

**Funktionelle und strukturelle Effekte einer ventrikulären
6-Hydroxydopaminläsion und nachfolgendem
Rotarodtraining im Tiermodell**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Fritzsch geb. Schürger, Sonja Dorothea Elisabeth

2015

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. D. Berg
2. Berichterstatter:	Professor Dr. A. Nieß
3. Berichterstatter:	Professor Dr. J. Kassubek

Für meine Eltern.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND WISSENSCHAFTLICHE FRAGESTELLUNG	8
1.1	MORBUS PARKINSON	8
1.2	TIERMODELLE	10
1.3	BEWEGUNGSTHERAPIE BEI PARKINSONPATIENTEN	13
1.4	TRAINING IM TIERMODELL	15
1.5	DIE BLUTHIRNSCHRANKE: AUFBAU UND FUNKTION	17
1.6	PATHOLOGIKA DER BLUTHIRNSCHRANKE BEI MORBUS PARKINSON UND PARKINSON TIERMODELLEN	20
1.7	FRAGESTELLUNG	22
1.7.1	<i>Effekte moderaten körperlichen Trainings auf die durch 6-OHDA-induzierten motorischen und neurochemischen Defizite der Ratte</i>	<i>22</i>
1.7.2	<i>Akute Nebenwirkungen der 6-OHDA Läsion auf die Bluthirnschranke und die zerebrale Flüssigkeitshomöostase</i>	<i>22</i>
2	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1	STUDIENDESIGN	23
2.2	TIERE UND LÄSIONSMODELL	25
2.2.1	<i>Versuchstiere</i>	<i>25</i>
2.2.2	<i>Läsion</i>	<i>25</i>
2.3	TRAINING	27
2.4	VERHALTENSTESTUNG	28
2.4.1	<i>Stepping Test</i>	<i>28</i>
2.4.2	<i>Open Field Activity Monitoring</i>	<i>29</i>
2.4.3	<i>Anzahl der Stürze vom Rotarod</i>	<i>30</i>
2.5	HISTOLOGIE	30
2.5.1	<i>Gewebeaufarbeitung und Präparation für Immunhistochemie</i>	<i>30</i>
2.5.2	<i>Immunhistochemische Färbungen</i>	<i>31</i>
2.5.3	<i>Gewebeaufarbeitung, Präparation und Auswertung der Semidünnschnitte</i>	<i>34</i>
2.6	MRT	34
2.7	AUSWERTUNG UND STATISTIK	36
3	ERGEBNISSE	37
3.1	ERGEBNISSE DER VERHALTENSTESTUNG	37
3.1.1	<i>Stepping Test der ersten Versuchsreihe</i>	<i>37</i>
3.1.2	<i>Explorationsverhalten im Open Field Activity Monitoring der ersten Versuchsreihe</i>	<i>38</i>

3.1.3	<i>Stepping Test der zweiten Versuchsreihe</i>	40
3.1.4	<i>Explorationsverhalten im Open Field Activity Monitoring der zweiten Versuchsreihe</i>	42
3.1.5	<i>Anzahl der Stürze vom Rotarod beim Training in der zweiten Versuchsreihe</i>	44
3.2	HISTOLOGISCHE ERGEBNISSE	45
3.2.1	<i>TH positive Fasern im Striatum nach dem Rotarodtraining (D24)</i>	45
3.2.2	<i>Ki-67 positive Zellen in der SVZ nach dem Rotarodtraining (D24)</i>	46
3.2.3	<i>Hinweise für Veränderungen der BBB (D4)</i>	48
3.2.4	<i>Veränderung der AQP4 Immunoreaktivität (D4)</i>	50
3.3	AUSWERTUNG DER MRT DATEN	52
3.3.1	<i>Hyperintensität und Diffusion</i>	52
3.3.2	<i>Histologie und MRT (D4)</i>	55
4	DISKUSSION	57
4.1	VERHALTENSDATEN	57
4.2	GRUNDLAGEN DER VERHALTENSVERÄNDERUNGEN.....	60
4.3	HYPERINTENSITÄT IN T2W KERNSPINAUFNAHMEN	63
4.4	VERÄNDERUNGEN DER BLUTHIRNSCHRANKE UND ÖDEMBILDUNG.....	68
4.5	LÄSIONSMODELL.....	71
4.6	LIMITATIONEN.....	75
4.6.1	<i>Limitationen im Versuchsaufbau</i>	76
4.6.2	<i>Limitationen in Bezug auf das Modell und die Übertragung auf den Patienten</i>	77
4.7	SCHLUSSFOLGERUNGEN	78
5	ZUSAMMENFASSUNG	79
6	LITERATURVERZEICHNIS	81
7	AUS DER DISSERTATION HERVORGEGANGENE PUBLIKATIONEN	92
8	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	93
9	DANKSAGUNG	97

