNpc sind kleine nichtdopaminerge Neurone einer Größe von 10 – 12 µm, die als Interneurone fungieren (Paxinos, 1995).

Die dopaminhaltigen Neurone der SNpc sind durch immunhistochemische Lokalisierung des Dopamin synthetisierenden Enzyms TH nachweisbar (Arulison et al., 1984). Die dickere, ventral gelegene SNpr besteht aus viel weiter auseinander liegenden Zellen,

enthält nur vereinzelt dopaminerge Neurone und hat histologisch und funktionell viele Gemeinsamkeiten mit dem inneren Pallidumsegment.

Dopaminerge Projektionen erreichen über das MFB das *Striatum* und stammen vor allem aus den ventralen und intermediären Schichten der SNpc sowie zu geringem Teil aus angrenzenden ventrolateralen Anteilen des *ventralen Tegmentums* (VTA). Der überwiegende Teil der nigrostriatalen Projektionen ist dopaminerg und ipsilateral (Fallon und Loughlin, 1985, 1987) (Abb. 7).

Serotoninerge Fasern

Die aufsteigenden Projektionen aus den serotonergen Kerngebieten sammeln sich im MFB bevor sie sich in verschiedene Faserbahnen zu ihren jeweiligen Zielstrukturen aufteilen. Die Basalganglien werden hauptsächlich aus von der Kerngruppe B6/ B7 (*Nucleus dorsalis raphe* und *Periaqueduktales Grau*) innerviert. Viele der Neurone, welche das *Striatum* innervieren, senden auch Axonkollateralen zur Substantia nigra (Paxinos, 1995).

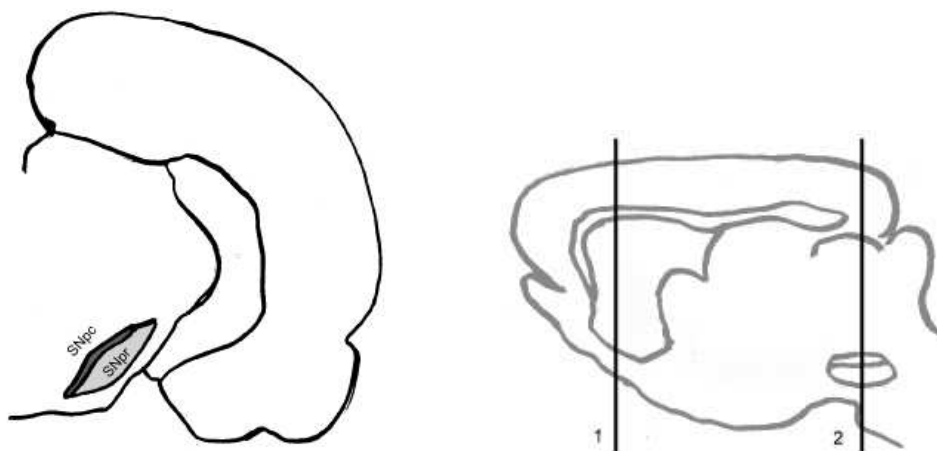


Abb. 7 Rattenhirn: Frontalschnitt durch die linke *Substantia nigra* mit ihren beiden Anteilen *Pars compacta* (SNpc) und *Pars reticulata* (SNpr), rechts (2) Lage im Sagittalschnitt; (1 bezeichnet die Schnittebene durch das *Striatum*, siehe Abb. 6)

1.8. Ziel und Fragestellung

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Erforschung der Ursache des Morbus Parkinson leisten. *Endogene* Substanzen wie NMNorsal mit struktureller Ähnlichkeit zu dem bekannten *exogenen* Neurotoxin MPTP sind möglicherweise an der Ätiologie dieser Erkrankung beteiligt.

Eine selektiv toxische Wirkung von NMNorsal auf dopaminerge Neurone *in vitro* wurde bereits nachgewiesen (Storch et al., 2002). *In vitro* hemmt NMNorsal auch wichtige Enzyme des dopaminergen Stoffwechsels. Ein toxischer Einfluss von NMNorsal auf die dopaminproduzierenden Zellen der SNpc *in vivo* wurde dagegen noch nicht nachgewiesen (Moser et al., 1996), dafür aber Interaktionen mit dem Serotoninstoffwechsel (Moser et al., 2003; Thümen et al., 2003). Ein Verlust TH-immunreaktiver Neurone *in vivo*, ROS-Produktion und apoptotische Veränderungen wurden allerdings nach Verabreichung hoher Dosen der strukturell eng verwandten Substanz N-Methyl-Salsolinol (NMSal) berichtet (Naoi et al., 1996; Naoi et al., 1998, 2002; Maruyama und Naoi, 2002).

Die vorliegende Arbeit untersucht deshalb anhand eines bewährten Versuchsaufbaus (Moser et al., 1996)- allerdings mit einer fünffach höheren Dosis von NMNorsal- die *in vivo* Effekte von NMNorsal auf das dopaminerge und das serotoninerge System der Ratte.

Dabei wurde folgenden Fragen nachgegangen:

- 1) *In vivo* Toxizität von NMNorsal auf die dopaminergen Zellen in der *Substantia nigra pars compacta* der Ratte
 - Histologisch
 - Auf Proteinebene: Nachweis des Schlüsselenzyms der Dopaminsynthese, der Tyrosinhydroxylase
 - Charakterisierung des Zelltodes in einem multiple approach-Ansatz: Apoptose oder Nekrose?
- 2) Wirkung von NMNorsal auf den Serotoninstoffwechsel
 - Auf Proteinebene: das Schlüsselenzym der 5-HT-Synthese, die Tryptophanhydroxylase
 - Veränderungen der 5-HT_{2A}-Rezeptoren

Dabei wurde auch der zeitliche Verlauf der durch NMNorsal ausgelösten Veränderungen untersucht. Die gewonnen Erkenntnisse zu den *in vivo*- Auswirkungen von NMNorsal wurden schließlich mit den Angaben in der Literatur zu NM(R)Sal verglichen und diskutiert.

2. MATERIAL

2.1. Stereotaktische Injektionen

a) Chemikalien:

Aqua ad injectabilia: B. Braun, Melsungen, Deutschland

Ascorbinsäure: Sigma Aldrich GMBH, Deisenhofen, Deutschland

Augmentan 1,2 g: GlaxoSmithKline GMBH, München, Deutschland

Cutasept F: Bode Chemie GMBH, Hamburg, Deutschland

6-Hydroxydopamin (6-OHDA): Sigma Aldrich GMBH

2-Methyl-6,7-Dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (N-Methyl-Norsalsolinol, 2-MDTIQ):
ICN Pharmaceuticals GMBH, Meckenheim, Deutschland

Pentobarbital-Natrium (53,33 mg Pentobarbital/ml): Apotheke UK-SH, Campus Lübeck,
Lübeck, Deutschland

Ringerlösung: B. Braun

b) Lösungen und Puffer:

Augmentan-Infusionslösung:

1,2 g Augmentan in 31 ml Aqua ad injectabilia lösen; 100 mg Wirkstoff/kg Körpergewicht intraperitoneal injizieren.

NMNorsal-Injektionslösung:

40 µg NMNorsal und 2 µg Ascorbinsäure (als Antioxidans) in 2,5 µl NaCl 0,9 % lösen.

6-OHDA-Injektionslösung:

8 µg 6-OHDA und 2 µg Ascorbinsäure in 2,5 µl NaCl 0,9 % lösen.

Kontroll-Injektionslösung:

2 µg Ascorbinsäure in 2,5 µl NaCl 0,9 % lösen.

c) Geräte und sonstiges Material:

Stereotaxierahmen: AD Krauth, Hamburg, Deutschland

Bohrer: Fine Science Tools Inc., Heidelberg, Deutschland

Hamilton-Spritze (10 µl): Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz

2.2. Transkardiale Perfusionsfixation

a) Chemikalien:

Isopentan: Fluka Chemika, Neu-Ulm, Deutschland

Liquemin: Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland

Di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$): Merck KG

Natriumchlorid (NaCl , rein): Merck KG

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$): Merck KG

Natriumhydroxid (NaOH , rein): Merck KG

Paraformaldehyd (reinst): Merck KG

Pentobarbital-Natrium (53,33 mg Pentobarbital/ml): Apotheke UK-SH, Campus Lübeck

Ringerlösung: B. Braun, Melsungen, Deutschland

Saccharose: Merck KG

b) Lösungen und Puffer:

heparinisierte Ringer-Lösung zur Bluttausspülung :

1000 ml Ringerlösung, mit 10000 IE Liquemin versetzt.

Paraformaldehyd (PFA) 4 %:

8 g Paraformaldehyd wurden in 200 ml PBS 0,1 M bei 60 °C mit Hilfe eines Plättchen Natriumhydroxid gelöst, anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und filtriert.

Saccharose 30 % in PBS:

Pro 100 ml 30 g Saccharose in PBS 0,1 M lösen.

PBS-Puffer 0,1 M (phosphate buffered saline):

PBS-Stammlösung (fünffach konzentriert):

In 1000 ml destilliertem Wasser

NaCl	45 g
------	------

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	1,352 g
--	---------

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	14,307 g
--	----------

lösen.

Die PBS-Gebrauchslösung wurde aus der Stammlösung durch 1:5-Verdünnung erzeugt; ihr pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

c) Geräte und sonstiges Material:

pH-Meter: Typ 761, Firma Knick

2.3. Anfertigung von Kryoschnitten

a) Chemikalien:

Chromalaun (Kalium III Sulfat, $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$): Merck KG

Einbettmedium: Tissue Tek, Firma Miles Inc., Elkhart, USA

Gelatin (gemahlen): Sigma Aldrich GmbH

b) Herstellung mit Chromalaun-Gelatine beschichteter Objektträger

Objektträger mit 70% Alkohol säubern, abgedeckt trocknen lassen. 5g Gelatine in 900ml kaltem, destilliertem Wasser 2 h vorweichen. Unter Rühren erhitzen bis die Gelatine klar ist (37°C). 2,5 g Chromalaun in dazugeben, auflösen und auf 1000ml mit destilliertem Wasser auffüllen. Die heiße Lösung filtrieren und vor Gebrauch abkühlen lassen.

Objektträger in Chromalaun-Gelatine eintauchen und für 1-3 s abkühlen lassen. Dann bei 37°C über Nacht inkubieren. Bei 4°C lagern.

c) Geräte und sonstiges Material:

Deckgläser: #1, Größe 24*50 mm, Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland

Brutschrank OV 2: Biometra

Kryotom: LEICA CM 3050, Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Deutschland

Objektträger: Sigma Aldrich GmbH

2.4. Nissl-Färbung mit Kresylviolett

a) Chemikalien

Destilliertes Wasser (aqua bidest): eigene Herstellung

Essigsäure (CH_3COOH): Merck KG

Ethanol (pro analysi): Merck KG

Kaliumbromid (KBr): Merck KG

Kresylviolett: Merck KG

Natriumacetat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$): Merck KG

b) Lösungen und Puffer

Stammlösung I:

2 g Kresylviolett in 100 ml destilliertem Wasser erhitzen, bis Dämpfe aufsteigen, erkalten lassen, filtrieren

Pufferlösung 1:

6 ml Essigsäure in 1000 ml destilliertem Wasser

Pufferlösung 2:

13,61 g Natriumacetat in 1000 ml destilliertem Wasser

Stammlösung II:

92 ml Pufferlösung 1 + 8 ml Pufferlösung 2

Kresylviolettgebrauchslösung:

100 ml Stammlösung II + 5 ml Stammlösung I

c) Geräte und sonstiges Material

Arbeitsplatz mit Abzug

Färbewannen

Papierfilter

2.5. Immunhistochemie

a) Chemikalien

Antikörperverdünnung (Dako Antibody Diluent): Dako Corporation, Carpinteria, USA

DAB Peroxidase Substrate Kit: Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA

DAB, H₂O₂, Nickellösung, Puffer

Destilliertes Wasser (aqua bidest): eigene Herstellung

Ethanol (pro analysi): Merck KG

EUKITT, Eindeckmedium: Agar Scientific

Methanol (HPLC gradient grade): JT Baker

Monoklonaler Maus-anti-Tyrosinhydroxylase-Antikörper: Sigma Aldrich GmbH

Monoklonaler Maus-anti-Tryptophanhydroxylase-Antikörper: Sigma Aldrich GmbH

Natriumchlorid (NaCl): Merck KG

Natrium-Dihydrogenphosphat Monohydrat (NaH₂PO₄*H₂O): Merck KG

di-Natriumhydrogenphosphat Dodecahydrat (Na₂HPO₄*12H₂O): Merck KG

Polyklonaler Kaninchen-anti-gespaltene-Caspase-3-Antikörper: Cell Signaling Technology, Inc., USA

Polyklonaler Kaninchen-anti-Serotonin-5HT_{2A}-Rezeptor-Antikörper: Sigma Aldrich GmbH

Proteinase K: Quiagen

Schweineserum: Dako Corporation, Carpinteria, USA

Triton X-100: Sigma Aldrich GmbH

Tris-HCl (1 M Stock Solution, pH 7,4): Sigma Aldrich GmbH

Universal-LSAB-Kit für Rattengewebe: Dako Corporation, Carpinteria, USA

Enthält biotinylierten Sekundärantikörper (spezifisch für Primärantikörper von Maus und Kaninchen), Streptavidin-Peroxidase

Wasserstoffperoxidlösung 30% (H₂O₂, medizinisch reinst): Merck KG

Xylol: Merck KG

b) Lösungen und Puffer

DAB-Lösung

Die Zubereitung erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers:

2 Tropfen der Pufferstammlösung in ein Gefäß mit 5,0 ml aqua bidest geben, gut mischen

4 Tropfen der DAB-Stammlösung hinzugeben und gut mischen

2 Tropfen der H₂O₂-Stammlösung hinzugeben und gut mischen

2 Tropfen der Nickellösung hinzugeben

Die DAB-Lösung wird unmittelbar vor der Verwendung hergestellt und innerhalb von 15-20 min verbraucht.

Ethanol 90 %:

Gelöst in Aqua bidest

Ethanol 100 %

Inaktivierungslösung:

0,3 % H₂O₂ in Methanol

Normal-Schweineserum 20 %:

In PBS

PBS-Puffer 0,1 M (phosphate buffered saline):

Für Stammlösung in 1000 ml destilliertem Wasser lösen:

NaCl 45 g

NaH₂PO₄*H₂O 1,352 g

Na₂HPO₄*12H₂O 14,307 g

Stammlösung zum Gebrauch 1:5 verdünnt, pH-Wert auf 7,4 einstellen

PBST-Puffer

0,1% Triton X-100 in PBS, pH 7,4

Proteinase K-Lösung:

50 µl Proteinase K in 0,03 M Tris-Puffer

TBS-Puffer

18,3 g Tris, 25 g NaCl in 3000 ml Aqua bidest, pH 7,6

Tris-Puffer 0,3 M :

6 ml Tris-HCl plus 194 ml Aqua bidest

Verdünnung des anti-TH-Primärantikörpers 1:5000:

1,0 µl monoklonaler Maus-anti-Tyrosinhydroxylase-Antikörper und 5,0 ml Antikörperverschönnung in geeignetem Gefäß mischen und gut vortexen

Verdünnung des anti-TpH-Primärantikörpers 1:1000:

1,0 µl monoklonaler Maus-anti-Tryptophanhydroxylase-Antikörper und 1,0 ml Antikörperverschönnung in geeignetem Gefäß mischen und gut vortexen

Verdünnung des anti-5HT_{2A}-Primärantikörpers 1:300:

10 µl polyklonaler Kaninchen-anti-Serotonin-5HT_{2A}-Rezeptor-Antikörper und 3,0 ml Antikörperverschönnung in geeignetem Gefäß mischen und gut vortexen

Verdünnung des antiCaspase3-Primärantikörpers 1:400:

10 µl Polyklonaler Kaninchen-anti-gespaltene-Caspase-3-Antikörper und 4,0 ml Antikörperverschönnung in geeignetem Gefäß mischen und gut vortexen

c) Geräte und sonstiges Material

Arbeitsplatz mit Abzug

Dako Pen: Dako Corporation, Carpinteria, USA

Deckgläser: #1, Größe 24*50 mm, Menzel GmbH

Färbewannen

Plastikkammer: luftdicht verschließbare Plastikbox, auf dem Boden befeuchtet durch ein mit destilliertem Wasser getränktes Papiertuch

pH-Meter: Typ 761, Firma Knick

Tischzentrifuge (Centrifuge 5415D): Eppendorf

Vortexer (Reax Top): Heidolph

Wassereis

2.6. TUNEL

a) Chemikalien

ABC Reagenz (Vector Elite Standard Kit): Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA

Antikörperverschönnung (Dako Antibody Diluent): Dako Corporation, Carpinteria, USA

1-Butanol, pro analysi: Merck KG

ApopTag Peroxidase Kit: Intergen Company, Oxford, UK

enthält Equilibrationspuffer, Reaktionspuffer, TdT, Stopp/Waschpuffer

Biotinylierter Ziegen-anti-Maus-Antikörper: Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA
DAB-Lösung (Peroxidase Substrate Kit Nickel): Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Destilliertes Wasser (aqua bidest): eigene Herstellung
Ethanol (pro analysi): Merck KG
EUKITT, Eindeckmedium: Agar Scientific
Methanol (HPLC gradient grade): JT Baker
Methylgrün: Sigma
Monoklonaler Maus-anti-Digoxin-Antikörper, Biotin-konjugiert: Sigma Aldrich GmbH
Natriumacetat(C₂H₃O₂Na*3H₂O): Merck
Natriumchlorid (NaCl): Merck KG
Natrium-Dihydrogenphosphat Monohydrat (NaH₂PO₄*H₂O): Merck KG
di-Natriumhydrogenphosphat Dodecahydrat (Na₂HPO₄*12H₂O): Merck KG
Natriumzitrat: Merck KG
Proteinase K: Quiagen
Universal-LSAB-Kit für Rattengewebe: Dako Corporation, Carpinteria, USA
Enthält Streptavidin-Peroxidase
Wasserstoffperoxidlösung 30% (H₂O₂, medizinisch reinst): Merck KG
Xylol: Merck KG
Ziegenserum: Sigma

b) Lösungen und Puffer

DAB-Lösung:

Die Zubereitung erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers:

2 Tropfen der Pufferstammlösung in ein Gefäß mit 5,0 ml aqua bidest geben, gut mischen

4 Tropfen der DAB-Stammlösung hinzugeben und gut mischen

2 Tropfen der H₂O₂-Stammlösung hinzugeben und gut mischen

2 Tropfen der Nickellösung hinzugeben

Die DAB-Lösung wird unmittelbar vor der Verwendung hergestellt und innerhalb von 15-20 min verbraucht.

Ethanol 90 %:

Gelöst in Aqua bidest

Ethanol 100 %:

Inaktivierungslösung:

0,3 % H₂O₂ in Methanol

Methylgrün-Färbelösung:

0,5 g Methylgrün in 100 ml 0,1 M Natriumacetat pH 4,0

PBS-Puffer 0,1 M (phosphate buffered saline):

Für Stammlösung in 1000 ml destilliertem Wasser lösen:

NaCl	45 g
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	1,352 g
Na ₂ HPO ₄ *12H ₂ O	14,307 g

Stammlösung zum Gebrauch 1:5 verdünnt, pH-Wert auf 7,4 einstellen

PBST-Puffer

0,1% Triton X-100 in PBS, pH 7,4

Proteinase K für TUNEL:

200 µl Proteinase K in 0,03 M Tris-Puffer

Streptavidin-Peroxidase:

Aus dem Universal-LSAB-Kit für Rattengewebe

Tris-Puffer 0,3 M

6 ml Tris-HCl plus 194 ml Aqua bidest

TUNEL ApopTag Equilibrationspuffer

ApopTag Kit

TUNEL ApopTag TdT

77 µl Reaction Buffer (ApopTag Kit) und 33 µl TdT Enzyme (ApopTag Kit)

TUNEL Stopp/Waschpuffer

1 ml Stop/Wash Buffer in 34 ml Aqua bidest

Ziegenerum 20 %:

In PBS

Zitrat-Puffer 0,01 M:

In destilliertem Wasser

c) Geräte und sonstiges Material

Arbeitsplatz mit Abzug

Dako Pen: Dako Corporation, Carpinteria, USA

Deckgläser: #1, Größe 24*50 mm, Menzel GmbH

Färbewannen

Plastikkammer: luftdicht verschließbare Plastikbox, auf dem Boden befeuchtet durch ein mit destilliertem Wasser getränktes Papiertuch

pH-Meter: Typ 761, Firma Knick

Tischzentrifuge (Centrifuge 5415D): Eppendorf

Vortexer (Reax Top): Heidolph

Wassereis

2.7. Rechnerprogramme

Fotografie: KS100, Zeiss

Grauwert-/ Optische Dichte- Messung: KS RUN 3.0, Zeiss

Textverarbeitung: Microsoft Word 2000, Microsoft Corporation, Redmond, USA

Tabellen- und Diagrammerstellung: Excel 97, Microsoft

Statistische Auswertung: SPSS für Windows, Version 10.0.7; SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA

2.8. Versuchstiere

Verwendet wurden bei allen Versuchen weibliche Wistar-Ratten (Züchter Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Körpergewicht von 250-300g.

2.9. Zulassung der Tierversuche

Sämtliche Tierversuche wurden genehmigt durch das Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein (Versuchsnummer 11 k 96, Versuchsleiter: Dr. Joachim Scholz).

3. METHODEN

3.1. Versuchsablauf

Es wurden insgesamt 23 Ratten untersucht, an denen stereotaktische Injektionen vorgenommen wurden. Dabei wurden 8 Tieren 40 µg NMNorsal, 8 Tieren 8 µg 6-OHDA und 6 Tieren lediglich NaCl-Lösung injiziert. An einem einzelnen, zusätzlichen Tier wurde die korrekte Lage der Injektionsstelle durch eine einmalige Injektion von Toulidinblau überprüft. Die zu injizierenden Substanzen wurden in sterilem NaCl 0,9 % gelöst, als Antioxidans wurden immer 2 µg Ascorbinsäure enthalten. Das injizierte Volumen betrug in jedem Fall exakt 2,5 µl. Die eine Hälfte der Tiere wurde nach 3 Tagen getötet, die andere Hälfte nach 21 Tagen. Am Tötungstag wurden die Tiere intrakardial perfusionsfixiert, die Hirne entnommen und eingefroren. Anschließend wurden Kryoschnitte von 14 µm Dicke angefertigt, an denen die einzelnen Untersuchungen vorgenommen wurden.

3.2. Gruppeneinteilung der Versuchstiere

Gruppe A (40 µg NMNorsal plus 2 µg Ascorbinsäure in 2,5 µl NaCl 0,9 %):

Überlebenszeit 3 Tage: 4 Tiere

Überlebenszeit 21 Tage: 4 Tiere

Gruppe B (8 µg 6-OHDA plus 2 µg Ascorbinsäure in 2,5 µl NaCl 0,9 %):

Überlebenszeit 3 Tage: 4 Tiere

Überlebenszeit 21 Tage: 4 Tiere

Gruppe C (Kontrolle; 2 µg Ascorbinsäure in 2,5 µl NaCl 0,9 %):

Überlebenszeit 3 Tage: 3 Tiere

Überlebenszeit 21 Tage: 3 Tiere

3.3. Stereotaktische Injektionen

Die stereotaktischen Injektionen von N-M-Norsal, 6-OHDA bzw. NaCl-Lösung (als Kontrolle) wurden bei sämtlichen Versuchstieren wie folgt durchgeführt:

Als Versuchstiere dienten bei allen Versuchen weibliche Wistar-Ratten. Zunächst erfolgte in einem speziellen Käfig eine CO₂-Kurznarkose, danach wurde den so betäubten Tieren eine Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital intraperitoneal injiziert.

Der Kopf der narkotisierten Tiere wurde anschließend exakt symmetrisch im Stereotaxierahmen fixiert. Nach einer Rasur und Desinfektion der Kopfhaut mittels Cutasept erfolgte medial auf der Oberseite des Kopfes mit dem Skalpell ein Hautschnitt von kurz hinter der Augenhöhe bis kurz vor der Interaurallinie. Nach einer Spülung der Wunde mit Ringerlösung sowie der vollständigen Freilegung des Schädelknochens mit sterilen Wattetupfern wurde das sogenannte *Bregma* (die Schnittstelle von Koronar- und Sagittalnaht) identifiziert und anschließend die zugehörigen Koordinaten im Stereotaxierahmen durch Aufsetzen der Spitze der für die Injektion verwendeten Hamilton-Spritze ermittelt. Von *Bregma* ausgehend wurden nun die Zielkoordinaten für die stereotaktische Injektion berechnet.

Injektionsort für alle Versuchstiere war das linke mediale Vorderhirnbündel (MFB) in unmittelbarer Nähe der *Substantia nigra* (SN). Die Zielkoordinaten (nach Paxinos und Watson, 1998), jeweils bezogen auf die ermittelten Koordinaten von *Bregma* im Stereotaxierahmen, waren: 2,5 mm posterior, 1,9 mm lateral (nach links) und 8,5 mm ventral.

Die linke Hirnhälfte (in welche die stereotaktische Injektion erfolgte) wird im folgenden Text als „ipsilateral“, die rechte als „kontralateral“ bezeichnet.

Senkrecht über der Injektionsstelle wurde der Schädel mit einem kleinen Handbohrer vorsichtig bis auf die Dura mater aufgebohrt. Die Spitze der Hamiltonspritze wurde nun langsam und gleichmäßig zum berechneten Zielpunkt herunter gefahren, wobei die Öffnung nach kaudal hin gerichtet war. Die Injektion der 2,5 µl Injektionslösung erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 0,5 µl/min. Die korrekte Lage der Injektionsstelle wurde durch einmalige Injektion von Toulidinblau an einem Tier überprüft.

Die Gesamtmenge an injizierter Substanz war für NMNorsal 40 µg (+ 2 µg Ascorbinsäure als Antioxidans), für 6-OHDA 8 µg (+ 2 µg Ascorbinsäure) sowie bei den Kontrolltieren lediglich 2 µg Ascorbinsäure in NaCl 0,9 %.

Nach 5 min Wartezeit wurde die Spritze langsam wieder aus der Injektionsstelle entfernt, die Wunde erneut gereinigt, desinfiziert und mit 2 Stichen genäht. Abschließend wurde das Tier wieder aus dem Rahmen entfernt. Zur Meningitisprophylaxe erhielten alle Versuchstiere nach der Operation eine Antibiose von 100 mg/kg Körpergewicht des Antibiotikums Augmentan intraperitoneal injiziert.

3.4. Transkardiale Perfusionsfixation der Hirne

Die Tiere wurden am Tötungszeitpunkt zunächst mit CO₂ betäubt. Darauf wurde ihnen intraperitoneal eine letale Dosis Pentobarbital (600mg Pentobarbital/kg Körpergewicht) injiziert.

Nach Eintreten der Anästhesie, aber bei noch erhaltenen Vitalfunktionen wurde anschließend mit einer großen Schere zuerst mit einem queren Schnitt die Bauchhöhle eröffnet und danach ein medialer Längsschnitt durch die Bauchdecke bis zum *Processus xiphoideus* des *Sternums* durchgeführt. Seitlich des Schnitts wurde das Fell subkutan gelöst und zur Seite geschlagen. Nun wurde unterhalb des *Sternums* die Bauchmuskulatur durchtrennt und der Rippenbogen freigelegt. Darauf erfolgte beidseits lateral die Durchtrennung des Rippenbogens, der dann zum Kopf hin zurückgebogen und dort mit einer Klemme befestigt wurde. Das jetzt freigelegte, noch schlagende Herz wurde mobilisiert und mit einer Pinzette festgehalten. Mit einer kleinen Schere wurde dann der linke Ventrikel eröffnet und eine Knopfkanüle vorsichtig in den *Bulbus aortae* eingeführt. Auch der rechte Ventrikel wurde zum Blutabfluss eröffnet und das Herz abschließend mit einer kleinen Klemme fixiert. Nacheinander erfolgte dann mit einer Geschwindigkeit von 2-3 Tropfen/min bei einem hydrostatischen Druck von 50-100 cm H₂O die Infusion von 200 ml heparinisierter Ringer-Lösung (10000 IE Liquemin/l) zur Blutauswaschung sowie von 200 ml PFA 4 % in PBS zur Fixation des Gehirns.

Anschließend erfolgten die Dekapitation der Tiere und die Präparation ihrer Gehirne, welche danach noch für 12-24 Stunden in 4%igem PFA immersionsfixiert wurden.

Nach der Immersionsfixation durchlief jedes Hirn zur Spülung 4 Bäder mit PBS (0,1 M, pH 7,4) und wurde danach zur Kryoprotektion bis zu seinem Absinken in 30%iger Saccharoselösung gelagert (Dauer bis zum Absinken je nach Hirn 36-96 h). Die so vorbehandelten Hirne wurden kurz in PBS gespült, auf Zellstoff gewendet und schließlich 10 min lang bei –30 °C in Isopentan auf Trockeneis eingefroren.

