

Aus dem Department für Anatomie Tübingen  
Institut für Neuroanatomie und Entwicklungsbiologie

Einfluss von 6-OHDA auf die Expression  
Tyrosinhydroxylase-positiver Zellen im Nager Striatum  
in vivo und vitro

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Karl, Anke  
geb. Schläger

2019

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth  
1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Liebau  
2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. M. Avci-Adali

Tag der Disputation: 24.01.2019

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>ii</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>iv</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 6-Hydroxydopamin . . . . .	1
1.1.1 Applikation von 6-OHDA . . . . .	3
1.1.2 Veränderungen nach der Applikation von 6-OHDA . . . . .	6
1.2 Dopamin . . . . .	8
1.2.1 Dopamin-Synthese . . . . .	8
1.2.2 Dopaminrezeptoren . . . . .	9
1.3 Ziele . . . . .	10
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>11</b>
2.1 Materialien . . . . .	11
2.1.1 Ausrüstung . . . . .	11
2.1.2 Chemikalien und Substanzen . . . . .	12
2.1.3 Puffer und Lösungen . . . . .	13
2.1.4 Immunhistochemie (in vivo) . . . . .	13
2.1.5 Immunhistochemie (in vitro) . . . . .	14
2.1.6 6-OHDA Läsion . . . . .	14
2.1.7 Organotypische Kulturen . . . . .	14
2.1.8 Antikörper und Seren . . . . .	15
2.1.9 Tiere . . . . .	15
2.2 Methoden . . . . .	17
2.2.1 Stereotaktische 6-OHDA-Läsion an Sprague-Dawley Ratten . . . . .	17
2.2.2 Vorbereitung des Gehirn-Gewebes für die Immunhistochemie . . . . .	18

---

2.2.3	Immunhistochemie an Gefrierschnitten von Gehirn-Gewebe von 6-OHDA-läsionierten Ratten . . . . .	18
2.2.4	Organotypische Kulturen von Gehirnschnitten aus Glast : : CreERT22 GFP – Mäusen . . . . .	20
2.2.5	Immunhistochemie von organotypischen Kulturen aus Gehirngewebe von Mäusen . . . . .	22
2.2.6	Mikroskopische Auswertung der Immunhistochemie . . . . .	23
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>27</b>
3.1	Ergebnisse in vivo . . . . .	27
3.1.1	Intrazerebroventrikuläre Injektion von 6-OHDA - Auswirkung auf TH-Expression im Striatum . . . . .	27
3.1.2	TH-positive Zellen im Striatum und AADC . . . . .	28
3.1.3	TH-positive Zellen im Striatum und Gad67 . . . . .	29
3.1.4	Zusammenfassung der in vivo Ergebnisse . . . . .	30
3.2	Ergebnisse in vitro . . . . .	31
3.2.1	Enzym-Expression in organotypischen Kulturen . . . . .	32
3.2.2	Einfluss von 6-OHDA auf Expression von TH und AADC . . . . .	34
3.2.3	Rolle von Dopamin und Dopaminrezeptoren bei der 6-OHDA induzierten Zunahme von TH-positiven Zellen in organotypischen Kulturen . . . . .	37
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>41</b>
4.1	Diskussion - in vivo . . . . .	41
4.1.1	Anstieg TH-positiver Zellkörper im Striatum nach intrazerebroventrikulärer 6-OHDA-Injektion . . . . .	41
4.1.2	TH-positive Zellkörper im Striatum exprimieren nach intrazerebroventrikulärer 6-OHDA-Injektion kein AADC . . . . .	42
4.1.3	TH-positive Zellkörper im Striatum exprimieren nach intrazerebroventrikulärer 6-OHDA-Injektion im Gegensatz zum Kortex nicht Gad67 . . . . .	44
4.2	Diskussion - in vitro . . . . .	46
4.2.1	Enzym-Expression in organotypischen Kulturen . . . . .	46
4.2.2	Einfluss von 6-OHDA auf die Expression von TH und AADC . . . . .	47

---

4.2.3	Rolle von Dopamin und Dopaminrezeptoren bei der 6-OHDA induzierten Zunahme von TH-positiven Zellen in organo- typischen Kulturen . . . . .	50
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil</b>	<b>65</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>66</b>

## Abkürzungsverzeichnis

6-OHDA	6-Hydroxydopamin
AADC	Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BSA	Bovin Serum Albumin
°C	Grad Celsius
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindole
DAT	Dopamintransporter
DIV	Tage in vitro
dl	deziliter
EAAC	Exzitatorischer Aminosäuretransporter
FGF	Fibroblasten Growth Factor
g	gramm
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
Gad	Glutamatdecarboxylase
GDNF	Glial cell-derived neurotrophic factor
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GLT	Glutamatttransporter
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
HCl	Chlorwasserstoff
IE	Internationale Einheit
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
K	Kontrolle
KG	Körpergewicht
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumphosphat
M	molar
M. Parkinson	Morbus Parkinson
MDF	Muscle-derived differentiation factor
ml	milliliter
mM	millimolar

---

n	Stoffmenge
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumphosphat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
Ncl.	Nucleus
NGF	Nerve growth factor
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
Ros	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
Sbst. nigra	Substantia nigra
sham	scheinbar behandelt
TBS	Tris buffered saline (Tris gepufferte Salzlösung)
TH	Tyrosinhydroxylase
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Hydroxymethyl-Aminomethan
u.a.	unter anderem
vGLUT	Vesikulärer Glutamattransporter
vMAT	Vesikulärer Monoamintransporter
µg	mikrogramm
µl	mikroliter
µM	mikromolar
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1. Einleitung

## 1.1 6-Hydroxydopamin

6-Hydroxydopamin (6-OHDA) ist ein strukturelles Analogon zu Dopamin, welches sich von diesem durch eine zusätzliche Hydroxyl-Gruppe am Benzol-Ring an Position 6 unterscheidet [69] (s. Abbildung 1). 6-OHDA ist hoch toxisch für katecholaminerge Neurone [67, 69] und wird häufig in Tiermodellen für Morbus Parkinson benutzt. Die selektiv auf katecholaminerge Neurone beschränkte Wirkung von 6-OHDA wird vor allem auf seine Wirkung und Aufnahme in Neurone über den Dopamintransporter (DAT) erklärt [48, 69]. Einmal (über den DAT) in ein Neuron aufgenommen, führt es dort über verschiedene Mechanismen zum Untergang des dopaminergen Neurons. So induziert es oxidativen Stress und führt in der Folge zu mitochondrialer Dysfunktion [42, 46, 82]. Die Konsequenz ist die Apoptose der betroffenen Zelle [42] (s. Abbildung 2).

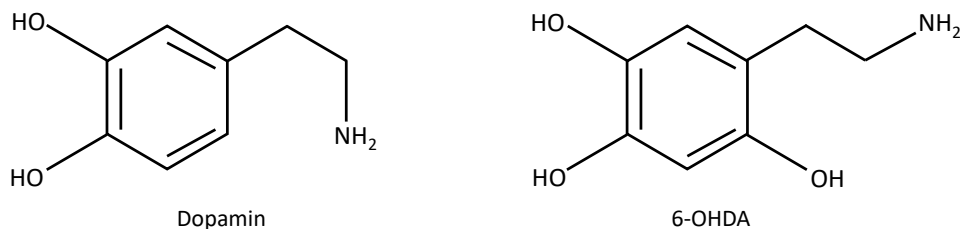


Abbildung 1: Strukturformeln: 6-OHDA: Zusätzliche Hydroxyl-Gruppe am Benzol-Ring.



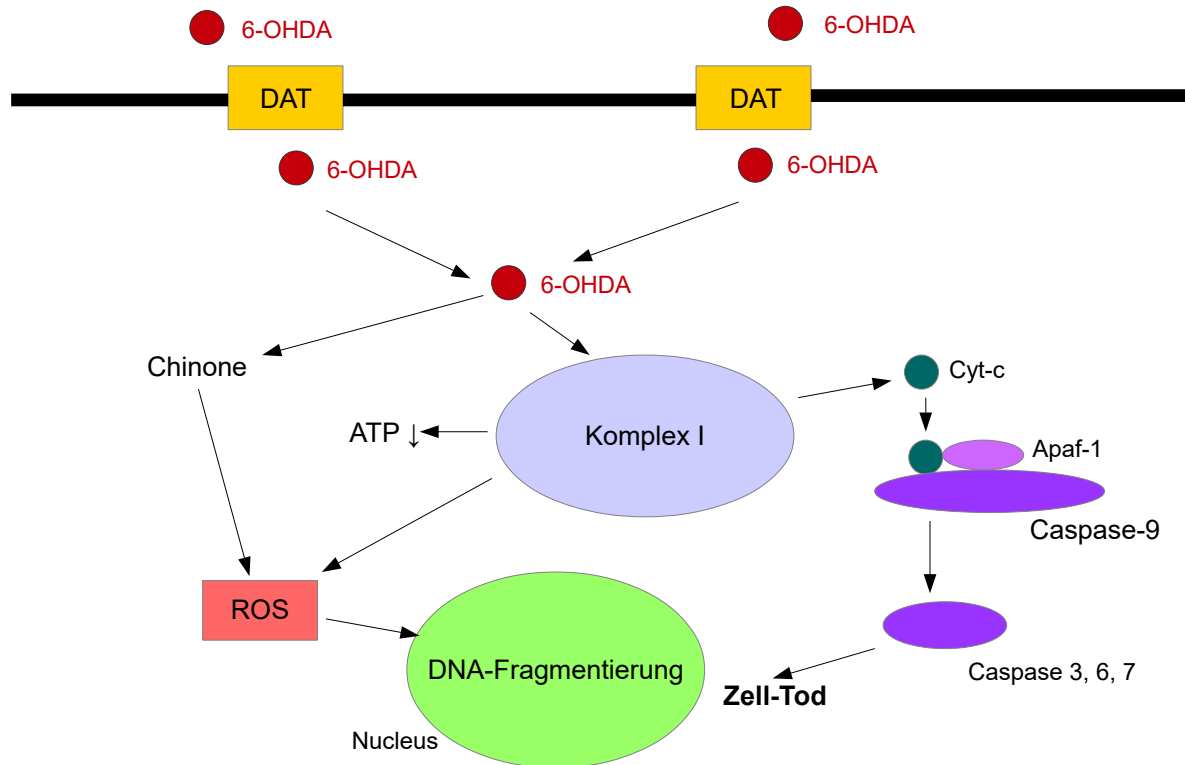


Abbildung 2: 6-OHDA überwindet die Zellmembran mittels Dopamintransportern (DAT). Die intrazelluläre Oxidation bildet Chinone, diese können durch Interaktion mit  $H_2O_2$  zu Hydroxy-Radikalen (OH) konvertiert werden. Zudem inhibiert 6-OHDA den mitochondrialen Komplex I der Atmungskette mit daraus resultierender Bildung von Sauerstoff-Radikalen (ROS) und Freisetzung von pro-apoptotischen Molekülen wie Cytochrom c (Cyt-c), welches die Caspase 9 aktiviert; dies triggert Caspase 3, 6 und 7 und induziert Apoptose. Modifiziert nach Cabezas et al. [10].

Auch bei M. Parkinson kommt es zur Degeneration dopaminerger Neurone in der Pars compacta der Substantia nigra und einem daraus resultierenden Dopaminverlust im Striatum [69, 71, 87]. Hieraus resultieren hauptsächlich die motorischen Symptome der Akinese, Ruhetremor, Rigor und posturale Instabilität [6, 43]. Im Tiermodell mit 6-OHDA konnte jedoch auch ein Teil der nicht-motorischen Symptome nach der Applikation beobachtet werden [52]. In der Folge spielt seither 6-OHDA eine wichtige Rolle bei Tiermodellen des M. Parkinson [71].

Der Ablauf des Verlusts von dopaminergen Neuronen in Folge von 6-OHDA ähnelt demjenigen, der bei M. Parkinson erfolgt. Auch hier führt oxidativer Stress in der betroffenen Zelle zu mitochondrialer Dysfunktion [6, 42]. Allerdings ist die pathophysiologische Degeneration dopaminergener Neurone bei M. Parkinson ein über Jahre ablaufender Prozess [6, 71]. Nach der Applikation von 6-OHDA hingegen wird eine rasche, über Tage bis Wochen dauernde Degeneration dopaminergener Neurone beobachtet [52]. Ein weiterer Unterschied ist, dass bei der Behandlung mit 6-OHDA und der konsekutiven Degeneration dopaminergener Neurone nur ein Teil der bei M. Parkinson betroffenen Pathologien auftritt. So kommt es wie bei M. Parkinson zu einem progressiven Mangel dopaminergener Neurone. Darüber hinaus sind bei M. Parkinson auch anteriore olfaktorische Strukturen, tiefe Hirnstammregionen sowie der Locus coeruleus betroffen [6, 20]. Auch die bei M. Parkinson öfters beobachteten Lewy-Körperchen, welche u.a. intrazytoplasmatisch in Neuronen der Subst. nigra vorkommen [3], lassen sich im 6-OHDA Modell nicht nachweisen [60, 69].

### 1.1.1 Applikation von 6-OHDA

Systemisch appliziertes 6-OHDA kann nicht die Blut-Hirnschranke überwinden und somit auch nicht im ZNS wirken. Folglich müssen andere Applikationsformen zum Einsatz kommen. Meist wird 6-OHDA daher uni- oder bilateral in Gehirnregionen der Versuchstiere mit dopaminergen Neuronen injiziert. In der Regel handelt es sich hier um die Subst. nigra, das Striatum oder das mediale Vorderhirnbündel [21, 65, 69] (s. Abbildung 3, S. 4). Jede der einzelnen Injektionsorte weist sowohl Vor- als auch Nachteile auf, grundsätzlich ist die Applikation von 6-OHDA in das ZNS jedoch ein etabliertes Verfahren.

Die Injektion in das mediale Vorderhirnbündel von Ratten kann zu einem vollständigen Untergang von A9 (nigrostriatalen)- sowie A10 (mesolimbischen)-Zellgruppen führen [64]. Häufig wird diese Methode unilateral angewendet und führt damit zu folgendem Bild: annähernd vollständiger Untergang der ipsilateralen, dopaminergen Neurone im Striatum sowie eine hochsensitive Denervation der dort lokalisierten postsynaptischen Dopamin-Rezeptoren [21, 64, 81]. Hierbei nimmt die Neurodegeneration der dopaminergen Neurone ein derart ausgedehntes Ausmaß an, welches in dieser Ausprägung beim humanen idiopathischen M. Parkinson nicht vorkommt [64]. Die singuläre Destruktion der A9-Zellgruppe (nigrostriatal) hingegen resultiert in einem dem M. Parkinson ähnlichen Bild [64].

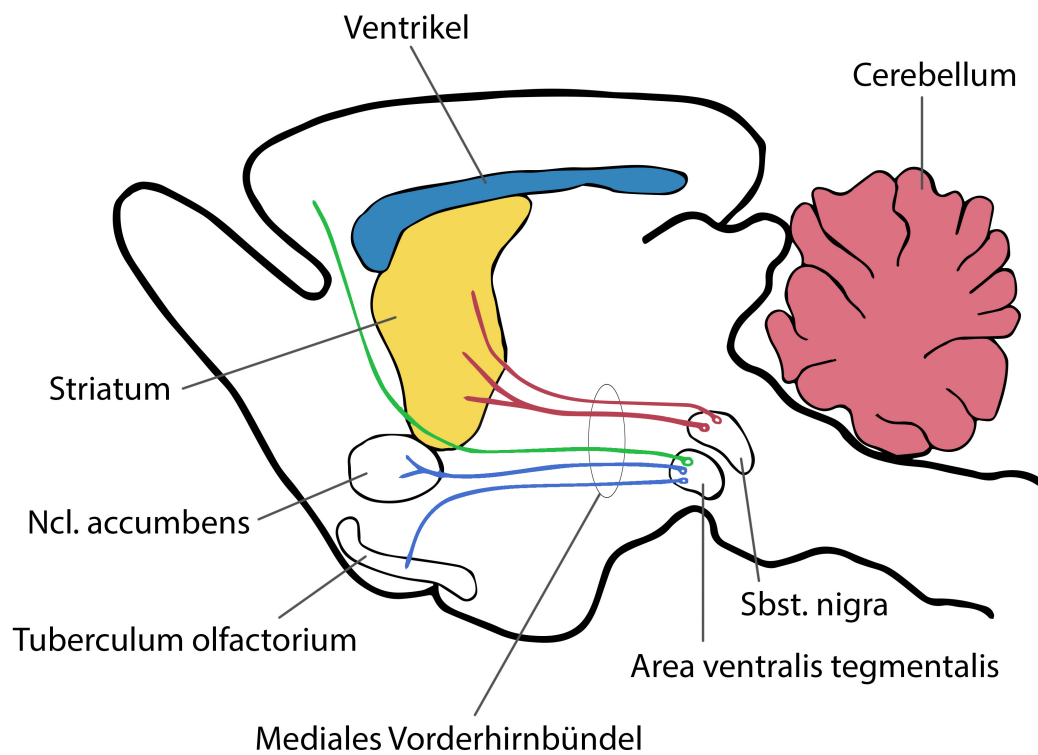


Abbildung 3: Schematische Übersicht eines Nagetierhirns, Sagittalschnitt. Häufig verwendete Applikationsorte von 6-OHDA in Gehirnregionen mit dopaminergen Neuronen: Sbst. nigra, Striatum, mediales Vorderhirnbündel.

Die Injektion von 6-OHDA in die rostrale Subst. nigra pars compacta führt, verglichen mit der Injektion in das mediale Vorderhirnbündel, zu einem geringeren Untergang dopaminerger Neurone in der Subst. nigra und gilt als ein selektiveres Tiermodell mit einer moderaten Reduktion dopaminerger Neurone [12, 21].

Des Weiteren ist auch das Striatum als Injektionsort von 6-OHDA von Bedeutung. Meist wird entweder eine ventrolaterale oder eine dorsomediale Injektion durchgeführt [21]. Hier wird vor allem der ventrolateralen Läsion des Striatums von Ratten Bedeutung zugesprochen [39]. Dieses erhält bedeutsame Informationen sowohl aus dem motorischen wie auch dem sensomotorischen Neokortex. Zudem erfolgt hier eine afferente dopaminerge Innervation von der Subst. nigra [7, 39]. Hiermit ist das ventrolaterale Striatum vergleichbar mit dem Putamen von Primaten und Menschen [16, 39]. Gerade was die Ausprägung der Klinik von Ratten nach der Behandlung mit 6-OHDA in das ventrolaterale Striatum betrifft, wurden bei diesem Modell übereinstimmende Beeinträchtigungen mit der Klinik des M. Parkinson beobachtet. Hierbei handelt es sich um die Bewegungsinitiation, sensomotorische Bewegung sowie geschicktes motorisches Verhalten [16, 21, 22, 68]. Durch die Dopamin-Entleerung im ventrolateralen Striatum ließ sich ein Tremor einer Rattenpfote induzieren, wohingegen die Abnahme dopaminerger Neurone in anderen Bereichen des Striatums einer Ratte nicht zu dieser Klinik führten [16, 36]. Dies lässt sich auch mit der Beobachtung, dass bei M. Parkinson vor allem die dopaminerge Innervation im Putamen abzunehmen scheint [59, 26], in Einklang bringen.

Das dorsomediale Striatum von Ratten hingegen erhält Afferenzen aus der Subst. nigra, Area tegmentalis ventralis sowie dem medialen und frontalen Kortex. Hiermit weist es vielerlei Gemeinsamkeiten mit dem humanen Ncl. caudatus auf, welcher bei M. Parkinson weniger ausgeprägt betroffen ist [39].

Neben der direkten Injektion von 6-OHDA ins Gehirngewebe gibt es auch die Möglichkeit der direkten Applikation in die Gehirnv ventrikel und somit in das Liquorsystem. Bei dieser Methode wurde 4 Tage nach der Applikation eine Reduktion von TH-positiven Fasern sowohl im Kortex wie auch im Striatum nachgewiesen [84, 83].

Vorteil dieser Methode ist, dass die intrazerebroventrikuläre Injektion von 6-OHDA zu einem dopaminergen Zellverlust führt, der mit dem Verlust-Profil des M. Parkinson mehr Gemeinsamkeiten aufweist. Im Gegensatz zur intrazerebroventrikulären Applikation führt die Injektion von 6-OHDA in Gehirngewebe zu einer fokalen Läsion um die verwendete Kanülenspitze [67]. Zudem kommt es lokal zu einer reaktiven Gliose, welche nicht auf die eigentliche Wirkung des Neurotoxins zurück zu führen ist, sondern mit der mechanischen

Schädigung im Zusammenhang steht [9, 72]. Durch die Injektion von 6-OHDA in den Liquor hingegen gelangt dieses in Regionen, welche zuvor nicht mechanisch geschädigt wurden. Zusätzlich fand man nach der intrazerebroventrikulären 6-OHDA-Injektion für den M. Parkinson typische Veränderungen auch in vom Injektionsort fernen Regionen [84, 83]. Die beidseitige intrazerebroventrikuläre Injektion führte zu einer auf beiden Seiten vorkommenden symmetrischen Läsion, wie sie bei einer bilateralen Injektion ins Gehirngewebe schwieriger zu erzielen ist [67]. Zudem lassen sich im Gegensatz zur Injektion ins Gehirngewebe sekundäre lokale Reaktionen auf die Manipulation umgehen [67].

Zusammengefasst liefern die oben angeführten Studien [43, 67, 84, 83, 92] sowie unsere eigenen Untersuchungen klare Evidenz, dass es sich bei der Methode der intrazerebroventrikulären Injektion um ein gut geeignetes Läsionsmodell handelt, um die Pathophysiologie des M. Parkinson zu untersuchen.