Abkürzungsverzeichnis

#	Anzahl
ADC	apparent diffusion coefficient/ apparenter Diffusionskoeffizient
ANOVA	analysis of variance
AQP4	Aquaporin 4
ATP	Adenosintriphosphat
BBB	Bluthirnschranke (blood brain barrier)
CPu	Caudatoputamen
c-CPu	zentrales Caudatoputamen
d-CPu	dorsales Caudatoputamen
v-CPu	ventrales Caudatoputamen
m-CPu	mediales Caudatoputamen
D	Tag (day)
DWI	diffusion weighted imaging / diffusionsgewichtete Aufnahmen
GFAP	glial fibrillary acidic protein
JAM	junctional adhesion molecule
icv	intracerebroventrikulär
ip	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharid
MFB	medial forebrain bundle, mediales Vorderhirnbündel
MMP	Matrix Metalloproteinasen
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
OAP	orthogonal arrays of particles
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PFA	Paraformaldehyd
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)

SEM	Standardfehler des arithmetischen Mittels (standard error of the mean)
SN	Substantia nigra
SVZ	Subventrikuläre Zone
T2w	T2 gewichtet/T2 weighted
UPDRS	Unified Parkinson's Disease Rating Scale
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

1.1 Morbus Parkinson

Morbus Parkinson betrifft ca. 1% der über 60-Jährigen und ist somit nach Morbus Alzheimer die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung (de Lau and Breteler, 2006). Klinisch manifestiert sie sich klassischerweise durch Muskelsteifigkeit (Rigor), Zittern in Ruhehaltung (Tremor), Bewegungsarmut (Hypokinesie bzw. Akinesie) und Beeinträchtigung der Haltungsreflexe (posturale Instabilität) mit asymmetrischem Beginn (FitzGerald et al., 2007). Des Weiteren zeigen die Patienten eine typische vornüber gebeugte Haltung, einen kleinschrittigen, verlangsamten Gang und einen hypomimen maskenhaften Gesichtsausdruck (Kandel et al., 2000).

Seit den frühen 60er Jahren ist bekannt, dass der klinischen Symptomatik im Wesentlichen eine Degeneration dopaminergener neuromelaninhaltiger Neurone in der Substantia nigra (SN) pars compacta zu Grunde liegt (Kandel et al., 2000), die zu Dopaminmangel im Corpus striatum führt. Morbus Parkinson galt als erstes Beispiel einer hirnanorganischen Störung, die aus dem Mangel eines einzigen Neurotransmitters resultiert (Kandel et al., 2000). Mittlerweile ist allerdings bekannt, dass außer dem dopaminergen nigrostriatalen System noch viele weitere Teile des zentralen, aber auch des peripheren und enterischen Nervensystems (Braak and Del Tredici, 2008a) von neurodegenerativen Prozessen betroffen sind, was nichtmotorische Symptome und die im fortgeschrittenen Stadium eintretende Therapieresistenz gegenüber L-DOPA erklären könnte (Braak and Del Tredici, 2008b; Gleixner et al., 2009/2010). Die genaue Ätiopathogenese des idiopathischen Parkinsonsyndroms, das mit 80-90% der Fälle die häufigste Variante eines Parkinsonsyndroms darstellt (Braak and Del Tredici, 2008a; Gleixner et al., 2009/2010), ist bislang nicht vollständig geklärt (Allam et al., 2005; Braak and Del Tredici, 2008b; de Lau and Breteler, 2006; Gaenslen et al., 2008). Diskutiert werden Fehlprozessierung und –aggregation von Proteinen, oxidativer Stress und mitochondriale Dysfunktion (de Lau and Breteler, 2006) auf der Basis von genetischer Disposition und der

Einwirkung von Umweltfaktoren (Allam et al., 2005; de Lau and Breteler, 2006) sowie retrograder axonaler Transport und transsynaptische Transmission eines neurotrophen Pathogens (Braak and Del Tredici, 2008a).

Eine Studie des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg ergab, dass defekte Kernkörperchen bei der Pathogenese eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen, vermittelt über eine verminderte Funktion des Enzyms mTOR. Dieses Enzym reguliert intrazelluläre Signalwege; eine verminderte Aktivität führt zu einer gestörten Funktion der Mitochondrien, was oxidativen Stress bewirkt. Die entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) schädigen zelluläre Strukturen und führen so zum Zelltod (Rieker et al., 2011).

Das für die Erkrankung charakteristische pathologische Merkmal sind α -Synuclein-immunoreaktive Einschlüsse in den Neuronen, Lewy-Neuriten und Lewy-Körperchen, und die Degeneration dopaminergischer Neurone in der SN, was post mortem zur neuropathologischen Bestätigung der Diagnose verwendet werden kann (Braak and Del Tredici, 2008a).