Die Lagerung der Hirne erfolgte in luftdicht abgeschlossenen Behältern bei –80 °C.

3.5. Anfertigung von Kryoschnitten

Das Schneiden der Hirne erfolgte bei einer Temperatur von –25 °C im Kryotom. Die Dicke der Kryoschnitte betrug jeweils 14 µm.

Striatum

Beginn der 1. Schnittserie war (nach Paxinos und Watson, 1998) + 11 mm interaural. In diesem Gebiet befindet sich der ungefähre Beginn des *Corpus Striatum*. Es wurden pro Hirn 8 Schnittserien in koronarer Ausrichtung (je 2 Schnitte pro Serie für TH- und Serotonin-5HT_{2A}-Rezeptor-Immunhistochemie) erstellt. Diese Serien wurden im Abstand von 500 µm jeweils doppelt angefertigt. Das Ende der letzten Schnittserie lag bei + 7 mm interaural.

Substantia nigra

Beginn der 1. Schnittserie war (nach Paxinos und Watson, 1998) + 4,5 mm interaural. In diesem Gebiet befindet sich der ungefähre Beginn der *Substantia nigra pars compacta*. Außerdem treten auf gleicher Höhe die serotonergen Projektionsfasern von den Raphekernen zum *Striatum* in das MFB ein. Es wurden pro Hirn 8 Schnittserien in koronarer Ausrichtung (je 4 Schnitte pro Serie für TH- Immunhistochemie, TUNEL, aktive Caspase-3-Immunhistochemie, TPH-Immunhistochemie) erstellt. Diese Serien wurden im Abstand von 250 µm jeweils doppelt angefertigt. Das Ende der letzten Schnittserie lag bei +2,5 mm interaural (ungefähres Ende von SN und VTA).

Die angefertigten Schnitte wurden auf Objektträger aufgetragen (je 2 Schnitte auf einen Objektträger). Um ein optimales Auffangen der Schnitte zu ermöglichen, wurden die Objektträger vor dem Auftragen bei ca. 4 °C auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Schnitte für 10 min bei + 37 °C auf einer Wärmeplatte angetrocknet.

Nachdem sie wieder auf Zimmertemperatur abgekühlt waren, wurden sie in lichtdicht verpackten Objektträgerkästen bei –80 °C eingefroren und gelagert.

3.6. Nissl-Färbung mit Kresylviolett

Grundlage der Anfärbung von Neuronen mit Kresylviolett ist, daß Nervenzellen gegenüber anderen Zellen die Besonderheit aufweisen, daß sie große Mengen sogenannter Nissl-Schollen (Stapel des rauhen endoplasmatischen Retikulums) aufweisen. Der Farbstoff bindet an basophile Strukturen wie RNA und DNA, wobei sich besonders die Nissl-Substanz und Zellkerne blau oder violett anfärben. Zellkerne färben sich etwas blasser an.

Alle Wasch- und Färbebäder erfolgten, soweit nicht anders beschrieben, in 200 ml Färbegefäßen aus Glas. Die Objektträger mit den Schnitten wurden aufgetaut und anschließend in destilliertem Wasser (AD) gespült. Anschließend wurden sie für 10 min in ein Bad mit Kresylviolett-Gebrauchslösung gegeben und dort von Zeit zu Zeit vorsichtig bewegt. Danach wurden in zwei Schritten mit AD und anschließend für jeweils 3 min in Ethanol 70 % und 80 % gespült. Daraufhin wurden die Schnitte in einem Bad mit Ethanol 85 %, dem 5 Tropfen gesättigter KBR zugegeben worden waren, vorsichtig geschwenkt bis sich erste Färbewolken lösten. Für jeweils 3 min wurde nun in Ethanol 85 % nachdifferenziert, anschließend in Ethanol 90 %, 96 % und schließlich 100% entwässert. Nach jeweils 5 min 4 aufeinanderfolgenden Xylobädern wurden die Schnitte mit EUKITT eingebettet.

3.7. Tyrosinhydroxylase (TH)-Immunhistochemie

Die Gehirnschnitte wurden langsam aufgetaut, bei Raumtemperatur (RT) getrocknet und auf dem Objektträger einzeln mit dem Dako Pen umrandet. Alle Wasch- und Inkubationsbäder erfolgten, soweit nicht anders beschrieben, in 200 ml Färbegefäßen aus Glas. Nach 5 min in PBS wurden die Schnitte bei RT für 5 min in Proteinase K inkubiert. Anschließend wurde zweimal für 5 min mit PBS gewaschen. Um die endogene Peroxidase zu unterdrücken, wurden die Objektträger für 20 min in die Inaktivierungslösung eingebracht. Wieder wurde zweimal mit PBS gewaschen. Vor der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden unspezifische Bindungsstellen mit 80 µl Ziegsenserum 20 % für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit von den Objektträgern vorsichtig abgeklopft. Jeder Schnitt wurde mit 80 µl des 1:5000 in Antikörperversdünnung verdünnten Maus-Anti-TH-Antikörpers inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und Abklopfen der Flüssigkeit wurden pro Schnitt je 2-3 Tropfen des biotinylierten Anti-Maus-Sekundärantikörpers aufgebracht und für 30 min bei RT inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit PBS und daraufhin die Inkubation für 30 min mit der Streptavidin-Peroxidase-Komplex-Lösung (LSAB Universal Kit). Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS wurden je 80 µl der unmittelbar vorher zubereiteten DAB-Lösung auf die Schnitte aufgebracht. Die Färbereaktion erfolgte bei RT für 2-10 min unter mikroskopischer Kontrolle. Nach zweimaligem Waschen mit Aqua dest. wurden die Schnitte zum Entwässern für je 2 min in 90 % und 100 % Ethanol, anschließend für zweimal 10 min in Xylol eingebracht. Die Präparate wurden in EUKITT eingebettet.

Bei allen immunhistochemischen Färbungen wurden Negativkontrollen mitgeführt, bei denen Schnitte anstelle des Primärantikörpers nur mit Antikörperversdünnungslösung inkubiert wurden. Als Positivkontrollen für die TH wurden gleichartig aufgearbeitete Gewebsschnitte von Nebennieren der Ratte verwendet.

3.8. Tryptophanhydroxylase (TPH)-Immunhistochemie

Prinzipiell wurde nach demselben Protokoll vorgegangen wie für die TH, mit folgenden Besonderheiten:

Als Primärantikörper wurde der Anti-TPH-Antikörper (Maus) in einer Verdünnung von 1:1000 in Antikörperversdünnung eingesetzt. Inkubiert wurde mit 80 µl pro Schnitt für 1 h bei RT. Sekundärantikörper sowie der weitere Färbeablauf waren identisch mit dem der TH-Immunhistochemie.

Als Positivkontrollen wurden gleichartig aufgearbeitete Gewebsschnitte durch das Gebiet des *Nucleus raphe dorsalis* verwendet.

3.9. Serotonin-5HT_{2A}-Rezeptor-Immunhistochemie

Prinzipiell wurde auch hier nach demselben Protokoll vorgegangen wie für die Tyrosinhydroxylase -Immunhistochemie, mit folgenden Besonderheiten:

Vor der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde jeder Schnitt mit 80 µl Schweineserum 20 % für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Anti-5HT_{2A}-Rezeptor-Antikörper (Kaninchen) als Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:300 in Antikörperverdünnung eingesetzt. Inkubiert wurde mit 80 µl pro Schnitt für 48 h bei 4 °C. sowie der weitere Färbeablauf waren identisch mit dem der TH-Immunhistochemie.

3.10. TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)

Positivkontrollen

Als Positivkontrollen für TUNEL wurden gleichartig aufbereitete Hirnschnitte nach temporärer Ischämie durch 90 min Okklusion der mittleren Hirnarterie mit anschließender Reperfusion (engl. *middle cerebral artery okklusion*, MCAO) verwendet. Das Material wurde freundlicherweise von Prof. T. Herdegen und Dr. S. Brecht vom Institut für Pharmakologie der Christian-Albrecht-Universität in Kiel zur Verfügung gestellt.

TUNEL

Es wurde ein modifiziertes Färbeprotokoll auf der Basis des ApopTag Plus Kit von INTERGEN verwendet (Cuello und Ciocca, 1999). Die Schnitte wurden langsam aufgetaut, bei Raumtemperatur (RT) getrocknet und auf dem Objektträger einzeln mit dem Dako Pen umrandet. Alle Wasch- und Inkubationsbäder erfolgten, soweit nicht anders beschrieben, in 200 ml Färbegefäßen. Nach 5 min in PBS wurden die Schnitte für 5 min in Proteinase K inkubiert. Anschliessend wurde zweimal für 5 min mit PBS gewaschen. Um die Membranpermeabilität der Zellkerne zu erhöhen, wurden die Objektträger mit den Schnitten in Zitratpuffer 0,01 M pH 3,0 für 1 min bei 750 W in der Mikrowelle erhitzt, danach durch die Zugabe von 80 ml Aqua bidest (RT) abgekühlt (Labat-Moleur et al., 1998; Sträter et al., 1995). Nachdem zweimal mit PBS gewaschen wurde, kamen die Schnitte für 1 min in PBS auf Eis. Nachdem dreimal für 5 min gründlich mit PBS gewaschen wurde, wurden die Objektträger für 20 min in die Inaktivierungslösung eingebracht, um die endogene Peroxidaseaktivität zu unterdrücken

(Migheli et al., 1995). Wieder wurde dreimal 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Flüssigkeit von den Objektträgern vorsichtig abgeklopft und jeder Schnitt für 1 min mit 100 µl TUNEL ApopTag Equilibrationspuffer bedeckt. Nach vorsichtigem Abklopfen der Flüssigkeit wurden jeweils 100 µl TUNEL ApopTag TdT (terminale Deoxynucleotidyltransferase) in Arbeitskonzentration auf die Schnitte aufgebracht und mit Hilfe von Parafilm gleichmäßig über der Schnittfläche verteilt. Die mit dem Enzym bedeckten Schnitte wurden für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Schnitte in TUNEL Stopp/Waschpuffer 15 s lang bewegt und dann für weitere 10 min inkubiert. Um unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper zu sättigen, wurden nach dreimaligem Waschen für 5 min mit PBS auf jeden Schnitt 80 µl Ziegen- Serum 20 % gegeben und 30 min bei RT inkubiert.

Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS für 5 min wurden pro Schnitt je 80 µl eines Biotin-konjugierten monoklonalen Maus-Anti-Digoxin-Antikörper (Sigma), Verdünnung 1:750 in Antikörperversdünnung, appliziert und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach Waschen mit TBS für dreimal 5 min folgte die Inkubation der Schnitte mit je 50 µl biotinylierten Ziegen-Anti-Maus-Antikörper (Jackson Immunoresearch) 1:300 in Antikörperversdünnung für 45 min bei RT. Die Schnitte wurden anschließend dreimal 5 min mit TBS gewaschen und für 30 min mit peroxidasekonjugiertem Streptavidin (Vector Elite Standard) bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen 5 min mit TBS folgte die Entwicklung mit DAB unter mikroskopischer Kontrolle für ca. 8 min. Anschließend kamen die Schnitte für 5 min in ein Bad mit Aqua dest.

Danach erfolgte eine Gegenfärbung, bei der die Zellkerne für 10 min mit Methylgrün gefärbt wurden. Die Schnitte wurden dreimal mit Aqua bidest und dreimal mit N-Butanol gespült. Nach 2 Bädern in Xylol für je 2 min wurden die Schnitte mit EUKITT eingebettet. Negativkontrollen wurden bei jeder Färbereihe mitgeführt. Bei diesen wurde im entsprechenden Arbeitsschritt die TdT weggelassen.

3.11. Aktive Caspase 3-Immunhistochemie

Positivkontrollen

Als Positivkontrollen für aktive Caspase-3 wurden Hirnschnitte nach temporärer Ischämie durch 90 min Okklusion der mittleren Hirnarterie mit anschließender Reperfusion verwendet. Das Material wurde freundlicherweise von Prof. T. Herdegen und Dr. S. Brecht vom Institut für Pharmakologie der Christian-Albrecht-Universität in Kiel zur Verfügung gestellt.

Immunhistochemie

Prinzipiell wurde nach demselben Protokoll vorgegangen wie für die Immunhistochemie TH, mit folgenden Besonderheiten:

Vor der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde jeder Schnitt mit 80 µl Normal-Schweineserum 20 % in PBST für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde, ohne erneutes Waschen, der Anti-aktive-Caspase-3-Antikörper in einer Verdünnung von 1:400 in PBST eingesetzt. Inkubiert wurde mit 80 µl pro Schnitt für 24 h bei 4 °C. Die weiteren Waschschrte erfolgten mit PBST anstelle von PBS.

3.12. Auswertung der Immunhistochemie

Digitalisierung

Für die semiquantitative Auswertung wurden die Schnitte nach den Immunfärbungen für TH, TPH oder den Serotonin-5HT_{2A}-Rezeptor mit der Digitalkamera Axiocam (Zeiss-Vision) am Axioskop-Mikroskop (Zeiss-Vision) in einer Auflösung von 1300 x 1030 Pixel fotografiert. Die Helligkeit wurde so eingestellt, daß die mittlere Pixelintensität von immunnegativen Gewebegebieten der in anderen Schnitten entspricht. Der Kontrast wurde mittels Fokussierung am Feintrieb des Mikroskopes eingestellt. Das Maximum der spektralen Empfindlichkeit des Schwarz/Weiß-Sensors der Kamera liegt bei einer Wellenlänge von 500 nm, der Umfang zwischen 400 und 1000 nm.

Die anti-Serotonin-5HT_{2A}-Rezeptor gefärbten Schnitte wurden mit einem 1,25x Objektiv aufgenommen; dabei entspricht 1 Pixel einer Fläche im Objekt von 4,8 µm x 4,8 µm. Die anti-TH und anti-TPH gefärbten Schnitte wurden mit dem 2,5x Objektiv aufgenommen; dabei ergibt sich eine Auflösung von 3 µm x 1,9 µm pro Pixel. Es wurden ausschließlich Plan-Neoflur-Objektive verwendet.

Mit dem Bildanalysesystem KS100 (Zeiss-Vision) wurden von den gefärbten Arealen jeder Gehirnhälfte Bilder erzeugt. Um die Beleuchtungsschwankungen der Lichtquelle des Mikroskopes auszugleichen, wurden je drei Bilder in kurzer Folge erstellt. Alle Werte, die im Folgenden in der vorliegenden Arbeit angegeben werden, entsprechen den Mittelwerten aus den Werten, die für jede dieser drei Aufnahmen gemessen wurden.

Für jede Serie von Bildern wurden zusätzlich ein Schwarzbild und ein Weißbild angefertigt, wobei ein Schwarzbild bei ausgeschalteter Lichtquelle und ein Weißbild bei der für das später aufzunehmende Areal eingestellten Beleuchtung in einem leeren Areal eines Objektträgers erstellt wurden. Die Beleuchtung innerhalb einer Serie wurde

anschließend nicht mehr verändert. Die Bilddateien wurden im tif-Format auf CD-ROMs für die nachfolgende Auswertung gespeichert.

Morphometrie

Die gespeicherten Bilder wurden mit dem Programm KS RUN (Zeiss-Vision) halbautomatisch ausgewertet. Die immunreaktiven Areale wurden in den Bildern mit dem Cursor umfahren (Morphometrie). Aus der Anzahl der Pixel in diesem Areal und der Auflösung ergibt sich die gefärbte Fläche. Beträgt beispielsweise die Zahl der Pixel des ersten 5HT_{2A} Präparates der linken Hemisphäre 629626, so ist die Objektfläche $14,51 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ bzw. $14,5 \text{ mm}^2$, da ein Pixel eine Objektfläche von $23,04 \mu\text{m}^2$ abbildet.

Grauwertmessung

Vor der Quantifizierung der Immunreaktivität (Densitometrie) wurden die Grauwertbilder bezüglich der optisch bedingten geometrischen Randverzerrung (shading) korrigiert. Anschließend wurde in den schattierungskorrigierten Bildern die Summe der Grauwerte (SUM) und der mittlere Grauwert (MEAN = Summe der Grauwerte/ Anzahl der Pixel) bestimmt. Jedes Pixel kann dabei einen Intensitätswert (I) zwischen 0 (schwarz) und 255 (weiß) annehmen.

Optische Dichten

Die optischen Dichten wurden ausgehend von den Pixelintensitätswerten nach folgender Formel berechnet (Oberholzer et al., 1996):

$$\text{OD} = -\log [(I_{\text{Originalbild}} - I_{\text{Schwarzbild}}) / (I_{\text{Weißbild}} - I_{\text{Schwarzbild}})]$$

OD = Optische Dichte, I = Intensität Grauwert

Die mittlere optische Dichte (MEAND) ist der Quotient aus der Summe der optischen Dichten (SUMD) und der Anzahl der Pixel (Fläche). Um die unspezifische Schwärzung des Hintergrundes zu eliminieren, wurde in jedem abgebildeten Hirnschnitt die optische Dichte einer beliebigen, nicht spezifisch angefärbten Hirnregion als Hintergrundsignal vom optischen Dichtewert der spezifisch markierten Gebiete abgezogen.

Die so erhaltenen Daten (Summe der optischen Dichten, mittlere optische Dichte, Fläche und Hintergrundsignal) wurden in eine Excel-Tabelle eingefügt.

Als Signalintensität (SUMD) jeder Hirnregion in jedem einzelnen Schnitt wurde das Produkt aus Fläche und mittlerer optischer Dichte abzüglich des Hintergrundsignals

betrachtet. Nun erfolgte aus den 8 zu jedem Versuchstier angefertigten Hirnschnitten jeweils die Berechnung des Mittelwerts dieser Signalintensität für SN links und SN rechts.

Seitenvergleich

Ausgehend von der Hypothese, dass bei einseitiger (links) Injektion der Testsubstanzen nur ipsilateral Änderungen der Parameter (Proteinantigene) zu erwarten sind, wurden die Mittelwerte der Signalintensitäten über der kontralateralen Hirnregion als Referenz gewählt. Die ipsilateralen Werte wurden in Prozent des kontralateralen Referenzwerts ausgedrückt. Die Seitendifferenz der Signalintensitäten wurde wie folgt berechnet:

$$D \text{ (SUMD)} = [(MW \text{ SUMD (li)} - MW \text{ SUMD (re)}) / MW \text{ SUMD (re)}] * 100 \%$$

D = Differenz, MW = Mittelwert, re = rechts, li = links

SUMD = Signalintensität der jeweiligen Hirnregion (effektive optische Dichte * Fläche)

Dadurch wurde einer möglichen Varianz der Immunfärbung zwischen verschiedenen Schnitten und Objektträgern Rechnung getragen, die auch bei standardisierter Färbetechnik nicht ausgeschlossen werden kann und mit dem bloßen Auge nicht unbedingt erkennbar ist. Für die untersuchten Hirnregionen wurde aus den einzelnen Seitendifferenzen pro Schnitt der Mittelwert für alle Schnitte eines jeden Tieres gebildet. Aus den so erhaltenen Mittelwerten der Seitendifferenzen der Signalintensitäten jedes Einzeltieres wurden nun für jede Gruppe an Versuchstieren der erneut der Mittelwert, die Standardabweichung (engl. *standard deviation*, SD) und die Standardabweichung des Mittelwertes (engl. *standard error of the mean*, SEM) berechnet. Das Ganze wurde anschließend graphisch anhand von Diagrammen dargestellt.

3.13. Statistik

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mit dem Programm SPSS. Für die Mittelwertsvergleiche wurden jeweils t-Tests für unabhängige Stichproben durchgeführt. Zusätzlich erfolgten nicht parametrische Gruppenvergleiche mit dem U-Test nach Mann-Whitney. Als statistisch signifikant wurden Testwerte angesehen, für deren Eintreten die Wahrscheinlichkeit bei kleiner als 5 % lag ($p < 0,05$).

Für nähere Einzelheiten zu den statistischen Rechenverfahren siehe Bortz (1999).

3.14. Auswertung für TUNEL und aktive Caspase 3

Die Schnitte wurden lichtmikroskopisch auf positive Anfärbung (TUNEL, aktive Caspase 3) und für Apoptose typische Zellmorphologie untersucht. Diese sind Zellschrumpfung, Bildung von Membranblasen, Chromatinkondensation, Kernfragmentation und schließlich Zerteilung der Zelle in Apoptosekörperchen (membranhüllte Vesikel welche die Zellorganellen und nukleäre Fragmente enthalten ohne entzündliche Reaktion des umliegenden Gewebes. Nekrose hingegen ist morphologisch gekennzeichnet durch Zell- und Kernschwellung, gestörter Plasmamembranfunktion bis hin zur Ruptur und umgebender entzündlicher Reaktion.

Positiv angefärbte Zellen im Bereich SN/VTA wurden bei Vergrößerung von 40 x nach den genannten Kriterien untersucht und gezählt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Injektionsort

Der Ort der Farbinjektion wurde aufgesucht und seine Übereinstimmung mit den berechneten Koordinaten (2,5 mm kaudal, 1,9 mm lateral, 8,5 mm ventral, bezogen auf das Bregma) nach Paxinos und Watson bestätigt. Der Stichkanal ist lichtmikroskopisch in einer Nissl-Färbung mit Kresylviolett anhand einer leichten nekrotischen Gewebsreaktion zu identifizieren. Um die Injektionsstelle herum im Bereich des MFB selbst sind keine Hinweise auf eine Nekrose beziehungsweise eine Immunreaktion festzustellen.

4.2. Untersuchungen im nigrostriatalen dopaminergen System

4.2.1. Untersuchungen in der Substantia nigra

Histologische Veränderungen

In der Nissl-Färbung sind die Neurone in der SNpc durch kräftig blau-violett angefärbten Somata und ihre typische Anordnung, Form und Größe leicht zu identifizieren.

Nach Injektion der Trägerlösung in der Kontrollgruppe unterscheiden sich die Zellen der Injektionsseite im Hinblick auf Morphologie und Zytoarchitektur nicht von denen der Kontrollseite. Dicht gedrängt sind mittelgroße Zellen mit deutlich angefärbter Nissl-Substanz und etwas blasserem, exzentrischen Kernen sichtbar. In der Umgebung der Neurone gibt es keine Hinweise auf Nekrose oder eine Immunreaktion (Abb. 8).

Ein ähnliches Bild bietet sich in der Gruppe von NMNorsal, wo die Neurone in der SNpc sowohl 3 Tage als auch 3 Wochen nach Injektion unverändert erscheinen.

3 Tage nach 6-OHDA-Injektion ist lichtmikroskopisch noch keine Reaktion erkennbar. 21 Tage nach der Injektion hingegen sind in der SNpc nur noch vereinzelt Nervenzellen zu erkennen. Allerdings finden sich auch hier in der Umgebung keine Zeichen einer Entzündungs- oder Abräumreaktion, wie sie bei nekrotischem Zelluntergang zu erwarten wäre. Eine gliale Reaktion im Sinne einer Narbenbildung ist nicht zu erkennen (Abb. 9).

Histologische Veränderungen in der SNpc durch die stereotaktischen Injektionen sind also ausschließlich nach Administration von 6-OHDA nachweisbar, welches drei Wochen nach der Läsion zu einer fast vollständigen Reduktion an Neuronen in der SNpc führt und dabei aber keine Anhaltspunkte für eine nekrotische Reaktion liefert. Ein Einfluss von NMNorsal auf die Zellen der SNpc kann in den vorliegenden Untersuchungen mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden.

Expression der Tyrosinhydroxylase

Positiv gefärbte Zellen finden sich im Bereich der SNpc, SNpl und VTA. Die Zellkörper und Zellfortsätze sind kräftig angefärbt, der exzentrische Kern ist als Aussparung zu unterscheiden (Abb. 11). Ein dichtes Fasernetz zieht sich quer durch die SNpc, SNpl und VTA, Vertikale Fasern aus den ventralen Anteilen der SNpc reichen in die SNpr (Abb. 10). Andere Strukturen weisen keine Anfärbung auf. Auch eine unspezifische Hintergrundfärbung ist nicht zu beobachten. Einzelne TH-positive Zellen finden sich zum Teil auch in der SNpr, welche dem ventralen Anteil der SNpc zugerechnet werden.

Eine Übersicht der Färberergebnisse zeigt Abb. 12. Lichtmikroskopisch beobachtet man unter dem Einfluß von 6-OHDA 3 Wochen nach der Injektion ipsilateral einen starken bis teilweise vollständigen Rückgang der TH-haltigen Strukturen. Die Veränderungen sind am stärksten ausgeprägt im dorsolateralen Bereich der SNpc. Das vorhandene Restsignal ist am stärksten in der VTA und dem medioventralem Anteilen der SNpc (Abb. 14). Der genaue zeitliche Verlauf des Zellrückganges ist aus diesen Untersuchungen nicht abzulesen, nach 3 Tagen sind hier mikroskopisch noch keine Veränderungen erkennbar. Nach Injektion von NMNorsal und in der Kontrollgruppe sind lichtmikroskopisch in der ipsilateralen SN weder nach 3 Tagen noch nach 3 Wochen Veränderungen im Vergleich mit der Gegenseite erkennbar (Abb. 13).

Um einen Einfluss der stereotaktisch injizierten Substanzen auf die dopaminergen Zellen in der SNpc zu quantifizieren, wurde die Intensität der Immunreaktivität der TH in den angefärbten Bereichen als optische Dichten gemessen. Ausgewertet wurden die markierten Bereiche der SNpc und SNpl, wobei auf eine getrennte Betrachtung dieser funktionell und anatomisch eng zusammenhängenden Gebiete verzichtet wurde und beide unter der Bezeichnung SNpc zusammengefasst wurden. Die Mittelwerte der Seitendifferenzen der einzelnen Gruppen werden nachfolgend stets mit Standardabweichung (engl. *standard deviation*, SD) und Standardabweichung des Mittelwertes (engl. *standard error of the mean*, SEM) in Klammern angegeben.

Nach 3 Tagen wird in der Kontrollgruppe eine leichte Zunahme (+2,65% +/-4,05%) der Immunreaktivität gemessen, ebenso in der Gruppe der mit NMNorsal behandelten Tiere (+1,29% +/-1,92%). Nach Injektion von 6-OHDA kommt es hingegen zu einem Verlust um -5,39% (+/-9.09%). Die Unterschiede in den mit NMNorsal sowie 6-OHDA behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe sind allerdings statistisch nicht signifikant.

Die Mittelwerte der Seitendifferenzen der optischen Dichten in den einzelnen Gruppen zum Zeitpunkt 3 Tage nach stereotaktischer Injektion sind in Diagramm 1 dargestellt.