Um die erfolgreiche Degeneration einer 6-OHDA-Läsion festzustellen wird der Verlust dopaminerger Fasern untersucht. Hierfür wird häufig das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) als Marker verwendet, da TH in der Regel in dopaminergen Fasern exprimiert wird. Es wird angenommen, dass der Verlust an TH-positiven Fasern mit der Ausprägung der dopaminergen Degeneration korreliert. Eine solche Reduktion der TH-positiven Fasern wurde auch nach der Injektion von 6-OHDA in beide Seitenventrikel von Ratten sowohl im Striatum wie auch im Kortex beobachtet [84]. Es ist davon auszugehen, dass diese verhältnismäßig selten angewendete Applikationsform von 6-OHDA ebenso als Tier-Modell mit einer dopaminergen Degeneration geeignet ist.

### **1.1.2 Veränderungen nach der Applikation von 6-OHDA**

6-OHDA wird seit Ende der 1960er Jahre für Tiermodelle zur Untersuchung von M. Parkinson verwendet und ist gut etabliert (s. 1.1 auf S.1). Die Wirkung sowohl von 6-OHDA wie auch von Dopamin auf Gliazellen ist bisher jedoch wenig untersucht. Diese beiden Wirkmechanismen zu verstehen war in den vergangenen Jahren Forschungsgegenstand meiner Arbeitsgruppe. Hierbei wurden im Kortex von Ratten nach intrazerebroventrikulärer Injektion von 6-OHDA Zellen entdeckt, welche positiv für TH waren. In Untersuchungen zeigten diese Zellen zum Teil eine Ko-Lokalisation für GABA bzw. die Glutamatdecarboxylase 67 (GAD67), wie auch für Calretinin, was darauf hindeutet, dass diese Zellen Interneurone sein könnten [83].

Es gibt Hinweise, die darauf hindeuten, dass die TH-positiven Zellen durch einen Phänotyp-Wechsel bereits existierender Zellen entstanden sind. Dieser Wechsel könnte durch 6-OHDA gefördert werden. Ein möglicher Trigger hierfür ist bisher unbekannt. Die funktionelle Insuffizienz des lokalen dopaminergen Systems mag hierbei beteiligt sein [51].

Zudem scheinen auch Astrozyten bei der Entstehung TH-positiver Zellen nach der Applikation von 6-OHDA eine Rolle zu spielen. Untersuchungen des Gehirns von biventrikulär mit 6-OHDA läsierten Tieren zeigten als Reaktion auf die Verletzung von Gehirngewebe reaktive Gliose in Form von zellulärer Hypertrophie, Hochregulation des sauren Glia-Filament-Proteins GFAP sowie Proliferation [72, 84, 86]. Die direkte Reaktion auf Verletzung scheint hier jedoch nicht die einzige zu sein. Es gibt Hinweise auf indirekte Effekte der durch 6-OHDA vermittelten Degeneration auf Astrozyten. Diese zeigten sich neben der Subst. nigra pars compacta [75] auch in Zielregionen dopaminergischer Projektionsneurone. So wurde die Aktivierung von Astroglia nach der Applikation von 6-OHDA in verschiedenen Vorderhirnregionen, der Area ventralis tegmentalis und dem Kortex beschrieben [14, 30].

Nach der Applikation von 6-OHDA fanden sich Zellen, die neben GFAP auch den Proliferations-Marker Ki67 exprimierten sowie teilweise für Nestin positiv waren [84]. Nestin wird typischerweise während der embryonalen und postnatalen Entwicklung exprimiert. Darüber hinaus fand man es auch in reaktiven Astrozyten, die diesen Marker erneut im Rahmen einer induzierten Proliferation exprimierten [28, 84]. Dies ist ein Hinweis darauf, dass reife, post-mitotische Astrozyten in der Lage sind, auf eine Verletzung mit einer De-Differenzierung in ein Vorläuferstadium zu reagieren [9]. Diese Zellen stellen eine potentielle Quelle für die Reparatur von Gehirngewebe nach Verletzung dar [9].

## 1.2 Dopamin

### 1.2.1 Dopamin-Synthese

Die Synthese von Dopamin findet im Zytosol von dopaminergen Neuronen in deren Zellkörper und Fortsätzen statt [80]. Das synthetisierte Dopamin wird dann aus dem Zytosol mit Hilfe des vesikulären Membrantransporters 2 (VMAT2) in Sekretgranula aufgenommen [33, 85]. Dopamin wird in dieser Form gespeichert und unter Membrandepolarisation über Exozytose ausgeschüttet [80]. Über den Dopamintransporter DAT wird ein Teil des ausgeschütteten Dopamins wieder in das Neuron aufgenommen [33].

Bei der Dopamin-Synthese wird zunächst die Aminosäure Tyrosin mit Hilfe des Enzyms Tyrosinhydroxylase (TH) zu L-Dopa, der Dopamin-Vorstufe, hydroxyliert. Das ist der geschwindigkeitsbestimmende Reaktionsschritt in der Synthese von Dopamin. In einem folgenden Reaktionsschritt wird L-Dopa zu Dopamin decarboxyliert. Dabei ist das Enzym aromatische Aminosäuren-Decarboxylase (AADC) beteiligt (s. Abbildung 4).

Dopamin ist der vorherrschende catecholaminerge Neurotransmitter im Gehirn von Säugetieren. Dort kontrolliert es eine Vielzahl an Funktionen wie die Aktivität des Bewegungsapparats, Kognition, Emotion, Nahrungsaufnahme und endokrine Regulation [54].

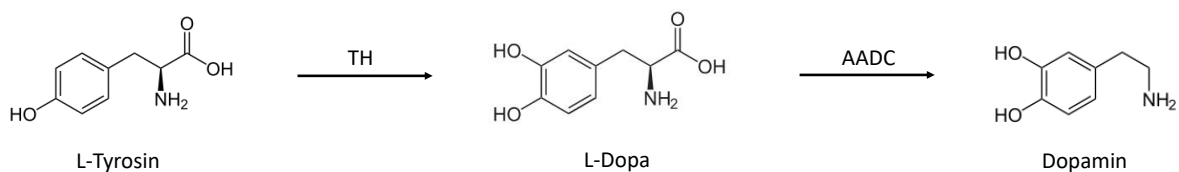


Abbildung 4: Dopaminsynthese: Die Aminosäure L-Tyrosin wird mit Hilfe des Enzyms Tyrosinhydroxylase (TH) zu L-Dopa hydroxyliert. AADC decarboxyliert L-Dopa zu Dopamin.

## **1.2.2 Dopaminrezeptoren**

Dopamin-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Man unterscheidet verschiedene Subtypen von Dopamin-Rezeptoren. Hierbei handelt es sich zum einen um D1-ähnliche Rezeptoren (D1 und D5) sowie um D2-ähnliche Rezeptoren (D2, D3 und D4) [54, 55]. Die einzelnen Subtypen der Dopaminrezeptoren befinden sich in bestimmten Gehirn-Regionen und induzieren intrazelluläre Signalkaskaden mit jeweils unterschiedlichen Effekten [54]. Dopamin-Rezeptoren wurden auf den Membranen verschiedener Zellen beobachtet. So nicht nur auf Nervenzellen, sondern auch auf Astrozyten in verschiedenen Gehirnregionen [4, 8, 56, 89].



## **1.3 Ziele**

Ziele der vorliegenden Arbeit sind die Untersuchungen folgender Fragen:

Resultiert die intrazerebroventrikuläre Injektion von 6-OHDA in Nagern neben einem Anstieg von TH-positiven Zellen im Kortex auch in der Zunahme TH-positiver Zellen in anderen dopaminergen Zielgebieten wie dem Striatum? Welchen molekularen Phänotyp haben diese Zellen?

Handelt es sich bei der vermehrten Expression von TH-positiven Zellen nach der Applikation von 6-OHDA um ein Ratten-spezifisches Phänomen?

Welche Rolle spielen Dopaminrezeptoren bei der Vermittlung des Effekts von 6-OHDA auf die TH-Expression?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Ausrüstung

##### *6-OHDA-Läsion*

Chirurgisches Besteck	Roth
Faden	Johnson&Johnson
Hamilton Spritze, 10 $\mu$ l	Hamilton
Knochen-Wax	Johnson&Johnson
Zahnarztbohrer, HMI 007	Meisinger

##### *Histologie*

DAKO Pen	DAKO
Deckglas, 24x32 mm	R. Langenbrinck
Kryotom, M560	Micron
Objektträger, SuperFrost R Plus, 75x25 mm	R. Langenbrinck
Zeiss Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop	Zeiss

##### *Zellkultur*

Inkubator	Heraeus
Millicell Cell Culture Inserts, 0.4 $\mu$ m	Millipore
Tissue Chopper, TC752	McIlwain
6-Well-Schale	Falcon

## 2.1.2 Chemikalien und Substanzen

Ampuwa	Fresenius Kabi
Ascorbinsäure	Sigma
B27 Supplement	Gibco
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital
BSA	Sigma
$C_6H_5Na_3O_7 \times 2 H_2O$	Merck
$C_6H_8O_7 \times H_2O$	AppliChem
Dako endogenous Blocking System	Dako
DAPI	Sigma
D-Glucose	Sigma
Dopamin	Sigma
Fentanyl	Ratiopharm
Heparin Na 25000	Meda
HCl	Merck
Isofluran	Abbt GmbH
$KH_2PO_4$	Merck KGaA
L-Glutamin, 200 mM	Gibco
MEM-Hepes	Gibco
2-Methylbutan	AppliChem
Moviol	Calbiochem
NaCl	Merck KGaA
$NaH_2PO_4$	Merck KGaA
$NaHCO_3$	Sigma
Narcorene	Merial
6-OHDA	Sigma
Penicillin/Streptomycin	lifetechnologies
PFA (Paraformaldehyd)	Merck
Procain hydrochloride	Merck
Quinpirol	Tocris
Saccharose	AppliChem
Sulpiride	Tocris
Stereotaktisches Gerät	Stoelting

---

Tamoxifen	Sigma
Tissue Tek® Compound	Sakura
Tris	Roth
Triton X-100	Sigma

### 2.1.3 Puffer und Lösungen

*PBS, 10 mM, pH 7.4*

H<sub>2</sub>O dest., 0.12 M NaCl, 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

*TBS*

für 1l 10 mM: 60.6 g Tris, 87.6 g NaCl, 1 M HCl, H<sub>2</sub>O dest.

*Citratpuffer (immuno in vitro), pH = 6.0*

9 ml Lösung A (0.1 M Zitronensäure), 41 ml Lösung B (0.1 M Natriumcitrat), 450 ml H<sub>2</sub>O dest.

### 2.1.4 Immunhistochemie (in vivo)

*Präinkubationslösung I (TH, AADC)*

10% Eseserum; 1% BSA; 0.3% Triton in PBS

*Präinkubationslösung II (Doppelfärbung TH und Gad67)*

4% Ziegen Serum, 1% BSA, 0.005% Triton in 100 mM PBS

*Antikörperverdünner I (TH, AADC)*

4% Eseserum, 1% BSA in PBS

*Antikörperverdünner II (Doppelfärbung TH und Gad67)*

4% Ziegen Serum, 1% BSA, 0.005% Triton in PBS

### 2.1.5 Immunhistochemie (in vitro)

*Präinkubationslösung III (TH, AADC)*

10% Ziegen Serum, 1% BSA, 0.3% Triton in TBS

*Antikörperverdünner III (TH, AADC Primärantikörper)*

10% Ziegen Serum, 1% BSA in TBS

*Antikörperverdünner IV (TH, AADC Sekundärantikörper)*

4% Ziegen Serum, 1% BSA in TBS

### 2.1.6 6-OHDA Läsion

*Prä-Lösung*

flüssiges NaCl (0,9%), 500 IE/dl Heparin NA 2500, 0.5 g/dl Procain hydrochlorid

*Perfusion solution, pH 7.4*

0.125 M Phosphat-Puffer, 4% PFA

*Phosphat-Puffer (nach Sörensen), 0.1 M, pH 7.4*

H<sub>2</sub>O dest., Lösung X: 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, Lösung Y: 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O

100 ml H<sub>2</sub>O dest., 40.5 ml Lösung X, 9.5 ml Lösung Y

### 2.1.7 Organotypische Kulturen

*Präparier-Puffer*

HBSS ohne Phenolrot mit 0.45% Glucose, 25 mM HEPES

*Kulturmedium nach Stoppini, Buchs und Müller [74]*

MEM-HEPES; 25% Pferdeserum; 25% HBSS; Zugabe von Glucose (Endkonzentration 6.5 mg/ml);

1% Penicillin/Streptomycin; pH=7.2

*Kulturmedium nach Norberg, Kristensen und Zimmer [58]*

50% OPTI-MEM, 25% HBSS (mit Phenolrot, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Glucose 1 g/l und Natriumbicarbonat); 0,5% Glucose, 25% Pferdeserum.

Umstellung nach drei Tagen auf ein serumfreies Medium: Neurobasales Medium, 1x B27 Supplement, 1 mM Glutamin.

Tabelle 2: Medien und Puffer

Medium	Bestell-Nr.	Hersteller
HBSS-Puffer	14025-050	Gibco
HEPES (PAA)	S11-001	Gibco
MEM-Hepes	32360-026	Gibco
neurobasales	Medium 12348-017	Gibco
OPTI-MEM	11058-021	Gibco

## 2.1.8 Antikörper und Seren

Tabelle 3: Primärantikörper

Primärantikörper	Wirt	Verdünnung	Bestell-Nr.	Hersteller
Anti-AADC	Kaninchen (polyklonal)	1:500	ab3905	abcam
Anti-TH	Kaninchen (polyklonal)	1:1000	ab112	abcam
Anti-TH	Maus	1:1000	22941	Immunostar
Anti-Gad67	Maus	1:1000	MAB5406	Chemicon

## 2.1.9 Tiere

Es wurden Sprague-Dawley Ratten, eine Wistar-Ratte und Glaxo : : CreERT2 GFP – Mäuse (Slc1a3tm1(cre/ERT2) Mgoe; Tg (CAG-cat, -EGFP) 1Rbns) verwendet. Die Tiere wurden bei einer Temperatur von 20-22 °C mit 50-60% Luftfeuchtigkeit und einem regelmäßigen Tag-Nacht-Rhythmus in mit Sägespänen ausgestreuten Standard-Käfigen gehalten. Hier hatten die Tiere nach Belieben Zugang zu gebräuchlichem Ratten- bzw. Mäuse-Futter sowie zu Wasser. Alle Experimente wurden im Einverständnis mit der European Communities

Tabelle 4: Sekundärantikörper

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Wirt</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Bestell-Nr.</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-Kaninchen Alexa Fluor 488	Esel	1:1000	A21206	life technologies
Anti-Maus Alexa Fluor 555	Esel	1:1000	A31570	invitrogen
Anti-Kaninchen Alexa Fluor 488	Ziege	1:1000	A11034	Molecular Probes
Anti-Kaninchen Alexa Fluor 546	Ziege	1:1000	A11010	Molecular Probes
Anti-Maus Alexa Fluor 488	Ziege	1:1000	A1101	Molecular Probes
Anti-Maus Alexa Fluor 546	Ziege	1:1000	A11030	Molecular Probes

Tabelle 5: Serum

<b>Serum</b>	<b>Bestell-Nr.</b>	<b>Hersteller</b>
Eselserum	D9663	Sigma-Aldrich
Pferdeserum	1270-100	Sigma
Ziegenserum	G9023	Sigma

Council Directive (86/608/EEC) durchgeführt, um die Sorgfalt bei der Verwendung der Tiere für Versuchsvorgänge zu bewahren. Zudem wurden die Experimente vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt. Darüber hinaus wurde versucht, die Unannehmlichkeiten sowie Schmerzen der Tiere so gering wie möglich zu halten.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Stereotaktische 6-OHDA-Läsion an Sprague-Dawley Ratten

Die biventrikuläre 6-OHDA-Läsion wurde von Sandro Caradonna (PhD-Student) durchgeführt und folgte stets demselben Protokoll, das im Anschluss beschrieben ist.

Die Experimente wurden an erwachsenen, männlichen Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von 240-310 g durchgeführt. 20 Minuten vor dem Eingriff wurde den Ratten 30 mg Nortryptilin/kg KG i.p. gespritzt. Dies bewirkt eine effiziente Hemmung des Noradrenalintransporters der Präsynapse. Über diesen Transporter kann ebenfalls die Aufnahme des Neurotoxins 6-OHDA erfolgen, welches einen Untergang noradrenerger Neurone zur Folge hätte. Die Blockade dieses Transporters mittels der Prä-Inkubation mit Nortryptilin ist erwünscht, um einen gezielten Untergang der dopaminergen Neuronen sicherzustellen. Es folgte eine Narkose der Ratten mit Isofluran (Airflow: 1000 ml; initial: 2-4 %; während der Läsion 1.5 – 2 %; 5 Min vor Ende der Läsion 0 %). Der Kopf wurde auf ein stereotaktisches Instrument gelegt. Um eine kontinuierliche Narkose zu gewährleisten, wurde Isofluran über eine Maske verabreicht, die auf der Tiernase befestigt war. Die Augen wurden mit einer Augensalbe bedeckt, um einem möglichen Austrocknen der Augen zu vorbeugen. Außerdem wurde zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur ein Wärmekissen unter das Tier gelegt. Die Koordinaten für die bilaterale intraventrikuläre 6-OHDA – Läsion waren AP: -0.7; L: +/- 1.3 und DV: -3.6 [63]. Passend zu diesen Läsionsstellen wurde vorsichtig mit einem Zahnarztbohrer ein Loch in den Schädel gebohrt. Die anschließende Injektion einer Einfachdosis von 105 µg 6-OHDA gelöst in 10 µl 0.1% Ascorbinsäure in den lateralen Ventrikel wurde mit Hilfe einer Hamilton Spritze mit einer Rate von 2.5 µl/Min durchgeführt. Nach der Injektion wurde die Nadel für einige Minuten im Seitenventrikel belassen, um einer Ausbreitung der 6-OHDA-Lösung im Gehirn vorzubeugen. Daraufhin wurde die Nadel langsam zurückgezogen. Das gleiche Vorgehen wurde auch bei dem anderen Seitenventrikel angewendet. Zum Schein behandelte Tiere (Kontrollgruppe) erhielten eine Einfachdosis von 10 µl 0.1% Ascorbinsäure in die Seitenventrikel. Nach der Behandlung wurde allen Ratten eine Injektion mit 5 µg Fentanyl/kg KG gegen postoperativen Schmerz gegeben. Da eine 6-OHDA-Läsion zu Aphagie und Adipsie führen kann, wurde in den folgenden Tagen das Körpergewicht und Fressverhalten der Tiere engmaschig kontrolliert. Diese Überwachung zeigte, dass die mit 6-OHDA behandelten Ratten eine zu einem gewissen Grad verminderte Nahrungsaufnahme und reduziertes Trinkverhalten aufwiesen. Wenn es nötig war, bekamen die Tiere Brei mit einer Pipette.



### **2.2.2 Vorbereitung des Gehirn-Gewebes für die Immunhistochemie**

Vier Tage nach der 6-OHDA-Läsion wurden Ratten mit 65 mg Narcorene-Lösung/kg KG narkotisiert und für 5 Minuten mit einer Präperfusions-Lösung (flüssiges NaCl (0,9%); 500 IE/dl Heparin NA 2500; 0.5 g/dl Procainhydrochlorid) transkardial perfundiert. Darauf folgte eine Perfusion mit 250 ml Perfusionslösung (4% Paraformaldehyd (PFA)). Die Gehirne wurden entnommen, bei 4 °C für 2 Stunden in 4% PFA nachfixiert und anschließend für zwei Stunden bei 4 °C in 10 mM PBS inkubiert. Zur Vorbereitung für anschließende Kryoschnitte wurden die Gehirne über Nacht in 10 mM PBS mit zusätzlich 30% Saccharose zur Verhinderung von Kristallbildung und als Kälteschutz gelegt.

Am Folgetag wurden die Gehirne für die Herstellung von Kryoschnitten aufgefroren. Hierzu wurde das Gehirngewebe jeweils so in einem Aluminiumförmchen positioniert, dass später mit einem Kryotom Frontalschnitte des gefrorenen Gehirn-Gewebes angefertigt werden konnten. Daraufhin wurde das Förmchen mit Tissue Tek aufgefüllt, bis das gesamte Gewebe darin eingebettet war. Das Aluminiumförmchen wurde anschließend mit Hilfe einer Pinzette in ein durch flüssigen Stickstoff (-180 °C) gekühltes Gefäß mit 2-Methylbutan wiederholt kurz für eine Sekunde eingetaucht bis der gesamte Inhalt des Aluminiumförmchens gefroren war. Mit einem Kryotom wurden koronare Schnitte hergestellt. Von den Gehirnen der mit 6-OHDA- sowie zum Schein behandelten Sprague-Dawley-Ratten wurden Koronarschnitte (20 µm) auf Höhe der Commissura anterior (Bregma -0.26 bis -1.4) angefertigt. Zur Herstellung von Schnitten für Kontrollfärbungen wurden Schnitte (14 µm) des Mittelhirns im Bereich der Subst. nigra einer Wistar-Ratte angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte auf Objektträger gelegt und auf diesen bei -20 °C bis zur Durchführung der folgenden Immunhistochemie gelagert.

### **2.2.3 Immunhistochemie an Gefrierschnitten von Gehirn-Gewebe von 6-OHDA-läsionierten Ratten**

Die Gefrierschnitte von mit 6-OHDA-läsionierten Ratten wurden immunhistochemisch gegen folgende Antikörper gefärbt: TH, AADC und Gad67. Zu Beginn wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für eine Stunde getrocknet, mit einem DAKO Pen umrundet und für 5 Min in 100 mM PBS gewaschen. Dann wurden sie 60 Min in einer Präinkubationslösung (s. Tabelle 6) inkubiert, um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu verringern. Darauf folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in Antikörperverdünner (s. Tabelle 7) über

Tabelle 6: Präinkubationslösung

<b>Färbung</b>	<b>Präinkubationslösung</b>
TH und AADC	10% Eselserum 1% BSA 0.3% Triton in 100 mM PBS
Doppelfärbung gegen TH und Gad67	4% Ziegenserum 1% BSA 0.005% Triton in 100 mM PBS

Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. (Ausnahme: Die Inkubation mit dem Antikörper gegen AADC erfolgte bei Raumtemperatur.) Die primären Antikörper wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt: TH (monoklonal) 1:1000; TH (polyklonal) 1:1000; AADC 1:500 (polyklonal); Gad67 1:1000 (monoklonal).

Am Folgetag wurden die Schnitte gewaschen (1x Ampuwa; 3x für 10 Min bei RT in 100 mM PBS) und mit dem geeigneten Sekundärantikörper in Antikörperverdünner verdünnt inkubiert (RT, 75 Min). Zur Markierung von TH wurde ein mit Alexa 555 konjugierter Esel-Anti-Maus-Antikörper (1:1000) verwendet, zur Markierung von AADC ein mit Alexa 488 konjugierter Esel-Anti-Kaninchen-Antikörper (1:1000). Bei der Immunhistochemie gegen TH und Gad67 wurde zur Markierung von TH ein mit Alexa 546 konjugierter Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (1:1000) eingesetzt, zur Markierung von Gad67 ein mit Alexa 488 konjugierter Ziege-Anti-Maus-Antikörper (1:1000). Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die Schnitte gewaschen (1x Ampuwa; 3x für 10 Min bei RT in 100 mM PBS). Darauf folgte für 10 Min eine Inkubation mit DAPI (Sigma; 1:1000) zur Färbung der Zellkerne und erneutes Waschen der Schnitte (1x Ampuwa; 3x für 10 Min bei RT in 100 mM PBS). Für die mikroskopische Auswertung wurden die Schnitte in Moviol eingedeckelt. Die Doppelmarkierung gegen TH und Gad67 erfolgte mit beiden Primärantikörpern synchron. Ebenso auch die anschließende Inkubation mit den Sekundärantikörpern. Die Doppelmarkierung gegen TH und AADC wurde wegen der unterschiedlichen Inkubation-Temperatur sukzessive durchgeführt. Zuerst erfolgte wie oben beschrieben die Inkubation mit dem Primärantikörper gegen AADC über Nacht (RT) und am Folgetag die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (RT, 75 Min). Darauf folgte die Inkubation gegen TH (s.o.).

Tabelle 7: Antikörperverdünner Primärantikörper

<b>Färbung</b>	<b>Antikörperverdünnung</b>
TH und AADC	4% Eselserum 1% BSA in 100 mM PBS
Doppelfärbung gegen TH und Gad67	4% Ziegenserum 1% BSA 0.005% Triton in 100 mM PBS

## 2.2.4 Organotypische Kulturen von Gehirnschnitten aus Glast : : CreERT22 GFP – Mäusen

### Präparation des Gehirngewebes für organotypische Schnittkulturen

Organotypischen Schnittkulturen wurden aus Gehirnen von ein bis drei Tage postpartum dekapitierten (P1, P2, P3) Glast : : CreERT22 GFP – Mäusen hergestellt. Auf Eis wurden die Kopfhaut, Kalotte und Meningen mit Präparationsbesteck entfernt und das Gehirn entnommen. Dieses wurde in gekühltem Präparier-Puffer (Hank´s basal solution ohne Phenolrot mit 0,45% Glucose, 25 mM HEPES) präpariert und zugeschnitten. Mit einem Tissue Chopper wurden 300-400 µm dicke Schnitte aus dem Bereich der Commissura anterior, der ca. Bregma +1,53 bis ca. -0,23 entspricht, angefertigt. Diese Schnitte wurden auf 6 sterile und durchlässige Millicell-CM Membranen in einer Platte mit 6 Schalen ausgelegt (s. Abbildung 5). Diese Schalen waren bereits mit je 1 ml des Kulturmediums so vorgelegt, dass sie die Membranen nicht berührten. Für eine Kultur des Gehirngewebes sind das gute Bedingungen, da das Gewebe Kontakt zur Luft hat und zusätzlich durch die Membran hindurch mit ausreichend Medium versorgt wird [74]. Es wurden separat zwei verschiedene Medien verwendet. Drei der Schalen waren mit dem von Stoppini et al. [74] beschriebenen Medium ausgelegt. In den anderen drei Schalen wurde das Medium nach Norberg et al. [58] verwendet. Das letztere Medium wurde nach drei Tagen auf ein serumfreies Medium umgestellt. Beide Medien wurden alle 48 h gewechselt. Hierfür wurde das alte Medium aus der jeweiligen Schale mit einer Pipette entfernt und durch 1 ml frisches Medium ersetzt, ohne dass dabei das Medium auf die Membran gelangte.

## Noraberg et al. (ohne Serum und Phenolrot)



## Stoppini et al. (mit Serum und Phenolrot)

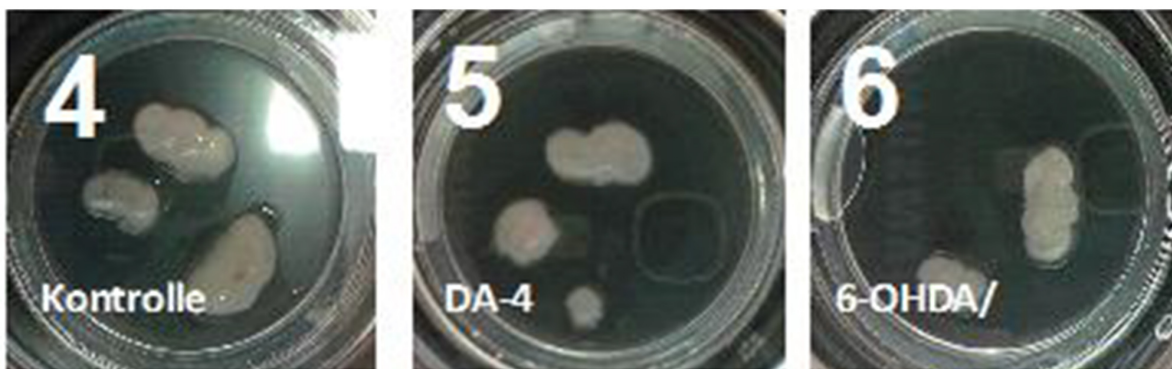


Abbildung 5: organotypische Kulturen nach 8 DIV: Platte mit 6 Schalen und inserts (Millicell-CM Membranen), darauf 300-400  $\mu\text{m}$  dicke Gehirn-Schnitte im Bereich der Commissura anterior v. GlastCreERT- Mäusen (P1-P3) 1-3 Medium nach Noraberg et al. [58] 4-6 Medium nach Stoppini et al. [74] 1,4 Kontrolle (unbehandelt) 2, 5 Dopamin  $10^{-4}$  M 3, 6 6-OHDA/ Dopamin  $10^{-6}$  M + Tamoxifen

### Behandlung der organotypischen Kulturen mit Dopamin bzw. 6-OHDA

Die organotypischen Kulturen wurden über 8 Tage in einem Inkubator bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\% \text{CO}_2$  inkubiert und wie im Folgenden beschrieben alle 24 h mit Hilfe einer Pipette behandelt. Je Medium wurde eine Schale mit  $10^{-4}$  M Dopamin behandelt. Eine weitere Schale je Medium wurde mit  $10^{-6}$  M Dopamin und zusätzlich Tamoxifen behandelt. Alternativ zur Behandlung

mit  $10^{-6}$  M Dopamin und zusätzlich Tamoxifen wurde mit  $15 \mu\text{M}$  6-OHDA behandelt. Zudem blieb je Medium immer eine Schale als Kontrolle unbehandelt (siehe Abbildung 5). Nach 8-tägiger Behandlung der organotypischen Kulturen wurden die Membranen aus den Ringen, über die sie in den Schalen befestigt waren, herausgeschnitten und für 2 h bei  $4^\circ\text{C}$  mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden sie einmal mit 10 mM PBS mit Magnesium und Calcium gewaschen und über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  in 30 % Saccharose gegeben.

### **Behandlung der organotypischen Kulturen mit Dopaminrezeptor-Antagonisten**

In weiteren organotypischen Kulturen wurden Schnitte neben dem Medium nach Noraberg et al. [58] zusätzlich mit  $15 \mu\text{M}$  6-OHDA und jeweils einem Dopaminrezeptor-Antagonisten behandelt. Als D1-Rezeptor-Antagonist wurden zusätzlich  $100 \mu\text{M}$  SCH23390 appliziert, als D2-Rezeptor-Antagonist  $100 \mu\text{M}$  Sulpiride.

### **Behandlung der organotypischen Kulturen mit Dopaminrezeptor-Agonisten**

In weiteren organotypischen Kulturen wurden Schnitte neben dem Medium nach Noraberg et al. [58] zusätzlich mit jeweils einem Dopaminrezeptor-Agonisten behandelt. Als D1-Rezeptor-Agonist wurden zusätzlich  $100 \mu\text{M}$  SKF-R(+38393) appliziert, als D2-Rezeptor-Agonist  $100 \mu\text{M}$  Quinpirol.

## **2.2.5 Immunhistochemie von organotypischen Kulturen aus Gehirngewebe von Mäusen**

### **Immunhistochemie der mit Dopamin bzw. 6-OHDA behandelten organotypischen Kulturen**

Gefrierschnitte von mit Dopamin bzw. 6-OHDA behandelten organotypischen Kulturen (Stoppini, 1991 [74]; Noraberg, 1999 [58]) wurden immunhistochemisch gegen folgende Antikörper gefärbt: TH und AADC. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur (RT) für 15 Min getrocknet und 5 Min in TBS (pH = 7.4, 10 mM) gewaschen. Dann wurden die Schnitte kurz in Ampuwa getaucht und für 3 Min in Citratpuffer (10 mM, pH = 6.0) im Dampfgerar inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte erneut kurz in Ampuwa getaucht, 5 Min in TBS (pH = 7.4, 10 mM) gewaschen und mit einem Dako-Pen umrandet. Es folgte eine Inkubation

mit dem Dako endogenous Blocking System (DAKO) für 10 Min bei RT. Danach wurde die Blocking Solution abgeklopft und die Schnitte 60 Min bei RT in einer Präinkubationslösung (10 % Ziegen Serum, 1 % BSA, 0.3 % Triton in 10 mM TBS) inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Präinkubationslösung abgeklopft und die Schnitte wurden mit dem Primärantikörper in Antikörperverdünner (10 % Ziegen Serum, 1 % BSA in 10 mM TBS) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die primären Antikörper wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt: TH (monoklonal) 1:1000; AADC (polyklonal) 1:500. Am Folgetag wurden die Schnitte gewaschen (1x in Ampuwa getaucht, 3x für 5 Min bei RT in 10 mM TBS) und mit dem geeigneten Sekundärantikörper in Antikörperverdünner (4 % Ziegen Serum, 1 % BSA in 10 mM TBS) inkubiert (RT, 60 Min). Zur Markierung von TH wurde ein mit Alexa 546 konjugierter Ziege-Anti-Maus-Antikörper (1:1000) verwendet, zur Markierung von AADC ein mit Alexa 488 konjugierter Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (1:1000). Nach der Inkubation wurden die Schnitte gewaschen (1x in Ampuwa getaucht, 3x für 5 Min in 10 mM TBS). Darauf folgte für 10 Min eine Inkubation mit DAPI (Sigma; 1:1000) zur Färbung der Zellkerne und erneutes Waschen der Schnitte (1x in Ampuwa getaucht, 3x für 5 Min in 10 mM TBS). Für die mikroskopische Auswertung wurden die Schnitte in Moviol eingedeckelt.

### **2.2.6 Mikroskopische Auswertung der Immunhistochemie**

Immunhistochemisch angefärbte Schnitte, die mit einem mit Alexa-Farbstoff konjugierten Sekundärantikörper markiert waren, wurden mit Hilfe eines Zeiss Axioplan2 Fluoreszenz Mikroskops visualisiert, dokumentiert und ausgewertet. Hierbei wurden die jeweiligen Farbstoffe durch ein auf eine geeignete Wellenlänge reduziertes Licht angeregt. Dieses wurde mit Hilfe eines Auflichtfilters produziert. Die angeregten Farbstoffe emittierten Licht mit einer schwächeren Intensität sowie einer verglichen zur Wellenlänge des anregenden Lichts höheren Wellenlänge. Dieses emittierte Licht wurde unter der Verwendung eines Emissionsfilters betrachtet (s. Abbildung 6).

Der Fluoreszenz-Farbstoff des mit einem mit Alexa 488 konjugierten Antikörpers wurde mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und erschien durch das emittierte, langwelligere Licht grün. Die Fluoreszenz-Farbstoffe der mit einem mit Alexa 546 und Alexa 555 konjugierten Antikörper wurden mit Licht einer Wellenlänge von 546 nm bzw. 555 nm angeregt und erschien durch das emittierte, langwelligere Licht jeweils rot (s. Tabelle 8). Mit DAPI (Sigma) markierte DNA der Zellkerne wurde mit ultraviolettem Licht angeregt und erschien blau.

Tabelle 8: anregendes und emittiertes Licht

Fluoreszenz-Farbstoff	Wellenlänge Anregungslicht	Farbe des emittierten Lichts
Alexa 488	488 nm	grün
Alexa 546	546 nm	rot
Alexa 555	555 nm	rot

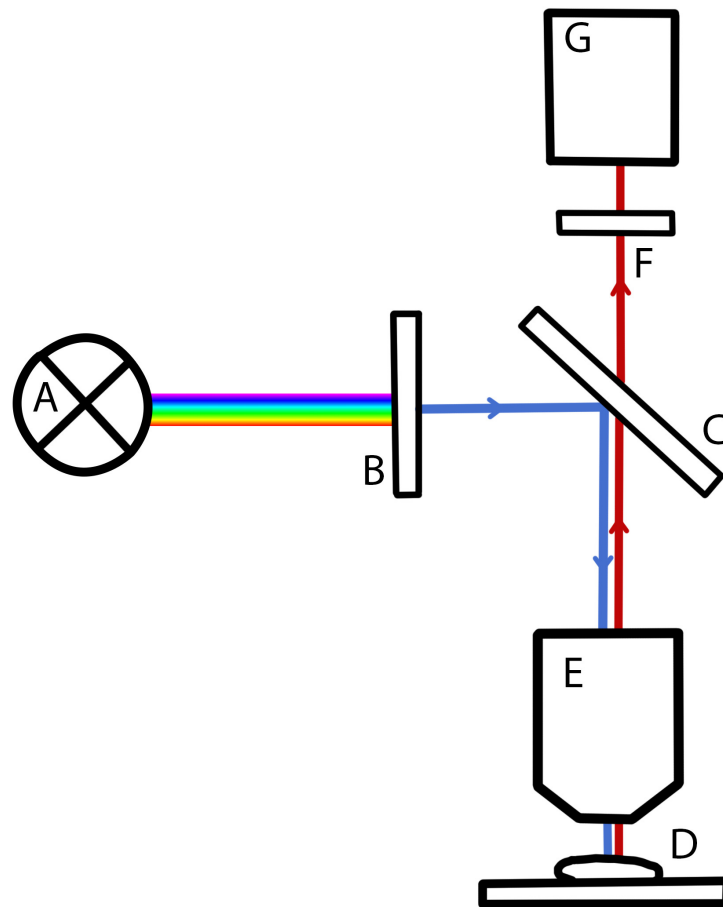


Abbildung 6: Strahlengang Fluoreszenzmikroskop: A: Lichtquelle; Aurlchtfilter (B) filtert das Licht mit der benötigten Wellenlänge heraus; C: Spiegel; D: Präparat, angeregter Fluoreszenz - Farbstoff emittiert Licht einer höheren Wellenlänge; E: Okular; Emissionsfilter (F) filtert das langwelligere Emissionslicht heraus, verhindert mögliches Durchtreten des Anregungslichtes; G: Objektiv

Die Schnitte wurden in quadratischen Feldern mit einer Vergrößerung von 10 x 20 (Okular x Objektiv) betrachtet und positiv angefarbte Zellen durch Zählen quantitativ erfasst. Zellen wurden als positiv erfasst, wenn sie eine eindeutig stärkere Fluoreszenz als der umgebende Hintergrund sowie keine Autofluoreszenz durch Kontrolle der anderen Farbkanäle aufwiesen und zudem einen mit DAPI angefarbten Zellkern zeigten. Bei der quantitativen Erfassung der TH-positiven Zellen im Striatum von 6-OHDA-läsionierten sowie zum Schein behandelten Ratten wurde jeweils einmal von dorsal nach rostral sowie von lateral nach medial jedes zweite Sichtfeld ausgewertet (s. Abbildung 7).

Für die Auswertung der organotypischen Kulturen wurden jeweils alle TH- sowie AADC-positiv angefarbten Zellen im ganzen Schnitt erfasst. Die für TH und AADC einfach positiven Zellen wurden ebenso wie die für TH und AADC doppelt positiven Zellen jeweils als einzelne Gruppe ausgezählt. Hierfür wurde mit Hilfe einer quadratischen Blende ein quadratisches Sichtfeld erzeugt und sukzessive jedes Sichtfeld einzeln quantitativ ausgewertet.

Schließlich wurden die Werte der jeweiligen Sichtfelder je Schnitt addiert, sodass der absolute Wert der für TH- und AADC- einfach positiven Zellen von jedem gesamten Schnitt vorlag. Zudem wurden die Werte der Sichtfelder der für TH- und AADC- doppelt positiven Zellen ebenfalls zusammenaddiert, um die absoluten Werte von jedem gesamten Schnitt zu erhalten.

Die statistische Analyse wurde mittels Mann-Whitney Rank Sum Test durchgeführt.



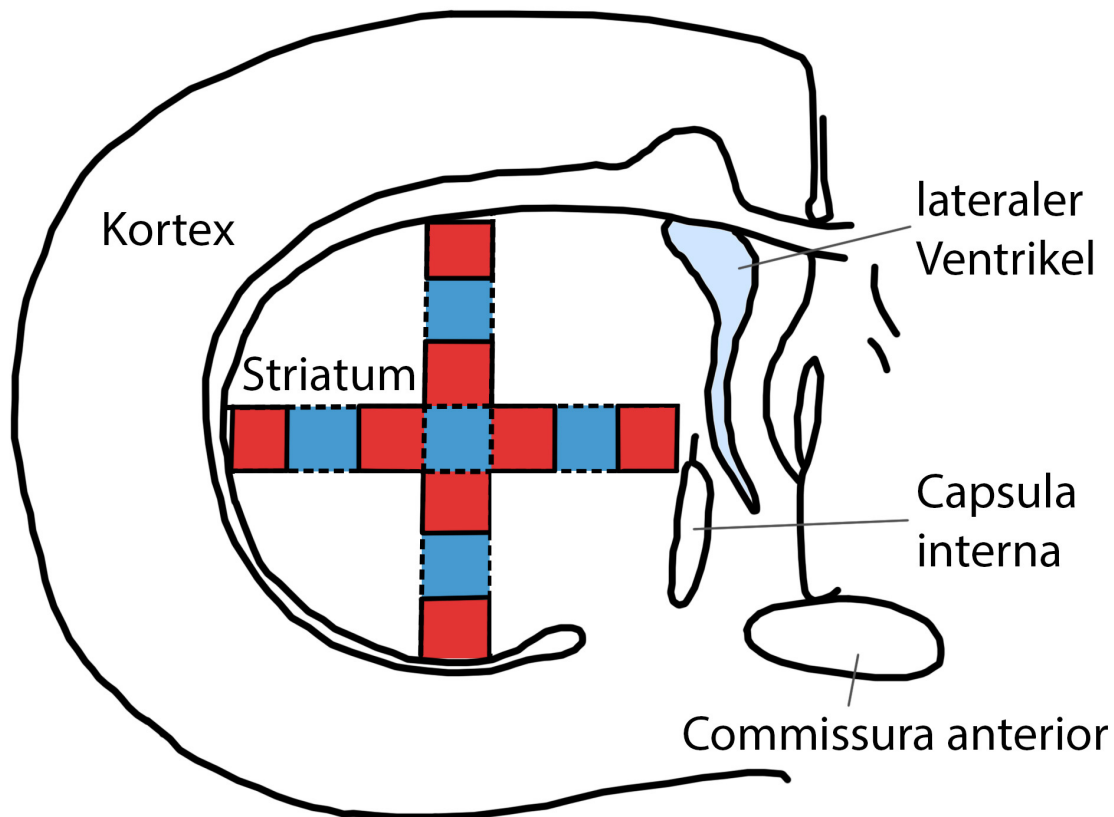


Abbildung 7: quantitative Erfassung der TH-positiven Zellen im Striatum von 6-OHDA-läsionierten sowie zum Schein behandelten Sprague-Dawley Ratten: Ausgewertet wurden die in der Abbildung rot dargestellten Quadrate; blau dargestellte Quadrate wurden nicht ausgewertet. Von dorsal nach rostral sowie von lateral nach medial wurde jeweils entlang einer Sichtfeld-breiten Linie jedes zweite Sichtfeld ausgewertet. Hierfür wurde mit Hilfe einer Blende ein quadratisches Sichtfeld erzeugt. In diesem wurden die positiven Zellen ausgezählt (rot); anschließend wurde das ausgewertete Sichtfeld verschoben; dieses neue Sichtfeld wurde nicht ausgewertet (blau); daraufhin wurde erneut das Sichtfeld verschoben und dieses (rot) wieder ausgewertet.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Ergebnisse in vivo

#### 3.1.1 Intrazerebroventrikuläre Injektion von 6-OHDA

##### - Auswirkung auf TH-Expression im Striatum

Erwachsene Sprague-Dawley Ratten wurden biventrikulär mit einer Injektion von 105 µg 6-OHDA gelöst in Ascorbinsäure oder als sham Tiere (scheinbar behandelt) nur mit Ascorbinsäure in die Seitenventrikel behandelt. 20 µm dicke koronare Gehirnschnitte auf Höhe der Commissura anterior (Bregma -0.26 bis -1.4) wurden anschließend immunhistochemisch gegen TH angefärbt. 4 Tage nach der Behandlung wurde im Striatum der mit 6-OHDA behandelten Ratten im Vergleich zu den Kontrollen ein 12.6-facher Anstieg an TH-positiven Zellkörpern beobachtet (s. Abbildung 8)[83].