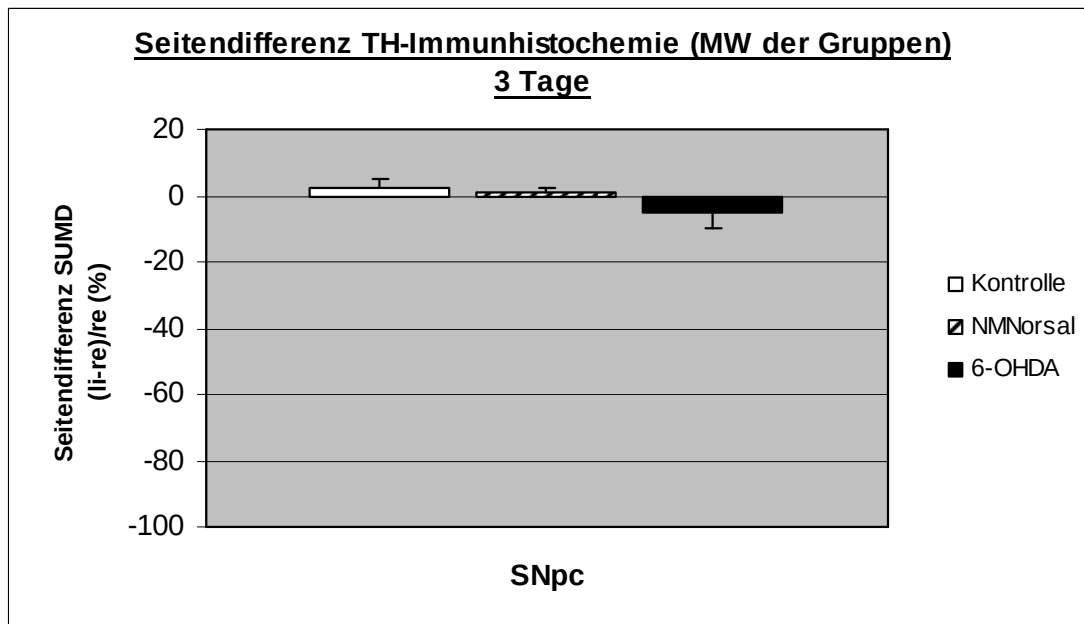


Diagramm 1: Gezeigt sind als Mittelwert für jede Gruppe die Seitendifferenzen ((links-rechts)/rechts in %) der Summe der optischen Dichten (SUMD) in der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) (+/- SEM) nach 3 Tagen.
 Gruppengröße: n = 3 für die Kontrollgruppe bzw. n = 4 für NMNorsal und 6-OHDA.
 Keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich von NMNorsal oder 6-OHDA mit der Kontrollgruppe

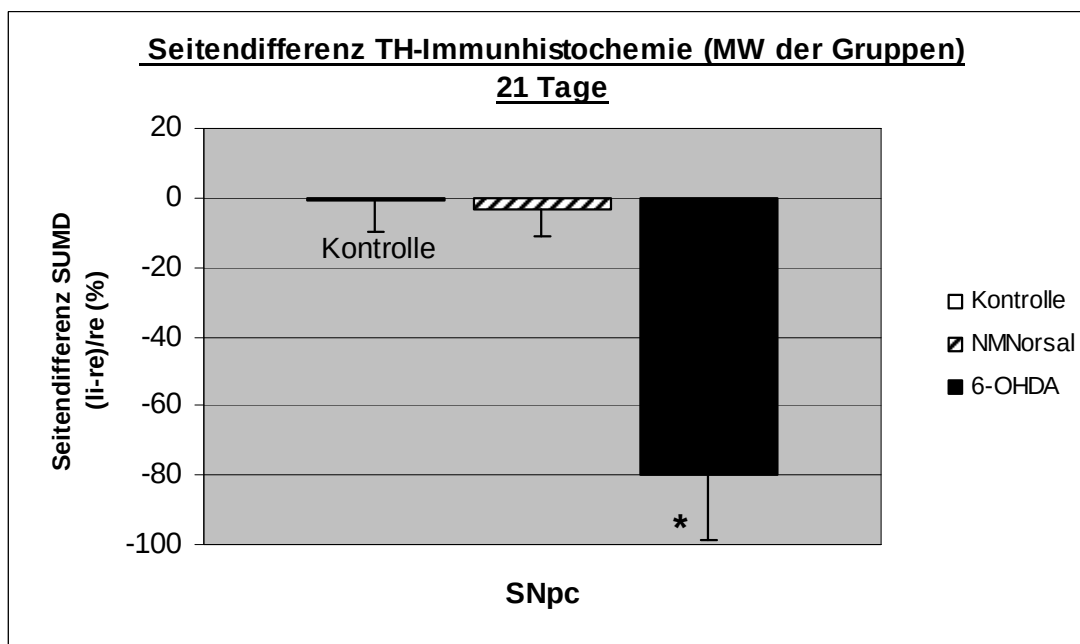


Diagramm 2: Gezeigt sind als Mittelwert für jede Gruppe die Seitendifferenzen ((links-rechts)/rechts in %) der Summe der optischen Dichten (SUMD) in der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) (+/- SEM) nach 21 Tagen.
 Gruppengröße: n = 3 für die Kontrollgruppe bzw. n = 4 für NMNorsal und 6-OHDA.
 * = t-Test (p=0,001) und Mann-Whitney-Test (p=0,034) sind signifikant gegenüber der Kontrollgruppe

21 Tage nach Injektion kommt es in der Kontrollgruppe praktisch zu keiner Veränderung (-0,54% +/-11,14%). In der Gruppe der mit NMNorsal behandelten Tiere zeigt sich ein leichter Verlust der gemessenen optischen Dichten (-3,53% +/-7,54%). Die Veränderungen für NMNorsal sind gegenüber der Kontrollgruppe statistisch nicht signifikant.

In der Gruppe 6-OHDA zeigt sich drei Wochen nach der stereotaktischen Injektion eine starke Reduktion TH-positiver Zellen. Die Intensität der Anfärbung im Bereich der SNpc auf der Injektionsseite ist um fast 80% (-79,59% +/-19,14%) gegenüber kontralateral gesunken. Diese Veränderung sind sowohl im t-Test ($p=0,001$) als auch im Mann-Whitney-Rangsummentest ($p=0,034$) statistisch signifikant.

Die Ergebnisse der Untersuchung nach 3 Wochen sind in Diagramm 2 dargestellt.

Apoptose

TUNEL

In den Positivkontrollen zeigen die Schnitte sehr wenig unspezifische Hintergrundfärbung. Zellkerne sind mit Methylgrün leicht grünlich-bläulich angefärbt. TUNEL-positive Zellen verteilen sich in den Grenzzonen (*Penumbra*) und Ischämiekernzonen des zerebralen *Cortex* und *Striatum* des okkludierten Gebietes. In der Vergrößerung werden deutlich kräftig angefärbte Kerne sichtbar. Der überwiegende Teil der Zellen weist große Kerne auf, bei denen die Perikarya ebenfalls schwach mit angefärbt sind, sodaß die Zellfortsätze erkennbar sind (Abb. 15, A, *). Einzelne Zellen weisen eher einen kondensierten Kern auf, das Chromatin erscheint verdichtet (Abb. 15, A, #), vereinzelt sind abgeschnürte runde kleinere Kompartimente sichtbar (Abb. 15, A, +), welche zum Teil angefärbt (Kernstrukturen) zum Teil nicht angefärbt (Zellkompartimente) sind. Positiv färben sich teilweise auch Wände angeschnittener Gefäße, Endothelzellen sowie vereinzelt Glia-artige Zellen an.

Die Qualität der Färbung in den untersuchten Gruppen (Kontrolle, NMNorsal, 6-OHDA) entspricht der in den Positivkontrollen mit nur geringem unspezifischem Hintergrundsignal. In mehr als der Hälfte der untersuchten Tiere aller Gruppen findet sich innerhalb der 8 untersuchten Schnitte pro Tier im Bereich der SNpc eine einzelne TUNEL-positiv angefärbte Zelle. Dies kommt in etwa gleichem Maße sowohl auf der Injektionsseite wie auch auf der Kontrollseite vor. Alle diese Zellen weisen kräftig angefärbte Kerne auf, welche abgerundet, zum Teil auch unregelmäßig begrenzt sind. Die Kerne erscheinen vergrößert. Perikarya sind teilweise diffus schwach mit angefärbt (Abb. 15, B – E).

Nach 21 Tagen ist bei den mit 6-OHDA behandelten Tieren die Zahl der TUNEL- positiven Zellen auf der Injektionsseite erhöht. Bei den vier Tieren dieser Gruppe finden sich 3, 4, 8 beziehungsweise 7 positiv markierte Zellen pro untersuchtes Hirn. Auch die Kerne dieser Zellen erscheinen kräftig braun markiert und vergrößert. Die Zellkörper sind diffus schwach mitangefärbt.

21 Tage nach NMNorsal- Injektion ist bei einem Tier in einem Schnitt eine TUNEL-positive Zelle im Bereich der ipsilateralen SNpc nachweisbar, welche einen kondensierten, fragmentierten, dunkel angefärbten Kern aufweist. (Abb. 15, F)

Aufgrund der geringen Anzahl positiv gefärbter Zellen (pro Tier werden je 8 Schnitte untersucht in denen circa 1000 TH-positive Neurone vorkommen) wird auf eine statistische Auswertung verzichtet und die Ergebnisse werden anschließend deskriptiv diskutiert.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Aktive Caspase-3

In der aktive Caspase-3- Immunhistochemie ist die unspezifische Hintergrundfärbung in den als Positivkontrollen verwendeten Ischämieschnitten nach MCAO gering. Das Chromatin der Zellkerne ist mit Methylgrün grünlich-bläulich dargestellt. In der lateralen Grenzzone des Striatums sind einzelne Zellen positiv markiert. Die Perikarya sind kräftig braun angefärbt. Das Chromatin erscheint verdichtet. Die Zelleiber sind teilweise in Zersetzung in kleine, runde Kompartimente begriffen welche Apoptosekörperchen darstellen könnten (Abb. 16).

Die Qualität des Färbeergebnisses bei den untersuchten Schnitten (Kontrolle, NMNorsal, 6-OHDA) entspricht der in den Positivkontrollen mit geringer oder fehlender unspezifischer Hintergrundanfärbung. Zellkerne sind mit Methylgrün grünlich-bläulich dargestellt. Es werden keine positiv angefärbten Zellen für aktive Caspase 3 nachgewiesen.

		TUNEL-positive Zellen in der SNC nach 3 Tagen	
		ipsilateral	kontralateral
NMNorsal	Tier 1		
	Tier 2		
	Tier 3		1
	Tier 4	1	
6-OHDA	Tier 1		
	Tier 2		
	Tier 3	1	1
	Tier 4		
Kontrolle	Tier 1		1
	Tier 2		
	Tier 3	1	
		TUNEL-positive Zellen in der SNpc nach 21 Tagen	
		ipsilateral	kontralateral
NMNorsal	Tier 1	1	
	Tier 2	1	
	Tier 3	1 *	
	Tier 4		
6-OHDA	Tier 1	3	1
	Tier 2	4	1
	Tier 3	8	
	Tier 4	7	1
Kontrolle	Tier 1	1	
	Tier 2	1	1
	Tier 3	1	

Tabelle 1: Ergebnisse der TUNEL-Färbung in der SNpc in der Übersicht

* = Zelle mit kondensiertem, fragmentiertem Kern (siehe Abb. 15, F)

4.2.2. Untersuchungen im Striatum

Expression der Tyrosinhydroxylase

In der immunhistochemischen Markierung der TH stellt sich lichtmikroskopisch das *Striatum* gleichmäßig angefärbt dar. *Patch-Matrix*-Kompartimente lassen sich in dieser Färbung nicht nachweisen (Abb. 17).

3 Tage nach Injektion von 6-OHDA zeigt sich im Lichtmikroskop ipsilateral eine starke Verringerung der Färbintensität in dieser Gruppe. Dieser Rückgang ist gleichmäßig im gesamten *Striatum* zu beobachten, es sind keine Unterschiede zwischen *dorsalem*, *ventralem Striatum* und *Tuberculum olfactorium* erkennbar. Auch im kranio-kaudalen Verlauf ist der Schwund an Färbintensität einheitlich.

In der NMNorsal- und der Kontrollgruppe sind nach 3 Tagen mikroskopisch keine Veränderungen erkennbar.

Nach 21 Tagen ist bei den mit 6-OHDA behandelten Tieren ipsilateral kaum oder keine Anfärbung mehr, das heißt ein weitestgehend vollständiger Rückgang TH-haltiger Strukturen, zu beobachten (Abb. 12).

In der NMNorsal- sowie Kontrollgruppe ergeben sich nach 21 Tagen keine erkennbaren Veränderungen.

Wie zuvor beschrieben wurden im auch *Striatum* zu Quantifizierung der Veränderungen die optischen Dichten der TH-Immunreaktivität auf der Injektionsseite gemessen und als prozentualer Wert der kontralateralen Seite dargestellt. Die Messungen der Immunreaktivität erfolgten innerhalb der untersuchten Schnitte aufgrund der beschriebenen schwierigen Abgrenzbarkeit der einzelnen Anteile einheitlich über das gesamte Gebiet des *Striatums* einschließlich des Nucleus accumbens sowie des *Tuberculum olfactorium*.

Nach 3 Tagen wird in der Kontrollgruppe ein minimaler Rückgang der Immunreaktivität um 3,22% (+/-13,97%) gemessen. Bei mit NMNorsal behandelten Tieren ergab sich im Gruppenmittel eine Reduktion um -2,49% (+/-18,99%) ohne statistische Signifikanz im Vergleich mit der Kontrolle. Die Gruppe der mit 6-OHDA behandelten Tiere wies einen deutlichen Verlust TH-immunreaktiver Strukturen auf (-51,69% +/-37,17%). Diese Veränderungen sind allerdings im t-Test und im Mann-Whitney-Test nicht signifikant. Grund dafür sind die stark abweichenden Werte bei einem der Tiere, bei welchem sich

kaum eine Seitendifferenz ergab (-2,18%), während das Ausmaß der Veränderungen der TH- Immunreaktivität bei den verbleibenden 3 Tieren dieser Gruppe dagegen größer war (-44,09%, -81,76% und -78,75%).

Die Mittelwerte der Seitendifferenzen der optischen Dichten in jeder Gruppe zum Zeitpunkt 3 Tage nach stereotaktischer Injektion sind in Diagramm 3 dargestellt.

Die durchschnittliche Seitendifferenz nach 21 Tagen beträgt in der Kontrollgruppe -2,01% (+/-11,01%). In der Gruppe der mit NMNorsal behandelten Tiere ergibt sich nach dieser Zeit ein Rückgang der Immunreaktivität um -10,50% (+/-3,33%). Diese Veränderungen sind gegenüber der Kontrollgruppe statistisch nicht signifikant. Eine Reduktion um -79,54% (+/-16,75%) wird in der Gruppe der Tiere 3 Wochen nach 6-OHDA-Injektion gemessen. Diese Veränderungen erweisen sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe im t-Test ($p=0,001$) sowie im Mann-Whitney-Test ($p=0,034$) als signifikant.

In Diagramm 4 sind die Ergebnisse der Untersuchungen nach 3 Wochen dargestellt.

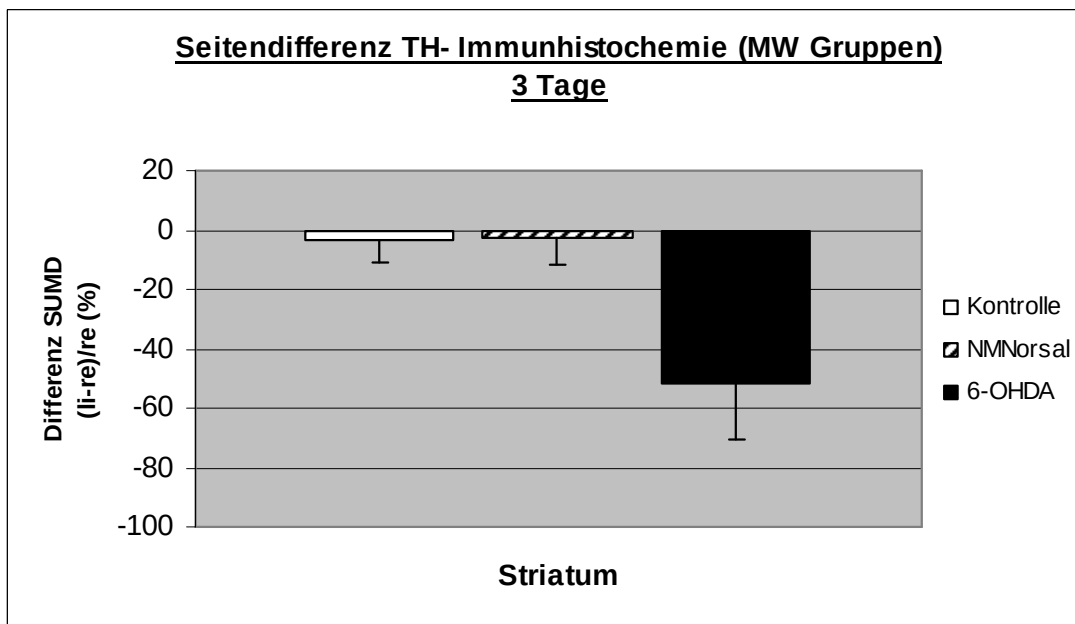


Diagramm 3: Gezeigt sind als Mittelwert für jede Gruppe die Seitendifferenzen ((links-rechts)/rechts in %) der Summe der optischen Dichten (SUMD) im *Striatum* (+/- SEM) nach 3 Tagen.

Gruppengröße: n = 3 für die Kontrollgruppe bzw. n = 4 für NMNorsal und 6-OHDA.

Keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich von NMNorsal oder 6-OHDA mit der Kontrollgruppe

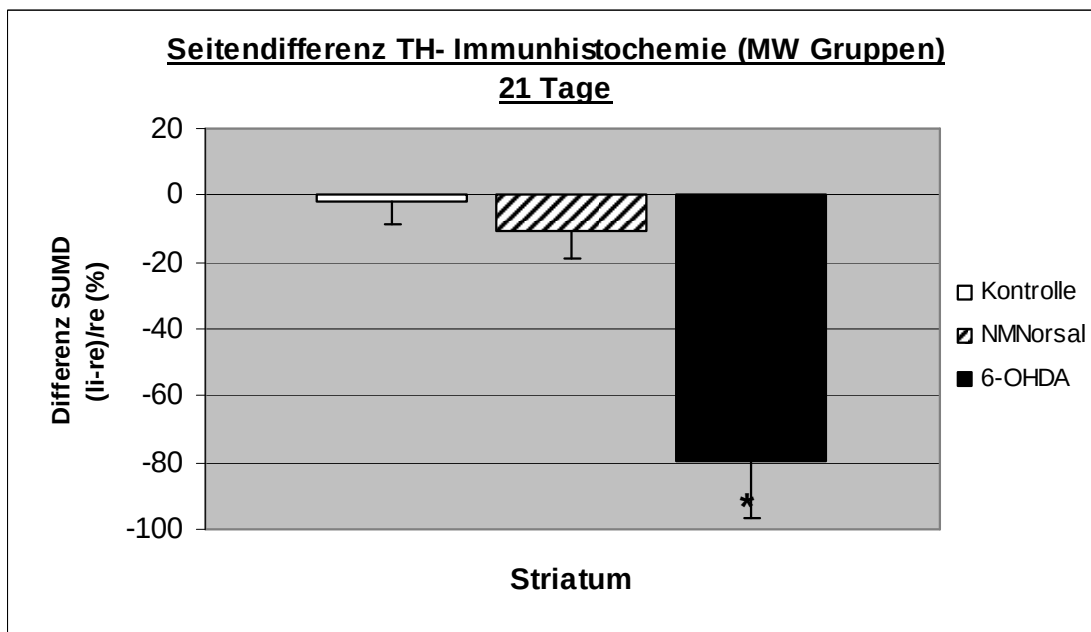


Diagramm 4: Gezeigt sind als Mittelwert für jede Gruppe die Seitendifferenzen ((links-rechts)/rechts in %) der Summe der optischen Dichten (SUMD) im *Striatum* (+/- SEM) nach 21 Tagen.

Gruppengröße: n = 3 für die Kontrollgruppe bzw. n = 4 für NMNorsal und 6-OHDA.

* = t-Test (p=0,001) und Mann-Whitney-Test (p=0,034) sind signifikant gegenüber der Kontrollgruppe

4.3. Untersuchungen im serotonergen System

4.3.1. Expression der Tryptophanhydroxylase im Medialen Vorderhirnbündel

In der immunhistochemischen Markierung der Tryptophanhydroxylase (TPH) als Marker für serotonerge Strukturen stellen sich die Fasern im MFB quer oder schräg angeschnitten dar. Der Durchmesser nimmt nach frontal hin in Richtung Striatum zu, wo die Fasern mehr und mehr nach lateral divergieren. Die TPH- positiven Fasern sind im Querschnitt deutlich angefärbt bei fehlender Hintergrundfärbung der Umgebung (Abb. 19). TPH- positive Strukturen finden sich unter anderem auch im *Cortex*.

In allen Gruppen sind weder makroskopisch noch mikroskopisch Unterschiede zwischen injizierter Seite und Kontrollseite feststellbar. Wie im Falle der TH wurde die Färbung TPH- positiver Fasern im MFB mittels Messung optischer Dichten ausgewertet und ipsilateral mit kontralateral verglichen.

Bei Auswertung der optischen Dichten nach 3 Tagen wird in der Kontrollgruppe eine geringe Reduktion der Immunreaktivität auf der injizierten Seite gemessen (-3,62% +/- 4,32%). Die Injektion von NMNorsal bewirkt Veränderungen in vergleichbarer Größenordnung (-5,17% +/- 3,27%) ohne statistisch signifikante Abweichungen. Bei den mit 6-OHDA behandelten Tieren ergibt sich eine geringe Zunahme des Signals (+4,81% +/- 5,56%). Diese Veränderungen waren sowohl im t-Test als auch im Mann-Whitney-Test nicht signifikant.

Die Mittelwerte der Seitendifferenzen der optischen Dichten zum Zeitpunkt 3 Tage nach stereotaktischer Injektion sind in Diagramm 5 dargestellt.

Bei den Messungen der optischen Dichten nach 21 Tagen ist innerhalb der Kontrollgruppe die Seitendifferenz im Gruppenmittel minimal (-0,034% +/- 9,52%). Auch in der NMNorsal-Gruppe (-5,44% +/- 8,66%) und in der 6-OHDA-Gruppe (+0,16% +/- 4,33%) fallen die Seitenunterschiede äußerst gering aus. Im Vergleich der NMNorsal-Gruppe sowie in der 6-OHDA-Gruppe mit der Kontrollgruppe ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Zeitpunkt 21 Tage zeigt Diagramm 6.

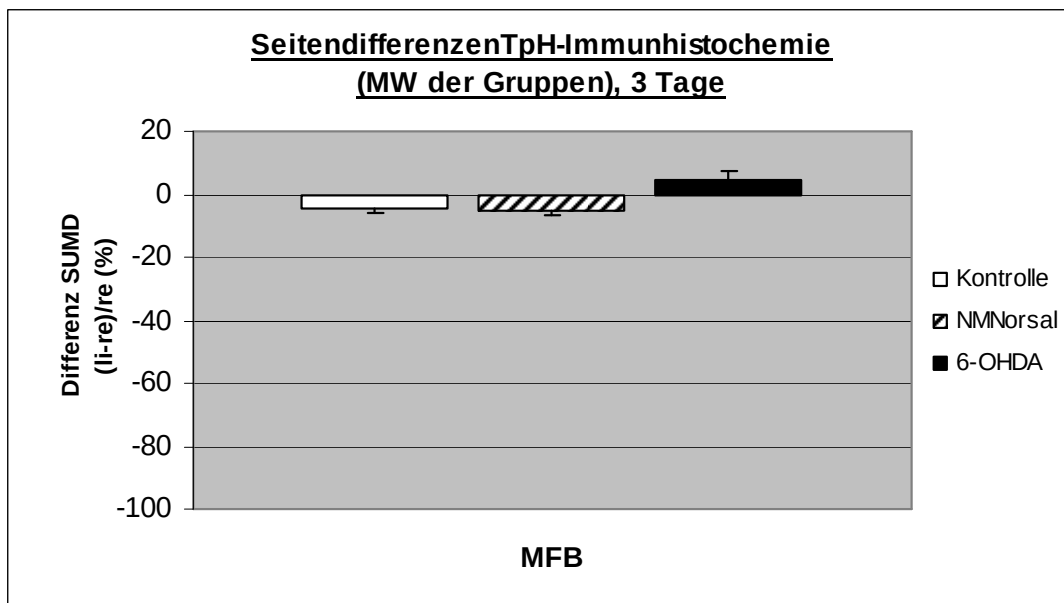


Diagramm 5: Gezeigt sind als Mittelwert für jede Gruppe die Seitendifferenzen ((links-rechts)/rechts in %) der Summe der optischen Dichten (SUMD) der Tryptophanhydroxylase (TPH) nach immunhistochemischer Anfärbung im medialen Vorderhinbündel (MFB) nach 3 Tagen (+/- SEM).

Gruppengröße: n = 3 für die Kontrollgruppe bzw. n = 4 für NMNorsal und 6-OHDA.

Keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich von NMNorsal oder 6-OHDA mit der Kontrollgruppe

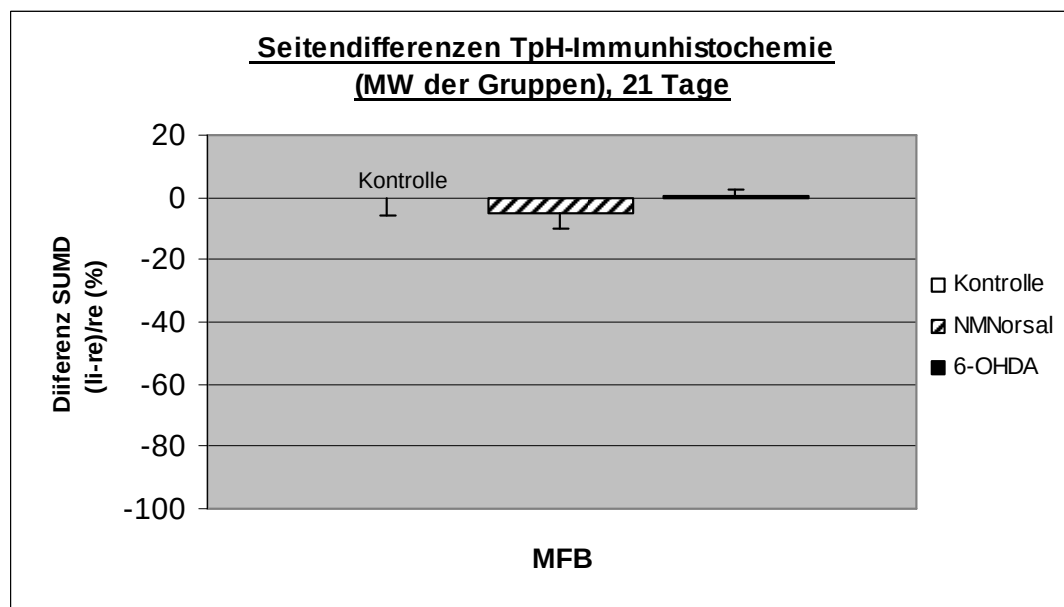


Diagramm 6: Gezeigt sind als Mittelwert für jede Gruppe die Seitendifferenzen ((links-rechts)/rechts in %) der Summe der optischen Dichten (SUMD) für die immunhistochemische Anfärbung der Tryptophanhydroxylase (TPH) im medialen Vorderhirnbündel (MFB) nach 21 Tagen(+/- SEM).

Gruppengröße: n = 3 für die Kontrollgruppe bzw. n = 4 für NMNorsal und 6-OHDA.

Keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich von NMNorsal oder 6-OHDA mit der Kontrollgruppe

4.3.2. 5HT_{2A}-Rezeptor im Striatum

Der Bereich des gesamten *Striatums* färbt sich 5HT_{2A}-Rezeptor-positiv an gegenüber einem schwach angefärbten Hintergrund, wobei die Markierung im *dorsalen Striatum* am geringsten ist und nach ventral hin sowie im *Nucleus accumbens* und im *Tuberculum olfactorium* an deutlichsten ist. Die Färbung ist im kraniokaudalen Verlauf homogen, zum Teil sind Fasern einzeln sowie in Netzen und Bündeln erkennbar. Es sind die ausgesparten Zellkörper striataler Neurone zu sehen. *Patch- Matrix*-Kompartimente sind nicht abzugrenzen. Zwischen allen untersuchten Gruppen lassen sich lichtmikroskopisch keine Unterschiede hinsichtlich Intensität und Verlauf der Färbung feststellen (Abb. 18).

Auch die immunhistochemische Anfärbung von 5HT_{2A}-Rezeptoren im Striatum wurde mittels Messung optischer Dichten ausgewertet. Nach 3 Tagen wird in der Kontrollgruppe eine minimale Zunahme (+1,84% $\pm$ 10,17%), in der NMNorsal-Gruppe (-7,78% $\pm$ 13,19%), in der 6-OHDA-Gruppe (-1,43% $\pm$ 10,01%) hingegen eine geringfügige Reduktion der Immunreaktivität registriert. Der Unterschied der gemessenen Werte letzterer beider Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe ist statistisch nicht signifikant.

Die Mittelwerte der Seitendifferenzen der Immunreaktivität 3 Tage nach stereotaktischer Injektion in den einzelnen Gruppen (Kontrolle, NMNorsal und 6-OHDA) sind nachfolgend im Diagramm 7 dargestellt.

Auch nach 21 Tagen sind die Abweichungen der Immunreaktivität im Seitenvergleich gering. In der Kontrollgruppe kommt es auf der Injektionsseite zu einer geringen Reduktion des Signals um -3,29% ($\pm$ 6,73%), 6-OHDA bewirkt eine leichte Zunahme um +2,37% ($\pm$ 9,11%) in Bezug auf die Gegenseite. Etwas stärkere Abweichungen werden bei mit NMNorsal behandelten Tieren registriert. Es kommt zu einer Abnahme der gemessenen optischen Dichten um -8,20% ($\pm$ 5,79%) im Seitenvergleich. Diese Veränderungen sind im Vergleich mit den Werten der Kontrollgruppe statistisch nicht signifikant.

Die Ergebnisse der Untersuchungen nach 21 Tagen sind in Diagramm 8 dargestellt.