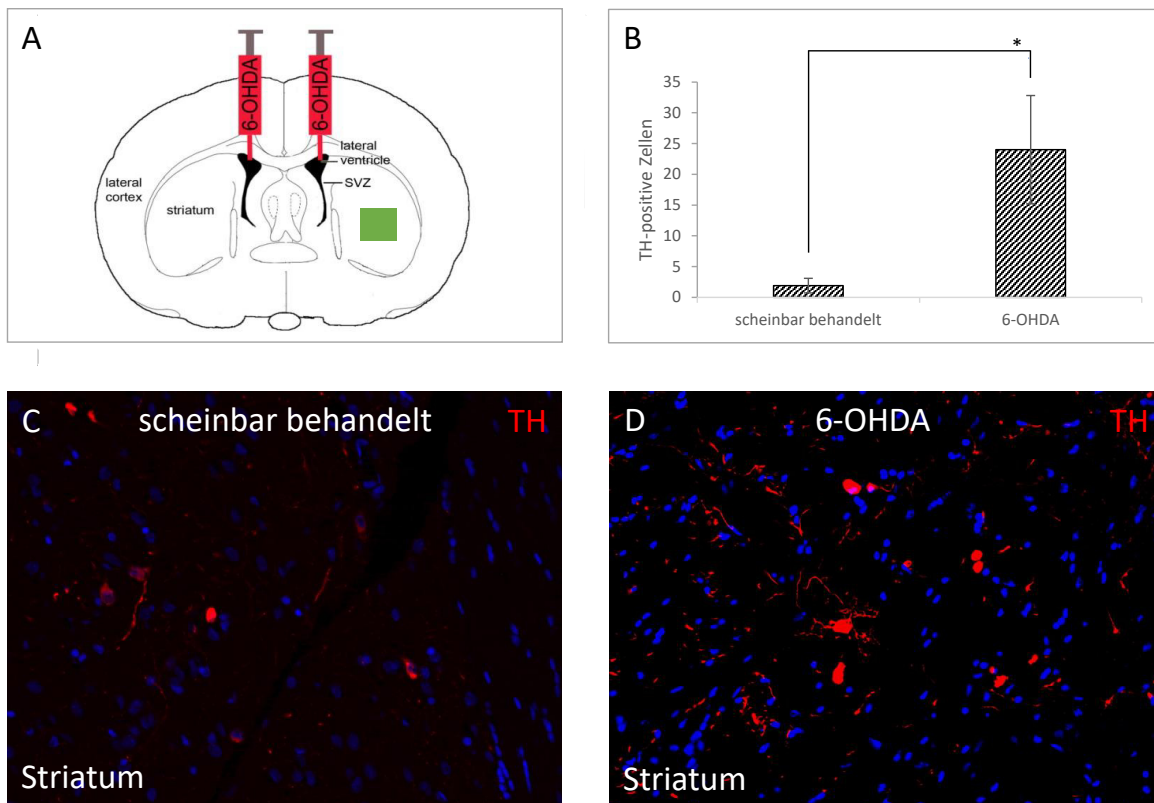


Abbildung 8: Immunhistochemische Darstellung von TH im Striatum erwachsener Sprague-Dawley Ratten 4 Tage nach sham- oder 6-OHDA-Behandlung (105  $\mu$ M)(TH rot; Kerne (DAPI) blau). A: schematische Ansicht von Rattenhirnschnitten im Bereich der intrazerebroventrikulären Injektion (Abbildung nach Wachter, Caradonna et al. 2014 [83]); grünes Quadrat zeigt den Bereich der abgebildeten Fotos (C, D); B: quantitative Analyse TH-positiver Somata; TH-positive Zellkörper: sham:  $1.9 \pm 1.2$  (n = 3); 6-OHDA:  $24 \pm 8.8$  (n = 3); Daten: Mittelwert  $\pm$  Standardfehler;  $p < 0.001$ , Mann-Whitney Rank Sum Test.

### 3.1.2 TH-positive Zellen im Striatum und AADC

Um die TH-positiven Zellkörper im Striatum der Sprague-Dawley Ratten, die eine 6-OHDA-Injektion (105  $\mu$ M) in beide Gehirnv ventrikel erhalten hatten, auf ihre Enzym-Expression genauer zu untersuchen, wurden koronare Gehirnschnitte dieser Tiere (n = 2) immunhistochemisch gegen TH und AADC doppelt angefärbt. Es zeigten sich vereinzelt AADC-positive Zellkörper. Darunter waren keine doppelt-gefärbten Zellkörper (s. Abbildung 9).

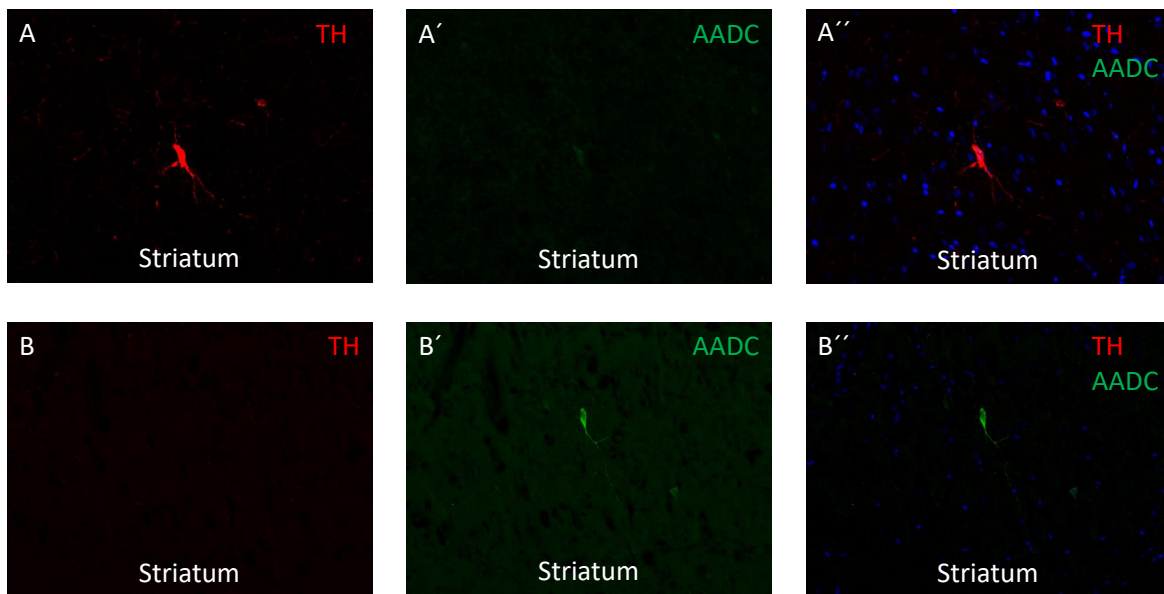


Abbildung 9: Repräsentative immunhistochemische Doppelfärbung gegen TH (rot) und AADC (grün) im Striatum erwachsener Sprague-Dawley Ratten 4 Tage nach intrazerebroventrikulärer Injektion von 105  $\mu\text{M}$  6-OHDA; Zellkerne (DAPI) blau. A-B: Keine Ko-Lokalisierung von TH und AADC.

### 3.1.3 TH-positive Zellen im Striatum und Gad67

Erwachsene Sprague-Dawley Ratten wurden intrazerebroventrikulär mit 105  $\mu\text{M}$  6-OHDA gelöst in Ascorbinsäure oder nur mit Ascorbinsäure (sham) behandelt. 20  $\mu\text{m}$  dicke koronare Gehirnschnitte wurden immunhistochemisch gegen TH und Gad67 doppelt gefärbt. Nach 4 Tagen wurden im Striatum unabhängig von der Behandlung Somata mit Gad67-Expression beobachtet. Keiner der Gad67-positiven Zellkörper exprimierte TH (s. Abbildung 10).

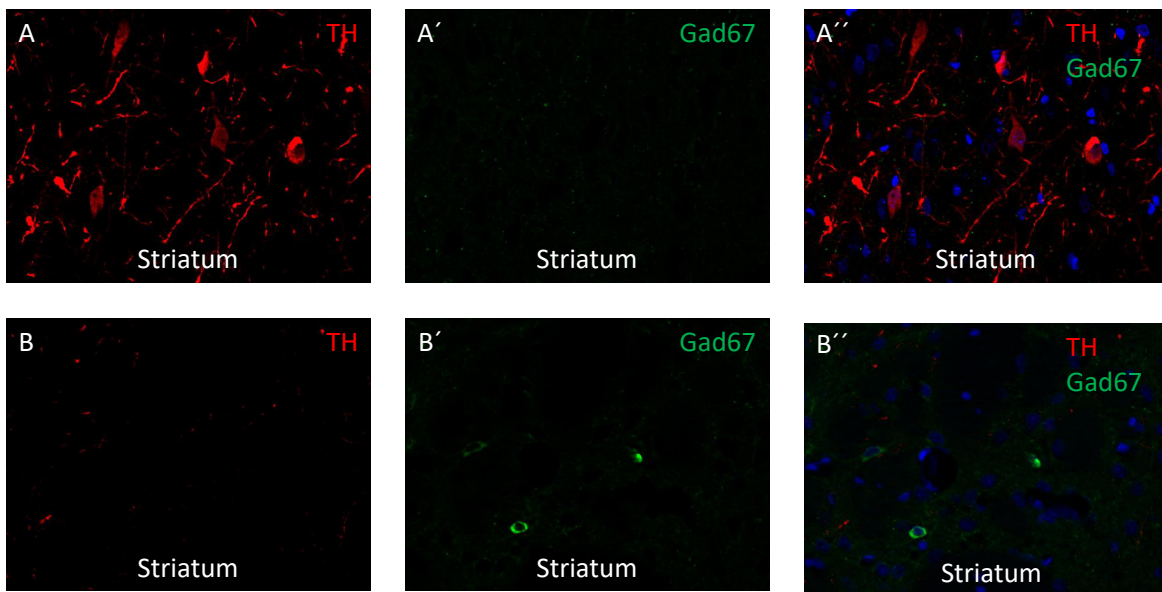


Abbildung 10: Charakterisierung des molekularen Phänotyps TH-positiver Zellkörper im Striatum 4 Tage nach 6-OHDA-Läsion. A-B: Betrachtung von zwei unterschiedlichen Schnitten; Repräsentative immunhistochemische Doppelfärbung gegen TH (A-A'') und gegen Gad67 (B-B''). Keine Ko-Lokalisierung. Zellkerne (DAPI) blau.

### 3.1.4 Zusammenfassung der in vivo Ergebnisse

Die intrazerebroventrikuläre Injektion von 105  $\mu\text{g}$  6-OHDA in erwachsene Sprague-Dawley Ratten resultierte verglichen mit scheinbar behandelten Ratten in einem 12.6-fachen Anstieg TH-positiver Zellkörper im Striatum [83]. Hierbei exprimierte bei immunhistochemischem Nachweis keine dieser Zellen zusätzlich AADC oder Gad67.

## 3.2 Ergebnisse in vitro

Um herauszufinden, ob die beobachtete vermehrte TH-Expression nach der Applikation von 6-OHDA Spezies-abhängig ist, wurden organotypische Kulturen aus dem Striatum neugeborener Mäuse erstellt. Auf eine intrazerebroventrikuläre Injektion von 6-OHDA in vergleichbarer Weise wie bei der Ratte wurde verzichtet, da sich diese Applikation bei Mäusen schwieriger gestaltet als bei Ratten. Mit dem Modell der organotypischen Kulturen wurde ein in vitro-Modell gewählt, dass sich durch eine größtmögliche "Lebensnähe" auszeichnet.

Für die Behandlung in organotypischen Kulturen wurden koronare Gehirnschnitte im Bereich der Commissura anterior von GLAST : : ERT2 GFP – Mäusen über 4 bzw. 8 Tage in einem Kulturmedium nach Norberg et al. [58] (nach drei Tagen ohne Serum) sowie alternativ über 8 Tage in einem Medium nach Stoppini et al. [74] (mit Serum) kultiviert. Daraufhin wurden sie immunhistochemisch gegen TH und AADC angefärbt. Mit der Gehirnregion in der Koronarebene auf Höhe der Commissura anterior wurde eine Gehirnregion von Mäusen ausgewählt, in der bisher bei unbehandelten Mäusen nach immunhistochemischer Färbung keine Zellkörper mit einer TH- oder AADC-Expression beobachtet wurden (Schnittebene vgl. Abbildung 11).

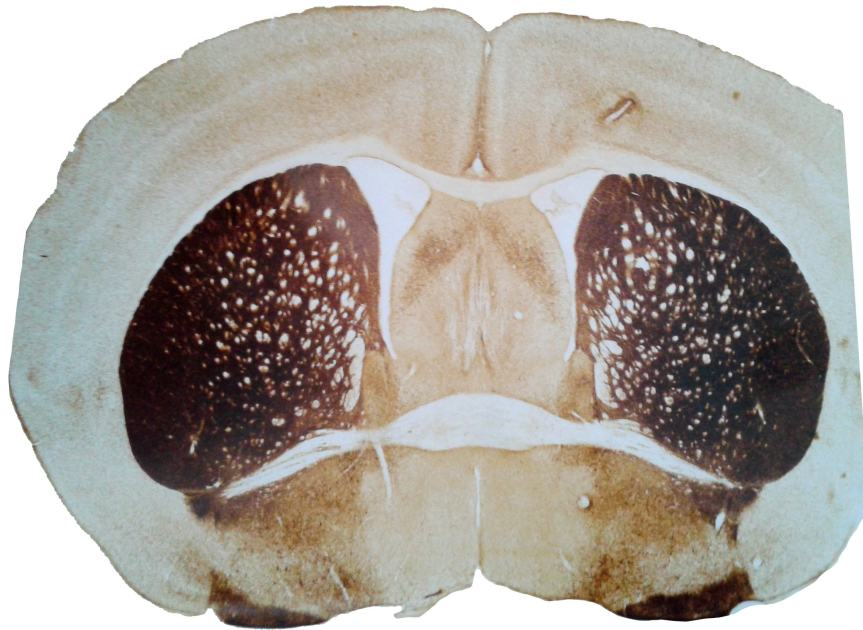


Abbildung 11: Koronarschnitt des Gehirns einer Maus auf Höhe der Commissura anterior. Bei unbehandelten Mäusen wurden auf dieser Schnittebene immunhistochemisch bisher keine Zellkörper mit TH- oder AADC-Expression beobachtet. (Abbildung aus: George Paxinos & Keith B.J. Franklin: *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 4th edition. Academic press. Elsevier [62]).

### 3.2.1 Enzym-Expression in organotypischen Kulturen

Nach 8-tägiger Kultivierung wurden unabhängig vom jeweiligen Kulturmedium TH-positive und AADC-positive Zellkörper beobachtet. Dabei wurden jeweils deutlich mehr TH- als AADC-positive Somata beobachtet (s. Abbildung 12). Zwischen den Gehirnschnitten, die im Medium nach Stoppini et al. [74] und denen, welche im Medium nach Noraberg et al. [58] kultiviert wurden, war kein Unterschied bezüglich der Enzym-Expression festzustellen. Das Medium nach Noraberg et al. [58] ist nach drei Tagen serumfrei und somit klarer definiert. Daher wurde bei den weiteren organotypischen Kulturen ausschließlich dieses Medium verwendet.

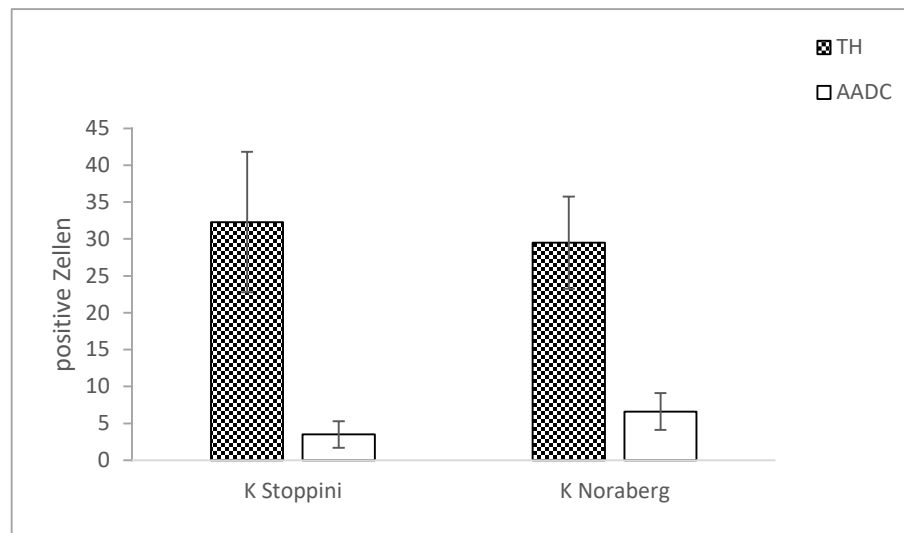


Abbildung 12: Quantitative Analyse der immunhistochemischen Färbung gegen TH und AADC nach 8 Tagen Kultivierung in unbehandelten organotypischen Kulturen von koronaren Gehirnschnitten im Bereich der Commissura anterior von GLAST : : ERT2 GFP Mäusen. Positive Zellkörper (Mittelwert): Stoppini: K: TH:  $32.278 \pm 9.524$  (n = 5); K AADC:  $3,5 \pm 1,794$  (n= 3); Noraberg: K TH:  $29,5 \pm 6,253$  (n = 8), K AADC:  $6,609 \pm 2,507$  (n = 6). Daten: Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

Die immunhistochemische Doppelfärbung von TH und AADC ergab in beiden Kultursystemen einige wenige doppelt-positive Zellkörper (s. Abbildung 13).



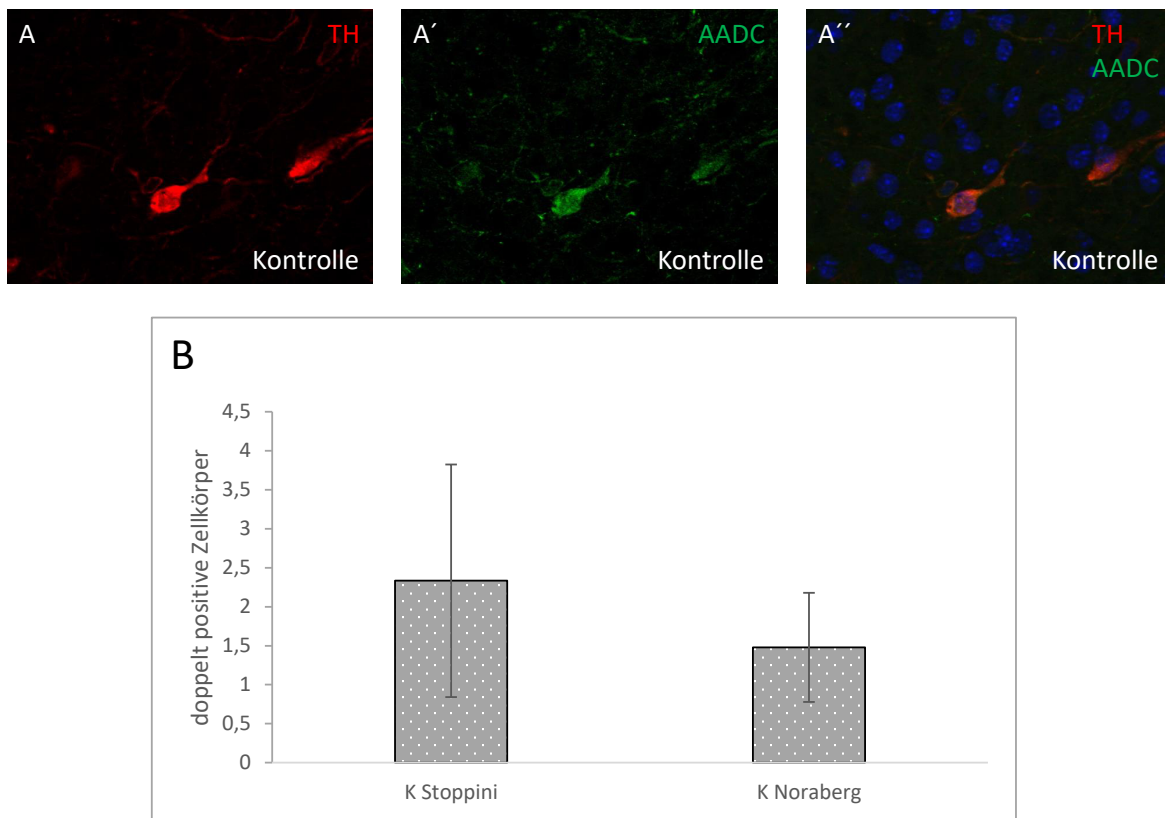


Abbildung 13: Repräsentative immunhistochemische Ko-Lokalisierung von TH (rot) und AADC (grün) nach 8-tägiger Kultivierung in unbehandelten organotypischen Kulturen in einem Medium nach Noraberg et al. [58]; Zellkerne (DAPI) blau. (A-A'').

B: Quantitative Analyse doppel-positiver Zellkörper, 8 DIV: Stoppini et al. [74]:  $2.333 \pm 1.491$  (n = 3); Noraberg et al. [58]:  $1.478 \pm 0.7$  (n = 6); Daten: Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

### 3.2.2 Einfluss von 6-OHDA auf Expression von TH und AADC

In organotypischen Kulturen aus dem Striatum neugeborener Mäuse zeigten sich nach 4 Tagen in Kultur in einem Medium nach Noraberg et al. [58] TH-positive Zellkörper ( $55.8 \pm 16.5$ , n = 3). Im weiteren Verlauf der Kultivierung nahm die Anzahl TH-positiver Zellkörper an Tag 8 deutlich ab auf  $29.5 \pm 6.253$  (n = 8). Die Behandlung mit 6-OHDA ( $15 \mu\text{M}$ ) über den Kulturzeitraum von 8 Tagen konnte diese Abnahme blockieren: Nach 8 Tagen war in den Kulturen eine signifikant höhere Anzahl an TH-positiven Zellen im Vergleich zu Kontrollkulturen zu diesem Zeitpunkt zu beobachten. Die behandelten Kulturen wiesen genauso viele TH-positive Zellkörper auf, wie Kontrollkulturen am Tag 4 (s. Abbildung 14).

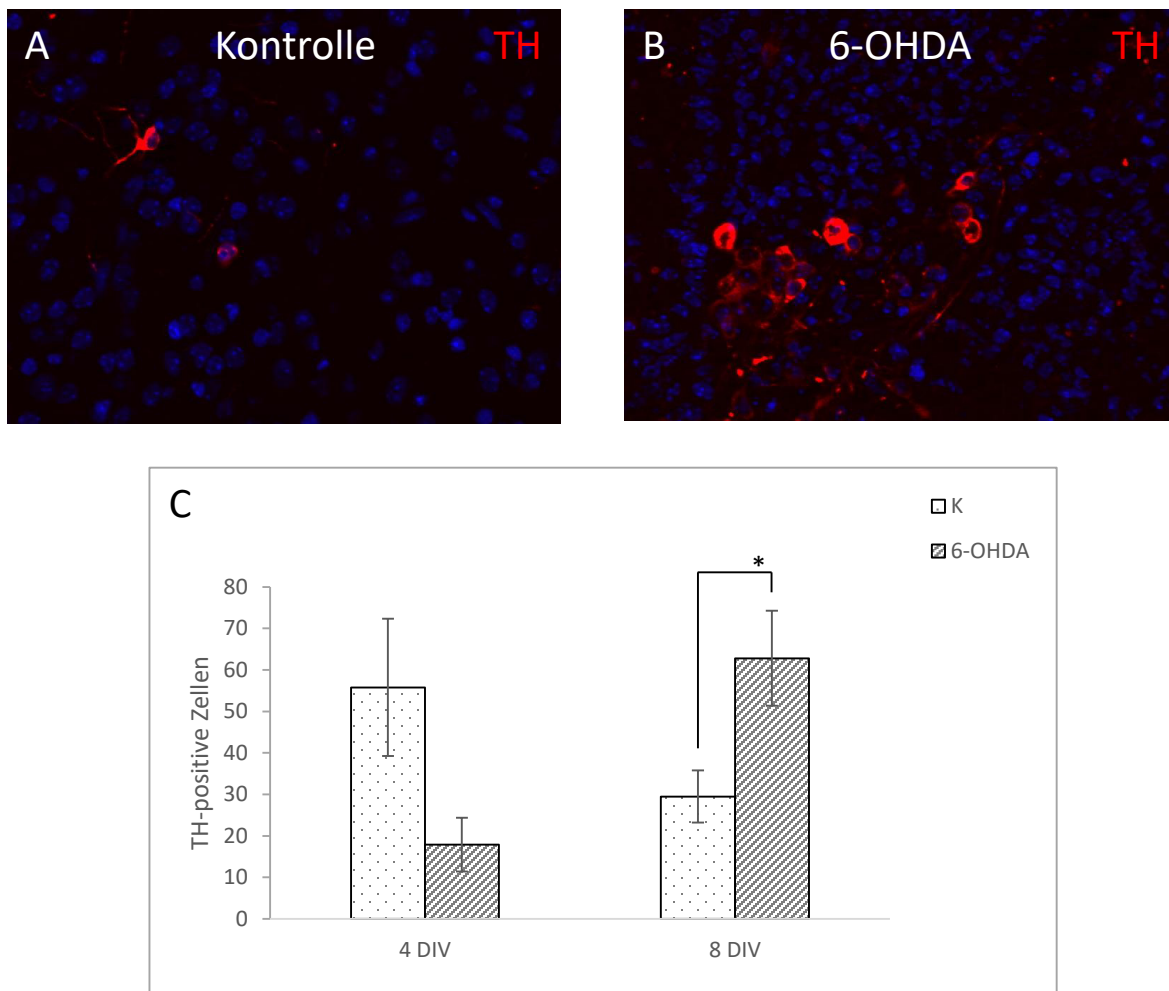


Abbildung 14: Repräsentative immunhistochemische Färbung gegen TH (A, B; TH rot; Kerne (DAPI) blau) von koronaren Gehirnschnitten aus GLAST : : ERT2 GFP Mäusen im Bereich der Commissura anterior nach 8-tägiger Kultivierung in organotypischen Kulturen in einem Medium nach Noraberg et al. [58].

C: Quantitative Analyse TH-positive Zellkörper: K 4 DIV:  $55.8 \pm 16.510$  (n = 3); 6-OHDA 4 DIV:  $17.875 \pm 6.474$  (n = 3); K 8 DIV:  $29.5 \pm 6.253$  (n = 8); 6-OHDA 8 DIV:  $62.818 \pm 11.439$  (n = 7); Daten: Mittelwert  $\pm$  Standardfehler; p (K 8 DIV vs 6-OHDA 8 DIV) = 0.037; Mann-Whitney Rank Sum Test.

Die Expression von AADC in den Kontrollen nahm über den Kulturzeitraum von 8 Tagen tendenziell zu. In den Gehirnschnitten der mit 15  $\mu$ M 6-OHDA behandelten organotypischen Kulturen zeigten sich sowohl nach 4 wie auch nach 8 Tagen vermehrt AADC-positive Zellen. Dies war jeweils ohne Signifikanz (s. Abbildung 15).

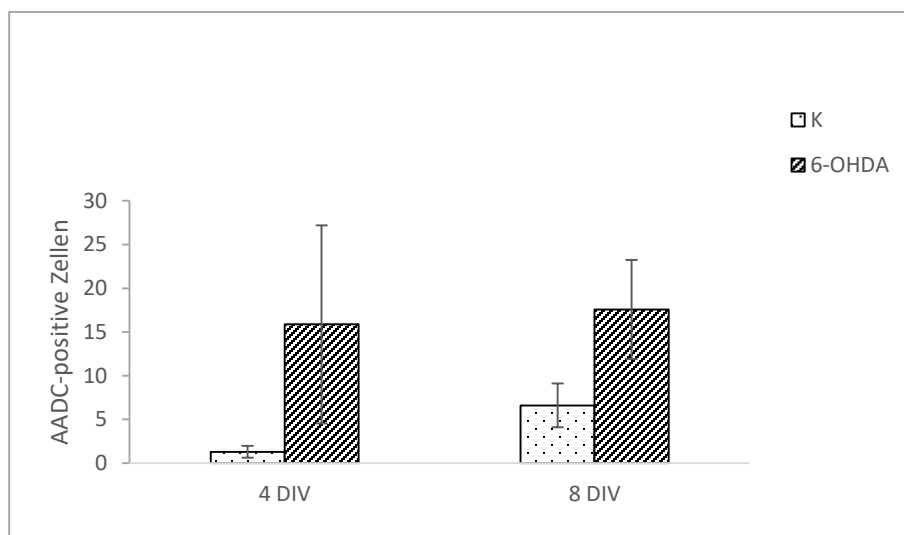


Abbildung 15: Quantitative Analyse immunhistochemischer Färbungen gegen AADC nach Kultivierung koronarer Gehirnschnitte im Bereich der Commissura anterior aus GLAST : : ERT2 GFP Mäusen nach 4- bzw. 8-tägiger Kultivierung in organotypischen Kulturen in einem Medium nach Noraberg et al. [58].

AADC-positive Zellkörper: K 4 DIV:  $1.3 \pm 0.667$  (n = 3); 6-OHDA 4 DIV:  $15.875 \pm 11.322$  (n = 3); K 8 DIV:  $6.609 \pm 2.507$  (n = 6); 6-OHDA 8 DIV:  $17.565 \pm 5.671$  (n = 6); Daten: Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

Doppelfärbungen der Schnitte mit Antikörpern gegen TH und AADC zeigten nach 4-tägiger Kultivierung keine doppelt-positiven Zellkörper. Nach 8-tägiger Kultivierung erschienen vereinzelt doppelt-gefärbte Zellen ( $2.348 \pm 0.789$  doppelt-positiv gefärbte Zellkörper (n = 6); Mittelwert  $\pm$  Standardfehler; s. Abbildung 16).

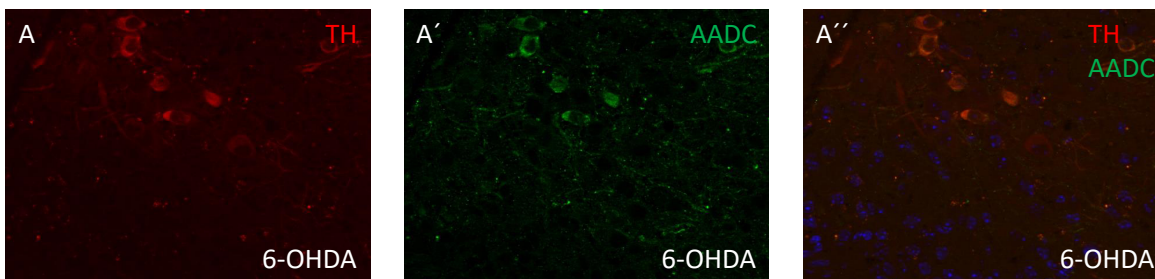


Abbildung 16: Repräsentative immunhistochemische Doppel-Färbungen gegen TH (rot) und AADC (grün) nach 8-tägiger Kultivierung in organotypischen Kulturen in einem Medium nach Noraberg et al. [58] mit zusätzlich 15  $\mu\text{M}$  6-OHDA; Zellkerne (DAPI) blau. Ko-Lokalisation von TH und AADC.

### 3.2.3 Rolle von Dopamin und Dopaminrezeptoren bei der 6-OHDA induzierten Zunahme von TH-positiven Zellen in organotypischen Kulturen

Koronare Gehirnschnitte im Bereich der Commissura anterior von GLAST : : ERT2 GFP Mäusen wurden in organotypische Kulturen in einem Medium nach Noraberg et al. [58] über 4 bzw. 8 Tage kultiviert. Ein Teil wurde mit  $10^{-4}$  M Dopamin oder mit 15  $\mu\text{M}$  6-OHDA und entweder Dopaminrezeptor-Antagonisten oder Dopaminrezeptor-Agonisten behandelt. Als D1-Rezeptor-Antagonist wurde 100  $\mu\text{M}$  SCH23390 verwendet. 100  $\mu\text{M}$  Sulpirid wurde als D2-Rezeptor-Antagonist eingesetzt. Als Dopaminrezeptor-Agonisten dienten 100  $\mu\text{M}$  SKF-R(+)-38393 (D1) bzw. 100  $\mu\text{M}$  Quinpirol (D2). Anschließend wurden die Gehirnschnitte immunhistochemisch gegen TH und AADC angefärbt.

Die 4-tägige Behandlung mit 6-OHDA und einem Dopaminrezeptor-Antagonist führte zu keiner signifikanten Veränderung der Anzahl der Zellkörper mit TH-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abbildung 18 A). Eine Behandlung mit 6-OHDA (15  $\mu\text{M}$ ) oder Dopamin ( $10^{-4}$  M) über 8 Tage führte zu einer signifikanten Zunahme an TH-positiven Zellkörpern. Dies konnte durch Dopaminrezeptor-Antagonisten (100  $\mu\text{M}$ ) nicht blockiert werden (s. Abbildung 17; Abbildung 18 B).

Die 4- wie auch 8-tägige Behandlung mit einem Dopaminrezeptor-Agonisten hatte keinen signifikanten Einfluss auf die TH-Expression (Daten nicht gezeigt). Die Versuchsgruppen waren mit jeweils maximal 2 Tieren zu klein. Aus Tierschutzgründen wurden keine weiteren Versuche durchgeführt.

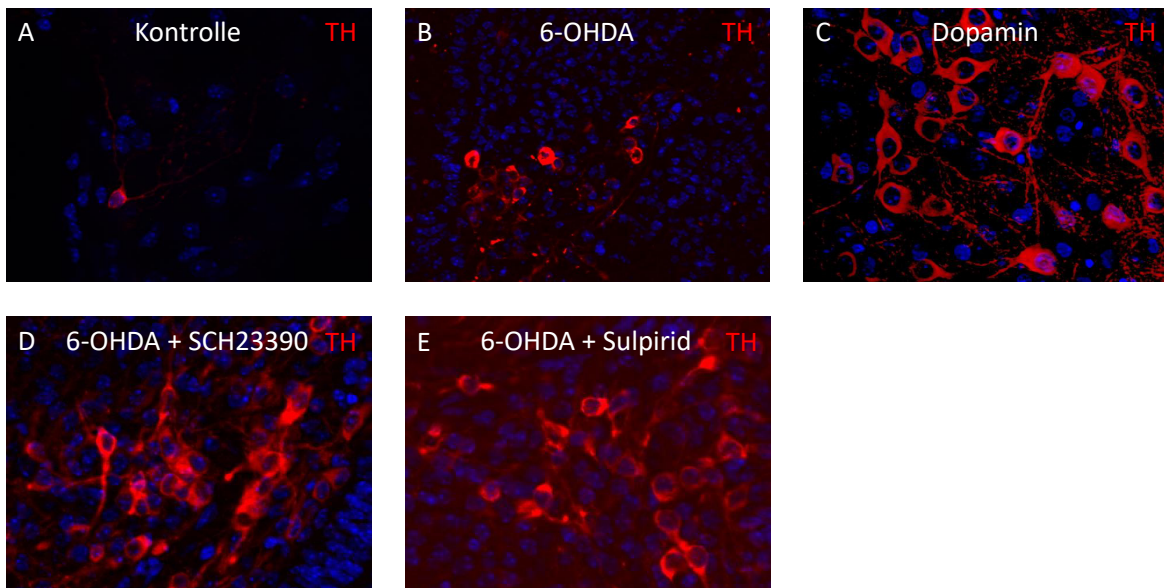


Abbildung 17: Repräsentative immunhistochemische Färbung gegen TH (rot) nach 8-tägiger Kultivierung von koronaren Gehirnschnitten im Bereich der Commissura anterior von GLAST::ERT2 GFP Mäusen in organotypischen Kulturen in einem Medium nach Norberg et al. [58]. Nach Applikation von 15 µM 6-OHDA (B),  $10^{-4}$  M Dopamin (C), 15 µM 6-OHDA + 100 µM SCH 23390 (D) oder 15 µM 6-OHDA + 100 µM Sulpirid (E) vermehrt Zellkörper mit TH-Expression verglichen mit Kontrollen (A).

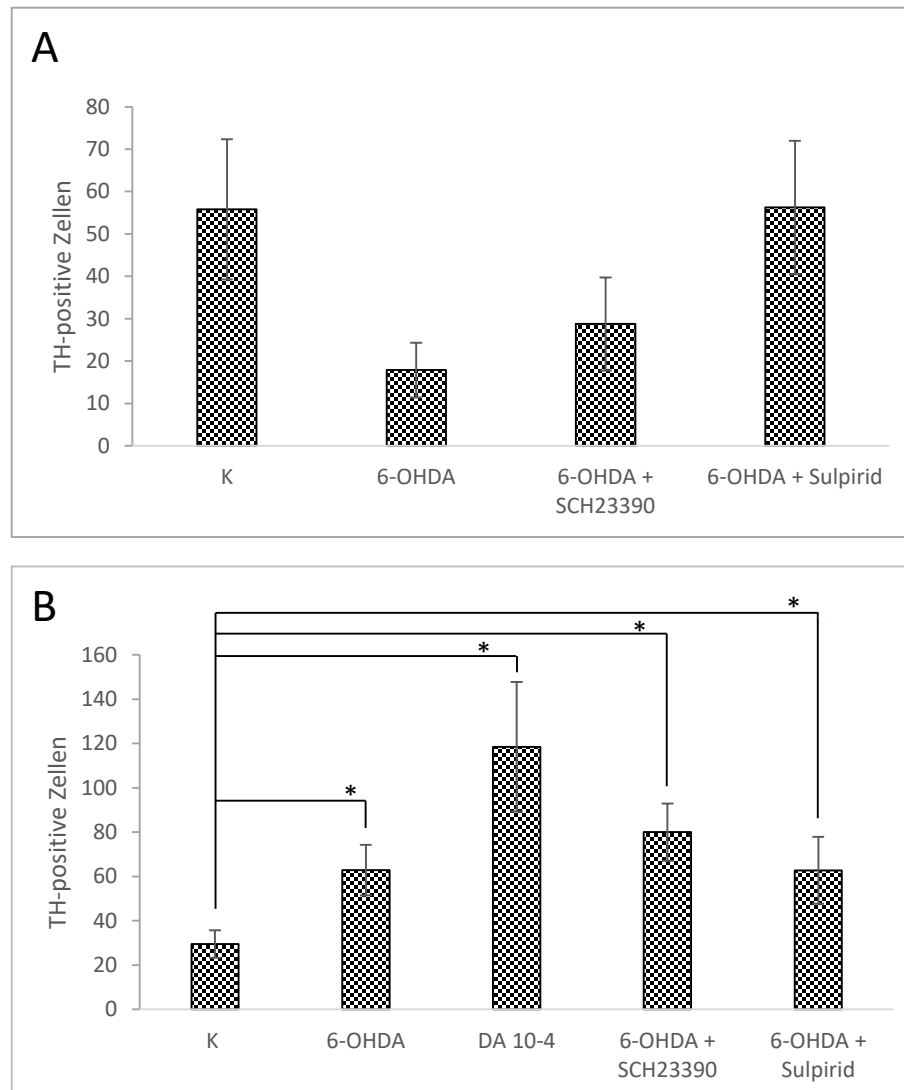


Abbildung 18: Quantitative Auswertung immunhistochemischer Färbungen gegen TH aus koronaren Gehirnschnitten im Bereich der Commissura anterior von GLAST : : ERT2 GFP Mäusen nach 4- bzw. 8-tägiger Kultivierung in organotypischen Kulturen in einem Medium nach Noraberg et al. [58].

A: 4 DIV, TH-positive Zellkörper: K:  $55.8 \pm 16.510$  (n = 3); 6-OHDA:  $17.875 \pm 6.474$  (n = 3); 6-OHDA + SCH23390:  $28.75 \pm 11.008$  (n = 3); 6-OHDA + Sulpirid:  $56.25 \pm 15.743$  (n = 3).

B: 8 DIV, TH-positive Zellkörper: K:  $29.5 \pm 6.253$  (n = 8); 6-OHDA:  $62.818 \pm 11.439$  (n = 7); DA:  $118.478 \pm 29.229$  (n = 6); 6-OHDA + SCH23390:  $89.714 \pm 12.92$  (n = 3); 6-OHDA + Sulpirid:  $62.75 \pm 15.032$  (n = 3). Daten: Mittelwert  $\pm$  Standardfehler; p (K 8 DIV vs 6-OHDA 8 DIV) = 0.037; p (K 8 DIV vs DA 8 DIV) = <0.001; p (K 8 DIV vs 6-OHDA + SCH23390 8 DIV) = <0.001; p (K 8 DIV vs 6-OHDA + Sulpirid 8 DIV) = <0.05. Mann-Whitney Rank Sum Test.

In den oben beschriebenen Gehirnschnitten wurde auch eine immunhistochemische Färbung gegen AADC vorgenommen. Weder Dopamin noch Dopaminrezeptor-Antagonisten oder -Agonisten zeigten einen Effekt auf die AADC-Expression. Dies wurde an Schnitten aus ein bis maximal zwei Tieren untersucht. Aus Tierschutzgründen wurde auf die Untersuchung weiterer Tiere verzichtet.

## 4. Diskussion

### 4.1 Diskussion - in vivo

#### 4.1.1 Anstieg TH-positiver Zellkörper im Striatum nach intrazerebroventrikulärer 6-OHDA-Injektion

4 Tage nach der intrazerebroventrikulären Injektion von 105  $\mu$ M 6-OHDA in erwachsene Sprague-Dawley Ratten kam es verglichen mit scheinbar behandelten Ratten zu einem signifikanten Anstieg von TH-positiven Zellkörpern im Striatum. Meine Beobachtung stimmt mit denen weiterer Studien, in denen eine Toxin-induzierte dopaminerge Denervation mittels 6-OHDA oder MPTP durchgeführt wurde, überein [5, 18, 47, 37, 53, 76, 77, 88]. So wurde zum Beispiel im Striatum von Ratten, die zwei bis 36 Tage zuvor eine unilaterale Injektion von 6-OHDA in das nigrostriatale System erhalten hatten, ein Anstieg TH-positiver Somata beobachtet [5, 53, 76]. Auch die striatale Injektion von 6-OHDA führte zu einem Anstieg von TH-positiven Somata im Striatum. Hier demonstriert ein quantitativer Vergleich von TH-positiven Zellen zwischen zwei und 10 Wochen nach der Läsion einen weiteren Anstieg nach einem längeren Zeitraum [37].