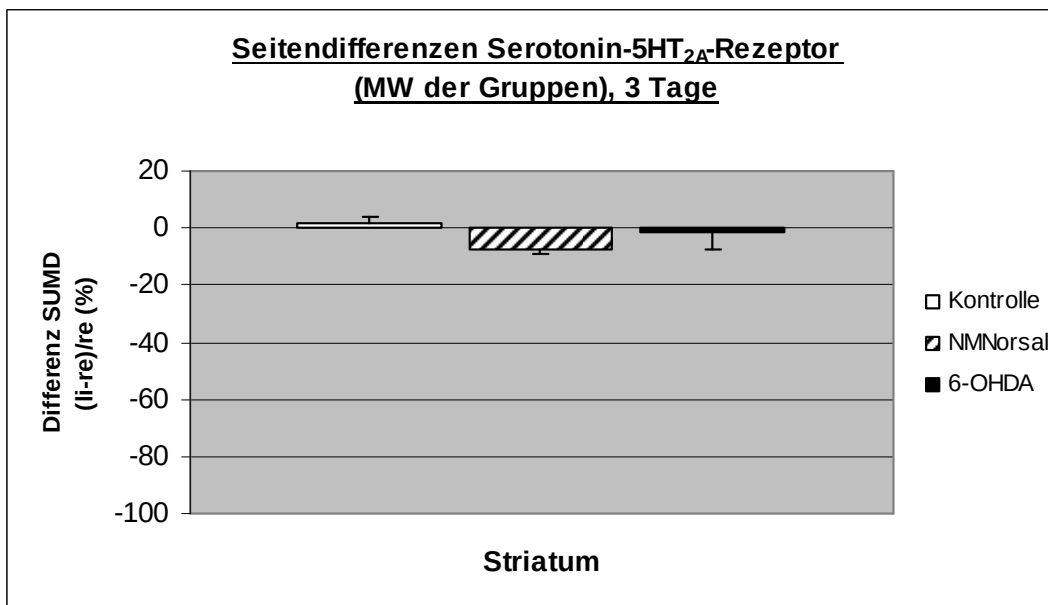


Diagramm 7: Gezeigt sind als Mittelwert für jede Gruppe die Seitendifferenzen ((links-rechts)/rechts in %) der Summe der optischen Dichten (SUMD) der 5HT_{2A}-Rezeptoren nach immunhistochemischer Anfärbung im *Striatum* nach 3 Tagen (+/- SEM).

Gruppengröße: n = 3 für die Kontrollgruppe bzw. n = 4 für N-M-Norsal und 6-OHDA

Keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich von NMNorsal oder 6-OHDA mit der Kontrollgruppe

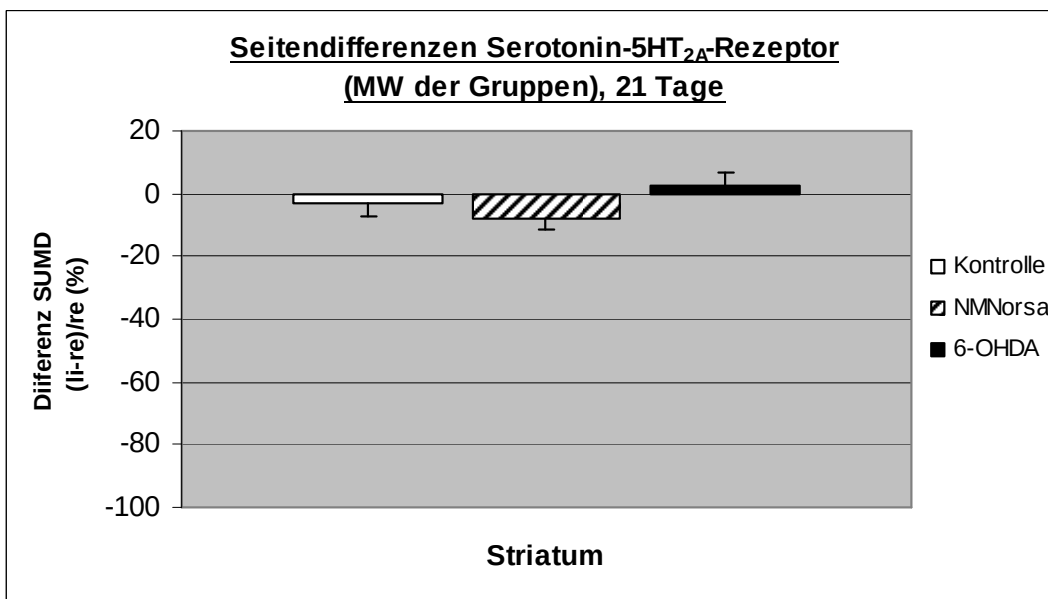


Diagramm 8: Gezeigt sind als Mittelwert für jede Gruppe die Seitendifferenzen ((links-rechts)/rechts in %) der Summe der optischen Dichten (SUMD) für die immunhistochemische Anfärbung der von 5-HT_{2A}-Rezeptoren im *Striatum* nach 21 Tagen(+/- SEM).

Gruppengröße: n = 3 für die Kontrollgruppe bzw. n = 4 für NMNorsal und 6-OHDA.

Keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich von NMNorsal oder 6-OHDA mit der Kontrollgruppe

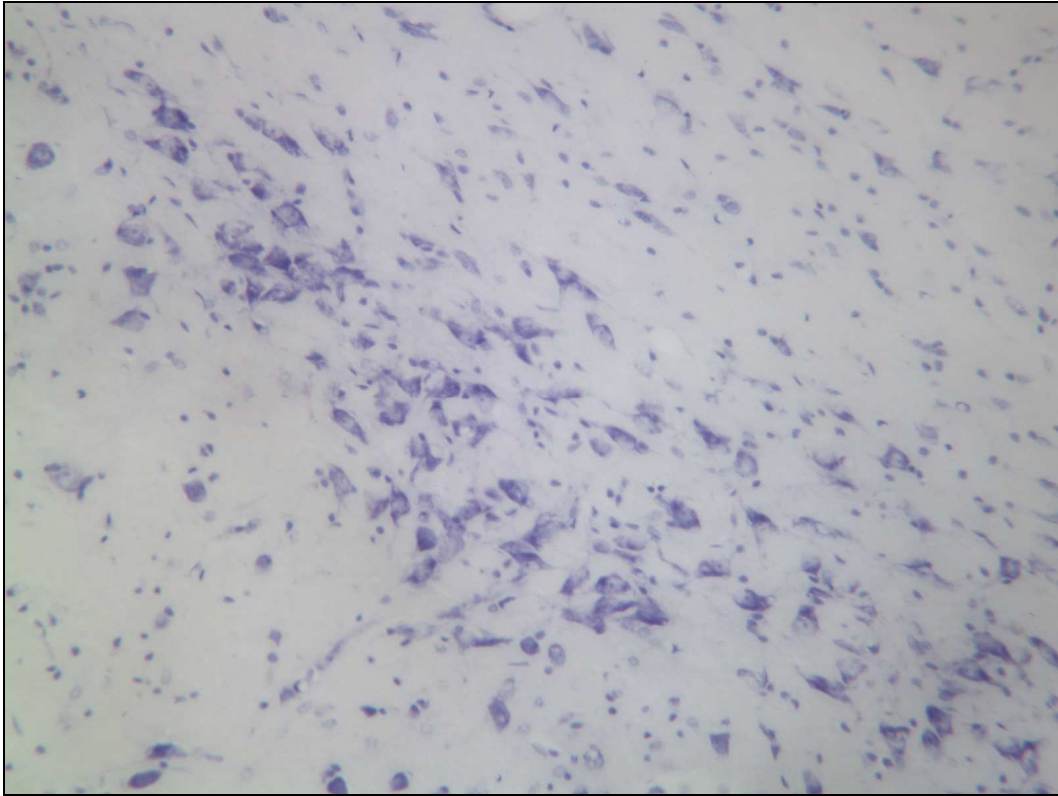


Abb. 8: SN in der Kontrollgruppe nach 21 Tagen, Kresylviolett, x 16

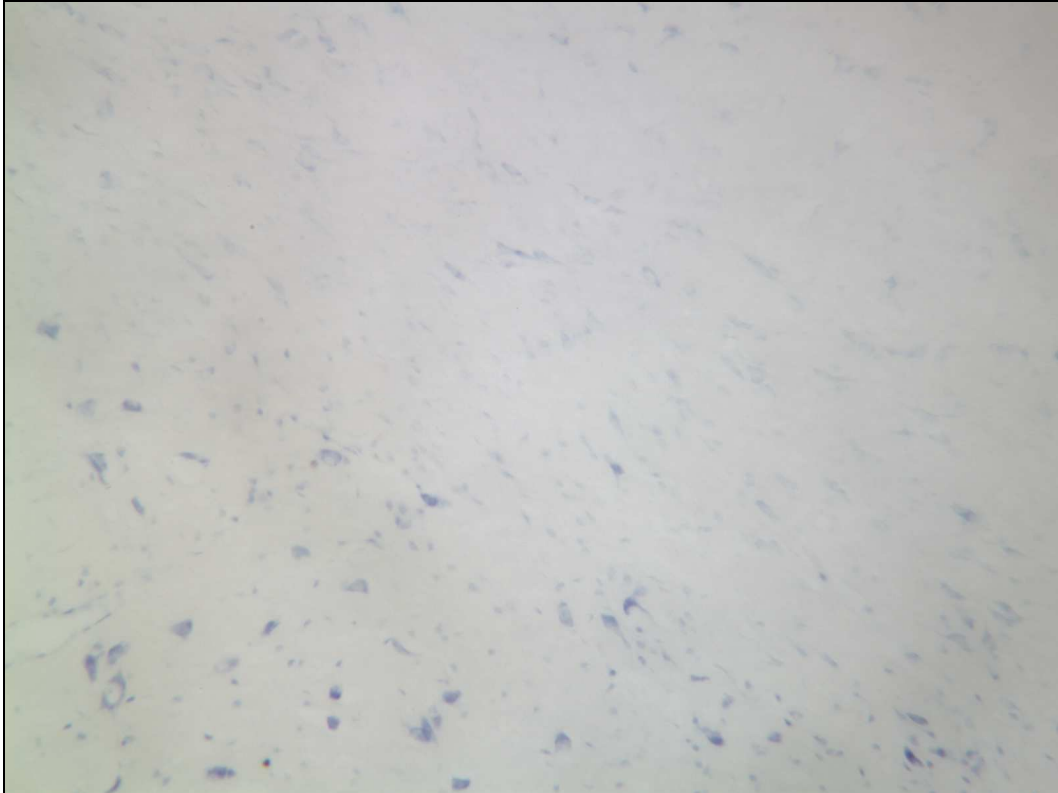


Abb. 9: SN 21 Tage nach Injektion von 6-OHDA, 21 Tage, Kresylviolett, x 16

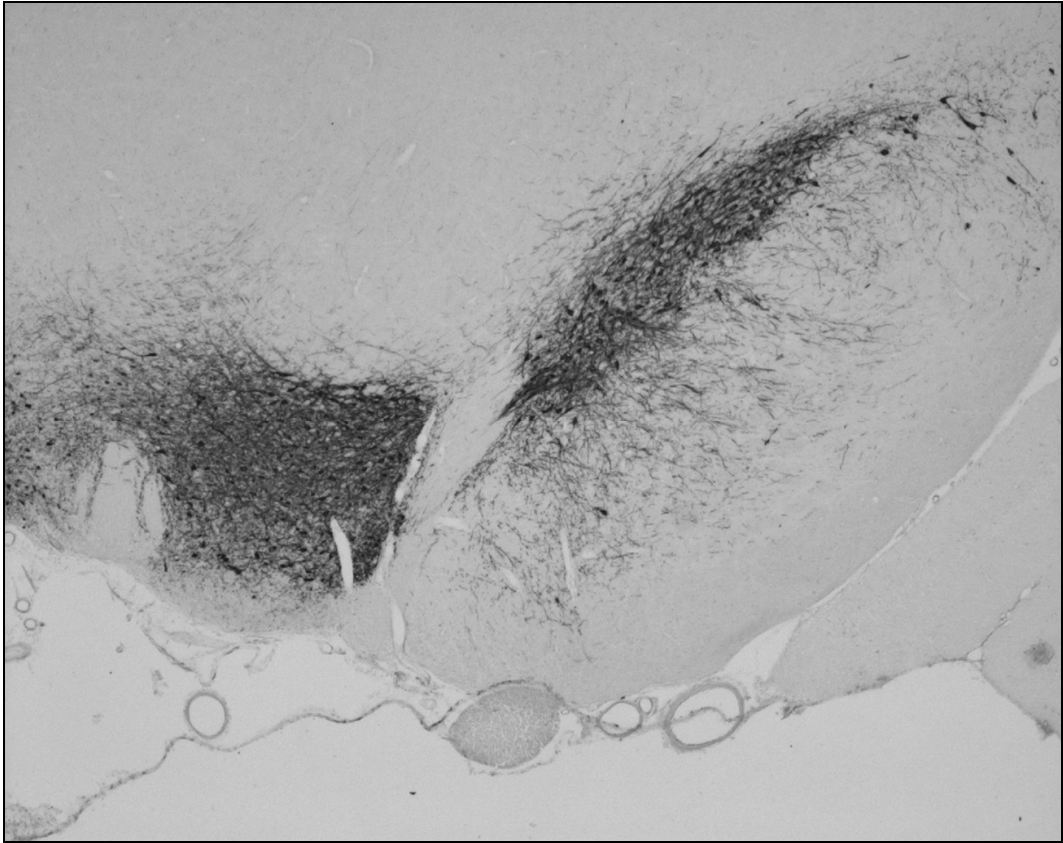


Abb. 10: Übersicht SN in der TH-Immunhistochemie, x 4

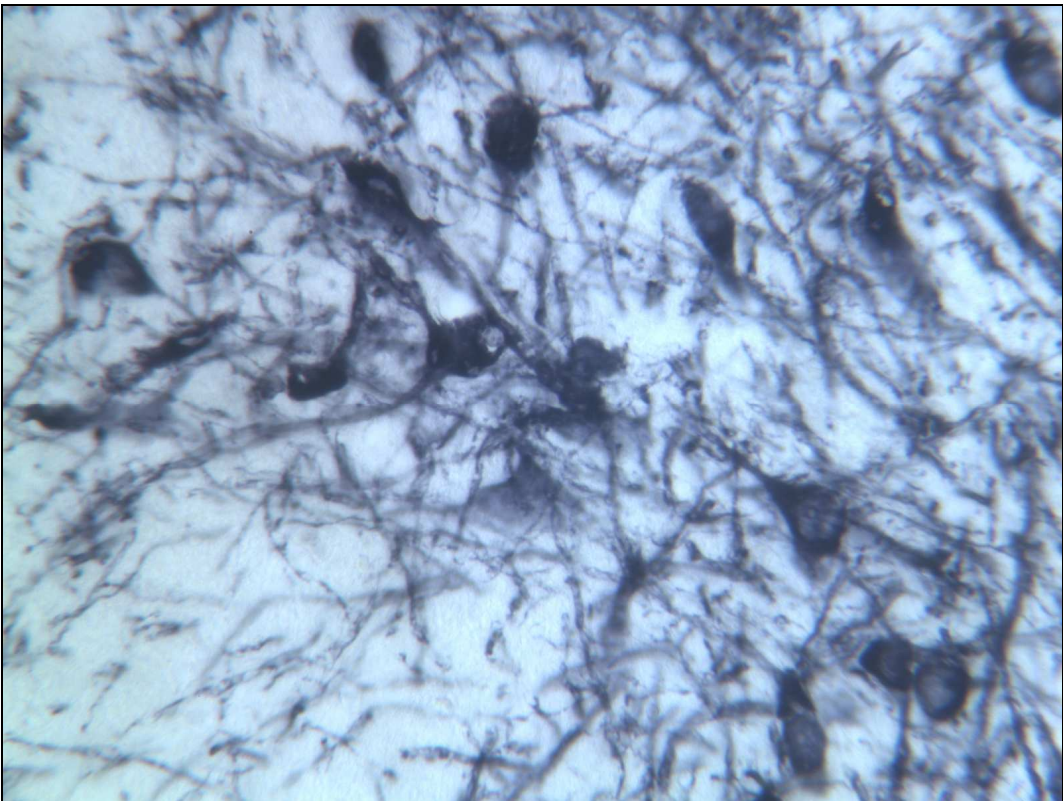


Abb. 11: SN in der TH-Immunhistochemie, x 100

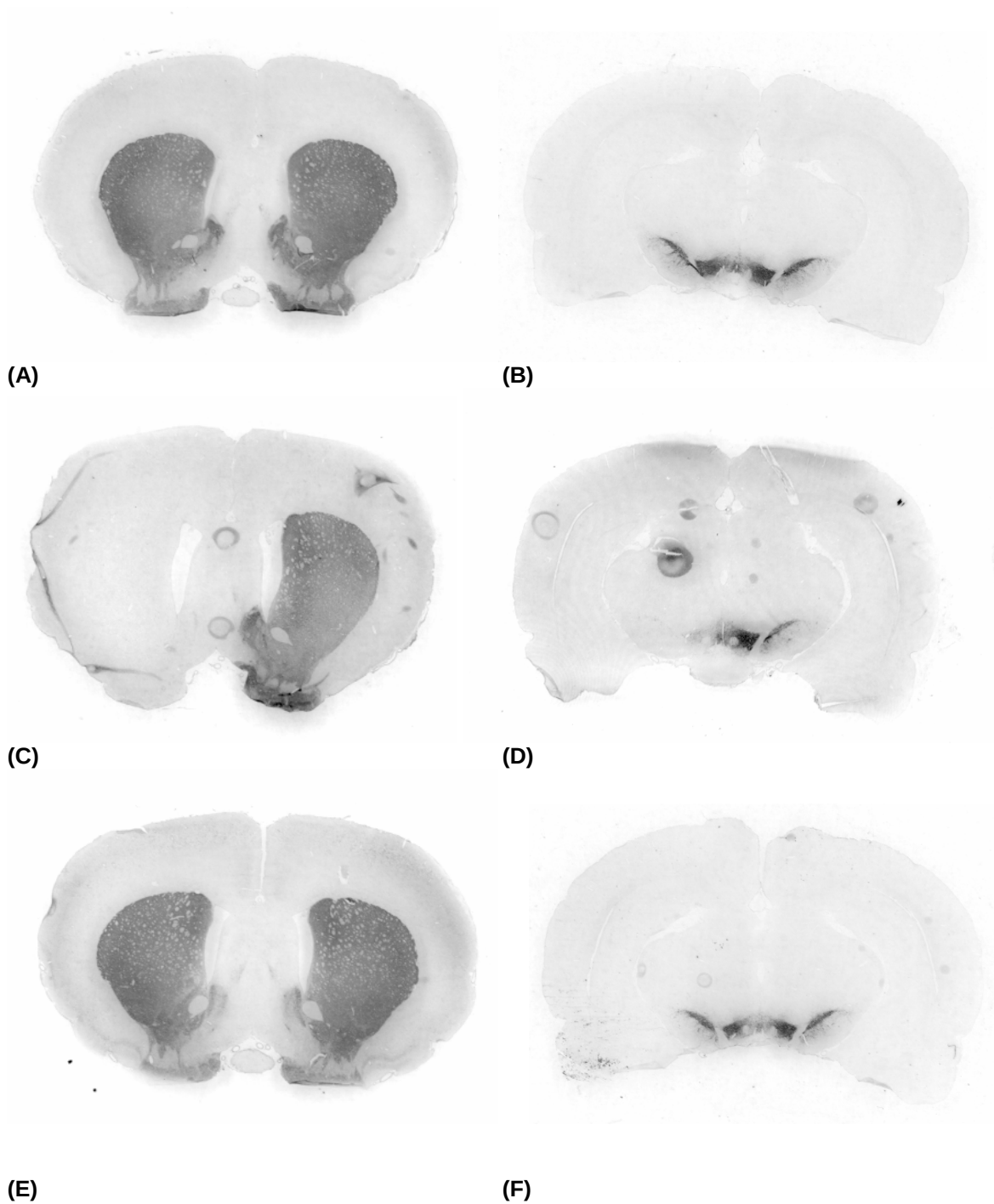


Abb. 12: Übersicht Färbeergebnisse der TH-Immunhistochemie nach 21 Tagen **(A)** Striatum, Kontrollgruppe **(B)** SN, Kontrollgruppe **(C)** Striatum, 6-OHDA **(D)** SN, 6-OHDA **(E)** Striatum, NMNorsal **(F)** SN NMNorsal

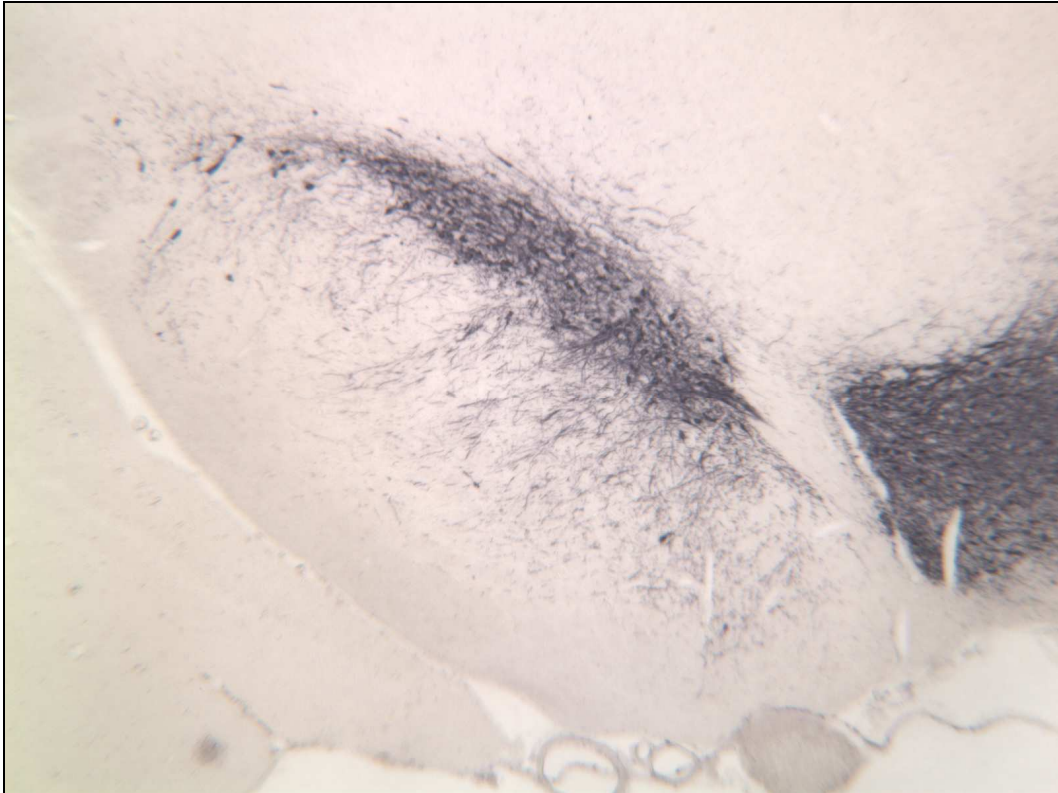
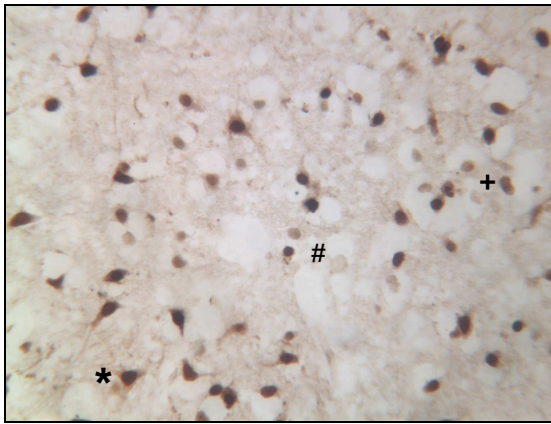


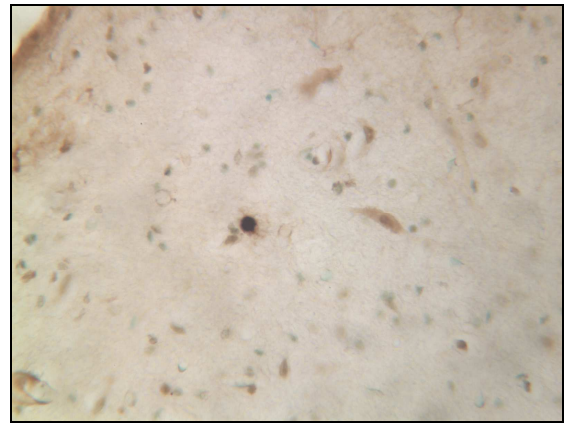
Abb. 13: SN in der TH-Immunhistochemie, Kontrollgruppe 21 Tage, x 4



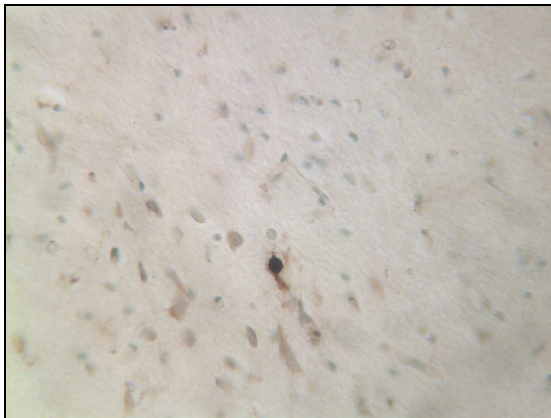
Abb. 14: SN in der TH-Immunhistochemie, 6-OHDA 21 Tage, x 4



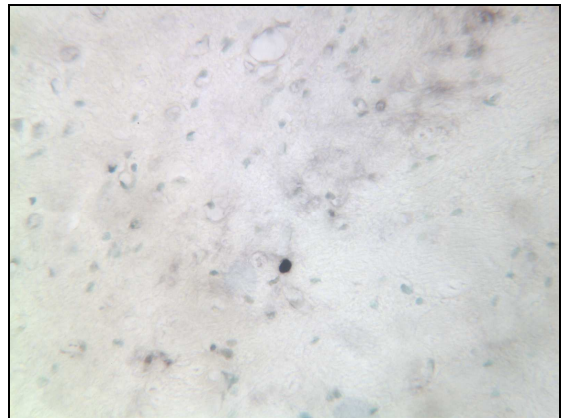
(A)



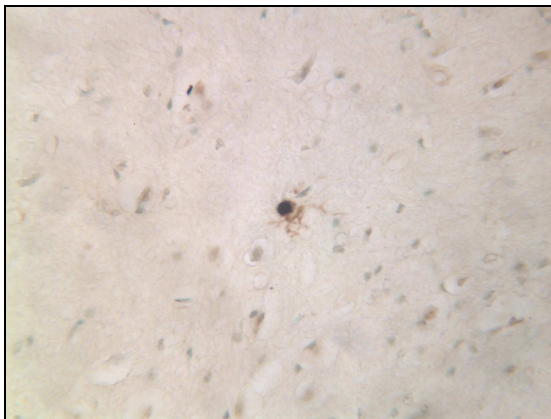
(B)



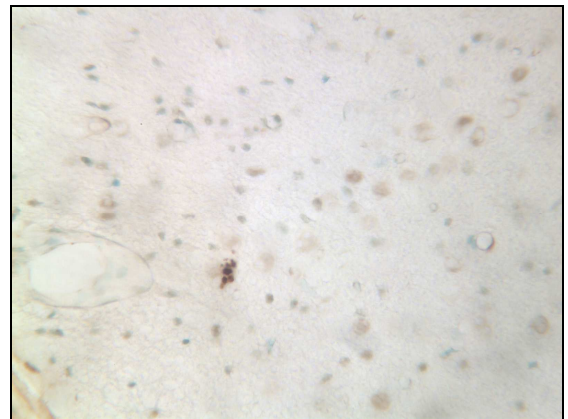
(C)



(D)

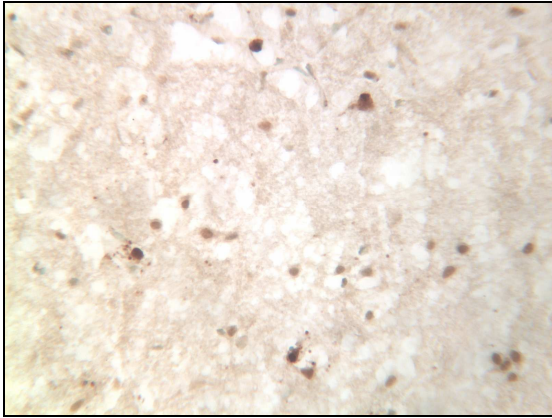


(E)

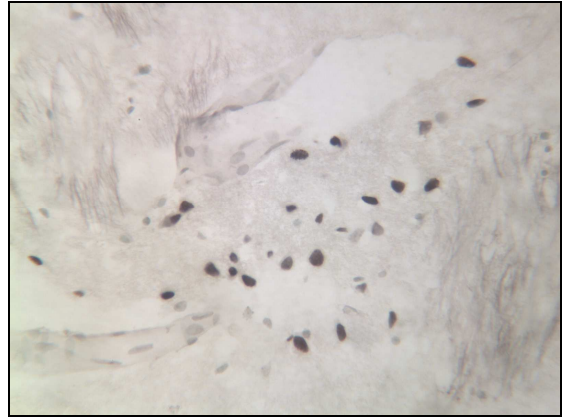


(F)

Abb. 15: TUNEL, x 40 (A) Positivkontrolle im Rattenhirn nach MCAO, * kräftig angefärbter, vergrößerter Kern, mitangefärbtes Perikaryon, # kondensierter Zellkern, + fragmentierter Zellkern (B – E) TUNEL-positive Zellkerne, wie sie in allen Gruppen vereinzelt in der SN vorkommen (F) einzelner kondensierter und fragmentierter Zellkern 21 Tage nach Injektion von NMNorsal