Für das vermehrte Auftreten von TH-positiven Zellen gibt es verschiedene Erklärungsversuche. Lange wurde vermutet, dass katecholaminerge Transmitter als „Feedback-Inhibitoren“ auf die Expression von TH wirken [73, 93]. Möglicherweise existiert ein Feedback-Mechanismus, über welchen die dopaminerge Innervation die striatale TH-Expression reguliert [61]. Sinkt die Konzentration an Katecholaminen, käme es zum Wegfall der Feedback-Inhibition. Hierfür spricht, dass in den ersten beiden postnatalen Wochen von Ratten, in denen die dopaminerge Innervation gering ausgeprägt ist, ein vermehrtes Auftreten von TH-positiven Zellkörpern u.a. im Striatum beobachtet wurde [61].



Eine weitere, konträre Idee, wie es nach einer Behandlung mit 6-OHDA zum Anstieg von TH-positiven Zellkörpern im Striatum kommt, ist die Wirkung von Dopamin. In Untersuchungen führte die dopaminerge Denervation zur vermehrten Ausschüttung von Dopamin aus den verbliebenen dopaminergen Neuronen. In der unmittelbaren Umgebung resultierte dies in einem erhöhten extrazellulären Dopaminspiegel [47, 66, 90]. Eine Erhöhung des extrazellulären Dopamins führte in vitro zum Anstieg von TH-positiven Zellkörpern in kortikalen und striatalen Kulturen [50, 91]. Zudem wurde beobachtet, dass in Gehirnregionen von Ratten mit einer ausgeprägten Zunahme TH-positiver Zellen nach der Behandlung mit 6-OHDA die dopaminerge Denervation weniger deutlich ausgeprägt war [47]. Um zu untersuchen, ob der von mir beobachtete Anstieg TH-positiver Zellen mit einer erhöhten interstitiellen Dopamin-Konzentration korreliert, könnte man eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie zur Bestimmung der Menge an interstitiellem Dopamin durchführen.

Meine Untersuchungen zeigen einen eindeutigen Effekt von 6-OHDA auf die striatale TH-Expression in Ratten auf. Die Art der Applikation von 6-OHDA spielt hierbei wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle. Bereits in anderen Studien wurde nach der Injektion von 6-OHDA in das nigrostriatale System ein Anstieg TH-positiver Zellkörper im Striatum beobachtet [5, 37, 53, 76]. Auch die biventrikuläre Injektion in beide Seitenventrikel erwachsener Sprague-Dawley Ratten führte zu vermehrt TH-positiven Zellen. Vorteil der intrazerebroventrikulären 6-OHDA Applikation gegenüber der Injektion in das nigrostriatale System ist die weitläufigere Verteilung des Neurotoxins. Zudem bleibt die untersuchte Region von der Manipulation durch die Injektion unbeeinflusst.

#### **4.1.2 TH-positive Zellkörper im Striatum exprimieren nach intrazerebroventrikulärer 6-OHDA-Injektion kein AADC**

4 Tage nach der intrazerebroventrikulären Injektion von 15  $\mu$ M 6-OHDA in beide Seitenventrikel von Sprague-Dawley Ratten war im Striatum kein Zellkörper immunhistochemisch doppelt gegen TH und AADC gefärbt, obwohl es vereinzelt AADC-positive Zellen gab. Meine Beobachtungen stehen im Gegensatz zu denen von anderen Studiengruppen, die zeigten, dass die vermehrt auftretenden TH-positiven Zellkörper im Nager-Striatum nach der Injektion von 6-OHDA ins nigrostriatale System zusätzlich AADC exprimierten [18, 47, 78]. Andere Studien zeigten in Übereinstimmung mit meinen Daten, dass alle TH- sowie AADC-positiven Zellkörper im Nager-Striatum monoenzymatisch waren [35, 88], sie ein anderes

Aussehen aufwiesen [53] und kein Dopamin enthielten.

Was könnte die Ursache für diese unterschiedlichen Beobachtungen sein?

Eine mögliche Ursache lässt sich in der verwendeten Methode der Immunhistochemie finden. Diese birgt Nachteile wie eine fehlende Standardisierung sowie zahlreiche Einflussfaktoren auf die Testergebnisse [45]. Prä-analytische Einflussfaktoren, die das Testergebnis verändern können, sind u.a. der Zeitraum bis zum Beginn der Fixierung, die Fixierungsart, die Konzentration der Fixierung, der pH sowie verwendete Puffer, Fixierungsdauer, Reagenzien und die Bedingungen der Dehydrierung, Reinigungsreagenz wie auch die dabei vorhandene Temperatur und die Bedingungen der Schnitttrocknung sowie dessen Aufbewahrung [23]. Der Vergleich der Methoden, die zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der immunhistochemischen Doppelmarkierungen gegen TH und AADC führten, zeigt Abweichungen in den prä-analytischen Einflussfaktoren.

Nicht nur die Vorbereitung des Gewebes für die Immunhistochemie variierte. Auch die verwendeten Tiere (Maus [18, 88], Wistar-Ratte [78], Sprague-Dawley Ratte [53, 57]) waren unterschiedlich. Hier lässt sich jedoch keine Regelmäßigkeit beobachten. Doppelt-positive Zellen wurden sowohl bei der Ratte [57, 78] wie auch bei der Maus [18] beschrieben. Und auch die Beobachtung von nicht doppelt-positiven Zellen für AADC und TH zeigte sich bei Maus [88] und Ratte [53].

Zudem wurde den Tieren in den einzelnen Studien 6-OHDA an unterschiedlichen Lokalisationen appliziert (mediales Vorderhirnbündel [53, 57], Striatum [18, 88], Gehirnvtrikel). Auch hier lässt sich im Ergebnis keine Regelmäßigkeit beobachten.

Die Gegenüberstellung der Methoden lässt kein Muster erkennen, das ursächlich für die unterschiedlichen Ergebnisse ist. Sie zeigt die Bandbreite der Variablen, die in verschiedenen Studien verwendet wurden und stellt die objektive Vergleichbarkeit der einzelnen Studienergebnisse nach Immunhistochemie in Frage.

Es gibt mittlerweile zahlreiche Antikörper. Auch deren unterschiedliche Beschaffenheit könnte Auswirkungen auf das endgültige Testergebnis haben [2, 45].

Darüber hinaus besteht auch die Möglichkeit, dass die für TH positiven Zellen dennoch AADC exprimierten, allerdings nur in so geringen Mengen, dass es unter der Nachweisgrenze dieses Verfahrens lag. Diesbezüglich ist die Immunhistochemie durch die lokale Antigenkonzentration limitiert [24].

Möglicherweise ist die AADC-Expression TH-positiver Zellkörper abhängig vom zeitli-

chen Abstand zur Applikation von 6-OHDA. Es ist möglich, dass ein größerer Abstand als 4 Tage zur biventrikulären Injektion von 6-OHDA in die Seitenventrikel zu TH-positiven Zellkörpern mit einer doppelten Enzym-Expression von TH und AADC führt.

Zusammengefasst ist die AADC-Expression TH-positiver Zellkörper im Ratten-Striatum nach der in vivo Behandlung mit 6-OHDA aktuell nicht abschließend beurteilbar. Grundsätzlich könnten AADC-positive Zellen im Striatum wichtig bei der Therapie von M. Parkinson sein. Möglicherweise könnten diese Zellen exogen appliziertes L-Dopa zu Dopamin decarboxylieren [57].

### **4.1.3 TH-positive Zellkörper im Striatum exprimieren nach intrazerebroventrikulärer 6-OHDA-Injektion im Gegensatz zum Kortex nicht Gad67**

Nach der intrazerebroventrikulären Injektion von 105  $\mu$ M 6-OHDA in beide Seitenventrikel von Sprague-Dawley Ratten kam es im Striatum zum Anstieg von TH-positiven Zellkörpern. Die immunhistochemische Untersuchung zeigte zudem Gad67-positive Somata. Die Untersuchung auf eine doppelte Enzym-Expression zeigte anders als im Kortex von Tieren aus demselben Experiment keine Ko-Lokalisierung von TH und Gad67. Auch Jollivet et al. [37] beschrieben im Striatum von 6-OHDA-läsionierten Ratten 2 Wochen nach der Läsion keine Ko-Lokalisierung von TH und Gad67.

Die Glutamat-Decarboxylase (Gad) ist ein Enzym zur Decarboxylierung von Glutamat zu GABA. Gad67 wird im Striatum in der Regel von GABAergen Interneuronen exprimiert. Im Striatum von MPTP-behandelten Affen [5, 76] wurden nach der dopaminergen Denervation TH-positive Zellkörper mit einer Ko-Lokalisierung von Gad67 beobachtet. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich bei den TH-positiven Zellkörpern von Affen [76] um GABAerge Interneurone handeln könnte. Auch in Mäusen wurden TH-positive Zellen im Striatum als Interneurone beschrieben [34, 88].

Neben dem Striatum war auch im Kortex von Sprague-Dawley Ratten nach der intrazerebroventrikulären Injektion von 6-OHDA in die Seitenventrikel ein Teil der immunhistochemisch TH-positiven Zellkörper zudem gegen Gad67 angefärbt (29.09 %  $\pm$  1.4 doppelpositive Zellkörper) [83].

Möglicherweise sind die TH-positiven Zellen im Striatum von Ratten nach dopaminenger

Denervation nicht GABAerg. Es könnte aber auch sein, dass nach dem kurzen Zeitraum von unter zwei Wochen noch keine Expression von Gad67 nachweisbar ist. Vielleicht handelt es sich im Striatum von Ratten im Gegensatz zu Affen und Mäusen jedoch auch nicht um Interneurone. So beschreibt Meredith et al. [53] die TH-positiven Zellen im Striatum von 6-OHDA läsierten Ratten morphologisch als Projektionsneurone.

Es besteht die Idee, dass die TH-positiven Zellkörper im Striatum eine intrinsische L-Dopa-Quelle darstellen und zur Kompensation der Pathologie des M. Parkinson beitragen könnten [5, 53]. Doch auch wenn die TH-positiven Zellkörper nicht bei der Dopamin-Synthese involviert sind, so könnten sie in Primaten dennoch als GABAerge Interneurone eine mögliche Kompensations-Quelle darstellen. Sie könnten dabei helfen, den Dopamin-Verlust über eine Vorwärts-Inhibition des Ncl. subthalamicus zu kompensieren. Diese Zellen könnten dabei involviert sein, der striatalen Hyperaktivität [70] im indirekten Pfad, wie sie beim M. Parkinson beobachtet wurde, entgegen zu wirken [40].

## 4.2 Diskussion - in vitro

### 4.2.1 Enzym-Expression in organotypischen Kulturen

In organotypische Kulturen von koronaren Gehirnschnitten des Striatums im Bereich der Commissura anterior aus GLAST : : ERT2 GFP Mäusen wurden unabhängig vom Kulturmedium (Stoppini et al. [74], Noraberg et al. [58]) über den Kultivierungs-Zeitraum von 8 Tagen Zellkörper mit TH- bzw. AADC-Expression beobachtet. Wenige der TH-positiven Zellkörper exprimierten gleichzeitig AADC. Bisher wurden in dieser Gehirnregion im intakten Mäuse-Gehirn immunhistochemisch weder TH- noch AADC-exprimierende Zellkörper beobachtet.

Organotypische Kulturen haben ein großes Potential als Tier-Modelle. Sie erhalten die Architektur und die Mikroumgebung des ursprünglichen Organs aufrecht und bieten eine ideale Untersuchungs-Form zwischen in vitro und in vivo Studien [19]. Im von mir verwendeten Modell entstand durch das Durchtrennen der dopaminergen nigrostriatalen Bahnen eine mechanische dopaminerge Denervierung. Auch Cavaliere et al. [13] verwendete organotypische Kulturen mit mechanischer dopaminerge Denervation. Hierbei wurde die dopaminerge Bahn der Subst. nigra zum Striatum in sagittalen Gehirnschnitten von Sprague-Dawley Ratten durchtrennt. Die mechanische dopaminerge Denervierung resultierte in einer reduzierten striatalen TH-Expression. Ein Anstieg TH-positiver Zellkörper im Striatum wurde nicht beschrieben [13].

In organotypischen Kulturen von Mäusen wurden TH-positive Zellkörper im Bulbus olfactorius bereits nach einem Tag Kultivierung mit einem Anstieg über eine längere Kultivierung ohne weitere Manipulation beschrieben [15]. Auch in organotypischen Kulturen vom Mesencephalon aus Mäusen wurden nach ein- [27] wie auch nach drei-wöchiger Kultivierung [44] TH-positive Zellen beschrieben. In beiden Regionen wurden auch in vivo TH-positive Zellkörper beobachtet [27, 32, 49].

Eine Beschreibung von TH- oder AADC-positiven Zellkörpern im in organotypischen Kulturen kultivierten Mäuse-Gehirn in der Koronarebene im Bereich der Commissura anterior ist mir zum aktuellen Zeitpunkt nicht bekannt. Es handelt sich um die Erstbeschreibung TH- und AADC-positiver Zellkörper in koronaren Gehirnschnitten im Bereich der Commissura anterior aus GLAST : : ERT2 GFP Mäusen, die in organotypischen Kulturen mit einem Kulturmedium nach Noraberg et al. [58] behandelt wurden. Wenige dieser Zellkörper zeigten eine Ko-Lokalisierung von TH und AADC.

Die mechanische dopaminerge Denervierung könnte einen Einfluss auf die Enzym-Expression haben. Möglich ist auch, dass die Gewebe-Manipulation oder die Kultur selbst hierfür ursäch-

lich ist. Eine Schwachstelle meiner Untersuchung ist, dass keine Gehirnschnitte unmittelbar vor der Kultivierung in organotypischen Kulturen auf die Expression von TH und AADC untersucht wurden. Zwar sind bisher in der Koronarebene auf Höhe der Commissura anterior immunhistochemisch keine Zellkörper mit TH- oder AADC-Expression beschrieben. Ausschließen lässt sich die jedoch nicht. Möglicherweise waren die Enzym-exprimierenden Somata bereits vor der Kultivierung in organotypischen Kulturen vorhanden. Hier sind weitere Untersuchungen auf die TH-Expression in koronaren Gehirnschnitten im Bereich der Commissura anterior von Mäusen direkt nach der Gehirn-Entnahme erforderlich.

#### **4.2.2 Einfluss von 6-OHDA auf die Expression von TH und AADC**

In meiner Studie nahm die Anzahl an TH-positiven Zellen über den Kulturzeitraum ab (nicht signifikant, 4 DIV:  $55.8 \pm 16.510$ ; 8 DIV:  $29.5 \pm 6.253$ ), wohingegen die Anzahl an AADC-positiven Zellen konstant blieb. Eine Behandlung der Kulturen mit 6-OHDA hatte nur einen Einfluss auf die Anzahl an TH-positiven Zellen. Diese waren nach 8 Tagen in behandelten Kulturen signifikant höher als in Kontrollkulturen zu diesem Zeitpunkt (K 8 DIV:  $29.5 \pm 6.253$ ; 6-OHDA 8 DIV:  $62.818 \pm 11.439$ ). Die Behandlung mit 6-OHDA über 8 Tage führte zu einer vergleichbaren Anzahl an TH-positiven Zellen wie in Kontrollkulturen nach 4 Tagen. Eine solche Erhöhung der Anzahl an TH-positiven Zellen in organotypischen Kulturen steht im Widerspruch zu Beobachtungen von Kearns et al. [38]. Diese Arbeitsgruppe hatte die Wirkung von 6-OHDA auf parasagittale Gehirnschnitte von transgenen Mäusen (C57BL/6 oder 9-KB TH promoter/EGFP reporter) inklusive medialem Vorderhirnbündel, nigrostriatalen Fasern und Striatum in organotypischen Kulturen untersucht. Hierbei wurden die Gehirnschnitte einmalig über 10 Minuten in 20 mM 6-OHDA gebadet. Diese Behandlung führte zur Reduktion TH-positiver Zellkörper in der Subst. nigra. TH-positive Zellkörper im Striatum bzw. auf Höhe der Commissura anterior wurden nicht beschrieben. Dies könnte auf den verwendeten Gehirnschnitt (parasagittal und nicht koronar) sowie die höhere Konzentration von 6-OHDA zurückzuführen sein.

Die Wirkung von 6-OHDA wurde auch in organotypischen Kulturen von sagittalen Gehirnschnitten von Ratten untersucht. Kress et al. [41] kultivierte organotypische Kulturen von koronaren Gehirnschnitten im Bereich der Subst. nigra, des Striatums sowie des Kortex von Sprague-Dawley Ratten. Nach 18 bis 20 Tagen Kultivierung erfolgte eine einmalige Behandlung mit 200  $\mu$ M 6-OHDA über eine Stunde. 4 Tage später wurden in der Subst. nigra TH-positive Zellen mit unscharfer Färbung beschrieben. Eine Reduktion dieser Zellen wurde

nicht beobachtet. Diese trat erst nach der zu 6-OHDA zusätzlichen Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$  NMDA auf. Dies könnte darauf hinweisen, dass die alleinige Behandlung mit 6-OHDA in entsprechend niedriger Konzentration *ex vivo* nicht spezifisch toxisch ist, sondern eine komplexere Wirkung hat. In den Koronarschnitten des Striatums wurden keine TH-positiven Zellkörper beschrieben [41]. Zu beachten ist, dass Kress et al. [41] das Striatum von Ratten untersuchte. Es handelte sich um eine andere Spezies als die von mir untersuchten Mäuse.

Eine Beschreibung von Zellkörpern mit AADC-Expression nach Kultivierung und Behandlung von Gehirnschnitten in organotypischen Kulturen ist mir weder in Mäusen noch Ratten bekannt.

In den genannten Untersuchungen [38, 41] wurde jeweils eine deutlich höhere Konzentration von 6-OHDA als die von mir verwendeten 15  $\mu\text{M}$  angewendet. Ich verwendete diese Konzentration, da sich diese in Vorversuchen als nicht toxisch erwiesen hatte. Hierbei wurde die Proliferation von Astrozyten in Zellkultur in Abhängigkeit von der 6-OHDA Konzentration untersucht. Bei der Konzentration von 15  $\mu\text{M}$  6-OHDA wurde keine Abnahme der Zellzahl über den Kulturzeitraum beobachtet [25]. Kearns et al. [38] verwendete bei der Behandlung sagittaler Maushirnschnitte 20 mM 6-OHDA. Die koronaren Rattenhirnschnitte behandelte Kress et al. [41] zunächst mit unterschiedlichen Konzentrationen (0.1-5 mM). Hierbei zeigten sich die Konzentrationen über 0.5 mM als stark toxisch für das gesamte Gehirngewebe. Daraufhin wurde der Großteil der Versuche mit 200  $\mu\text{M}$  6-OHDA durchgeführt. Diese Konzentration lag immer noch deutlich über der von mir verwendeten (15  $\mu\text{M}$ ).

Zudem handelte es sich bei den untersuchten organotypischen Kulturen von Mäusen im Gegensatz zu den von mir verwendeten koronaren Gehirnschnitte um Parasagittalschnitte mit noch intakten nigrostriatalen Bahnen [38]. Dies stellt eine weitere mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse dar.

Ich habe ein Modell von Gehirngewebe in organotypischen Kulturen miteinander untersucht, in welchen eine mechanische dopaminerge Denervierung erfolgt war. In einem Teil erfolgte zusätzlich die Applikation von 15  $\mu\text{M}$  6-OHDA. Diese Applikation blockierte über den Zeitraum von 8 Tagen die in den Kontrollkulturen beobachtete Reduktion TH-positiver Zellen. Dies deutet darauf hin, dass dieses Toxin selbst eine Wirkung auf Zellen und ihre TH-Expression haben könnte.

### **TH- und AADC- doppelt positive Zellen**

Nach 4-tägiger Kultivierung in organotypischen Kulturen und der Behandlung mit 15  $\mu\text{M}$  6-OHDA wurden keine für TH und AADC doppelt-positiven Zellen beobachtet. Nach 8-tägiger Kultivierung und 6-OHDA-Behandlung hingegen zeigten wenige Zellen eine Ko-Lokalisation von TH und AADC.

Meine Beobachtung nach der 4-tägigen Kultivierung stimmt mit dem Ergebnis in den von mir in vivo untersuchten Ratten-Hirnschnitten des Striatums überein. Auch hier konnte ich 4 Tage nach der intrazerebroventrikulären Injektion von 105  $\mu\text{M}$  6-OHDA keine Ko-Lokalisierung von TH und AADC beobachten. Dies weist darauf hin, dass die Wirkung von 6-OHDA bzw. der Effekt der dopaminergen Denervierung auf die Ko-Expression von AADC TH-positiver Zellen erst nach einem Zeitraum über 4 Tage auftritt. Auch in den Kontrollen der koronaren Gehirnschnitte (mechanische dopaminerge Denervation) wurden nach 8 Tagen TH- und AADC- doppelt positive Zellkörper beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass das Auftreten dieser Zellkörper nicht auf die Wirkung von 6-OHDA zurückzuführen ist, sondern dass die Ursache in der dopaminergen Denervation liegt. Das ist im Einklang mit der Annahme, dass 6-OHDA keine Wirkung auf die AADC-Expression zeigt.

6-OHDA führte zu einem Anstieg TH-positiver Zellen. Die AADC-Expression war davon unabhängig. Das Auftreten von Zellkörpern mit doppelter Enzym-Expression von TH und AADC ist möglicherweise auf die dopaminerge Denervation zurückzuführen.



### **4.2.3 Rolle von Dopamin und Dopaminrezeptoren bei der 6-OHDA induzierten Zunahme von TH-positiven Zellen in organotypischen Kulturen**

Über die 8-tägige Kultivierung der organotypischen Kulturen kam es in den Kontrollen zu einer Abnahme TH-positiver Zellen. Dieser Effekt wurde sowohl durch die Behandlung mit 15  $\mu\text{M}$  6-OHDA (s. 4.2.2, S. 47) wie auch mit  $10^{-4}$  M Dopamin blockiert. Hierbei war der Effekt von Dopamin deutlich stärker. Es wurden signifikant mehr TH-positive Zellkörper beobachtet als in den Kontrollen. Auf die AADC-Expression hatte die Applikation von  $10^{-4}$  M Dopamin keinen Einfluss.

Die Blockade von Dopaminrezeptoren synchron zur Behandlung mit 15  $\mu\text{M}$  6-OHDA hatte keinen Einfluss auf die Wirkung von 6-OHDA auf die TH-Expression. Dies muss als Hinweis darauf gesehen werden, dass der Effekt von 6-OHDA nicht über Dopamin-Rezeptoren vermittelt wird. Diese Annahme wird auch durch die Ergebnisse von Experimenten bestätigt, in denen die organotypischen Kulturen von mir mit Dopamin-Agonisten behandelt wurden: Die Behandlung weiterer organotypischer Kulturen mit Dopaminrezeptor-Agonisten zeigte bei jeweils zwei Tieren je Versuchsgruppe keinen Effekt. Daher wurde auf weitere Untersuchungen verzichtet.

Die oben beschriebene Beobachtung, dass die Behandlung der organotypischen Kulturen mit Dopamin zu einer vermehrten Expression von TH führt, wurde ähnlich von Max et al. [50] und Zhou et al. [91] beschrieben. Sowohl in striatalen Kulturen von Mäusen [50] wie auch in kortikalen Kulturen von Ratten [91] führte eine Erhöhung des extrazellulären Dopamins zu einem Anstieg von Zellkörpern mit TH-Expression.

Nach der Applikation von 6-OHDA in das nigrostriatale System von Ratten wurden im Striatum Veränderungen der Expression von Dopamin-Rezeptoren beschrieben [29, 31]. Die striatale dopaminerge Denervation nach unilateraler 6-OHDA-Läsion des medialen Vorderhirnbündels beziehungsweise der Subst. nigra von Ratten resultierte in einer verstärkten Affinität der striatalen D2-Rezeptoren im Gegensatz zu einer herabgesetzten Affinität der D1-Rezeptoren [29, 31]. Auch nach der Applikation von 6-OHDA in das Striatum von Ratten kam es zu einem Anstieg von D2-Rezeptoren [11, 65].

Dies weist auf eine vermehrte Expression von D2-Rezeptoren sowie eine verstärkte Affinität von D2-Rezeptoren hin. Eine Beschreibung der Wirkung von 6-OHDA über Dopamin-Rezeptoren ist mir bisher nicht bekannt.

Meine Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl 6-OHDA in geringer Konzentration wie auch exogen zugeführtes Dopamin die TH-Expression fördert. Dopamin-Rezeptoren scheinen bei der Wirkung von 6-OHDA nicht beteiligt zu sein. Der Effekt von Dopamin auf die TH-Expression ist ausgeprägter als von 6-OHDA. Dopamin wirkt neben Dopamin-Rezeptoren auch über adrenerge Rezeptoren ( $\alpha$ ,  $\beta$ ). Möglicherweise wird der Anstieg TH-positiver Zellen über einen adrenergen Rezeptor vermittelt. Diesbezüglich sind weitere Untersuchungen erforderlich.

### **Die Wirkung von 6-OHDA und ihre Konsequenz**

6-OHDA ist ein seit Jahrzehnten benutztes Toxin zur Untersuchung von M. Parkinson in Tiermodellen (s. 1.1 auf S. 1 ff). Bis heute geht man davon aus, dass durch die Applikation von 6-OHDA dopaminerge Neurone degenerieren und man dadurch ein gutes Tiermodell mit indirekter dopaminergener Denervation bekommt, um dieses Krankheitsbild zu erforschen. Meine Arbeit liefert zudem Hinweise darauf, dass 6-OHDA in niedriger Konzentration (15  $\mu$ M) nicht nur toxisch auf dopaminerge Neurone wirkt, sondern zudem die Expression von TH fördert. Sollte sich dies bestätigen, dann stellt dies das seit Jahrzehnten verwendete 6-OHDA-Modell durchaus in Frage. Hier ist zu klären, ob es möglicherweise auch in Gehirnen von Patienten mit M. Parkinson zur Ansammlung von 6-OHDA kommt. So wurde bisher endogenes 6-OHDA sowohl im humanen Gehirn (Ncl. subthalamicus) [17] wie auch in humanem Urin beobachtet [1, 79]. Die Beschreibung einer Veränderung der 6-OHDA-Konzentration im Parkinson-Gehirn ist mir bisher nicht bekannt. Für den Fall von vermehrtem endogenem 6-OHDA bei Patienten mit M. Parkinson wäre dieses Modell dem M. Parkinson unter Umständen noch ähnlicher als zunächst vermutet. Es könnte nicht nur zur dopaminergen Denervation führen, sondern zudem auch vermehrt vorhandenes 6-OHDA berücksichtigen.

## 5. Zusammenfassung

Das Neurotoxin 6-OHDA wird seit Jahrzehnten für Tier-Modelle u.a. zur Untersuchung von M. Parkinson verwendet. Es wird über Dopamintransporter in dopaminerge Neurone aufgenommen [69, 67] und führt über die Induktion von oxidativem Stress zur dopaminergen Degeneration [42, 46, 82]. 6-OHDA kann über verschiedene Arten appliziert werden. In meiner Arbeitsgruppe wurde in den vergangenen Jahren bei Ratten die intrazerebroventrikuläre Injektion durchgeführt. Untersuchungen zeigten, dass die Applikation von 6-OHDA in der Folge im Rattenkortex zum Anstieg TH-positiver Zellen führte [83]. Meine Untersuchungen zeigten, dass dies nicht nur im Kortex, sondern auch im Striatum auftritt [83]. Diese Beobachtung stimmt mit denen weiterer Studien überein, in denen eine Toxin-induzierte dopaminerge Denervation mittels 6-OHDA oder MPTP in verschiedenen Gehirnregionen durchgeführt wurde [5, 18, 47, 37, 53, 76, 77, 88]. Vorteil der intrazerebroventrikulären Injektion ist eine weitläufige Toxin-Verteilung sowie, dass das Striatum von der Manipulation bei der 6-OHDA-Applikation unbeeinflusst bleibt. Die striatalen TH-positiven Zellen exprimierten 4 Tage nach der intrazerebroventrikulären Injektion weder AADC noch Gad67. Damit steht meine Beobachtung gegenüber anderen. Mögliche Ursachen für die Diskrepanz der unterschiedlichen Ergebnisse sind unterschiedliche Verfahren im immunhistochemischen Nachweis, die verschiedenen untersuchten Tier-Spezies, die Applikations-Art von 6-OHDA sowie der zeitliche Abstand zwischen der Toxin-Applikation und der Untersuchung auf die Enzym-Expression.

In weiteren Untersuchungen von koronaren Gehirnschnitten von GLAST :: ERT2 GFP Mäusen im Bereich der Commissura anterior in organotypischen Kulturen kam es über den Kultivierungs-Zeitraum von 8 Tagen zu Zellkörpern mit der Expression von TH wie auch von AADC. Bisher wurden in dieser Gehirnregion keine TH- oder AADC-positiven Zellkörper beobachtet. Ursächlich für diese Beobachtung könnte sowohl die mechanische dopaminerge Denervierung wie auch die Gewebe-Manipulation oder organotypische Kultur selbst sein. Die Gabe von 6-OHDA in geringer Konzentration (15  $\mu$ M) zu den Gehirnschnitten in orga-

notypischen Kulturen führte über 8 Tage zur Erhöhung der TH-positiven Zellen, die AADC-Expression blieb dabei unverändert. Dies deutet darauf hin, dass diese 6-OHDA eine direkte Wirkung auf Zellen und ihre TH-Expression haben könnte. Der Wirkungsweg ist hierbei bisher unklar. Von mir durchgeführte Experimente weisen darauf hin, dass Dopaminrezeptoren dabei nicht beteiligt sind. Ein weiterer Wirkungsweg, welcher zum Anstieg TH-positiver Zellen durch 6-OHDA führt, könnte über adrenerge Rezeptoren vermittelt sein. Diesbezüglich sind weitere Untersuchungen erforderlich.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] ANDREW, R. ; WATSON, D. G. ; BEST, S. A. ; MIDGLEY, J. M. ; WENLONG, H. ; PETTY, R. K.: The determination of hydroxydopamines and other trace amines in the urine of parkinsonian patients and normal controls. In: *Neurochemical research* 18 (1993), Nr. 11, S. 1175–1177. – ISSN 0364–3190
- [2] ARAI, R. ; KARASAWA, N. ; NAGATSU, I.: Aromatic L-amino acid decarboxylase is present in serotonergic fibers of the striatum of the rat. A double-labeling immunofluorescence study. In: *Brain research* 706 (1996), Nr. 1, S. 177–179. – ISSN 0006–8993
- [3] BÄHR, Mathias ; FROTSCHER, Michael: *Neurologisch-topische Diagnostik: Anatomie ; Funktion ; Klinik*. 10. Aufl. s.l. : Georg Thieme Verlag KG, 2014 <http://dx.doi.org/10.1055/b-002-99152>. – ISBN 978–3–13–535810–9
- [4] BAL, A. ; BACHELOT, T. ; SAVASTA, M. ; MANIER, M. ; VERNA, J. M. ; BENABID, A. L. ; FEUERSTEIN, C.: Evidence for dopamine D2 receptor mRNA expression by striatal astrocytes in culture: in situ hybridization and polymerase chain reaction studies. In: *Brain research. Molecular brain research* 23 (1994), Nr. 3, S. 204–212. – ISSN 0169–328X
- [5] BETARBET, R. ; TURNER, R. ; CHOCKKAN, V. ; DELONG, M. R. ; ALLERS, K. A. ; WALTERS, J. ; LEVEY, A. I. ; GREENAMYRE, J. T.: Dopaminergic neurons intrinsic to the primate striatum. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17 (1997), Nr. 17, S. 6761–6768. – ISSN 0270–6474
- [6] BETARBET, Ranjita ; SHERER, Todd B. ; GREENAMYRE, J. T.: Animal models of Parkinson's disease. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 24 (2002), Nr. 4, S. 308–318. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.10067>. – DOI 10.1002/bies.10067. – ISSN 0265–9247
- [7] BJORKLUND, Anders ; DUNNETT, Stephen B.: Dopamine neuron systems in the brain: an update. In: *Trends in neurosciences* 30 (2007), Nr. 5, S. 194–202. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.006>. – DOI 10.1016/j.tins.2007.03.006. – ISSN 0166–2236

- [8] BRITO, Veronica ; BEYER, Cordian ; KUPPERS, Eva: BDNF-dependent stimulation of dopamine D5 receptor expression in developing striatal astrocytes involves PI3-kinase signaling. In: *Glia* 46 (2004), Nr. 3, S. 284–295. <http://dx.doi.org/10.1002/glia.10356>. – DOI 10.1002/glia.10356. – ISSN 0894–1491
- [9] BUFFO, Annalisa ; RITE, Inmaculada ; TRIPATHI, Pratibha ; LEPIER, Alexandra ; COLAK, Dilek ; HORN, Ana-Paula ; MORI, Tetsuji ; GOTZ, Magdalena: Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (2008), Nr. 9, S. 3581–3586. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0709002105>. – DOI 10.1073/pnas.0709002105. – ISSN 0027–8424
- [10] CABEZAS, R. ; AVILA, Mor. F. ; TORRENTE, D. ; EL-BACHÁ, R. S. ; MORALES, L. ; GONZALEZ, J. ; BARRETO, G. E.: *Astrocytes Role in Parkinson: A Double-Edged Sword*. <http://dx.doi.org/10.5772/5430>; 2013 InTech, DOI: 10.5772/54305. – ISBN 978–953–51–1088–0
- [11] CADET, J. L. ; LAST, R. ; KOSTIC, V. ; PRZEDBORSKI, S. ; JACKSON-LEWIS, V.: Long-term behavioral and biochemical effects of 6-hydroxydopamine injections in rat caudate-putamen. In: *Brain research bulletin* 26 (1991), Nr. 5, S. 707–713. – ISSN 0361–9230
- [12] CARMAN, L. S. ; GAGE, F. H. ; SHULTS, C. W.: Partial lesion of the substantia nigra: relation between extent of lesion and rotational behavior. In: *Brain research* 553 (1991), Nr. 2, S. 275–283. – ISSN 0006–8993
- [13] CAVALIERE, Fabio ; VICENTE, Edurne S. ; MATUTE, Carlos: An organotypic culture model to study nigro-striatal degeneration. In: *Journal of neuroscience methods* 188 (2010), Nr. 2, S. 205–212. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.02.008>. – DOI 10.1016/j.jneumeth.2010.02.008. – ISSN 0165–0270
- [14] CHADI, G. ; GOMIDE, V. C.: FGF-2 and S100beta immunoreactivities increase in reactive astrocytes, but not in microglia, in ascending dopamine pathways following a striatal 6-OHDA-induced partial lesion of the nigrostriatal system. In: *Cell biology international* 28 (2004), Nr. 12, S. 849–861. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellbi.2004.08.005>. – DOI 10.1016/j.cellbi.2004.08.005. – ISSN 1065–6995
- [15] CIGOLA, E. ; VOLPE, B. T. ; LEE, J. W. ; FRANZEN, L. ; BAKER, H.: Tyrosine hydroxylase expression in primary cultures of olfactory bulb: role of L-type calcium channels. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18 (1998), Nr. 19, S. 7638–7649. – ISSN 0270–6474

- [16] COUSINS, M. S. ; SALAMONE, J. D.: Involvement of ventrolateral striatal dopamine in movement initiation and execution: a microdialysis and behavioral investigation. In: *Neuroscience* 70 (1996), Nr. 4, S. 849–859. – ISSN 0306–4522
- [17] CURTIUS, H. C. ; WOLFENSBERGER, M. ; STEINMANN, B. ; REDWEIK, U. ; SIEGFRIED, J.: Mass fragmentography of dopamine and 6-hydroxydopamine. Application to the determination of dopamine in human brain biopsies from the caudate nucleus. In: *Journal of chromatography* 99 (1974), Nr. 0, S. 529–540
- [18] DARMOPIL, Sanja ; MUNETON-GOMEZ, Vilma C. ; CEBALLOS, Maria L. ; BERNSON, Miya ; MORATALLA, Rosario: Tyrosine hydroxylase cells appearing in the mouse striatum after dopamine denervation are likely to be projection neurones regulated by L-DOPA. In: *The European journal of neuroscience* 27 (2008), Nr. 3, S. 580–592. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06040.x>. – DOI 10.1111/j.1460–9568.2008.06040.x. – ISSN 0953–816X
- [19] DAVIAUD, Nicolas ; GARBAYO, Elisa ; SCHILLER, Paul C. ; PEREZ-PINZON, Miguel ; MONTERO-MENEI, Claudia N.: Organotypic cultures as tools for optimizing central nervous system cell therapies. In: *Experimental neurology* 248 (2013), S. 429–440. <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.07.012>. – DOI 10.1016/j.expneurol.2013.07.012. – ISSN 0014–4886
- [20] DEL TREDICI, Kelly ; RUB, Udo ; VOS, Rob A. I. ; BOHL, Jurgen R. E. ; BRAAK, Heiko: Where does parkinson disease pathology begin in the brain? In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 61 (2002), Nr. 5, S. 413–426. – ISSN 0022–3069
- [21] DEUMENS, Ronald ; BLOKLAND, Arjan ; PRICKAERTS, Jos: Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. In: *Experimental neurology* 175 (2002), Nr. 2, S. 303–317. <http://dx.doi.org/10.1006/exnr.2002.7891>. – DOI 10.1006/exnr.2002.7891. – ISSN 0014–4886
- [22] DUNNETT, S. B. ; IVERSEN, S. D.: Sensorimotor impairments following localized kainic acid and 6-hydroxydopamine lesions of the neostriatum. In: *Brain research* 248 (1982), Nr. 1, S. 121–127. – ISSN 0006–8993
- [23] ENGEL, Kelly B. ; MOORE, Helen M.: Effects of preanalytical variables on the detection of proteins by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. In: *Archives of pathology & laboratory medicine* 135 (2011), Nr. 5, S. 537–543. <http://dx.doi.org/10.1043/2010-0702-RAIR.1>. – DOI 10.1043/2010–0702–RAIR.1. – ISSN 0003–9985
- [24] ERSHOV, Petr V. ; UGRUMOV, Michael V. ; CALAS, Andre ; MAKARENKO, Irina G. ; KRIEGER, Monique ; THIBAUT, Jean: Neurons possessing enzymes of dopamine synthesis in the mediobasal hypothalamus of rats. Topographic relations and axonal projec-

- tions to the median eminence in ontogenesis. In: *Journal of chemical neuroanatomy* 24 (2002), Nr. 2, S. 95–107. – ISSN 0891–0618
- [25] ETSCHMANN, J.: *Stellen murine Astrozyten Zielzellen für 6-OHDA dar?* Medizinische Dissertationsschrift, Universität Tübingen; 2016
- [26] FEARNLEY, J. M. ; LEES, A. J.: Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. In: *Brain : a journal of neurology* 114 ( Pt 5) (1991), S. 2283–2301. – ISSN 0006–8950
- [27] FRIEDMAN, W. J. ; DREYFUS, C. F. ; MCEWEN, B. ; BLACK, I. B.: Presynaptic transmitters and depolarizing influences regulate development of the substantia nigra in culture. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 8 (1988), Nr. 10, S. 3616–3623. – ISSN 0270–6474
- [28] FRISEN, J. ; JOHANSSON, C. B. ; TOROK, C. ; RISLING, M. ; LENDAHL, U.: Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. In: *The Journal of cell biology* 131 (1995), Nr. 2, S. 453–464. – ISSN 0021–9525
- [29] GERFEN, C. R. ; ENGBER, T. M. ; MAHAN, L. C. ; SUSEL, Z. ; CHASE, T. N. ; MONSMA, F. J. JR ; SIBLEY, D. R.: D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. In: *Science (New York, N.Y.)* 250 (1990), Nr. 4986, S. 1429–1432. – ISSN 0036–8075
- [30] GOMIDE, Vania ; CHADI, Gerson: Glial bFGF and S100 immunoreactivities increase in ascending dopamine pathways following striatal 6-OHDA-induced partial lesion of the nigrostriatal system: a stereological analysis. In: *The International journal of neuroscience* 115 (2005), Nr. 4, S. 537–555. <http://dx.doi.org/10.1080/00207450590521064>. – DOI 10.1080/00207450590521064. – ISSN 0020–7454
- [31] GRAHAM, W. C. ; CROSSMAN, A. R. ; WOODRUFF, G. N.: Autoradiographic studies in animal models of hemi-parkinsonism reveal dopamine D2 but not D1 receptor supersensitivity. I. 6-OHDA lesions of ascending mesencephalic dopaminergic pathways in the rat. In: *Brain research* 514 (1990), Nr. 1, S. 93–102. – ISSN 0006–8993
- [32] HENG, Xin ; BREER, Heinz ; ZHANG, Xin ; TANG, Yu ; LI, Jia ; ZHANG, Su-fang ; LE, Weidong: Sall3 correlates with the expression of TH in mouse olfactory bulb. In: *Journal of molecular neuroscience : MN* 46 (2012), Nr. 2, S. 293–302. <http://dx.doi.org/10.1007/s12031-011-9563-x>. – DOI 10.1007/s12031-011-9563-x. – ISSN 0895–8696
- [33] HOFFMAN, B. J. ; HANSSON, S. R. ; MEZEY, E. ; PALKOVITS, M.: Localization and dynamic regulation of biogenic amine transporters in the mammalian central nervous system. In: *Frontiers in neuroendocrinology* 19 (1998), Nr. 3, S. 187–231.