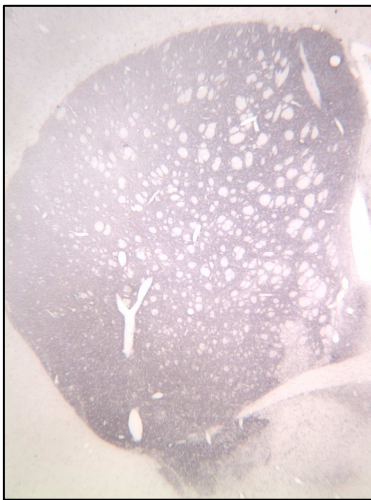


(A)

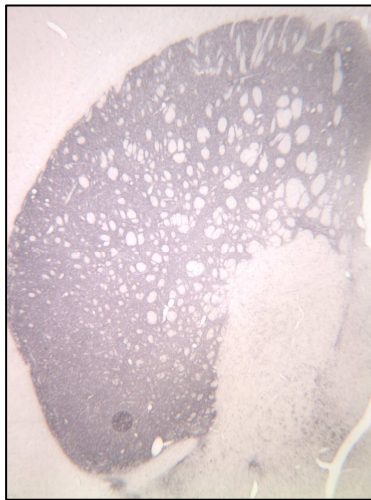


(B)

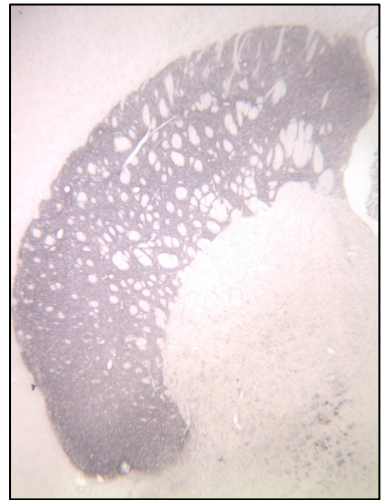
Abb. 16 (A und B): Immunhistochemie aktivierte Caspase 3 aus der Grenzzone des okkludierten Gebietes nach MCAO in der Positivkontrolle, x 40



(A)

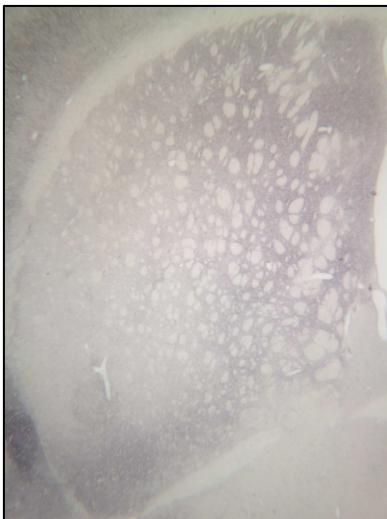


(B)

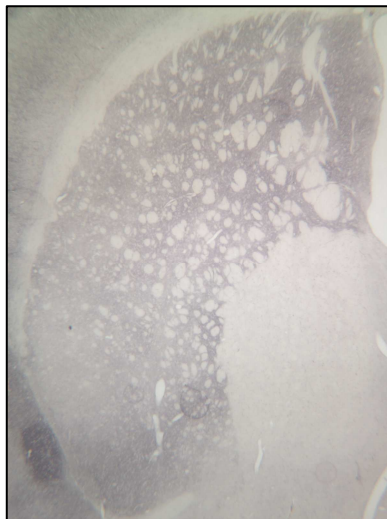


(C)

Abb. 17 Striatum in der TH-Immunhistochemie, x 2,5, (A) Kopfbereich (B) Mittelteil (C) Schwanz

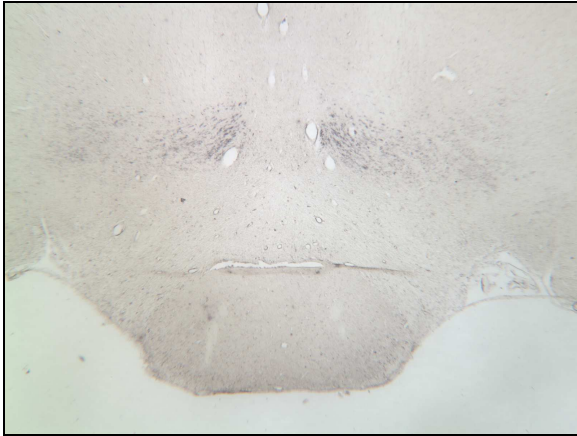


(A)



(B)

Abb. 18: Immunhistochemische Anfärbung von 5-HT_{2A}-Rezeptoren im Striatum, x 2,5
(A) Kopfbereich des Striatums (B) Mittelteil des Striatums



(E)

Abb. 19: Tryptophanhydroxylase im MFB, Immunhistochemie, x 2,5

7. DISKUSSION

Die Ätiologie des progressiven Zelluntergangs dopaminergener Neurone in der *Substantia nigra* (SN) und in anderen monoaminergen Systemen beim Morbus Parkinson ist trotz intensiver Forschung noch weitgehend unklar. Für die Entwicklung therapeutischer Ansätze ist ein umfassendes Verständnis der pathogenen Mechanismen notwendig. Nur bedingte Aspekte der Erkrankung können an den Patienten selbst, im *post mortem* Hirngewebe oder in *in vitro* Systemen untersucht werden.

Bei der Suche nach den Mechanismen der Neurodegeneration ist der Nachweis von reaktiven Sauerstoffverbindungen (engl. *reactive oxygen species*, ROS) sowie von Kennzeichen programmierten Zelltodes (engl. *programmed cell death*, PCD)- mit widersprüchlichen Ergebnissen- *post mortem* im Hirngewebe von Parkinsonpatienten erbracht worden. Einige Gruppen fanden morphologische Merkmale von Apoptose (Tompkins et al., 1997; Anglade et al., 1997; Hirsch et al., 1999), andere nicht (Kösel et al., 1997; Jellinger, 2000, 2006; Banati et al., 1998) (siehe 1.3).

Der Nachweis von Apoptose *post mortem* im Hirngewebe von Patienten ist allerdings schwierig. Morphologische Merkmale apoptotischer Zellen sind nur äußerst kurze Zeit nachweisbar, der Großteil der dopaminergen Zellen stirbt lange vorher und Anzeichen von oxidativem Stress können unspezifische Kennzeichen sterbender Zellen darstellen (siehe auch 5.1.3). Biochemische PCD-Marker wie *Bax* und aktivierte Caspase 3 sind an humanen *post mortem* dopaminergen SNpc- Neuronen nachgewiesen worden (Hartmann et al., 2000, 2001, 2002). Diese Erkenntnisse legen nahe, dass die PCD-Maschinerie in Hirngewebe von Parkinsonpatienten aktiviert ist, beschreiben allerdings nur einen Zustand zu einem bestimmten Zeitpunkt nach dem Tod und geben wenig Aufschlüsse über deren Auslöser, Ursachen und zeitlichen Verlauf.

Untersuchungen an Tieren erlauben Erkenntnisse über die Mechanismen der verschiedenen Aspekte der Krankheit und sind deshalb ein unentbehrliches Werkzeug bei der Erforschung der Parkinsonkrankheit. Konventionelle (6-OHDA) und neuere (MPTP) toxische Tiermodelle des Morbus Parkinson arbeiten mit *exogenen* Toxinen. Die Übertragbarkeit der hier gefundenen pathologischen Mechanismen auf das idiopathische Parkinson-Syndrom ist jedoch begrenzt. MPTP, das die Erkrankung auf beeindruckende Weise mit großer Ähnlichkeit imitiert, bildet nur in Primaten die motorischen Symptome des Morbus Parkinson ab. Nagetiere entwickeln nicht die typischen klinischen Parkinsonsymptome, allerdings ähneln die biochemischen und zellulären Veränderungen nach MPTP-Gabe in Mäusen wie in Affen bemerkenswert denen beim Morbus Parkinson. MPTP ist für Ratten weitgehend ungeeignet, dafür findet das 6-OHDA-Modell bei diesen große Verwendung. (zu den Gemeinsamkeiten und Unterschieden der Wirkungen von MPTP und 6-OHDA im Vergleich zum Morbus Parkinson siehe 1.4).

Bei der Verwendung *endogener* Substanzen, das heißt Stoffen, die im Gehirn selbst gebildet werden, erlaubt der Nachweis von Interaktionen mit dem Metabolismus oder einer toxischen Wirkung auf Neurone unmittelbare Rückschlüsse auf die pathogenetische Beteiligung. Von Nachteil ist, dass über ihre eigentliche Beteiligung an der Entstehung des Morbus Parkinson wenig bekannt ist. Darüber hinaus ist nicht geklärt, inwieweit die Verwendung des bei Parkinsonkranken *endogen* vorkommenden NMNorsal bei Versuchen im Rattenmodell Rückschlüsse auf den Menschen erlaubt. Eine ausgeprägte Toxizität ist außerdem nicht zu erwarten, da sonst der Krankheitsverlauf rascher wäre. Dies wiederum erschwert die Herstellung von Modellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Versuchsaufbau gewählt welcher sich in diversen Vorarbeiten bewährt hat (Moser et al., 1986; Moser et al., 1996c). NMNorsal, das bei Patienten mit Morbus Parkinson erhöht vorliegt und für das die *endogene* Synthese ausgehend vom Dopamin nachgewiesen ist, wurde stereotaktisch unilateral in das linke MFB bei Ratten injiziert. Dabei wurde die fünffach höhere Dosis von 40 µg NMNorsal verwendet als in Moser et al. (1996), in deren Untersuchungen keine histologischen Veränderungen beziehungsweise kein Verlust dopaminerger Neurone nach stereotaktischer Injektion von 8 µg NMNorsal nachgewiesen werden konnten. In der vorliegenden Arbeit wurde die toxische Wirksamkeit auf das nigrostriatale sowie das serotoninerge System untersucht und dabei geprüft, ob NMNorsal (in der genannten höheren Dosis) in den Zellen der SNpc PCD auslöst. Diese Untersuchungen erfolgten im Vergleich mit der bekannten Substanz 6-OHDA und mit Injektionen der Trägerlösung als Negativkontrolle.

7.1. Die Wirkung von N-Methyl-Norsalsolinol auf das dopaminerge System

7.1.1. Histologische Untersuchungen

In dem gewählten Versuchsaufbau wurde mit Blick auf eine möglichst weitgehende Schonung vor einer direkten Irritation der zu untersuchenden Strukturen der SN und des *Striatums* durch den Injektionsvorgang selbst stereotaktisch in das verbindende Axonbündel der dopaminergen Projektionen aus der SN in das Striatum, das mediale Vorderhirnbündel (engl. *medial forebrain bundle*, MFB), injiziert. Da die nigrostriatalen Projektionen fast ausschließlich ipsilateral verlaufen (95 %) und kaum auf die Gegenseite kreuzen (Fallon und Loughlin, 1985, 1987; Paxinos und Watson, 1997) sind die Effekte der injizierten Substanzen hauptsächlich unilateral zu erwarten, was den Seitenvergleich der operierten Seite mit der gesunden Gegenseite zulässig macht. Zur Verifizierung des Versuchsaufbaus wurde die korrekte Lage der Injektionsstelle durch einmalige Injektion von Toulidinblau bestätigt. Um die Injektionsstelle herum sind im Bereich des MFB selbst

keine Hinweise auf eine Nekrose beziehungsweise eine Immunreaktion festzustellen. Die stereotaktische Injektion in den durchgeführten Versuchen ist somit geeignet, die zu untersuchenden Substanzen in das MFB ohne direkte histologisch nachweisbare Schädigung der nigrostriatalen Bahnen durch die Operation an sich zu applizieren.

6-OHDA

6-OHDA führte 3 Wochen nach Injektion zu einer deutlich sichtbaren Reduktion der Neurone in der SNpc ohne Zeichen einer Entzündungs- oder Abräumreaktion sowie ohne gliale Reaktion im Sinne einer Narbenbildung. 3 Tage nach 6-OHDA-Injektion waren lichtmikroskopisch dagegen noch keine Veränderungen zu beobachten. 6-OHDA scheint nach der Aufnahme in die dopaminergen Zellen auf Höhe des Axonbündels (MFB) einen protrahierten nigralen Degenerationsprozess mit Reduktion der neuronalen Zellkörper auszulösen. Diese Ergebnisse bezüglich des als Positivkontrolle eingesetzten bekannten Neurotoxins 6-OHDA stimmen mit zahlreichen Vorarbeiten überein, in denen nach einseitiger Applikation dieser Substanz in das nigrostriatale System ebenfalls ein drastischer ipsilateraler Rückgang der Neurone in der SN nachgewiesen wurde, wobei der Zeitverlauf und das Ausmaß abhängig von Injektionsort, -art (Einzelinjektion, kontinuierlich) und Dosis sind (u.a. Blandini et al., 2007; Jeon et al., 1995).

NMNorsal

Nach Injektion von NMNorsal sowie auch in der Negativkontrollgruppe waren in den durchgeführten Versuchen weder in der SNpc noch im *Striatum* histologische Veränderungen zu erkennen. Die Zellen der Injektionsseite unterschieden sich im Hinblick auf Anzahl, Morphologie und Zytoarchitektur nicht von denen der Kontrollseite und wiesen keine Hinweise auf Nekrose oder eine Immunreaktion auf.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen überein, die Moser et al. (1996b) mit einer fünffach geringeren Dosis erzielten (Moser et al., 1996b). Naoi et al. (1996) fanden bei Verwendung des strukturell ähnlichen NM(R)Sal, nach einwöchiger kontinuierlicher Gabe eine leichte, aber statistisch nicht signifikante, Reduktion von Nissl(K-B)-gefärbten Neuronen in der SN ohne Nekrose.

Nach stereotaktischer Injektion von NMNorsal in das nigrostriatale System wurden histologische Veränderungen weder in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen noch finden sich darüber in der Literatur Angaben. Die dopaminergen Zellkörper werden durch die *in vivo* Behandlung mit NMNorsal in ihrer Integrität offenbar nicht so beeinträchtigt, dass Veränderungen histologisch nachweisbar werden - zumindest nicht in den verwendeten Dosierungen und Zeitintervallen.

7.1.2. Immunhistochemie der TH in SNpc und Striatum

Die dopaminhaltigen Neurone der SNpc sind durch immunhistochemische Lokalisierung des Dopamin synthetisierenden Enzyms Tyrosinhydroxylase (TH) nachweisbar (Arлуison et al., 1984). Das Ziel dieser Anfärbung in der vorliegenden Arbeit war die Quantifizierung der dopaminergen Degeneration. Zu beachten ist bei der Interpretation der Ergebnisse, dass aus methodischen Gründen jeweils nur die Seitendifferenz der Intensität des durch die TH verursachten Signals innerhalb eines jeden Tieres ermittelt werden konnte, und zwar jeweils zwischen ipsilateraler und kontralateraler Hirnhälfte. Ein direkter, quantitativer Vergleich der TH-Proteinkonzentrationen der einzelnen Hirnregionen zwischen unterschiedlichen Versuchstieren ist bei dieser Technik vor allem deshalb nicht möglich, da für die immunhistochemische Färbungen nie völlige gleiche Bedingungen (Temperaturen, Inkubationszeiten usw.) gegeben sind, dieselbe Menge an TH-Protein kann in unterschiedlichen Färbereihen zu verschiedenen Signalintensitäten führen.

Die Seitendifferenzen der Färbeintensität von TH-positiven Signalen von verschiedenen Tieren konnten dagegen miteinander verglichen werden, da bei jedem Tier beide Seiten gleichzeitig im selben Schnitt und unter denselben Versuchsbedingungen behandelt wurden. Bei den im Folgenden dargestellten Ergebnissen können daher mögliche bilaterale Effekte auf die TH-Gewebkonzentrationen, die eventuell durch die einseitigen stereotaktischen Injektionen entstehen könnten, aus den genannten methodischen Gründen nicht dargestellt werden.

6-OHDA

3 Tage nach 6-OHDA-Injektion wird in der SNpc ein Rückgang der Signalintensität von -5,4 % gemessen. Diese geringen Veränderungen sind statistisch nicht signifikant und auch lichtmikroskopisch nicht erkennbar.

Im *Striatum* ist 3 Tage nach Behandlung mit 6-OHDA dagegen ein deutlichen Verlust TH-immunreaktiver Strukturen zu verzeichnen (-51,7 %). Dieser Rückgang ist gleichmäßig im gesamten *Striatum* zu beobachten, es sind keine Unterschiede zwischen dorsalem, *ventralem Striatum* und *Tuberculum olfactorium* erkennbar. Auch im kraniokaudalen Verlauf ist der Schwund an Färbeintensität einheitlich. Diese Veränderungen sind allerdings im t-Test und im Mann-Whitney-Test nicht signifikant. Grund dafür sind die stark abweichenden Werte bei einem der Tiere, bei welchem sich kaum eine Seitendifferenz ergab (-2,2 %), während das Ausmaß der Veränderungen der TH-Immunreaktivität bei den verbleibenden 3 Tieren dieser Gruppe dagegen bedeutender war (-44,1 %, -81,8 % und -78,8 %). Der Verlust wichtiger zellulärer Proteine wie der TH in den axonalen

Endigungen im *Striatum* geht in unseren Versuchen anscheinend den degenerativen Veränderungen im Bereich der Zellkörper in der SNpc voraus.

3 Wochen nach der stereotaktischen Injektion von 6-OHDA ist die Intensität der Anfärbung TH-positiver Zellen im Bereich der SNpc auf der Injektionsseite um fast 80% gegenüber kontralateral gesunken. Lichtmikroskopisch beobachtet man ipsilateral einen starken bis teilweise vollständigen Rückgang der TH-haltigen Strukturen. Die Veränderungen sind am stärksten ausgeprägt im dorsolateralen Bereich der SNpc. Das vorhandene Restsignal ist am stärksten in der VTA und dem medioventralen Anteilen der SNpc. Diese Veränderung sind sowohl im t-Test ($p=0,001$) als auch im Mann-Whitney-Rangsummentest ($p=0,034$) statistisch signifikant. Der genaue zeitliche Verlauf des Zellrückganges ist aus diesen Untersuchungen nicht abzulesen, da nach drei Tagen mikroskopisch sind hier noch keine Veränderungen erkennbar sind.

Im *Striatum* ist 3 Wochen nach Injektion von 6-OHDA lichtmikroskopisch ipsilateral kaum oder keine Anfärbung mehr, das heißt ein weitestgehend vollständiger Rückgang TH-haltiger Strukturen, zu beobachten. Gemessen wird im *Striatum* eine Reduktion um ebenfalls nahezu 80 % wird in der Gruppe der Tiere nach 6-OHDA-Injektion. Diese Veränderungen erweisen sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe im t-Test ($p=0,001$) sowie im Mann-Whitney-Test ($p=0,034$) als signifikant.

Die Wirkungen des in der vorliegenden Arbeit als Positivkontrolle verwendeten 6-OHDA nach stereotaktischer Injektion in das nigrostriatale System sind in der Literatur ausgiebig beschrieben (Blandini et al., 2007; Jeon et al., 1995; Sauer und Oertel, 1994). Je nach Applikationsart (Einzelinjektion oder chronische Infusion), Injektionsort (*Striatum*, MFB, SNpc) und Dosierung kommt es 12 Stunden nach Behandlung bis zu einer Dauer von mehreren Monaten zu massivem neuronalem Zelluntergang in der SNpc. Diese Degeneration geht einher mit dem Verlust des Markerenzym TH sowie mit zellulärer Atrophie (Sauer und Oertel, 1994). Die Degeneration der terminalen Fasern im *Striatum* geht diesem entweder voraus (bei intrastriataler Applikation von 6-OHDA) mit retrograder neuronaler Degeneration oder folgt anterograd der direkten Einwirkung von 6-OHDA auf die Zellkörper bei Injektion in die SNpc.

In unseren Ergebnissen ist der Rückgang des immunhistochemisch nachweisbaren TH-Proteins nach drei Tagen im *Striatum*, nicht aber in der SNpc nachweisbar, während nach 21 Tagen die Degeneration auch die Zellkörper erfasst. Die TH verschwindet also zuerst im Axon. Eine Deutung könnte sein, daß die stereotaktischen Läsionen mit 6-OHDA zunächst Störungen im Energiehaushalt der Zelle bewirken. Es kommt u.a. zu Schäden auf Niveau des Axonskeletts und zum Erliegen des Transports des TH-Proteins in die Nervenendigungen. Eine aktive Umverteilung findet statt, die Axone degenerieren

während die Zellkörper zunächst noch einige Zeit überleben und ihren biochemischen Phänotyp beibehalten. Jeon erklärt 1995 die protrahierte Reduktion dopaminerger Neurone in der SNpc mit einer Degeneration in den dopaminergen Fasern nachfolgenden Verlust von retrograden Signalen aus den Zielgebieten (Jeon et al., 1995).

NMNorsal

NMNorsal bewirkt 3 Tage nach stereotaktischer Injektion ipsilateral eine minimale Zunahme der Immunreaktivität in der SNpc. Es bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe. Auch im *Striatum* ist die Signalintensität 3 Tage nach NMNorsal-Injektion nur minimal verändert, allerdings mit einer recht hohen Schwankungsbreite und ohne statistische Signifikanz im Vergleich mit der Kontrolle. Diese Veränderungen sind als normale Schwankungen zu deuten.

Die Veränderungen nach drei Wochen bewegen sich in der SNpc in vergleichbarer Größenordnung. Im *Striatum* wird 3 Wochen nach Injektion von NMNorsal eine Reduktion der Immunreaktivität um -10,5 % gemessen. Diese Veränderungen sind allerdings gegenüber der Kontrollgruppe statistisch nicht signifikant.

In unseren Untersuchungen lässt sich somit kein Einfluß von NMNorsal auf die TH-Expression dopaminerger Neurone des nigrostriatalen Systems nachweisen. Da aber *in vitro*-Untersuchungen eine Hemmwirkung von NMNorsal auf die Aktivität der TH nachgewiesen haben, könnte NMNorsal auch *in vivo* die Funktion dieses Schlüsselenzyms der Dopaminsynthese beeinträchtigen, ohne dass Veränderungen der TH-Proteinmenge nachweisbar werden.

Bei Untersuchungen mit NM(R)Sal, für welches eine Beteiligung bei der Ätiologie des Morbus Parkinson ebenfalls diskutiert wird und welches eine ähnliche selektive Toxizität auf dopaminerge Neurone in Zellkulturen zeigte wie NMNorsal (Storch et al., 2002), war allerdings nach einwöchiger kontinuierlicher Administration in das *Striatum* und nicht nach einer Einzeldosis eine statistisch signifikante Reduktion von immunhistochemisch TH-positiven Neuronen in der SN ohne begleitende Nekrose *in vivo* nachgewiesen worden. Dies legt apoptotischen Zelltod nahe.

Unter Verwendung *endogener* Substanzen, bei denen von einem eher geringen toxischen Potential auszugehen ist, könnte somit eventuell erst die chronische Exposition zu nachweisbar degenerativen Effekten führen.

7.1.3. Art des Zelltodes

Zur Klärung der Frage nach der Art des Zelltodes wurden neben morphologischen Kriterien auch biochemische Marker von PCD untersucht. Aufgrund der Vielschichtigkeit

der apoptotischen bzw. nekrotischen Veränderungen auf DNA-, Protein- und morphologischer Ebene existieren diverse Nachweis- und Differenzierungsmethoden. Limitationen der einzelnen Methoden hinsichtlich Spezifität und Sensitivität führten zum gegenwärtig geforderten Konzept der kombinierten Anwendung unterschiedlicher Nachweisverfahren (sog. „*multiple approach*“) (u.a. Vila and Przedborski, 2003; Jellinger, 2006).

Im Einzelnen wurde mittels Methylgrün- Färbung nach apoptotischen Veränderungen der Kernstruktur gesucht, nämlich Kondensation, Fragmentierung und Anlagerung des Chromatins an die Kernmembran (siehe 1.3). Darüber hinaus verwendeten wir die Markierung freier Enden des DNA-Strangs durch dUTP-Biotin (TUNEL). Solche freien DNA-Enden ergeben sich nach Strangbrüchen, wie sie während Zellnekrose und Apoptose auftreten. TUNEL ist daher nicht spezifisch, weist aber eine höhere Sensitivität für apoptotischen Zelltod als für Nekrose auf (Hegyí et al., 1997). Die Kombination beider Methoden erlaubt Rückschlüsse auf das Vorliegen von Apoptose oder Nekrose *in situ*. Weiterhin wurde immunhistochemisch nach Vorliegen von aktiver Caspase 3 gesucht, die besonders in Neuronen an PCD beteiligt ist und ein Effektorenzym der Todeskaskade darstellt (Jeon et al., 1999).

Positivkontrollen

Die TUNEL-Färbung sowie die immunhistochemische Detektierung aktiver Caspase-3 wurden zunächst an Hirnschnitten nach temporärer Ischämie durch 90 min Okklusion der mittleren Hirnarterie mit anschließender Reperfusion (engl. *middle cerebral artery okklusion*, MCAO) als Positivkontrolle für die verwendeten Methoden angewendet. Ischämie produziert bekanntermaßen reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies und induziert die Spaltung von Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), Aktivierung von Caspase sowie DNA-Fragmentierung in normalen Zellen. Durch die temporäre Ischämie, die mittels Okklusion der *Arteria cerebri media* hervorgerufen wird und anschließende Reperfusion kommt es zu ausgedehnter neuronaler Apoptose im betroffenen Hirnareal (Xu et al., 2003).

Biochemische und immunhistochemische Studien haben besonders die verstärkte Expression und Aktivierung von intrazellulären Proteasen, vor allem Caspase-3, nachgewiesen, welche als Initiatoren und Exekutoren im apoptotischen Prozeß wirken (Velier et al., 1999). Die Beteiligung von Caspasen im apoptotischen Prozeß nach Ischämie wird unterstützt durch die Beobachtung, daß die Behandlung mit Caspase-Inhibitoren den ischämieinduzierten Hirnschaden reduziert (Endres et al., 1998).

Die TUNEL-Färbung zeigt in den als Positivkontrollen verwendeten Ischämiehirnen im überwiegenden Teil angeschwollene Zellen mit großen Kernen, bei denen die Perikarya

ebenfalls schwach mit angefärbt sind sodaß die Zellfortsätze erkennbar sind. Diese Zellen stellen wahrscheinlich nekrotischen Zelltod dar (Zellschwellung, Störung der Integrität der Kernmembran). Einzelne Zellen erscheinen geschrumpft, weisen eher einen kondensierten Kern auf, das Chromatin ist verdichtet, vereinzelt sind abgeschnürte runde kleinere Kompartimente sichtbar, welche zum Teil angefärbt (Kernstrukturen) zum Teil nicht angefärbt (Zellkompartimente) sind. Diese Zellen weisen also Merkmale programmierten Zelltodes auf.

In weit weniger Zellen der Ischämiehirne wird aktivierte Caspase 3 nachgewiesen. Diese befinden sich in der lateralen Grenze des *Striatums* und damit höchstwahrscheinlich in der Penumbra der Ischämie. Sie weisen mit verdichtetem Chromatin, Zellschrumpfung und Kompartimentierung im Sinne von „*apoptotic bodies*“ eine apoptosetypische Morphologie auf. Diese Ergebnisse in den als Positivkontrollen verwendeten Hirnschnitten nach MCAO zeigen, dass die eingesetzten Methoden geeignet sind, Apoptose nachzuweisen.

Generelle Befunde im untersuchten Material (NMNorsal, 6-OHDA, Kontrollen)

In den untersuchten Schnitten der vorliegenden Arbeit (NMNorsal, Negativkontrolle, Positivkontrolle 6-OHDA) zeigte sich, dass bei mehr als der Hälfte aller Tiere einzelne TUNEL-positiv markierte Zellen im Bereich der SNpc zu finden sind. Diese kommen sowohl auf der Injektions- als auch auf der Kontrollseite vor und weisen große, kräftig angefärbte Kerne auf, welche abgerundet, zum Teil auch diffus unregelmäßig begrenzt sind, die Kerne erscheinen vergrößert und aufgequollen. Die Perikarya sind teilweise diffus schwach mit angefärbt. Diese Zellen ähneln denen, welche den überwiegenden Anteil in den Positivkontrollen der Ischämiehirne nach MCAO ausmachen.

Diese Zellen könnten den natürlich vorkommenden Zellumsatz in der SNpc darstellen, obwohl sie morphologische Kriterien nekrotischer Zellen aufweisen und in keinem der Schnitte aktive Caspase 3 als Nachweis der Exekutionsphase von PCD gefunden wurde. Natürlichen vorkommender neuronaler Zelluntergang wurde auch bei anderen Autoren, allerdings in sich entwickelnden Tieren und mit apoptotischen Merkmalen, in der kontralateralen beziehungsweise nicht behandelten SNpc gefunden (Janec and Burke, 1993; Oo und Burke, 1997).

Die bei unseren Untersuchungen gefundenen, in allen Gruppen und beidseitig vereinzelt vorkommenden, TUNEL-positiven Zellen könnten aber auch aus methodischen Gründen DNA-Strangbrüche aufweisen (Transkardiale Perfusionsfixation, eventuelle ischämische Schädigung, Auffrieren und Lagerung, Kryoschnitte, Auftauen und Trocknen etc.) oder aufgrund anderer Ursachen falsch positiv erscheinen.

6-OHDA

Eine erhöhte Zahl TUNEL-positiver Zellen auf der Injektionsseite ist in der vorliegenden Studie lediglich 3 Wochen nach der Injektion von 6-OHDA zu finden. Bei den vier Tieren dieser Gruppe finden sich 3, 4, 8 beziehungsweise 7 positiv markierte Zellen im Bereich der SNpc pro untersuchtes Hirn. Diese weisen dieselben Merkmale von Nekrose wie die vorher beschriebenen einzelnen Zellen auf und sind wahrscheinlich Ausdruck eines erhöhten degenerativen Prozesses, ausgelöst durch 6-OHDA. In keinem der untersuchten Schnitte wurde aktivierte Caspase 3 angefärbt; zusammen mit der für Nekrose sprechenden Morphologie bei den wenigen detektierten, TUNEL-positiven Zellen, macht dies das Auftreten von Zelluntergang durch PCD in unseren Untersuchungen unwahrscheinlich, schließt ihn aber nicht aus.

PCD ist ein rasch ablaufendes Ereignis und morphologische und biochemische Merkmale sind nur kurze Zeit nachweisbar. Apoptotische Zellen werden anschließend schnell von Makrophagen und umgebenden Zellen phagozytiert. In einem Gewebe kann deshalb ausgedehnter Zelltod ablaufen, wobei die zu bestimmten Zeitpunkten nachweisbare Anzahl apoptotischer Zellen gering ist (Bosman et al., 1996; Wyllie, 1987). Die Wahl der geeigneten Untersuchungszeitpunkte ist deshalb eine der größten Herausforderungen beim Nachweis von Apoptose.

Darüber hinaus wird die Art des durch 6-OHDA ausgelösten Zelltodes in dopaminhaltigen Zellen kontrovers diskutiert. Proapoptotische Effekte von 6-OHDA sind erstmalig von Walkinshaw und Waters (1994) beschrieben worden. Sie beobachteten, dass niedrige Konzentrationen von 6-OHDA biochemische und morphologische Merkmale von Apoptose in dopaminergen PC12 Zellen auslösen. Diese *in vitro* Ergebnisse sind später auch in anderen Zelllinien vielfach bestätigt worden (Tsao et al., 1996; Blum et al., 1997; Funa and Ahgren, 1997; Mayo et al., 1998, 1999; Dodel et al., 1999; Lotharius et al., 1999; Woodgate et al., 1999).

In vivo führte die Injektion von 6-OHDA direkt in die SN zu massiver Nekrose mit narbiger Reaktion (Jeon et al., 1995). Untersuchungen nach Injektion periaxonal oder im striatalen Zielgebiet weisen dagegen Apoptose nach. Die Injektion von 6-OHDA in das *Striatum*, welche einen protrahierten und geringeren Zelluntergang in der SN bewirkt, rief bei den Untersuchungen von Marti et al. (2002) retrograde dopaminerge Degeneration und nigrale Apoptose hervor. Nach Injektion geringer Dosen von 6-OHDA in das MFB konnten TUNEL-positive Zellen mit einem Maximum von 10- 14 Tagen in der SNpc nachgewiesen werden. Diese Zellen waren dopaminerg und wiesen Apoptosemerkmale wie

Zellschrumpfung, Nukleuskondensation und Chromatinklumpen auf (He et al., 2000; Zuch et al., 2000). Kramer und Mytilineou (2004) fanden nach 6-OHDA induzierter Zellschädigung in adulten Ratten hingegen keine morphologischen Apoptosemerkmale, aber Veränderungen in der Verteilung von *Bcl-2*, *Bcl-xL* und *Bax* bereits nach 3 Tagen, was als eine aktive Antwort auf oxidativen Stress gedeutet werden könnte.

Der Nachweis aktivierter Caspase 3 als Nachweis für Apoptose nach 6-OHDA-Behandlung ist sowohl *in vitro* (Ochu et al., 1998) als auch *in vivo* nach intrastriataler Injektion bei erwachsenen und jungen Ratten erbracht worden (Cutillas et al., 1999; Jeon et al., 1999). Darüber hinaus konnte durch Caspase-Inhibitoren der 6-OHDA-vermittelte Zelluntergang verhindert werden (Ochu et al., 1998; Takai et al., 1998; Dodel et al., 1999; Lotharius et al., 1999; Von Coelln et al., 2001).

Wurden apoptotische Zellen detektiert war deren Anzahl *in vitro* (Walkinshaw and Waters, 1994; Woodgate et al., 1999) wie *in vivo* (He et al., 2000) stets sehr gering. Der Grund für die niedrige Anzahl vorgefundener apoptotischer Zellen ist nicht bekannt. Eine Erklärung könnte wie erwähnt die kurze Dauer des apoptotischen Zelluntergangs, das enge Zeitfenster für den Nachweis der einzelnen Marker (Morphologie, Caspasen, TUNEL etc.) und der rasche Abbau apoptotischer Zellen durch Mikroglia sein. Caspase 3 tritt in der Todeskaskade früh und nur kurzzeitig in Aktion, zu einem Zeitpunkt an dem apoptotische Morphologie noch nicht immer vorgefunden wird. Jeon et al. (1999) detektierten aktivierte Caspase 3 *in vivo* 24 Stunden nach 6-OHDA-Läsion. In den vorliegenden Untersuchungen könnte, bei eventuell auftretendem programmiertem Zelltod, 3 Tage nach Injektion die Todeskaskade schon weiter fortgeschritten sein.

Die Angaben in der Literatur zur Art des *in vivo* durch 6-OHDA ausgelösten Zelltodes variieren also, abhängig unter anderem von Injektionsort, Dosis und Alter der Tiere sowie Art der Nachweismethode. Diese Faktoren bestimmen die effektive Konzentration von 6-OHDA auf die Zellen vor Ort und damit offensichtlich die Toxizität. Möglicherweise existiert ein energieabhängiges Kontinuum zwischen Apoptose und Nekrose (Przedborski und Jackson-Lewis, 1998; Beal, 1995). Demnach resultiert der Zelltod aus einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Faktoren, z.B. mitochondrialer Funktionsstörung, oxidativer Stress, Beeinträchtigungen des Energiehaushaltes. Zusammen bewirken diese Einflüsse eine gestörte Zellfunktion bis dies unvereinbar mit dem Leben wird. Die Zelle stirbt durch Nekrose wenn die Schädigung so stark ist, dass keine Zellfunktion mehr vorhanden ist beziehungsweise durch Apoptose wenn noch ausreichend zelluläre Funktionen konserviert sind. Verschiedene Formen des Zelltodes durch die unterschiedliche Verabreichung, Dosis und damit effektiv toxische Wirkung auf die Zelle könnten somit erklärt werden.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden wie gesagt keine Anhaltspunkte für die Beteiligung von PCD an der durch 6-OHDA ausgelösten Degeneration gefunden. Die erhöhte Zahl von TUNEL-positiven Zellen nach 21 Tagen spricht aufgrund morphologischer Merkmale und fehlendem Nachweis von aktiver Caspase 3 für nekrotischen Zelltod. Das Auftreten beider Zelltodarten, Nekrose und Apoptose, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da die einzelnen Marker nur kurzzeitig auftreten und somit die Wahl des geeigneten Zeitfensters schwierig ist. Für die Detektion von aktiver Caspase 3 könnte, bei eventuell auftretendem programmiertem Zelltod, 3 Tage nach Injektion die Todeskaskade schon weiter fortgeschritten sein. Auch könnte es sich um eine Art von PCD handeln die nicht Caspase 3- vermittelt ist. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, bei der nahe der SN in das MFB injiziert wurde, ist der Großteil untergehender Neurone, welche DNA-Strangbrüche aufweisen, nach 3 Tagen möglicherweise noch nicht und nach 21 Tagen eventuell nicht mehr durch TUNEL nachweisbar.

Der Nicht-Nachweis von Apoptose schließt eine Beteiligung von PCD aufgrund der erläuterten Schwierigkeiten des Nachweises somit nicht aus. Natürlich kann das Ausbleiben des Nachweises von aktiver Caspase 3 und morphologischen Apoptosemerkmalen auch technische Gründe haben (die Behandlung der untersuchten Kryoschnitte, fehlende Erreichbarkeit der verwendeten immunhistochemischen Materialien zu vorhanden Proteinen etc.), falsch negative Ergebnisse stellen ein häufiges Problem bei immunhistochemischen Färbungen dar. Die TUNEL-Färbung ist wie bereits erläutert nur im Zusammenhang mit dem Nachweis typischer Morphologie spezifisch und die von uns gewählte Methodik zur morphologischen Identifizierung apoptotischer Zellen möglicherweise nicht sensitiv genug. Marti et al. (2002) verwendete beispielsweise eine Silberimprägnierung mit Bestätigung durch ultrastrukturelle Untersuchungen (Elektronenmikroskopie).

NMNorsal

3 Wochen nach NMNorsal- Injektion ist bei einem einzelnen Tier in einem Schnitt eine TUNEL-positive Zelle im Bereich der ipsilateralen SNC nachweisbar, welche einen kondensierten, fragmentierten, dunkel angefärbten Kern aufweist. Dies spricht für eine Zelle, welche in apoptotischem Zelluntergang begriffen ist, obwohl sich aktivierte Caspase 3 als Effektorenzym von PCD in keinem der Schnitte nachweisen ließ. Ob dies durch NMNorsal ausgelöst ist oder einen Zufallsbefund (zum Beispiel im Rahmen des natürlichen Zellumsatzes) darstellt kann in diesem Fall nicht klar beantwortet werden. Die Befunde in den übrigen Schnitten 3 bzw. 21 Tage nach Injektion von NMNorsal

entsprechen mit einzelnen detektierten TUNEL-positiven Zellen, ipsi- und kontralateral mit nekrosetypischer Morphologie, den Ergebnissen der Kontrollgruppe.

Das Ausbleiben des Nachweises von PCD kann mehrere Ursachen haben, die Schwierigkeit des Beweises apoptotischen Zelltodes wurde im vorangegangenen Absatz bereits diskutiert. Die erwähnte kurze Dauer des apoptotischen Zelluntergangs, das enge Zeitfenster für den Nachweis der einzelnen Marker (Morphologie, Caspasen, TUNEL etc.) und der rasche Abbau apoptotischer Zellen durch Mikroglia erschweren den Nachweis. Ob ausserdem die *in vitro* (Storch et al., 2002) wirksame toxische Dosis in unseren Versuchen *in vivo* erreicht werden kann ist unklar.

Die Schlussfolgerung ist, daß wenn NMNorsal über ein neurotoxisches Potential auf dopaminerge Zellen in der SNpc verfügt, dieses sehr gering wäre, vor allem im Vergleich mit dem potenten 6-OHDA. Bei der menschlichen Parkinsonerkrankung dürften außerdem intrazellulär geringere Konzentrationen eine Rolle spielen, deren Effekte angesichts der im Tierversuch (nach Einzeldosis) nicht nachgewiesenen *in vivo* Toxizität nicht akut, sondern möglicherweise durch chronisch kumulative Effekte zu Stande kommen. Ein neurotoxischer Effekt von NMNorsal mit messbaren degenerativen Effekten kann mit der hier verwendeten höheren Dosis zu den untersuchten Zeitpunkten nicht nachgewiesen werden.

Vergleich mit NMSal

N-Methyl(R)Salsolinol ist ein Tetrahydroisochinolin, welches sich von NMNorsal lediglich durch eine Methylgruppe in Position 1 unterscheidet. NM(R)Sal ist im menschlichen *Liquor cerebrospinalis*, im *Striatum* und in der SN nachgewiesen worden (Maruyama et al., 1997). Sein metabolisierendes Enzym (R)Sal N-Methyltransferase ist in Lymphozyten von Parkinsonkranken signifikant erhöht (Naoi et al., 1996, 1997, 1998).

Nach singulärer intrastriärer Injektion von NM(R)Sal bewirkte dieses Verhaltensänderungen bei Ratten wie Bradykinese, Schwanzrigidität und abnormale Haltung (Naoi et al., 1996). Der Dopamingehalt in der SN und im Striatum war erniedrigt (Naoi et al., 1996). *In vitro* löste NM(R)Sal in dopaminergen SH-SY5Y-Zellen apoptosetypische morphologische Veränderungen aus, außerdem konnte die Aktivierung von Caspase 3 nachgewiesen werden (Akao et al., 1999; Maruyama et al., 2001). In einem *in vivo* Modell, bei dem NM(R)Sal eine Woche lang kontinuierlich einseitig in das *Striatum* von Ratten infundiert wurde zeigte sich histopathologisch eine Verminderung TH-positiver Neurone in der SNpc um 40 % im Vergleich zur Kontrollseite (Naoi et al., 1996) ohne Nachweis von Nekrose, was apoptotischen Zelltod nahelegt. Der Nachweis von Apoptose *in vivo* steht noch aus.

NMNorsal und NM(R)Sal werden durch den DAT in die Zelle aufgenommen und haben eine vergleichbare spezifisch toxische Wirkung auf dopaminerge Zellen *in vitro* (Storch et al., 2002). Erhebliche Unterschiede bestehen allerdings in der beschriebenen *in vivo* nachgewiesenen Toxizität von NM(R)Sal (Naoi et al., 1996) und unseren Ergebnissen bezüglich NMNorsal.

Für den direkten Vergleich beider Substanzen sollte das apoptoseauslösende Potential von NMNorsal in zukünftigen Untersuchungen ebenfalls in Zellkulturen geprüft werden. Dies würde Rückschlüsse und Vergleiche mit den *in vitro*-Untersuchungen zu NM(R)Sal ermöglichen. Ob NMNorsal *in vivo* bei chronischer Applikation eine vergleichbare neurotoxische Wirkung auf die dopaminergen Neurone der SNpc hat ist noch nicht bekannt, Versuche mit kontinuierlichen Infusionen wie bei Naoi et al. (1996) würden direkte Vergleiche zwischen beiden Substanzen erlauben und sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Ein chronisches Modell würde auch die eventuelle Beteiligung bei den sehr langsamen neurodegenerativen Prozessen der idiopathischen Parkinsonerkrankung besser nachahmen.

7.1.4. Untersuchungen im serotoninergen System

Neben den Untersuchungen im dopaminergen System wurde auch die Wirkung von NMNorsal auch auf das serotonerge System geprüft. In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen einer einmaligen Injektion von NMNorsal in das linke MFB auf die Tryptophanhydroxylase, dem Schlüsselenzym in der 5-HT-Synthese, im Faserbündel zwischen serotonergem Kerngebiet und *Striatum* untersucht. Unterschiede in der Intensität der Anfärbung TPH-positiver Fasern zwischen Injektions- und Kontrollseite wurden dabei weder nach 6-OHDA- oder NMNorsal- Injektion noch in der Negativkontrolle festgestellt. Auch Veränderungen der Immunreaktivität der 5-HT_{2A}-Rezeptoren im *Striatum* der injizierten Seite im Vergleich zur kontralateralen Seite konnten nicht nachgewiesen werden. Im Vergleich der NMNorsal- und 6-OHDA-behandelten Tiere mit der Kontrollgruppe ergaben sich keine signifikanten Differenzen.

Wie sind diese ausbleibenden Veränderungen zu erklären?

NMNorsal

In früheren *in vitro*-Versuchen war für NMNorsal eine Hemmwirkung auf MAO und TH nachgewiesen worden (Moser et al., 1996a; Scholz et al., 1997). Serotonin (5-HT) wird durch Monoaminoxidase A (MAO-A) zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) oxidiert (Fowler und Tipton, 1984). Experimente mit Mikrodialysetechniken *in vivo* hatten gezeigt, daß - während im Dopaminmetabolismus keine Änderungen auszumachen waren - im

Dialysat gemessene 5-HT-Spiegel im *Nucleus caudatus* 48 h nach der Einzelinjektion einer hohen Dosis von NMNorsal um annähernd das Doppelte anstiegen und 5-HIAA als sein Abbauprodukt um ungefähr 50 % absank (Thümen et al., 2003). Diese Veränderungen waren identisch mit denen, die in Homogenatpräparationen beobachtet worden waren. Auch das Verhalten der Tiere war verändert, allerdings unterschied es sich trotz erhöhtem 5-HT deutlich von einem sogenannten 5-HT-Syndrom. Dieses ist eines der schwersten Nebenwirkungen von Antidepressiva. Vielmehr schien NMNorsal den normalen Tag-Nacht-Rhythmus der spontanen lokomotorischen Aktivität der Tiere zu stören.

Serotonerge Projektionen erreichen das *Striatum* vom dorsalen Raphekern ausgehend (Paxinos, 1995). Der Gehalt an 5-HT im *Striatum* scheint unter anderem in Verbindung mit den Auswirkungen von Helligkeit und Dunkelheit auf das Verhalten zu stehen. Im Vergleich zu schlafenden oder ruhenden Tieren hat sich der extrazelluläre Gehalt an 5-HT in aktiven Tieren als hoch erwiesen (Linthorst et al., 1994, 1996). Eine signifikante positive Korrelation von allgemeinem Aktivitätszustand und extrazellulärem 5-HT im *Striatum* war durch elektrophysiologische Untersuchungen und Mikrodialysestudien bestätigt worden (Jacobs und Azmitia, 1992; Heslop und Curzon, 1994; Rueter und Jacobs, 1996). Die Verhaltensänderungen der Ratten in den Untersuchungen von Thümen et al. (2003) könnten also mit den gemessenen erhöhten 5-HT-Spiegeln im *Striatum* nach Injektion einer hohen Dosis von NMNorsal zusammenhängen.

Die Auswirkungen von NMNorsal auf das Verhalten von Tieren wurden schon von Yoshida et al. (1993) untersucht. Diese fanden in Experimenten nach intraventrikulärer Gabe von NMNorsal an einem Affen allerdings keine Verhaltensänderungen. Auch Untersuchungen mit weiteren Tetrahydroisochinolininen zeigten keine Auswirkungen auf den 5-HT-Stoffwechsel. Salsolinol führte nur nach chronischer Administration zu einem deutlichen Abfall von Dopamin in *Striatum* und SN. Auswirkungen auf den 5-HT-Metabolismus wurden nicht beobachtet. Naoi et al. (1996) zeigten, daß eine Einzeldosis NM(R)Sal Dopamin und DOPA in der SN deutlich reduzierte, während DOPAC und HVA sowie 5-HT und 5-HIAA unverändert blieben.

Die von Thümen et al. (2003) beobachteten 5-HT-Erhöhungen im *Striatum* und Verhaltensänderungen scheinen allerdings weder durch eine direkte Hemmwirkung von NMNorsal auf die Wiederaufnahme von 5-HT noch auf eine Interaktion mit dem Dopaminstoffwechsel (da dieser unverändert blieb) zurückzuführen sein. Experimente mit Monoamin-Wiederaufnahme-Hemmern wie Fluoxetin hatten erhöhte 5-HT-Spiegel mit einem Maximum schon nach 1 h bewirkt (Guan und McBride, 1988). Die NMNorsal-bedingten Effekte waren hingegen verzögert, 2 h nach NMNorsal-Gabe waren keine Effekte zu beobachten. Die Tatsache, daß der Dopaminstoffwechsel unverändert blieb,

sprach auch gegen eine Hemmwirkung auf die MAO als Ursache. Vielmehr lag nahe, daß diese verzögerten Effekte auf eine Veränderung der Expression oder der Proteinbiosynthese von Enzymen der 5-HT-Synthese, des 5HT-Abbaus oder von Rezeptoren zurückzuführen seien. In der Tat beobachteten Moser et al. einen deutlichen Anstieg von 5-HT_{2A}- und Δ -Opioid-Rezeptor-mRNA mit einem Maximum nach 48 h nach NMNorsal-Gabe in Mikrodialyseexperimenten (Moser et al., 2003).

In den Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten keine signifikanten Veränderungen im Serotoninstoffwechsel festgestellt werden. Ein indirekter Einfluß durch das DA-System als Erklärung für die von Thümen et al. (2003) und Moser et al. (2003) beobachteten Veränderungen ist wie oben diskutiert wenig plausibel. Zwar ist die Aufnahme von NMNorsal in die dopaminergen Neurone über den DAT nachgewiesen worden (Storch et al., 2002), allerdings hatten Thümen et al. (2003) und Moser et al. (2003) ja keine Veränderungen im DA-System gefunden und auch in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte eine Beeinträchtigung der Integrität oder eine toxische Wirkung von NMNorsal auf den Stoffwechsel dieser Neurone *in vivo* nicht nachgewiesen werden.

Die von Thümen et al. (2003) und Moser et al. (2003) beobachteten Veränderungen könnten somit auch durch eine direkte Beeinflussung der serotonergen Zellen durch NMNorsal ausgelöst sein. Der Nachweis dafür, daß NMNorsal und andere TIQs in serotonerge Neurone überhaupt aufgenommen werden, steht allerdings noch aus. Das strukturell sehr ähnliche NM(R)Sal bewirkte nach intrastriataler Injektion jedenfalls keine Veränderungen im Serotoninstoffwechsel (Naoi et al., 1996). Serotonerge Neurone besitzen außerdem wahrscheinlich keinen Dopamin-Transporter (DAT), und ob NMNorsal über andere Mechanismen in 5-HT-Zellen aufgenommen werden kann, z.B. über den SERT (Serotonin-Transporter), ist noch unklar.

Zwischen den Arbeiten von Thümen et al. (2003) und Moser et al. (2003) und den vorliegenden Untersuchungen bestehen außerdem methodische Unterschiede. Hier wurde periaxonal injiziert, während bei den Mikrodialyse-Untersuchungen (Thümen et al., 2003 und Moser et al., 2003) NMNorsal systemisch (intraperitoneal) appliziert wurde. Die von Thümen et al. (2003) und Moser et al. (2003) beobachteten Veränderungen im 5-HT-Stoffwechsel können somit theoretisch auch über andere, möglicherweise indirekte und noch nicht näher bekannte Mechanismen oder Interaktionen erfolgt sein könnten. Thümen et al. (2003) verwendeten ausserdem eine bedeutend höhere Dosis von 40 mg/ kg intraperitoneal. Ein Einfluß von NMNorsal auf den Serotoninstoffwechsel der Ratte nach stereotaktischer Injektion in das MFB konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden.

6-OHDA

Daß der zentrale 5-HT - und Dopaminstoffwechsel in einer engen funktionellen Interaktion zueinander stehen, ist vielfach in neurochemischen und elektrophysiologischen Studien nachgewiesen worden. Diese Interaktion ist wahrscheinlich reziproker Natur, wobei 5-HT das dopaminerge System beeinflusst und umgekehrt. Dopamin scheint dabei modulierend auf die 5-HT-Funktion einzuwirken (Lee und Geyer, 1984; Ferré und Artigas, 1993; Ferré et al., 1994; Mendlin et al., 1999).

Eine Verminderung an Dopamin in den Basalganglien führt zu adaptativen Veränderungen, einschließlich weitreichender struktureller Reorganisation des serotonergen Systems sowohl in neonatalen als auch in erwachsenen Tieren.

Durch 6-OHDA verursachte Veränderungen im Dopaminstoffwechsel müssten sich daher auf den Serotoninstoffwechsel auswirken. Neonatale Ratten, denen 6-OHDA injiziert wurde, zeigten später im Erwachsenenstadium einerseits eine Verarmung an Dopamin im *Striatum* durch Degeneration dopaminerger Projektionen aus der SN. Andererseits beobachtete man dort eine gesteigerte Dichte an 5-HT-Axonon. Eine Veränderung im dynamischen Gleichgewicht, wie es eine Verminderung der Innervationsdichte darstellt, erzeugt oftmals entweder eine Hochregulation von Zielfaktoren wie zum Beispiel der Rezeptorenmenge oder -Sensitivität in der Initialphase oder längerfristig eine Zunahme der Innervation, wenn Neurone für eine Reinnervation noch verfügbar sind beziehungsweise einige Fasern im Zielfeld ausgespart bleiben. Die 5-HT-Hyperinnervation nach Dopamin-Verarmung unter Verwendung von 6-OHDA war begleitet von einem Anstieg des striatalen 5-HT-Gehaltes und der 5-HT-Wiederaufnahme (Luthman et al., 1987; Molina-Holgado et al. 1993; Molina-Holgado et al., 1994). Die neonatalen 6-OHDA-Läsionen förderten eine erhöhte Ligandenbindung an 5-HT_{2A}-Rezeptoren (Radja et al., 1993), ein verstärktes Ansprechen auf 5-HT-Rezeptor-Agonisten (El Mansari et al., 1994) sowie erhöhte mRNA-Level des 5-HT_{2A}-Rezeptors im *Striatum* im Erwachsenenstadium der Tiere (Laprade et al., 1996). Der Anstieg der 5-HT_{2A}-Rezeptor-mRNA im *Striatum* 60 Tage nach bilateraler Dopaminverarmung (>98%) mit 6-OHDA in neonatalen Ratten 5-HT_{2A} Rezeptor Anstieg im Striatum war unabhängig von einer 5-HT-Hyperinnervation (Basura und Walker, 1999).

Wurden 6-OHDA-Läsionen an adulten Ratten vorgenommen, so waren die Ergebnisse weit weniger eindeutig. Snyder et al. (1986) konnte keine der bei im Kindesalter läsierten Ratten gefundenen Veränderungen 2-4 Wochen nach intraventrikulärer 6-OHDA-Gabe an erwachsene Ratten beobachten. Womöglich könnte die Fähigkeit der 5-HT-Neurone zum Wiedereinsprossen als Antwort auf Dopaminverarmung im Kindesalter den Reifegrad des 5-HT-Systems zur Zeit der Läsion widerspiegeln. Biochemische Studien zeigten, daß der im *Striatum* gemessene 5-HT-Gehalt bei adulten Ratten, die mit

6-OHDA behandelt worden waren, nicht erhöht war (Breese et al., 1984). Takeuchi et al. (1991) beobachteten hingegen, daß die 876-OHDA-Läsion des nigrostriatalen Bündels erwachsener Ratten nach 4 Wochen eine signifikante Reduktion der striatalen 5-HT Innervationsdichte und anormale Morphologie 5-HT-immunreaktiver Fasern um die Läsion herum induzierte. Eine 5-HT-Hyperinnervation, wie sie bei neonatalen Ratten nach intraventrikulärer oder intrazisternaler 6-OHDA Administration erscheint, trat nicht auf. In Untersuchungen von Zhou et al. (1991) hingegen resultierte die Injektion von 6-OHDA in die SN in einer Erhöhung der Anzahl von 5-HT-Fasern in SN und *Striatum* nach 2 Monaten. Für die Induktion des Aussprossens von 5-HT-Fasern war allerdings eine Abnahme des Dopamin-Levels um > 90 % erforderlich. Auch von funktionellen Anpassungen wie Veränderungen im 5-HT-Stoffwechsel und Gehalt an mRNA von 5-HT-Rezeptoren im *Striatum* 6-OHDA-läsionierter Ratten ist berichtet worden. Karstaedt et al. (1994) beobachteten 6 Wochen nach kompletter unilateraler Läsion der nigrostriatalen dopaminergen Bahn mit > 90 % Dopaminverlust durch stereotaktische Injektion von 8 µg 6-OHDA in das MFB das Absinken des striatalen 5-HT-Gehalts um mehr als 50 %, während 5-HIAA/5-HT-Ratio, ein Index des 5-HT Umsatzes, um mehr als 90 % stieg. Die Implantation von Dopamin-Pellets in das *Striatum* kehrte die läsionsinduzierten Veränderungen wieder um. Numan et al. (1995) zeigten eine erhöhte Expression 5-HT₂-Rezeptor-mRNA im *Striatum* der Ratte nach 6-OHDA-Läsion des adulten nigrostriatalen Weges.

In den Versuchen im Rahmen der vorliegenden Arbeit, bei denen drei Wochen nach 6-OHDA-Läsion das TH-Signal in *Striatum* und SN um durchschnittlich 80 % zurückgegangen war, waren keine signifikanten Veränderungen in der Immunreaktivität der 5-HT_{2A}-Rezeptoren im *Striatum* und der TPH im MFB nachzuweisen. Möglicherweise war die erzielte dopaminerge Läsion in den vorliegenden Experimenten nach 3 Wochen noch nicht ausreichend, um Veränderungen im Serotinstoffwechsel zu verursachen oder zumindest nachzuweisen.