- <http://dx.doi.org/10.1006/frne.1998.0168>. – DOI 10.1006/frne.1998.0168. – ISSN 0091–3022
- [34] IBANEZ-SANDOVAL, Osvaldo ; TECUAPETLA, Fatuel ; UNAL, Bengi ; SHAH, Fulva ; KOOS, Tibor ; TEPPER, James M.: Electrophysiological and morphological characteristics and synaptic connectivity of tyrosine hydroxylase-expressing neurons in adult mouse striatum. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30 (2010), Nr. 20, S. 6999–7016. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5996-09.2010>. – DOI 10.1523/JNEUROSCI.5996-09.2010. – ISSN 0270–6474
- [35] IKEMOTO, K. ; KITAHAMA, K. ; JOUVET, A. ; ARAI, R. ; NISHIMURA, A. ; NISHI, K. ; NAGATSU, I.: Demonstration of L-dopa decarboxylating neurons specific to human striatum. In: *Neuroscience letters* 232 (1997), Nr. 2, S. 111–114. – ISSN 0304–3940
- [36] JICHA, G. A. ; SALAMONE, J. D.: Vacuous jaw movements and feeding deficits in rats with ventrolateral striatal dopamine depletion: possible relation to parkinsonian symptoms. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 11 (1991), Nr. 12, S. 3822–3829. – ISSN 0270–6474
- [37] JOLLIVET, Christophe ; MONTERO-MENEI, Claudia N. ; VENIER-JULIENNE, Marie-Claire ; SAPIN, Anne ; BENOIT, Jean-Pierre ; MENEI, Philippe: Striatal tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons are induced by L-dihydroxyphenylalanine and nerve growth factor treatment in 6-hydroxydopamine lesioned rats. In: *Neuroscience letters* 362 (2004), Nr. 2, S. 79–82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2004.02.068>. – DOI 10.1016/j.neulet.2004.02.068. – ISSN 0304–3940
- [38] KEARNS, Sean M. ; SCHEFFLER, Bjorn ; GOETZ, A. K. ; LIN, Dean D. ; BAKER, Harriet D. ; ROPER, Steven N. ; MANDEL, Ronald J. ; STEINDLER, Dennis A.: A method for a more complete in vitro Parkinson's model: slice culture bioassay for modeling maintenance and repair of the nigrostriatal circuit. In: *Journal of neuroscience methods* 157 (2006), Nr. 1, S. 1–9. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1204.050756>. – DOI 10.3201/eid1204.050756. – ISSN 0165–0270
- [39] KIRIK, D. ; ROSENBLAD, C. ; BJORKLUND, A.: Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. In: *Experimental neurology* 152 (1998), Nr. 2, S. 259–277. <http://dx.doi.org/10.1006/exnr.1998.6848>. – DOI 10.1006/exnr.1998.6848. – ISSN 0014–4886
- [40] KITA, Hitoshi ; KITA, Takako: Cortical stimulation evokes abnormal responses in the dopamine-depleted rat basal ganglia. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31 (2011), Nr. 28, S. 10311–10322. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0915-11.2011>. – DOI 10.1523/JNEUROSCI.0915-11.2011. – ISSN 0270–6474

- [41] KRESS, Geraldine J. ; REYNOLDS, Ian J.: Dopaminergic neurotoxins require excitotoxic stimulation in organotypic cultures. In: *Neurobiology of disease* 20 (2005), Nr. 3, S. 639–645. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2005.04.019>. – DOI 10.1016/j.nbd.2005.04.019. – ISSN 0969–9961
- [42] KURUVILLA, Korah P. ; NANDHU, M. S. ; PAUL, Jes ; PAULOSE, C. S.: Oxidative stress mediated neuronal damage in the corpus striatum of 6-hydroxydopamine lesioned Parkinson's rats: neuroprotection by serotonin, GABA and bone marrow cells supplementation. In: *Journal of the neurological sciences* 331 (2013), Nr. 1-2, S. 31–37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2013.04.020>. – DOI 10.1016/j.jns.2013.04.020. – ISSN 0022–510X
- [43] LANE, Emma ; DUNNETT, Stephen: Animal models of Parkinson's disease and L-dopa induced dyskinesia: how close are we to the clinic? In: *Psychopharmacology* 199 (2008), Nr. 3, S. 303–312. <http://dx.doi.org/10.1007/s00213-007-0931-8>. – DOI 10.1007/s00213-007-0931-8. – ISSN 0033–3158
- [44] LARSEN, Trine R. ; ROSSEN, Sine ; GRAMSBERGEN, Jan B.: Dopamine release in organotypic cultures of foetal mouse mesencephalon: effects of depolarizing agents, pargyline, nomifensine, tetrodotoxin and calcium. In: *The European journal of neuroscience* 28 (2008), Nr. 3, S. 569–576. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06354.x>. – DOI 10.1111/j.1460-9568.2008.06354.x. – ISSN 0953–816X
- [45] LIN, Fan ; CHEN, Zongming: Standardization of diagnostic immunohistochemistry: literature review and geisinger experience. In: *Archives of pathology & laboratory medicine* 138 (2014), Nr. 12, S. 1564–1577. <http://dx.doi.org/10.5858/arpa.2014-0074-RA>. – DOI 10.5858/arpa.2014-0074-RA. – ISSN 0003–9985
- [46] LIU, Xiqi ; SHAO, Rushing ; LI, Meng ; YANG, Guofeng: Edaravone protects neurons in the rat substantia nigra against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress damage. In: *Cell biochemistry and biophysics* 70 (2014), Nr. 2, S. 1247–1254. <http://dx.doi.org/10.1007/s12013-014-0048-8>. – DOI 10.1007/s12013-014-0048-8. – ISSN 1085–9195
- [47] LOPEZ-REAL, Ana ; RODRIGUEZ-PALLARES, Jannette ; GUERRA, Maria J. ; LABANDEIRA-GARCIA, Jose L.: Localization and functional significance of striatal neurons immunoreactive to aromatic L-amino acid decarboxylase or tyrosine hydroxylase in rat Parkinsonian models. In: *Brain research* 969 (2003), Nr. 1-2, S. 135–146. – ISSN 0006–8993
- [48] LUTHMAN, J. ; FREDRIKSSON, A. ; SUNDSTROM, 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. In: *Behavioural brain research* 33 (1989), Nr. 3, S. 267–277. – ISSN 0166–4328

- [49] MATTHEWS, Gillian A. ; PATEL, Ronak ; WALSH, Alison ; DAVIES, Owain ; MARTINEZ-RICOS, Joana ; BRENNAN, Peter A.: Mating increases neuronal tyrosine hydroxylase expression and selectively gates transmission of male chemosensory information in female mice. In: *PloS one* 8 (2013), Nr. 7, S. e69943. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0069943>. – DOI 10.1371/journal.pone.0069943. – ISSN 1932–6203
- [50] MAX, S. R. ; BOSSIO, A. ; IACOVITTI, L.: Co-expression of tyrosine hydroxylase and glutamic acid decarboxylase in dopamine differentiation factor-treated striatal neurons in culture. In: *Brain research. Developmental brain research* 91 (1996), Nr. 1, S. 140–142. – ISSN 0165–3806
- [51] MAZLOOM, Maney ; SMITH, Yoland: Synaptic microcircuitry of tyrosine hydroxylase-containing neurons and terminals in the striatum of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated monkeys. In: *The Journal of comparative neurology* 495 (2006), Nr. 4, S. 453–469. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.20894>. – DOI 10.1002/cne.20894. – ISSN 0021–9967
- [52] MCDOWELL, Kimberly ; CHESSELET, Marie-Francoise: Animal models of the non-motor features of Parkinson's disease. In: *Neurobiology of disease* 46 (2012), Nr. 3, S. 597–606. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2011.12.040>. – DOI 10.1016/j.nbd.2011.12.040. – ISSN 0969–9961
- [53] MEREDITH, G. E. ; FARRELL, T. ; KELLAGHAN, P. ; TAN, Y. ; ZAHM, D. S. ; TOTTERDELL, S.: Immunocytochemical characterization of catecholaminergic neurons in the rat striatum following dopamine-depleting lesions. In: *The European journal of neuroscience* 11 (1999), Nr. 10, S. 3585–3596. – ISSN 0953–816X
- [54] MISSALE, C. ; NASH, S. R. ; ROBINSON, S. W. ; JABER, M. ; CARON, M. G.: Dopamine receptors: from structure to function. In: *Physiological reviews* 78 (1998), Nr. 1, S. 189–225. – ISSN 0031–9333
- [55] MISSALE, Cristina ; FIORENTINI, Chiara ; COLLO, Ginetta ; SPANO, PierFranco: The neurobiology of dopamine receptors: evolution from the dual concept to heterodimer complexes. In: *Journal of receptor and signal transduction research* 30 (2010), Nr. 5, S. 347–354. <http://dx.doi.org/10.3109/10799893.2010.506192>. – DOI 10.3109/10799893.2010.506192. – ISSN 1079–9893
- [56] MIYAZAKI, Ikuko ; ASANUMA, Masato ; DIAZ-CORRALES, Francisco J. ; MIYOSHI, Ko ; OGAWA, Norio: Direct evidence for expression of dopamine receptors in astrocytes from basal ganglia. In: *Brain research* 1029 (2004), Nr. 1, S. 120–123. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2004.09.014>. – DOI 10.1016/j.brainres.2004.09.014. – ISSN 0006–8993
- [57] MURA, A. ; JACKSON, D. ; MANLEY, M. S. ; YOUNG, S. J. ; GROVES, P. M.: Aromatic L-amino acid decarboxylase immunoreactive cells in the rat striatum: a possible site for

- the conversion of exogenous L-DOPA to dopamine. In: *Brain research* 704 (1995), Nr. 1, S. 51–60. – ISSN 0006–8993
- [58] NORABERG, J. ; KRISTENSEN, B. W. ; ZIMMER, J.: Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. In: *Brain research. Brain research protocols* 3 (1999), Nr. 3, S. 278–290. – ISSN 1385–299X
- [59] NYBERG, P. ; NORDBERG, A. ; WESTER, P. ; WINBLAD, B.: Dopaminergic deficiency is more pronounced in putamen than in nucleus caudatus in Parkinson's disease. In: *Neurochemical Pathology* 1 (1983), Nr. 3, S. 193–202. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02834244>. – DOI 10.1007/BF02834244. – ISSN 0734–600X
- [60] ORTH, Michael ; TABRIZI, Sarah J.: Models of Parkinson's disease. In: *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 18 (2003), Nr. 7, S. 729–737. <http://dx.doi.org/10.1002/mds.10447>. – DOI 10.1002/mds.10447. – ISSN 0885–3185
- [61] OSTERGAARD, K. ; SCHOU, J. P. ; GAHWILER, B. H. ; ZIMMER, J.: Tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons in organotypic slice cultures of the rat striatum and neocortex. In: *Experimental brain research* 83 (1991), Nr. 2, S. 357–365. – ISSN 0014–4819
- [62] PAXINOS, G. ; FRANKLIN, Keith B.: *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 4. Academic press. Elsevier, 2012
- [63] PAXINOS, G.W., C.: *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6. Amsterdam : Boston: Academic Press, 2007
- [64] PERESE, D. A. ; ULMAN, J. ; VIOLA, J. ; EWING, S. E. ; BANKIEWICZ, K. S.: A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. In: *Brain research* 494 (1989), Nr. 2, S. 285–293. – ISSN 0006–8993
- [65] PRZEDBORSKI, S. ; LEVIVIER, M. ; JIANG, H. ; FERREIRA, M. ; JACKSON-LEWIS, V. ; DONALDSON, D. ; TOGASAKI, D. M.: Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. In: *Neuroscience* 67 (1995), Nr. 3, S. 631–647. – ISSN 0306–4522
- [66] ROBINSON, T. E. ; MOCSARY, Z. ; CAMP, D. M. ; WHISHAW, I. Q.: Time course of recovery of extracellular dopamine following partial damage to the nigrostriatal dopamine system. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14 (1994), Nr. 5 Pt 1, S. 2687–2696. – ISSN 0270–6474
- [67] RODRIGUEZ, M. ; BARROSO-CHINEA, P. ; ABDALA, P. ; OBESO, J. ; GONZALEZ-HERNANDEZ, T.: Dopamine cell degeneration induced by intraventricular administration of 6-hydroxydopamine in the rat: similarities with cell loss in parkinson's disease. In: *Experimental neurology* 169 (2001), Nr. 1, S. 163–181.

- <http://dx.doi.org/10.1006/exnr.2000.7624>. – DOI 10.1006/exnr.2000.7624. – ISSN 0014–4886
- [68] SABOL, K. E. ; NEILL, D. B. ; WAGES, S. A. ; CHURCH, W. H. ; JUSTICE, J. B.: Dopamine depletion in a striatal subregion disrupts performance of a skilled motor task in the rat. In: *Brain research* 335 (1985), Nr. 1, S. 33–43. – ISSN 0006–8993
- [69] SCHOBER, Andreas: Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. In: *Cell and tissue research* 318 (2004), Nr. 1, S. 215–224. <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-004-0938-y>. – DOI 10.1007/s00441-004-0938-y. – ISSN 0302–766X
- [70] SCHULTZ, W. ; UNGERSTEDT, U.: Short-term increase and long-term reversion of striatal cell activity after degeneration of the nigrostriatal dopamine system. In: *Experimental brain research* 33 (1978), Nr. 2, S. 159–171. – ISSN 0014–4819
- [71] SEGURA-AGUILAR, Juan ; KOSTRZEWA, Richard M.: Neurotoxin mechanisms and processes relevant to Parkinson's disease: an update. In: *Neurotoxicity research* 27 (2015), Nr. 3, S. 328–354. <http://dx.doi.org/10.1007/s12640-015-9519-y>. – DOI 10.1007/s12640-015-9519-y. – ISSN 1029–8428
- [72] SOFRONIEW, Michael V.: Reactive astrocytes in neural repair and protection. In: *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 11 (2005), Nr. 5, S. 400–407. <http://dx.doi.org/10.1177/1073858405278321>. – DOI 10.1177/1073858405278321. – ISSN 1073–8584
- [73] SPECTOR, S. ; GORDON, R. ; SJOERDSMA, A. ; UDENFRIEND, S.: End-product inhibition of tyrosine hydroxylase as a possible mechanism for regulation of norepinephrine synthesis. In: *Molecular pharmacology* 3 (1967), Nr. 6, S. 549–555. – ISSN 0026–895X
- [74] STOPPINI, L. ; BUCHS, P. A. ; MULLER, D.: A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. In: *Journal of neuroscience methods* 37 (1991), Nr. 2, S. 173–182. – ISSN 0165–0270
- [75] STROMBERG, I. ; BJORKLUND, H. ; DAHL, D. ; JONSSON, G. ; SUNDSTROM, E. ; OLSON, L.: Astrocyte responses to dopaminergic denervations by 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine as evidenced by glial fibrillary acidic protein immunohistochemistry. In: *Brain research bulletin* 17 (1986), Nr. 2, S. 225–236. – ISSN 0361–9230
- [76] TANDE, Dominique ; HOGLINGER, Gunter ; DEBEIR, Thomas ; FREUNDLIEB, Nils ; HIRSCH, Etienne C. ; FRANCOIS, Chantal: New striatal dopamine neurons in MPTP-treated macaques result from a phenotypic shift and not neurogenesis. In: *Brain : a journal of neurology* 129 (2006), Nr. Pt 5, S. 1194–1200. <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awl041>. – DOI 10.1093/brain/awl041. – ISSN 0006–8950

- [77] TASHIRO, Y. ; KANEKO, T. ; SUGIMOTO, T. ; NAGATSU, I. ; KIKUCHI, H. ; MIZUNO, N.: Striatal neurons with aromatic L-amino acid decarboxylase-like immunoreactivity in the rat. In: *Neuroscience letters* 100 (1989), Nr. 1-3, S. 29–34. – ISSN 0304–3940
- [78] TASHIRO, Y. ; SUGIMOTO, T. ; HATTORI, T. ; UEMURA, Y. ; NAGATSU, I. ; KIKUCHI, H. ; MIZUNO, N.: Tyrosine hydroxylase-like immunoreactive neurons in the striatum of the rat. In: *Neuroscience letters* 97 (1989), Nr. 1-2, S. 6–10. – ISSN 0304–3940
- [79] TIEU, Kim: A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 1 (2011), Nr. 1, S. a009316. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a009316>. – DOI 10.1101/cshperspect.a009316. – ISSN 2157–1422
- [80] UGRUMOV, M. V.: Non-dopaminergic neurons partly expressing dopaminergic phenotype: distribution in the brain, development and functional significance. In: *Journal of chemical neuroanatomy* 38 (2009), Nr. 4, S. 241–256. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchemneu.2009.08.004>. – DOI 10.1016/j.jchemneu.2009.08.004. – ISSN 0891–0618
- [81] UNGERSTEDT, U. ; ARBUTHNOTT, G. W.: Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. In: *Brain research* 24 (1970), Nr. 3, S. 485–493. – ISSN 0006–8993
- [82] UNSICKER, K. ; ALLAN, I. J. ; NEWGREEN, D. F.: Extraneuronal effects of 6-hydroxydopamine and extraneuronal uptake of noradrenaline. In-vivo and in-vitro studies on adrenocortical cells of lizards and rats. In: *Cell and tissue research* 173 (1976), Nr. 1, S. 45–69. – ISSN 0302–766X
- [83] WACHTER, B. ; CARADONNA, S. ; GITTINGER, K. ; SCHLAGER, A. ; KUPPERS, E.: Intraventricular injection of 6-hydroxydopamine results in an increased number of tyrosine hydroxylase immune-positive cells in the rat cortex. In: *Neuroscience* 280 (2014), S. 99–110. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.09.010>. – DOI 10.1016/j.neuroscience.2014.09.010. – ISSN 0306–4522
- [84] WACHTER, Britta ; SCHURGER, Sonja ; ROLINGER, Jens ; AMELN-MAYERHOFER, Andreas von ; BERG, Daniela ; WAGNER, Hans-Jochen ; KUEPPERS, Eva: Effect of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) on proliferation of glial cells in the rat cortex and striatum: evidence for de-differentiation of resident astrocytes. In: *Cell and tissue research* 342 (2010), Nr. 2, S. 147–160. <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-010-1061-x>. – DOI 10.1007/s00441-010-1061-x. – ISSN 0302–766X
- [85] WEIHE, Eberhard ; DEPBOYLU, Candan ; SCHUTZ, Burkhard ; SCHAFER, Martin K-H ; EIDEN, Lee E.: Three types of tyrosine hydroxylase-positive CNS neurons distinguished by dopa decarboxylase and VMAT2 co-expression. In: *Cellular and molecular neurobiology* 26 (2006), Nr. 4-6, S. 659–678.

<http://dx.doi.org/10.1007/s10571-006-9053-9>. – DOI 10.1007/s10571-006-9053-9. – ISSN 0272-4340

- [86] WILHELMSSON, Ulrika ; BUSHONG, Eric A. ; PRICE, Diana L. ; SMARR, Benjamin L. ; VAN PHUNG ; TERADA, Masako ; ELLISMAN, Mark H. ; PEKNY, Milos: Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (2006), Nr. 46, S. 17513–17518. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0602841103>. – DOI 10.1073/pnas.0602841103. – ISSN 0027-8424
- [87] WOLTERS, E. C. ; BRAAK, H.: Parkinson's disease: premotor clinico-pathological correlations. In: *Journal of neural transmission. Supplementum* (2006), Nr. 70, S. 309–319. – ISSN 0303-6995
- [88] XENIAS, Harry S. ; IBANEZ-SANDOVAL, Osvaldo ; KOOS, Tibor ; TEPPER, James M.: Are striatal tyrosine hydroxylase interneurons dopaminergic? In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35 (2015), Nr. 16, S. 6584–6599. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0195-15.2015>. – DOI 10.1523/JNEUROSCI.0195-15.2015. – ISSN 0270-6474
- [89] ZANASSI, P. ; PAOLILLO, M. ; MONTECUCCO, A. ; AVVEDIMENTO, E. V. ; SCHINELLI, S.: Pharmacological and molecular evidence for dopamine D(1) receptor expression by striatal astrocytes in culture. In: *Journal of neuroscience research* 58 (1999), Nr. 4, S. 544–552. – ISSN 0360-4012
- [90] ZHANG, W. Q. ; TILSON, H. A. ; NANRY, K. P. ; HUDSON, P. M. ; HONG, J. S. ; STACHOWIAK, M. K.: Increased dopamine release from striata of rats after unilateral nigrostriatal bundle damage. In: *Brain research* 461 (1988), Nr. 2, S. 335–342. – ISSN 0006-8993
- [91] ZHOU, J. ; BRADFORD, H. F. ; STERN, G. M.: Induction of dopaminergic neurotransmitter phenotype in rat embryonic cerebrocortex by the synergistic action of neurotrophins and dopamine. In: *The European journal of neuroscience* 8 (1996), Nr. 11, S. 2328–2339. – ISSN 0953-816X
- [92] ZIGMOND, M. J. ; STRICKER, E. M.: Deficits in feeding behavior after intraventricular injection of 6-hydroxydopamine in rats. In: *Science (New York, N.Y.)* 177 (1972), Nr. 4055, S. 1211–1214. – ISSN 0036-8075
- [93] ZIGMOND, R. E. ; SCHWARZSCHILD, M. A. ; RITTENHOUSE, A. R.: Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation. In: *Annual review of neuroscience* 12 (1989), S. 415–461. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ne.12.030189.002215>. – DOI 10.1146/annurev.ne.12.030189.002215. – ISSN 0147-006X

## 7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Frau PD. Dr. biol. hum. Eva Küppers, wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Anatomie Abteilung Neuroanatomie und Zelluläre Neurobiologie der Universität Tübingen.

Der überwiegende Teil der Versuche wurde von mir eigenständig durchgeführt. Die stereotaktische 6-OHDA Läsion der Sprague-Dawley Ratten wurde von Sandro Caradonna, PhD-Student durchgeführt. Vereinzelt Versuche wurden von Frau Sabine Conrad, medizinisch-technische Assistentin des Instituts für Anatomie Abteilung Neuroanatomie und Zelluläre Neurobiologie der Universität Tübingen und Herr Ulrich Mattheus, medizinisch-technischer Assistent des Instituts für Anatomie Abteilung Neuroanatomie und Zelluläre Neurobiologie der Universität Tübingen durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau PD. Dr. biol. hum. Eva Küppers.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Ludwigsburg, den 18. Februar 2019



## Danksagung

Ich danke Frau PD. Dr. biol. hum. Eva Küppers für ihre ausgesprochen große Unterstützung und Hilfestellung beim Projekt meiner medizinischen Dissertation. Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Sabine Conrad und Herrn Ulrich Mattheus für die Anleitung und Unterstützung beim Arbeiten im Labor.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie und Freunden für die ermutigende und aufmunternde Unterstützung. Danke an meine Eltern, die nicht nur jederzeit für mich da waren, sondern mir auch materiell die Dissertation ermöglichten. Danken möchte ich Johanna für die LaTeX-Unterstützung insbesondere auf der Zugfahrt von Graz nach Stuttgart, Anna für die feinen Café-Besuche in Arbeitspausen, Valentine für die gute Abwechslung zum Labor- und Arbeitsalltag in meinem Tübinger Zuhause und ein großes Dankeschön an Andreas für die Hilfe sowohl bei Informatik- wie auch mentalen Notlagen.