Die genauen Wechselwirkungen zwischen striatalem Dopamin und dem serotonergen System sind noch immer nicht vollständig geklärt. Ein inhibitorischer Effekt auf die 5-HT-Neurotransmission, der in der beobachteten Hyperinnervation nach dopaminenger Denervierung resultiert, wird ebenso diskutiert wie eine positive Wirkung auf die 5-HT-Freisetzung. Eine intakte dopaminerge Innervation hatte sich als notwendig für die beobachtete erhöhte 5-HT-Erhöhung im Vorderhirn von Ratten nach Aktivierung der Tiere erwiesen (Mendlin et al., 1999). Ein Effekt auf die basale striatale 5-HT-Freisetzung war dagegen nicht nachweisbar, da die Blockierung von D₂-Rezeptoren und Läsionierung des dopaminergen Systems durch 6-OHDA keine Veränderungen hervorriefen. Der Effekt des Dopamins könnte deshalb auf die Vermittlung von Veränderungen des extrazellulären 5-

HT-Gehaltes bei der Aktivierung der Tiere durch äußere Einflüsse beschränkt sein. Die 5-HT Freisetzung im Vorderhirn scheint nicht Resultat einer tonischen dopaminergen Kontrolle sein, vielmehr könnte Dopamin eine lediglich modulierende Rolle auf die serotonerge Transmission nach aktivierenden Einflüssen zukommen (Mendlin et al., 1999).

Bei den Überlegungen zu den Diskrepanzen in den Versuchen mit adulten Ratten sollte das Ausmaß der Manipulation mit in die Antwort eingehen. Verschiedene Arten der 6-OHDA-Administration - 4. Ventrikel, *Striatum*, SN, MFB - und unterschiedliche Grade der dopaminergen Schädigung könnten in unterschiedlichen Graden der 5-HT-Plastizität resultieren (Snyder et al., 1986) und dies ganz besonders in adulten Tieren, wo das Wachstum der Neurone normalerweise endet. Untersuchungen des Ausmaßes der Läsion zeigten darüber hinaus, daß ein signifikanter Anstieg des 5-HT-Levels und seines Metaboliten nur dann auftrat, wenn der Dopamingehalt in der SN um mehr als 90 % und um 95-98 % im *Striatum* zurückgegangen war. In der vorliegenden Arbeit waren nach Reduktion der TH-positiven Zellen um 80 % jedenfalls keine Veränderungen sichtbar. Verschiedene Ergebnisse deuten darauf hin, daß adulte 5-HT-Neurone, die im intakten Gehirn nicht mehr wachsen, immer noch dazu in der Lage sind, auf drastische Degeneration dopaminerg Neurone in der SN und Denervierung von dopaminergen Fasern im *Striatum* zu reagieren (Zhou et al., 1991). Die aus Ergebnissen von Experimenten mit 6-OHDA gewonnen Erkenntnisse zeigen eine gewisse Plastizität des serotonergen Raphe-striatalen Systems in der adulten Ratte. In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings weder für 6-OHDA noch NMNorsal ein Einfluß auf das serotonerge System nachgewiesen werden.

8. ZUSAMMENFASSUNG

NMNorsal ist ein Tetrahydroisochinolin, ein Vertreter einer Stoffgruppe also, welche aufgrund struktureller Ähnlichkeit mit MPTP mit der Ätiologie dieser Erkrankung in Verbindung gebracht wird. NMNorsal wurde im *post mortem* Hirngewebe von Parkinsonkranken (Niwa et al., 1991) und im lumbalen zerebrospinalen Liquor von Patienten, die an Morbus Parkinson litten, nicht aber bei gesunden Kontrollpersonen, nachgewiesen (Moser und Kömpf, 1992). Die *endogenen* Synthesewege für NMNorsal konnten ausgehend von Dopamin gezeigt werden (Naoi et al., 1998; Niwa et al., 1992). NMNorsal kann die Blut-Hirn-Schranke zumindest im Tierversuch bei der Ratte in gewissem Umfang überschreiten (Thümen et al., 2002). Somit ist prinzipiell auch eine *exogene* Zufuhr ins Hirn möglich. Wahrscheinlich dürfte die *endogene* Synthese von NMNorsal im Hirn aber trotzdem größere Bedeutung besitzen. NMNorsal kann über das Dopamin-Transportsystem selektiv in die dopaminergen Neurone aufgenommen werden und wird innerhalb der Axone retrograd in die in SN gelegenen Perikaryen transportiert (Storch et al., 2002). *In vitro* Untersuchungen zeigten einen starken Einfluß von NMNorsal auf wichtige Enzyme des Dopaminmetabolismus. NMNorsal hemmt potent die Aktivität der Tyrosinhydroxylase (TH) im *Nucleus accumbens* der Ratte (Scholz et al., 1997) und die Monoaminoxidase (MAO) im *Nucleus caudatus* (Moser et al., 1996)- ein inhibitorischer Effekt auf die TH ist auch bei MPTP bekannt (Hirata und Nagatsu, 1985). NMNorsal kann ähnlich wie MPTP durch die MAO zu einem positiv geladenen Ion oxidiert werden, im Falle des MPTP eine wichtige Voraussetzung für seine toxische Wirkung (Moser und Kömpf, 1992). *In vivo* führt NMNorsal bei Ratten nach unilateraler stereotaktischer Injektion von NMNorsal in das MFB nach Gabe von S(+)-Amphetamin zu einem starken Rotationsverhalten der Tiere ipsilateral zur Läsion ähnlich wie bei Verwendung von 6-OHDA, allerdings ohne 6-OHDA-äquivalente histologische und metabolische Veränderungen (Moser et al., 1996c).

Ein toxischer Einfluss von NMNorsal auf die dopaminergen Zellen *in vivo* mit histologischen Veränderungen, nekrotischem oder apoptotischem Zelltod und einer Auswirkung auf das TH-Protein konnten in der vorliegenden Arbeit auch mit einer fünffach höheren Dosis als in den Versuchen von Moser et al. (1996) nicht nachgewiesen werden. Das Ausmaß der dopaminergen Läsion durch 6-OHDA entspricht dem zahlreicher Vorarbeiten, wobei die Frage nach nekrotischem oder apoptotischen Zelltod nicht genau beantwortet werden kann, die Ergebnisse aber für Nekrose sprechen. Wie NM(R)Sal wirkt NMNorsal *in vitro* selektiv toxisch auf dopaminerge Zellen (Storch et al., 2002). Die für NM(R)Sal *in vitro* gefundene Aktivierung der Effektorcaspase-3 sowie dessen *in vivo* Toxizität mit Reduktion dopaminerger Zellen um 40% konnten für NMNorsal nicht

reproduziert werden, wobei zwischen den Arbeiten wesentliche methodische Unterschiede bestehen.

Die Schlussfolgerung ist, dass, wenn NMNorsal über ein neurotoxisches Potential auf dopaminerge Zellen in der SNpc verfügt, dieses sehr gering ist, vor allem im Vergleich mit dem potenten 6-OHDA. Ein neurotoxischer Effekt von NMNorsal mit messbaren degenerativen Effekten kann mit der hier verwendeten höheren Dosis nicht nachgewiesen werden, zumindest nicht zu den untersuchten Zeitpunkten.

In früheren Versuchen waren Auswirkungen von NMNorsal auch auf den Serotoninstoffwechsel von Ratten festgestellt worden. 48 h nach Gabe von NMNorsal wurden erhöhte 5-HT-Spiegel im *Nucleus caudatus* der Ratte festgestellt (Thümen et al., 2003). Parallel dazu zeigten die Tiere eine Veränderung im Tag-/ Nacht-Rhythmus mit einer signifikanten Verstärkung der lokomotorischen Aktivität tagsüber mit einem Maximum nach 48 h (Thümen et al., 2003). Moser et al. (2003) beobachteten einen deutlichen Anstieg von 5-HT_{2A}- und Δ -Opioid-Rezeptor-mRNA im *Nucleus caudatus* von Ratten mit einem Maximum nach 48 h im striatalen Mikrodialysat nach intraperitonealer Gabe von 40 mg/kg NMNorsal.

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit konnten nach der hier durchgeführten periaxonalen Applikation von 40 μ g keine Veränderungen des TpH-Proteins im MFB sowie des 5-HT_{2A}-Rezeptor-Proteins im *Striatum* festgestellt werden. Auch die Behandlung mit 6-OHDA bewirkte keine Veränderungen.

Wie und unter welchen Bedingungen NMNorsal an der Pathogenese des Morbus Parkinson beteiligt ist und auf das dopaminerge und serotoninerge System Einfluß nimmt, muss weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Dabei sollte das apoptoseauslösende Potential von NMNorsal in zukünftigen Untersuchungen in Zellkulturen geprüft werden. Dies würde Rückschlüsse und Vergleiche mit den *in vitro*-Untersuchungen zu NM(R)Sal ermöglichen. Versuche mit kontinuierlicher Infusion *in vivo* wie bei Naoi et al. (1996) würden direkte Vergleiche zwischen beiden Substanzen erlauben und sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Ein chronisches Modell würde auch die eventuelle Beteiligung bei den sehr langsamen neurodegenerativen Prozessen der idiopathischen Parkinsonerkrankung besser nachahmen.

9. ABKÜRZUNGEN

Abb = Abbildung

ACB = Nucleus accumbens

AD = Aqua dest. = destilliertes Wasser

ADP = Adenosindiphosphat

Aqua bidest = zweifach destilliertes Wasser

ATP = Adenosintriphosphat

bzw. = beziehungsweise

C = Kohlenstoff

°C = Grad Celsius

ca. = circa

Caspasen = Cystein mediated Aspartat directed Proteases

CO₂ = Kohlendioxyd

CP = Caudatus-Putamen-Komplex

CSF = Hirnwasser, Liquor cerebrospinalis (engl. *cerebrospinal fluid*)

Δ = delta

D = Differenz

DA = Dopamin

DAB = Diaminobenzidin

DAT = Dopamintransporter

DNA = Desoxyribonukleinsäure (engl. *desoxyribonucleic acid*)

DOPAC = 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (engl. *dihydroxyphenylacetic acid*)

DR = Nucleus dorsalis raphe

dUTP = 2'-deoxyuridin 5'-Triphosphat

GABA = γ-Aminobuttersäure (engl. *gamma-aminobutyric acid*)

ggf. = gegebenenfalls

engl. = englisch

et al. = und andere (lat. *et alii*)

h = Stunde

H = Wasserstoff

HCHO = Formaldehyd

Hg. = Herausgeber

5-HT = 5-Hydroxytryptamin = Serotonin

5-HTP = 5-Hydroxytryptophan

5-HIAA = 5-Hydroxyindolessigsäure (engl. *5-hydroxyindole acetic acid*)

H₂O = Wasser

H₂O₂ = Wasserstoffperoxid

HVA = Homovanillinsäure
 I = Intensität Grauwert
 IE = internationale Einheiten
 KBr = Kaliumbromid
 lat. = lateinisch
 LB = Lewykörperchen (engl. *Lewy bodies*)
 L-Dopa = 3,4-Dihydroxyphenylalanin
 LGP = Globus pallidus pars lateralis
 li = links
 MAO = Monoaminoxidase
 MAO A/B = Monoaminoxidase Typ A/ Typ B
 MCAO = Middle cerebral artery occlusion
 MEAN = Mittlerer Grauwert
 MFB = mediales Vorderhirnbündel (engl. *medial forebrain bundle*)
 µg = Microgramm
 MGP = Globus pallidus pars lateralis
 min = Minute(n)
 ml = Milliliter (10⁻³ Liter)
 µl = Mikroliter (10⁻⁶ Liter)
 µm = Micrometer
 mm = Milimeter
 MP = Morbus Parkinson
 MPP⁺ = 1-Methyl-4-Phenylpyridiniumion
 MPDP⁺ = 1-Methyl-4-Phenyl-2,3-Dihydropyridin
 MPPP = 1-Methyl-4-Phenyl-4-Propionoxyperidin
 MPTP = 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
 mRNA = messenger-RNA
 MW = Mittelwert
 N = Stickstoff
 Na = Natrium
 NaCl = Natriumchlorid
 NaOH = Natriumhydroxid
 Ncl. = Nucleus
 NMNorsal = N-Methyl-Norsalsolinol (2(N)-Methyl-6,7-Dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin)
 NM(R)Sal = N-Methyl(R)salsolinol (1(R),2(N)-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin)

O = Sauerstoff
 OD = Optische Dichte
 6-OHDA = 6-Hydroxydopamin
 PBS = Phosphate buffered saline
 PBST = Phosphate buffered saline + Triton X 100
 PCD = Programmierter Zelltod (engl. *programmed cell death*)
 PFA = Paraformaldehyd
 pH = negativer Zehnerlogarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
 re = rechts
 RNA = Ribonukleinsäure (engl. *ribonucleic acid*)
 ROS = Reaktive Sauerstoffverbindungen (engl. *reactive oxygen species*)
 RT = Raumtemperatur
 s = Sekunde(n)
 SD = Standardabweichung (engl. *standard deviation*)
 SEM = Standardabweichung des Mittelwertes (engl. *standard error of the mean*)
 SERT = Serotonintransporter
 SN = Substantia nigra
 SNpc = Substantia nigra pars compacta
 SNpl = Substantia nigra pars lateralis
 SNpr = Substantia nigra pars reticulata
 s.o. = siehe oben
 sog. = sogenannte/-r
 s.u. = siehe unten
 STH = Nucleus subthalamicus (engl. *subthalamic nucleus*)
 SUM = Summe der Grauwerte
 SUMD = Summe der optischen Dichten
 TBS = Tris-gepufferte Salzlösung (engl. *Tris-buffered saline*)
 TdT = terminale Deoxynucleotidyltransferase
 TH = Tyrosinhydroxylase
 TIQ = Tetrahydroisoquinolin
 TPH = Tryptophanhydroxylase
 Tris = Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
 TUNEL = TdT-mediated dUTP nick end labeling
 u.a. = unter anderem
 VTA = Area tegmentalis ventralis (engl. *ventral tegmental area*)
 W = Watt
 z.B. = zum Beispiel

10. LITERATURVERZEICHNIS

Aitken AR, Törk I: Early development of serotonin-containing neurons and pathways as seen in wholemount preparations of the fetal rat brain. *J Comp Neurol.* 1988 Aug 1;274(1):32-47.

Akao Y, Nakagawa Y, Maruyama W, Takahashi T, Naoi M: Apoptosis induced by an endogenous neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol, is mediated by activation of caspase 3. *Neurosci Lett.* 1999 Jun 4;267(3):153-6. Erratum in: *Neurosci Lett* 1999 Jun 25;268(3):166.

Anglade P, Vyas S, Javoy-Agid F, Herrero MT, Michel PP, Marquez J, Mouatt-Prigent A, Ruberg M, Hirsch EC, Agid Y: Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol.* 1997 Jan;12(1):25-31.

Arluison M, Dietl M, Thibault J: Ultrastructural morphology of dopaminergic nerve terminals and synapses in the striatum of the rat using tyrosine hydroxylase immunocytochemistry: a topographical study. *Brain Res Bull.* 1984 Aug;13(2):269-85.

Banati RB, Daniel SE, Blunt SB: Glial pathology but absence of apoptotic nigral neurons in long-standing Parkinson's disease. *Mov Disord.* 1998 Mar;13(2):221-7.

Barcia C, Emborg ME, Hirsch EC, Herrero MT: Blood vessels and parkinsonism. *Front Biosci* 9: 277-282 (2004)

Barnes NM, Sharp T: A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology.* 1999 Aug;38(8):1083-152. Review.

Bartling B, Holtz J, Darmer D: Contribution of myocyte apoptosis to myocardial infarction? *Basic Res Cardiol.* 1998 Apr;93(2):71-84. Review.

Basura GJ, Walker PD: Serotonin 2A receptor mRNA levels in the neonatal dopamine-depleted rat striatum remain upregulated following suppression of serotonin hyperinnervation. *Brain Res Dev Brain Res.* 1999 Aug 5;116(1):111-7.

Beal MF: Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol.* 1995 Sep;38(3):357-66. Review.

Becker T, Becker G, Seufert J, Hofmann E, Lange KW, Naumann M, Lindner A, Reichmann H, Riederer P, Beckmann H, Reiners K: Parkinson's disease and depression: evidence for an alteration of the basal limbic system detected by transcranial sonography. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1997 Nov;63(5):590-6.

Benloucif S, Keegan MJ, Galloway MP: Serotonin-facilitated dopamine release in vivo: pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993 Apr;265(1):373-7.

Berger TW, Kaul S, Stricker EM, Zigmond MJ: Hyperinnervation of the striatum by dorsal raphe afferents after dopamine-depleting brain lesions in neonatal rats. *Brain Res*. 1985 Jun 17;336(2):354-8.

Blandini F, Levandis G, Bazzini E, Nappi G, Armentero MT: Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model. *Eur J Neurosci*. 2007 Jan;25(2):397-405.

Blum D, Wu Y, Nissou MF, Arnaud S, Alim-Louis-Benabid, Verna JM: p53 and Bax activation in 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *Brain Res*. 1997 Mar 14;751(1):139-42.

Bortz J: Verfahren zur Überprüfung von Unterschiedshypothesen. In: Bortz J (Hg.): *Statistik für Sozialwissenschaftler*, 5. Auflage. S. 133-172. Springer, Berlin (1999)

Bosman FT, Visser BC, van Oeveren J: Apoptosis: pathophysiology of programmed cell death. *Pathol Res Pract*. 1996 Jul;192(7):676-83. Review.

Braak H, Rüb U, Braak E: Neuroanatomie des Morbus Parkinson. *Nervenarzt* 71: 459-469 (2000)

Breese GR, Baumeister AA, McCown TJ, Emerick SG, Frye GD, Crotty K, Mueller RA: Behavioral differences between neonatal and adult 6-hydroxydopamine-treated rats to dopamine agonists: relevance to neurological symptoms in clinical syndromes with reduced brain dopamine. *J Pharmacol Exp Ther*. 1984 Nov;231(2):343-54.

Cenci MA, Whishaw IQ, Schallert T: Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nat Rev Neurosci*. 2002 Jul;3(7):574-9. Review.

Chan P, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW, Di Monte D: Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain. *J Neurochem.* 1991 Jul;57(1):348-51.

Cheng AV, Ferrier IN, Morris CM, Jabeen S, Sahgal A, McKeith IG, Edwardson JA, Perry RH, Perry EK: Cortical serotonin-S2 receptor binding in Lewy body dementia, Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J Neurol Sci.* 1991 Nov;106(1):50-5.

Clarke PG: Apoptosis: from morphological types of cell death to interacting pathways. *Trends Pharmacol Sci.* 2002 Jul;23(7):308-9; author reply 310.

Cohen G: Oxidative stress, mitochondrial respiration, and Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;899:112-20.

Cohen, G., and Werner, P. (1994): Free radicals, oxidative stress, and neurodegeneration. In *Neurodegenerative Diseases*, D.B. Calne, ed. (Philadelphia: W.B. Saunders), pp. 139–161.

Collins MA: Neuroamine condensations in human subjects. *Adv Exp Med Biol* 126: 87-102 (1980)

Cotran, Kumar, Collins. *Cellular Pathology I: Cell Injury and Cell Death*. In: Cotran KCR, editor. *Pathologic basis of disease*. Saunders, 1999: 1-29.

Cuello-Carrión FD, Ciocca DR: Improved detection of apoptotic cells using a modified in situ TUNEL technique. *J Histochem Cytochem.* 1999 Jun;47(6):837-9.

Cutillas B, Espejo M, Gil J, Ferrer I, Ambrosio S: Caspase inhibition protects nigral neurons against 6-OHDA-induced retrograde degeneration. *Neuroreport.* 1999 Aug 20;10(12):2605-8.

Dauer W, Przedborski S: Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* 2003 Sep 11;39(6):889-909. Review.

Desagher S, Martinou JC: Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 2000 Sep;10(9):369-77. Review.

Descarries L, Soghomonian JJ, Garcia S, Doucet G, Bruno JP: Ultrastructural analysis of the serotonin hyperinnervation in adult rat neostriatum following neonatal dopamine denervation with 6-hydroxydopamine. *Brain Res.* 1992 Jan 8;569(1):1-13.

Dodel RC, Du Y, Bales KR, Ling Z, Carvey PM, Paul SM: Caspase-3-like proteases and 6-hydroxydopamine induced neuronal cell death. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999 Jan 22;64(1):141-8.

el Mansari M, Radja F, Ferron A, Reader TA, Molina-Holgado E, Descarries L: Hypersensitivity to serotonin and its agonists in serotonin-hyperinnervated neostriatum after neonatal dopamine denervation. *Eur J Pharmacol.* 1994 Aug 11;261(1-2):171-8.

Endres M, Namura S, Shimizu-Sasamata M, Waeber C, Zhang L, Gómez-Isla T, Hyman BT, Moskowitz MA: Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998 Mar;18(3):238-47.

Fallon JH and Loughlin SE. (1985): The substantia nigra. In: *The Rat Central Nervous System: A Handbook for Neuroscientists.* (G. Paxinos and J. Watson, Eds.) pp. 353-374. Academic Press, Sydney

Fallon JH and Loughlin SE (1987): Monoamine innervation of cerebral cortex and a theory of the role of monoamines in cerebral cortex and basal ganglia. In: *Cerebral Cortex.* (E.G. Jones and A. Peters, Eds.), Vol. 6, pp. 41-127. Plenum, New York

Fearnley JM, Lees AJ: Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain.* 1991 Oct;114 (Pt 5):2283-301.

Ferré S, Artigas F: Dopamine D2 receptor-mediated regulation of serotonin extracellular concentration in the dorsal raphe nucleus of freely moving rats. *J Neurochem.* 1993 Aug;61(2):772-5.

Ferré S, Cortés R, Artigas F: Dopaminergic regulation of the serotonergic raphe-striatal pathway: microdialysis studies in freely moving rats. *J Neurosci.* 1994 Aug;14(8):4839-46.

Fowler CJ, Tipton KF: On the substrate specificities of the two forms of monoamine oxidase.

J Pharm Pharmacol. 1984 Feb;36(2):111-5.

Forno LS: Neuropathology of Parkinson's disease. J Neuropathol Exp Neurol. 1996 Mar;55(3):259-72. Review.

Forno LS, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW: Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonism and Parkinson's disease. Neuropathologic considerations.

Adv Neurol. 1993;60:600-8.

Funa K, Ahgren A: Characterization of platelet-derived growth factor (PDGF) action on a mouse neuroblastoma cell line, NB41, by introduction of an antisense PDGF beta-receptor RNA. Cell Growth Differ. 1997 Aug;8(8):861-9.

Galloway MP, Suchowski CS, Keegan MJ, Hjorth S: Local infusion of the selective 5HT-1b agonist CP-93,129 facilitates striatal dopamine release in vivo. Synapse. 1993 Sep;15(1):90-2.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol. 1992 Nov;119(3):493-501.

Giasson BI, Duda JE, Murray IV, Chen Q, Souza JM, Hurtig HI, Ischiropoulos H, Trojanowski JQ, Lee VM: Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. Science. 2000 Nov 3;290(5493):985-9.

Graham DG: Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. Mol Pharmacol. 1978 Jul;14(4):633-43.

Guan XM, McBride WJ: Fluoxetine increases the extracellular levels of serotonin in the nucleus accumbens. Brain Res Bull. 1988 Jul;21(1):43-6.

Halliday GM, Törk I: Comparative anatomy of the ventromedial mesencephalic tegmentum in the rat, cat, monkey and human. J Comp Neurol. 1986 Oct 22;252(4):423-45.

Hartmann A, Hunot S, Michel PP, Muriel MP, Vyas S, Faucheux BA, Mouatt-Prigent A, Turmel H, Srinivasan A, Ruberg M, Evan GI, Agid Y, Hirsch EC: Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Mar 14;97(6):2875-80.

Hartmann A, Michel PP, Troadec JD, Mouatt-Prigent A, Faucheux BA, Ruberg M, Agid Y, Hirsch EC: Is Bax a mitochondrial mediator in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease? J Neurochem. 2001 Mar;76(6):1785-93

Hartmann A, Troadec JD, Hunot S, Kikly K, Faucheux BA, Mouatt-Prigent A, Ruberg M, Agid Y, Hirsch EC: Caspase-8 is an effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease, but pathway inhibition results in neuronal necrosis.

J Neurosci. 2001 Apr 1;21(7):2247-55.

Hartmann A, Hirsch EC: Parkinson's disease. The apoptosis hypothesis revisited.

Adv Neurol. 2001;86:143-53. Review.

Hartmann A, Mouatt-Prigent A, Faucheux BA, Agid Y, Hirsch EC: FADD: A link between TNF family receptors and caspases in Parkinson's disease. Neurology. 2002 Jan 22;58(2):308-10.

Hasegawa E, Takeshige K, Oishi T, Murai Y, Minakami S: 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) induces NADH-dependent superoxide formation and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. Biochem Biophys Res Commun. 1990 Aug 16;170(3):1049-55

He Y, Lee T, Leong SK: 6-Hydroxydopamine induced apoptosis of dopaminergic cells in the rat substantia nigra. Brain Res. 2000 Mar 6;858(1):163-6.

Hegy L, Hardwick SJ, Mitchinson MJ, Skepper JN: The presence of apoptotic cells in human atherosclerotic lesions. Am J Pathol. 1997 Jan;150(1):371-3.

Hely MA, Morris JG, Reid WG, Trafficante R: Sydney Multicenter Study of Parkinson's disease: non-L-dopa-responsive problems dominate at 15 years. Mov Disord. 2005 Feb;20(2):190-9.

Hely MA, Morris JG, Rail D, Reid WG, O'Sullivan DJ, Williamson PM, Genge S, Broe GA. The Sydney Multicentre Study of Parkinson's disease: a report on the first 3 years. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1989 Mar;52(3):324-8.

Hernán MA, Takkouche B, Caamaño-Isorna F, Gestal-Otero JJ: A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2002 Sep;52(3):276-84.

Heslop KE, Curzon G: Depletion and repletion of cortical tissue and dialysate 5-HT after reserpine. *Neuropharmacology*. 1994 Mar-Apr;33(3-4):567-73.

Hirata Y, Nagatsu T : Inhibition of tyrosine hydroxylation in rat striatal tissue slices by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion. *Neurosci Lett*. 1985 Jun 24;57(3):301-5.

Hirsch EC, Hunot S, Faucheux B, Agid Y, Mizuno Y, Mochizuki H, Tatton WG, Tatton N, Olanow WC: Dopaminergic neurons degenerate by apoptosis in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 1999 Mar;14(2):383-5.

Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP: International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev*. 1994 Jun;46(2):157-203. Review.

Hoyer D, Martin G: 5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome. *Neuropharmacology*. 1997 Apr-May;36(4-5):419-28. Review.

Jacobs BL, Azmitia EC: Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev*. 1992 Jan;72(1):165-229. Review.

Jacotot E, Costantini P, Laboureau E, Zamzami N, Susin SA, Kroemer G: Mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;887:18-30. Review.

Janec E, Burke RE: Naturally occurring cell death during postnatal development of the substantia nigra of the rat. *Mol Cell Neurosci* 1993;4:30-35.doi:10.1006/mcne.1993.1004

Javoy F, Sotelo C, Herbet A, Agid Y : Specificity of dopaminergic neuronal degeneration induced by intracerebral injection of 6-hydroxydopamine in the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* 1976 Feb 6;102(2):201-15.

Jellinger KA: Cell death mechanisms in Parkinson's disease.
J Neural Transm. 2000;107(1):1-29.

Jellinger KA: Challenges in neuronal apoptosis. *Curr Alzheimer Res.* 2006 Sep;3(4):377-91. Review.

Jeon BS, Jackson-Lewis V, Burke RE: 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration.* 1995 Jun;4(2):131-7.

Jeon BS, Kholodilov NG, Oo TF, Kim SY, Tomaselli KJ, Srinivasan A, Stefanis L, Burke RE: Activation of caspase-3 in developmental models of programmed cell death in neurons of the substantia nigra. *J Neurochem.* 1999 Jul;73(1):322-33.

Jéquier E, Lovenberg W, Sjoerdsma A: Tryptophan hydroxylase inhibition: the mechanism by which p-chlorophenylalanine depletes rat brain serotonin. *Mol Pharmacol.* 1967 May;3(3):274-8

Jiminez-Jiminez FJ, Garcia-Ruiz PJ, Molina JA: Drug-induced movement disorders.
Drug Saf 16: 180-204 (1997)

Jonsson, G. (1983): Chemical lesioning techniques: monoamine neurotoxins. In *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Volume 1: Methods in Chemical Neuroanatomy*, A. Björklund and T. Hökfelt, eds. (Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.), pp. 463–507

Karstaedt PJ, Kerasidis H, Pincus JH, Meloni R, Graham J, Gale K: Abstract Unilateral destruction of dopamine pathways increases ipsilateral striatal serotonin turnover in rats. *Exp Neurol.* 1994 Mar;126(1):25-30.

Kelland MD, Freeman AS, Chiodo LA: Serotonergic afferent regulation of the basic physiology and pharmacological responsiveness of nigrostriatal dopamine neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990 May;253(2):803-11.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972 Aug;26(4):239-57. Review.

Kösel S, Egensperger R, von Eitzen U, Mehraein P, Graeber MB: On the question of apoptosis in the parkinsonian substantia nigra. *Acta Neuropathol*. 1997 Feb;93(2):105-8.

Kramer BC, Mytilineou C: Alterations in the cellular distribution of bcl-2, bcl-x and bax in the adult rat substantia nigra following striatal 6-hydroxydopamine lesions. *J Neurocytol*. 2004 Mar;33(2):213-23.

Kroeze WK, Kristiansen K, Roth BL: Molecular biology of serotonin receptors structure and function at the molecular level. *Curr Top Med Chem*. 2002 Jun;2(6):507-28. Review.

Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Negoescu A.

TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem*. 1998 Mar;46(3):327-34.

Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I: Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*. 1983 Feb 25;219(4587):979-80.

Laprade N, Radja F, Reader TA, Soghomonian JJ: Dopamine receptor agonists regulate levels of the serotonin 5-HT_{2A} receptor and its mRNA in a subpopulation of rat striatal neurons. *J Neurosci*. 1996 Jun 1;16(11):3727-36.

Lee EH, Geyer MA: Dopamine autoreceptor mediation of the effects of apomorphine on serotonin neurons. *Pharmacol Biochem Behav*. 1984 Aug;21(2):301-11.

Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P: Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med*. 1997 Apr 21;185(8):1481-6.

Levy G, Tang MX, Louis ED, Cote LJ, Alfaró B, Mejia H, Stern Y, Marder K: The association of incident dementia with mortality in PD. *Neurology*. 2002 Dec 10;59(11):1708-13.

Linthorst AC, Flachskamm C, Holsboer F, Reul JM: Local administration of recombinant human interleukin-1 beta in the rat hippocampus increases serotonergic neurotransmission, hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis activity, and body temperature. *Endocrinology*. 1994 Aug;135(2):520-32.

Linthorst AC, Flachskamm C, Holsboer F, Reul JM: Activation of serotonergic and noradrenergic neurotransmission in the rat hippocampus after peripheral administration of bacterial endotoxin: involvement of the cyclo-oxygenase pathway. *Neuroscience*. 1996 Jun;72(4):989-97.

Lotharius J, Dugan LL, O'Malley KL: Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *J Neurosci*. 1999 Feb 15;19(4):1284-93.

Lovenberg W, Jequier E, Sjoerdsma A: Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor. *Science*. 1967 Jan 13;155(759):217-9.

Luthman J, Fredriksson A, Sundström E, Jonsson G, Archer T: Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. *Behav Brain Res*. 1989 Jul 1;33(3):267-77.

Luthman J, Bolioli B, Tsutsumi T, Verhofstad A, Jonsson G: Sprouting of striatal serotonin nerve terminals following selective lesions of nigro-striatal dopamine neurons in neonatal rat. *Brain Res Bull*. 1987 Aug;19(2):269-74.

Majno G, Joris I: Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*. 1995 Jan;146(1):3-15. Review.

Maricq AV, Peterson AS, Brake AJ, Myers RM, Julius D: Primary structure and functional expression of the 5HT3 receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science*. 1991 Oct 18;254(5030):432-7.

Markey SP, Johannessen JN, Chiueh CC, Burns RS, Herkenham MA: Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature*. 1984 Oct 4-10;311(5985):464-7.

Martí MJ, Saura J, Burke RE, Jackson-Lewis V, Jiménez A, Bonastre M, Tolosa E: Striatal 6-hydroxydopamine induces apoptosis of nigral neurons in the adult rat. *Brain Res.* 2002 Dec 20;958(1):185-91.

Martinou JC: Apoptosis. Key to the mitochondrial gate. *Nature.* 1999 Jun 3;399(6735):411-2.

Maruyama W, Nakahara D, Ota M, Takahashi T, Takahashi A, Nagatsu T, Naoi M: N-methylation of dopamine-derived 6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, (R)-salsolinol, in rat brains: in vivo microdialysis study. *J Neurochem.* 1992 Aug;59(2):395-400.

Maruyama W, Takahashi T, Minami M, Takahashi A, Dostert P, Nagatsu T, Naoi M: Cytotoxicity of dopamine-derived 6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines. *Adv Neurol.* 1993;60:224-30.

Maruyama W, Sobue G, Matsubara K, Hashizume Y, Dostert P, Naoi M: A dopaminergic neurotoxin, 1(R), 2(N)-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, N-methyl(R)salsolinol, and its oxidation product, 1,2(N)-dimethyl-6,7-dihydroxyisoquinolinium ion, accumulate in the nigro-striatal system of the human brain. *Neurosci Lett.* 1997 Feb 14;223(1):61-4.

Maruyama W, Akao Y, Youdim MB, Davis BA, Naoi M: Transfection-enforced Bcl-2 overexpression and an anti-Parkinson drug, rasagiline, prevent nuclear accumulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by an endogenous dopaminergic neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol. *J Neurochem.* 2001 Aug;78(4):727-35.

Maruyama W, Boulton AA, Davis BA, Dostert P, Naoi M: Enantio-specific induction of apoptosis by an endogenous neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol, in dopaminergic SH-SY5Y cells: suppression of apoptosis by N-(2-heptyl)-N-methylpropargylamine. *J Neural Transm.* 2001;108(1):11-24.

Maruyama W, Naoi M: Cell death in Parkinson's disease. *J Neurol.* 2002 Sep;249 Suppl 2:II6-10.

Mayo JC, Sainz RM, Uria H, Antolin I, Esteban MM, Rodriguez C: Melatonin prevents apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuronal cells: implications for Parkinson's disease. *J Pineal Res.* 1998 Apr;24(3):179-92.

Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Rodriguez C: Ultrastructural confirmation of neuronal protection by melatonin against the neurotoxin 6-hydroxydopamine cell damage. *Brain Res.* 1999 Feb 13;818(2):221-7.

Mendlin A, Martín FJ, Jacobs BL: Dopaminergic input is required for increases in serotonin output produced by behavioral activation: an in vivo microdialysis study in rat forebrain. *Neuroscience.* 1999;93(3):897-905.

Merad-Boudia M, Nicole A, Santiard-Baron D, Saillé C, Ceballos-Picot I: Mitochondrial impairment as an early event in the process of apoptosis induced by glutathione depletion in neuronal cells: relevance to Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol.* 1998 Sep 1;56(5):645-55.

Migheli A, Attanasio A, Schiffer D: Ultrastructural detection of DNA strand breaks in apoptotic neural cells by in situ end-labelling techniques. *J Pathol.* 1995 May;176(1):27-35.

Molina-Holgado E, Dewar KM, Grondin L, van Gelder NM, Reader TA: Changes of amino acid and monoamine levels after neonatal 6-hydroxydopamine denervation in rat basal ganglia, substantia nigra, and Raphe nuclei. *J Neurosci Res.* 1993 Jul 1;35(4):409-18.

Molina-Holgado E, Dewar KM, Descarries L, Reader TA: Altered dopamine and serotonin metabolism in the dopamine-denervated and serotonin-hyperinnervated neostriatum of adult rat after neonatal 6-hydroxydopamine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994 Aug;270(2):713-21.

Moratalla R, Quinn B, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW, Graybiel AM: Differential vulnerability of primate caudate-putamen and striosome-matrix dopamine systems to the neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 May 1;89(9):3859-63.

Morgante L, Salemi G, Meneghini F, Di Rosa AE, Epifanio A, Grigoletto F, Ragonese P, Patti F, Reggio A, Di Perri R, Savettieri G: Parkinson disease survival: a population-based study.

Arch Neurol. 2000 Apr;57(4):507-12.

Moser A, Reavill C, Jenner P, Marsden CD, Cramer H: Effect of somatostatin on dopamine sensitive adenylate cyclase activity in the CP of the rat. Exp Brain Research 62: 567-571 (1986)

Moser A, Kömpf D: Presence of methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines, derivatives of the neurotoxin isoquinoline, in parkinsonian lumbar CSF. Life Sci 50: 1885-1891 (1992)

Moser A, Scholz J, Nobbe F, Vieregge P, Böhme V, Bamberg H: Presence of N-methyl-norsalsolinol in the CSF: correlations with dopamine metabolites of patients with Parkinson's disease. J Neurol Sci 131:183-189 (1995)

Moser A, Scholz J, Bamberg H, Böhme V: The effect of N-methyl-norsalsolinol on monoamine oxidase of the rat nucleus caudatus in vitro. Neurochem Int 28: 109-112 (1996a)

Moser A, Siebecker F, Vieregge P, Jaskowski P, Kömpf D: Salsolinol, catecholamine metabolites, and visual hallucinations in L-dopa treated patients with Parkinson's disease. J Neural Transm 103: 421-432 (1996b)

Moser A, Siebecker F, Nobbe F, Böhme V: Rotational behaviour and neurochemical changes in unilateral N-methyl-norsalsolinol and 6-hydroxydopamine lesioned rats. Exp Brain Res 112: 89-95 (1996c)

Moser A: TIQ derivatives in the human central nervous system. In: Moser A (Hg.): Pharmacology of endogenous neurotoxins. S. 25-40. Birkhäuser, Boston (1998)

Moser A, Thümen A, Qadri F: Modulation of striatal serotonin and opioid receptor mRNA expression following systemic N-methyl-norsalsolinol administration. J Neurol Sci 216: 109-112 (2003)

Nagatsu T, Levitt M, Udenfried S: Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrin biosynthesis. J Biol Chem 239: 2910-2917 (1964)

Nagatsu T, Kaneda N, Kobayashi K, Ichinose H, Sasaoka T, Kiuchi K, Fujita K, Kurosawa Y: The human tyrosine hydroxylase gene. In: Naoi M, Parvez SH (Hg.): Tyrosine hydroxylase. S. 177-191. VSP, Utrecht (1993)

Naoi M, Dostert P, Yoshida M, Nagatsu T: N-methylated tetrahydroisoquinolines as dopaminergic neurotoxins. Adv Neurol. 1993;60:212-7.

Naoi M, Maruyama W, Dostert P, Kohda K, Kaiya T: A novel enzyme enantio-selectively synthesizes (R)salsolinol, a precursor of a dopaminergic neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol. Neurosci Lett. 1996 Jul 19;212(3):183-6.

Naoi M, Maruyama W, Dostert P, Hashizume Y, Nakahara D, Takahashi T, Ota M: Dopamine-derived endogenous 1(R),2(N)-dimethyl-6,7-dihydroxy- 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, N-methyl-(R)-salsolinol, induced parkinsonism in rat: biochemical, pathological and behavioral studies. Brain Res. 1996 Feb 19;709(2):285-95.

Naoi M, Maruyama W, Matsubara K, Hashizume Y: A neutral N-methyltransferase activity in the striatum determines the level of an endogenous MPP⁺-like neurotoxin, 1,2-dimethyl-6,7-dihydroxyisoquinolinium ion, in the substantia nigra of human brains. Neurosci Lett. 1997 Oct 10;235(1-2):81-4.

Naoi M, Maruyama W, Kasamatsu T, Dostert P: Oxidation of N-methyl(R)salsolinol: involvement to neurotoxicity and neuroprotection by endogenous catechol isoquinolines. J Neural Transm Suppl. 1998;52:125-38.

Naoi M, Maruyama W, Nakao N, Ibi T, Sahashi K, Benedetti MS: (R)salsolinol N-methyltransferase activity increases in parkinsonian lymphocytes. Ann Neurol. 1998 Feb;43(2):212-6.

Naoi M, Maruyama W, Akao Y, Yi H: Dopamine-derived endogenous N-methyl-(R)-salsolinol: its role in Parkinson's disease. Neurotoxicol Teratol. 2002 Sep-Oct;24(5):579-91. Review.

Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE: Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci.* 1985 Jul 1;36(26):2503-8.

Niwa T, Takeda N, Yoshizumi H, Tatematsu A, Yoshida M, Dostert P, Naoi M, Nagatsu T: Presence of 2-methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinoline and 1,2-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, novel endogenous amines, in parkinsonian and normal human brains. *Biochem Biophys Res Commun* 177: 603-609 (1991)

Niwa T, Maruyama W, Nakahara D, Takeda N, Yoshizumi H, Tatematsu A, Takahashi A, Dostert P, Naoi M, Nagatsu T: Endogenous synthesis of N-methylsalsolinol, an analogue of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, in rat brain during in vivo microdialysis with salsolinol, as demonstrated by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr.* 1992 Jul 1;578(1):109-15.

Niwa T, Kajita M, Nagatsu T: Isoquinoline Derivates. In: Moser A (Hg.): *Pharmacology of endogenous neurotoxins*. S. 3-23. Birkhäuser, Boston (1998)

Numan S, Lundgren KH, Wright DE, Herman JP, Seroogy KB. Increased expression of 5HT2 receptor mRNA in rat striatum following 6-OHDA lesions of the adult nigrostriatal pathway. *Brain Res Mol Brain Res.* 1995 Apr;29(2):391-6.

Oberholzer M, Ostreicher M, Christen H, Brühlmann M: Methods in quantitative image analysis. *Histochem Cell Biol.* 1996 May;105(5):333-55. Review.

Ochu EE, Rothwell NJ, Waters CM: Caspases mediate 6-hydroxydopamine-induced apoptosis but not necrosis in PC12 cells. *J Neurochem.* 1998 Jun;70(6):2637-40.

Oo TF, Burke RE: The time course of developmental cell death in phenotypically defined dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Dev Brain Res* 1997;98:191-196.doi:10.1016/S0165-3806(96)00173-3

Otsuki Y, Li Z, Shibata MA : Apoptotic detection methods--from morphology to gene. *Prog Histochem Cytochem.* 2003;38(3):275-339. Review.

Parent A, Levesque M, Parent M: A re-evaluation of the current model of the basal ganglia.

Parkinsonism Relat Disord. 2001 Jul;7(3):193-198.

Paxinos G, Watson C: The rat brain in stereotactic coordinates, 4th edition. Academic Press, San Diego, New York (1998)

Paxinos G: The Rat Nervous System, 2nd edition. Elsevier Academic Press, San Diego (1995)

Paxinos G: The Rat Nervous System, 3rd edition. Elsevier Academic Press, San Diego (2004)

Przedborski S, Levivier M, Jiang H, Ferreira M, Jackson-Lewis V, Donaldson D, Togasaki DM: Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. Neuroscience. 1995 Aug;67(3):631-47.

Przedborski S, Jackson-Lewis V: Mechanisms of MPTP toxicity. Mov Disord. 1998;13 Suppl 1:35-8. Review.

Radja F, Descarries L, Dewar KM, Reader TA: Serotonin 5-HT1 and 5-HT2 receptors in adult rat brain after neonatal destruction of nigrostriatal dopamine neurons: a quantitative autoradiographic study. Brain Res. 1993 Mar 26;606(2):273-85.

Roth BL: Multiple serotonin receptors: clinical and experimental aspects. Ann Clin Psychiatry. 1994 Jun;6(2):67-78. Review.

Rueter LE, Jacobs BL: Changes in forebrain serotonin at the light-dark transition: correlation with behaviour. Neuroreport. 1996 Apr 10;7(5):1107-11.

Rueter LE, Jacobs BL : A microdialysis examination of serotonin release in the rat forebrain induced by behavioral/environmental manipulations. Brain Res. 1996 Nov 11;739(1-2):57-69.

Saraste A, Pulkki K: Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. Cardiovasc Res. 2000 Feb;45(3):528-37. Review.

Sauer H, Oertel WH: Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience*. 1994 Mar;59(2):401-15.

Scarabelli T, Stephanou A, Rayment N, Pasini E, Comini L, Curello S, Ferrari R, Knight R, Latchman D: Apoptosis of endothelial cells precedes myocyte cell apoptosis in ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2001 Jul 17;104(3):253-6.

Scholz J, Bamberg H, Moser A: N-Methyl-norsalsolinol, an endogenous neurotoxin, inhibits tyrosine hydroxylase activity in the rat brain nucleus accumbens in vitro. *Neurochem. Int.* 31: 845-849 (1997)

Sherman MY, Goldberg AL: Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron*. 2001 Jan;29(1):15-32. Review.

Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, Jenner P, Marsden CD: Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol*. 1994 Sep;36(3):348-55.

Sibon I, Tison F: Vascular parkinsonism. *Curr Opin Neurol*. 17: 49-54 (2004)

Snyder AM, Zigmond MJ, Lund RD: Sprouting of serotonergic afferents into striatum after dopamine-depleting lesions in infant rats: a retrograde transport and immunocytochemical study. *J Comp Neurol*. 1986 Mar 8;245(2):274-81.

Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M: alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 May 26;95(11):6469-73.

Srinivasan A, Roth KA, Sayers RO, Shindler KS, Wong AM, Fritz LC, Tomaselli KJ: In situ immunodetection of activated caspase-3 in apoptotic neurons in the developing nervous system. *Cell Death Differ*. 1998 Dec;5(12):1004-16.

Stachowiak MK, Bruno JP, Snyder AM, Stricker EM, Zigmond MJ: Apparent sprouting of striatal serotonergic terminals after dopamine-depleting brain lesions in neonatal rats. *Brain Res*. 1984 Jan 16;291(1):164-7.

Steinbusch HW, Nieuwenhuys R, Verhofstad AA, Van der Kooy D: The nucleus raphe dorsalis of the rat and its projection upon the caudatoputamen. A combined cytoarchitectonic, immunohistochemical and retrograde transport study. *J Physiol (Paris)*. 1981;77(2-3):157-74.

Steinbusch HW, Verhofstad AA, Penke B, Varga J, Joosten HW: Immunohistochemical characterization of monoamine-containing neurons in the central nervous system by antibodies to serotonin and noradrenalin. A study in the rat and the lamprey (*Lampetra fluviatilis*). *Acta Histochem Suppl*. 1981;24:107-22.

Stern MB: Head Trauma as a risk for Parkinson's disease. *Mov Disord* 6: 95-97 (1991)

Storch A, Ott S, Hwang YI, Ortmann R, Hein A, Frenzel S, Matsubara K, Ohta S, Wolf HU, Schwarz J: Selective dopaminergic neurotoxicity of isoquinoline derivatives related to Parkinson's disease: studies using heterologous expression systems of the dopamine transporter. *Biochem Pharmacol*. 2002 Mar 1;63(5):909-20.

Sträter J, Günthert AR, Brüderlein S, Möller P: Microwave irradiation of paraffin-embedded tissue sensitizes the TUNEL method for in situ detection of apoptotic cells. *Histochem Cell Biol*. 1995 Feb;103(2):157-60.

Takahashi T, Maruyama W, Deng Y, Dostert P, Nakahara D, Niwa T, Ohta S, Naoi M: Cytotoxicity of endogenous isoquinolines to human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neural Transm*. 1997;104(1):59-66.

Takai N, Nakanishi H, Tanabe K, Nishioku T, Sugiyama T, Fujiwara M, Yamamoto K: Involvement of caspase-like proteinases in apoptosis of neuronal PC12 cells and primary cultured microglia induced by 6-hydroxydopamine. *J Neurosci Res*. 1998 Oct 15;54(2):214-22.

Takeuchi Y, Sawada T, Blunt S, Jenner P, Marsden CD: Effects of 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal pathway on striatal serotonin innervation in adult rats. *Brain Res*. 1991 Oct 25;562(2):301-5.

Tanner CM: Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin*. 1992 May;10(2):317-29. Review.

Tatton NA, Kish SJ: In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining. *Neuroscience*. 1997 Apr;77(4):1037-48.

Thornberry NA, Lazebnik Y: Caspases: enemies within. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1312-6. Review.

Thümen A, Behnecke A, Qadri F, Bäuml E, Moser A: N-Methyl-norsalsolinol, a putative dopaminergic neurotoxin, passes through the blood-brain barrier in vivo. *Neuroreport* 13: 25-28 (2002)

Thümen A, Behnecke A, Qadri F, Moser A: N-methyl-norsalsolinol modulates serotonin metabolism in the rat caudate nucleus: correlations with behavioural changes. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 6: 35-40 (2003)

Törk I: Anatomy of the serotonergic system. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;600:9-34; discussion 34-5. Review

Tompkins MM, Basgall EJ, Zamrini E, Hill WD: Apoptotic-like changes in Lewy-body-associated disorders and normal aging in substantia nigral neurons. *Am J Pathol*. 1997 Jan;150(1):119-31.

Trepel M (Hg.): *Neuroanatomie: Struktur und Funktion*, 2. Auflage. S. 126-128, 186-195. Urban und Fischer Verlag, München (1999)

Tsao CW, Cheng JT, Shen CL, Lin YS: 6-Hydroxydopamine induces thymocyte apoptosis in mice. *J Neuroimmunol*. 1996 Apr;65(2):91-5.

Ungerstedt U: 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol*. 1968 Dec;5(1):107-10.

Ungerstedt U: Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1971;367:1-48.

von Economo, C: *Encephalitis lethargica: it's sequela and treatment*. Oxford Univ Press, London, 1931

Varastet M, Riche D, Maziere M, Hantraye P: Chronic MPTP treatment reproduces in baboons the differential vulnerability of mesencephalic dopaminergic neurons observed in Parkinson's disease. *Neuroscience*. 1994 Nov;63(1):47-56.

Velier JJ, Ellison JA, Kikly KK, Spera PA, Barone FC, Feuerstein GZ: Caspase-8 and caspase-3 are expressed by different populations of cortical neurons undergoing delayed cell death after focal stroke in the rat. *J Neurosci*. 1999 Jul 15;19(14):5932-41.

Vertes RP : A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol*. 1991 Nov 22;313(4):643-68.

Vertes RP, Fortin WJ, Crane AM: Projections of the median raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol*. 1999 May 17;407(4):555-82.

Vila M, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Djaldetti R, Liberatore G, Offen D, Korsmeyer SJ, Przedborski S: Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl- 4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Feb 27;98(5):2837-42. Epub 2001 Feb 13.

Vila M, Przedborski S: Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2003 May;4(5):365-75. Review.

Viswanath V, Wu Y, Boonplueang R, Chen S, Stevenson FF, Yantiri F, Yang L, Beal MF, Andersen JK: Caspase-9 activation results in downstream caspase-8 activation and bid cleavage in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease. *J Neurosci*. 2001 Dec 15;21(24):9519-28.

von Coelln R, Kügler S, Bähr M, Weller M, Dichgans J, Schulz JB: Rescue from death but not from functional impairment: caspase inhibition protects dopaminergic cells against 6-hydroxydopamine-induced apoptosis but not against the loss of their terminals. *J Neurochem*. 2001 Apr;77(1):263-73.

Walkinshaw G, Waters CM: Neurotoxin-induced cell death in neuronal PC12 cells is mediated by induction of apoptosis. *Neuroscience*. 1994 Dec;63(4):975-87.

Weissmann D, Belin MF, Aguera M, Meunier C, Maitre M, Cash CD, Ehret M, Mandel P, Pujol JF : Immunohistochemistry of tryptophan hydroxylase in the rat brain. *Neuroscience*. 1987 Oct;23(1):291-304.

Woodgate A, MacGibbon G, Walton M, Dragunow M: The toxicity of 6-hydroxydopamine on PC12 and P19 cells. *Brain Res Mol Brain Res*. 1999 May 21;69(1):84-92.

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR: Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. 1980;68:251-306. Review

Wyllie AH: The biology of cell death in tumours. *Anticancer Res*. 1985 Jan-Feb;5(1):131-6.

Wyllie AH: Apoptosis: cell death under homeostatic control. *Arch Toxicol Suppl*. 1987;11:3-10.

Xu J, Culman J, Blume A, Brecht S, Gohlke P: Chronic treatment with a low dose of lithium protects the brain against ischemic injury by reducing apoptotic death. *Stroke*. 2003 May;34(5):1287-92. Epub 2003 Apr 3.

Yadid G, Pacak K, Kopin IJ, Goldstein DS: Endogenous serotonin stimulates striatal dopamine release in conscious rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994 Sep;270(3):1158-65.

Yamamoto M: Depression in Parkinson's disease: its prevalence, diagnosis, and neurochemical background. *J Neurol*. 2001 Sep;248 Suppl 3:III5-11. Review.

Yoshida M, Ogawa M, Suzuki K, Nagatsu T: Parkinsonism produced by tetrahydroisoquinoline (TIQ) or the analogues. *Adv Neurol*. 1993;60:207-11.

Zecca L, Tampellini D, Gerlach M, Riederer P, Fariello RG, Sulzer D: Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour. *Mol Pathol*. 2001 Dec;54(6):414-8. Review.

Zhou FC, Bledsoe S, Murphy J: Serotonergic sprouting is induced by dopamine-lesion in substantia nigra of adult rat brain. *Brain Res*. 1991 Aug 9;556(1):108-16.

Zoldan J, Friedberg G, Goldberg-Stern H, Melamed E: Ondansetron for hallucinosis in advanced Parkinson's disease. *Lancet*. 1993 Feb 27;341(8844):562-3.

Zuch CL, Nordstroem VK, Briedrick LA, Hoernig GR, Granholm AC, Bickford PC: Time course of degenerative alterations in nigral dopaminergic neurons following a 6-hydroxydopamine lesion. J Comp Neurol. 2000 Nov 20;427(3):440-54.

11. DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, in Zusammenarbeit mit dem Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie und dem Institut für Anatomie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, erstellt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Andreas Moser aus der Klinik für Neurologie für die Überlassung des Themas und für die verständnisvolle Betreuung. Für die anfängliche Betreuung danke ich ebenfalls Herrn Dr. med. Joachim Scholz. Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Oliver Schmitt aus dem Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck (aktuell an der Universität Rostock) für seine Einarbeitung und Hilfe und beim Anfertigen der Schnitte sowie die kompetente Zusammenarbeit bei den histologischen Färbungen und der Auswertung der Immunhistochemie.

Einen besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. med. Olaf Jöhren aus dem Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie aussprechen für seine hervorragende Unterstützung bei den immunhistochemischen Färbungen und bei allen darüber hinausgehenden Fragen zu meiner Arbeit. Herzlich danken möchte ich auch Prof. Dr. med. T. Herdegen und Dr. med. S. Brecht vom Institut für Pharmakologie der Christian-Albrecht-Universität in Kiel für die freundliche Bereitstellung der als Positivkontrollen für Apoptose verwendeten Hirne nach temporärer Ischämie nach MCAO.

Ebenfalls ein herzlicher Dank für die immer hervorragende, ausserordentlich angenehme und hilfreiche Zusammenarbeit geht an Frau Katharina Schnackenberg, Frau Karin Wiegers, Frau Marlies Reher sowie Frau Gisa Brunk aus dem Labor für Liquordiagnostik und Neuroimmunchemie. Außerdem danken möchte ich Frau Constanze Siggel und Frau Christine Eichholz aus dem Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie sowie Frau Lidija Gutjahr aus dem Institut für Anatomie für die freundliche Hilfe und das sehr angenehme Arbeitsklima. Ein Dank geht weiterhin an die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Tierhaltung für die Pflege der Tiere und die unkomplizierte Zusammenarbeit.

Meinem Doktorandenkollegen Jan Bürmann bin ich ausserordentlich dankbar für die sehr hilfreiche Einarbeitung und die stets sehr angenehme Zusammenarbeit. Seine Zuverlässigkeit und Stetigkeit sind mir Vorbild und haben entscheidenden Anteil am Gelingen meiner Arbeit. Ein besonderer Dank geht an Peter Bürmann, der mir bei der statistischen Auswertung des Datenmaterials behilflich war.

Zutiefst dankbar bin ich Sebastian Schramm für die wertvollen Korrekturvorschläge sowie meinen Freunden, Eltern und Geschwistern für die mentale Unterstützung, Anteil- und Rücksichtnahme bei der Erstellung dieser Arbeit.

Der größte Dank gilt Gott, dem Schöpfer des Universums und allen Lebens, bei dem alle Weisheit und alle Erkenntnis ist. IHM soll diese Arbeit gewidmet sein.

12. PUBLIKATIONSLISTE

Poster:

Mende K , Schmitt O , Scholz J , Moser A

Die Wirkung von N-Methyl-Norsalsolinol auf das dopaminerge und das serotoninerge System der Ratte. 20. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg (01.-03.10.2003)

Bürmann J, Mende K, Jöhren O, Scholz J, Moser A

Interference of N-methyl-norsalsolinol with the metabolism of dopamine *in vivo*. European Neurological Society (ENS) 12th Meeting, Berlin, Germany (22.-26.06. 2002)

13. CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Geboren am 03.12.1976 in Berlin

ledig

Schulbildung

1983 - 1991	Polytechnische Oberschule Weixdorf
1991 - 1995	Gymnasium Dresden-Klotzsche
16.06.1995	Abitur

Zivildienst

1995 - 1996	Altenpflege Ev.- luth. Diakonissenanstalt Dresden e.V.
-------------	---

Studium

	Studium der Humanmedizin:
1996 - 2000	Technische Universität Dresden
2000 - 2004	Universität zu Lübeck
2001 – 2002	Université de Caen, Frankreich ERASMUS-Stipendium an der Faculté de Médecine
21.12.2004	Approbation als Arzt

Ärztliche Tätigkeit

05/ 2005 – 03/ 2006	Assistenzarzt Anästhesie, Unfallkrankenhaus Berlin
Seit 04/ 2006	Assistenzarzt Chirurgie davon:
12 Monate	Clinique et Permanence de Longeraie, Abteilung für Handchirurgie des Universitätsklinikums (CHUV) Lausanne, Schweiz
6 Monate	Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum (CHUV) Lausanne, Schweiz
6 Monate	Chirurgische Notaufnahme, Universitätsklinikum (CHUV) Lausanne, Schweiz
Ab 04/ 2008	Hôpital du Jura bernois, Moutier, Schweiz