Die Identifikation von Risikofaktoren gestaltet sich nicht einfach: Retrospektive Fall-Kontroll-Studien sind anfällig für Studienfehler (Allam et al., 2005; de Lau and Breteler, 2006; Gaenslen et al., 2008), präklinischer Dopaminverlust könnte bereits Verhaltensänderungen z.B. in Bezug auf das Ernährungs- oder Bewegungsverhalten provozieren und damit zu Fehlinterpretationen von Frühsymptomen als Risikofaktoren führen (de Lau and Breteler, 2006). Als Risikofaktoren werden unter anderem Pestizidexposition (Gorell et al., 1998), Schwermetallbelastung (Eisen, Mangan, Kupfer, Blei, Aluminium, Zink) (Gorell et al., 1999) und damit verbundener oxidativer Stress und eine an Milchprodukten reiche Ernährung, möglicherweise aufgrund darin enthaltener Schadstoffe (Park et al., 2005), diskutiert. Viele dieser Faktoren sind jedoch umstritten (Miyake et al., 2011; Mortimer et al., 2012). Als protektive Faktoren gelten Kaffeekonsum, Rauchen, Ernährung mit niedriger Kalorienzahl und vielen ungesättigten Fettsäuren, antioxidativen Vitaminen, Polyphenolen, Östrogene und Bewegung (de Lau and Breteler, 2006; Gaenslen et al., 2008; Hirsch and Farley, 2009).

Bis die ersten oben genannten klassischen Symptome auftreten, müssen ca. 60% der nigralen Neurone degeneriert sein (Berg, 2006; FitzGerald et al., 2007). Einer der aktuellen Forschungsschwerpunkte besteht daher darin, Frühmarker auf Ebene der klinischen, biochemischen, genetischen und bildgebenden Untersuchung zu identifizieren (Berg, 2008; Berg and Gaenslen, 2010; Gaenslen and Berg, 2010; Gerlach et al., 2008; Godau et al., 2010), um die Krankheit besser verstehen und frühzeitig therapeutisch oder präventiv intervenieren zu können (Berg, 2006, 2008; DeKosky and Marek, 2003).

1.2 Tiermodelle

Morbus Parkinson ist eine Erkrankung des Menschen und tritt normalerweise im Tierreich nicht auf (Braak and Del Tredici, 2008a). Da die Ätiopathogenese des idiopathischen Parkinsonsyndroms noch nicht geklärt ist, konnte bislang kein Tiermodell mit Konstrukt-Validität, welches basierend auf dem exakten Pathomechanismus den progredienten und multisystemischen Verlauf der Erkrankung widerspiegelt, entwickelt werden.

Jedoch ist es gelungen, in toxischen oder genetischen Modellen, Teile der Symptomatik an Tieren darzustellen, um Einblick in wichtige pathogenetische Mechanismen zu gewinnen sowie therapeutische Strategien zu testen (Tolwani et al., 1999).

William Langstons Entdeckung, dass das Pethidin-Derivat 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) bei Drogenabhängigen Parkinsonismus auslöste (Langston et al., 1983), lenkte die Parkinsonforschung in die intensive Untersuchung der Rolle von Neurotoxinen in der Pathogenese der Erkrankung und die Entwicklung von Tiermodellen (Kandel et al., 2000). Aus Primatenmodellen mit MPTP stammt die These, dass durch den Verlust des dopaminergen Inputs aus der SN pars compacta der indirekte motorische Schaltkreis im Striatum verstärkt, der direkte vermindert aktiv ist, wodurch es zu gesteigerter Aktivität im internen Pallidumsegment kommt, das zu verstärkter Hemmung der thalamokortikalen und tegmentaleneurone des Mittelhirns und so zu verstärkten hypokinetischen Symptomen führt (Kandel et al., 2000).

Aufgrund der Ähnlichkeit ihrer funktionellen Neuroanatomie mit dem Menschen, insbesondere bezüglich der Organisation der Schaltkreise von Kortex und Basalganglien, werden am häufigsten Ratten als Modelltiere für neurologische Erkrankungen verwendet (Cenci et al., 2002). Um den nigrostriatalen Dopaminverlust zu erzeugen, können die Neurotoxine 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) oder Rotenon verwendet werden (Betarbet et al., 2002; Greenamyre et al., 2003). Rotenon ist jedoch als Parkinsonmodell aufgrund seiner unspezifischen Toxizität auf periphere Organe und die mangelnde dopaminerge Neurodegeneration bei subkutaner Applikation zunehmend unter Kritik geraten (Lapointe et al., 2004; Ravenstijn et al., 2008). MPTP kann bei Ratten keinen Dopaminverlust erzeugen, da die Tiere über die ausgeprägte Fähigkeit verfügen, das Neurotoxin intrazellulär in Vesikeln abzusondern (Cenci et al., 2002; Staal et al., 2000). MPTP findet jedoch Anwendung im Maus- oder Primatenmodell.

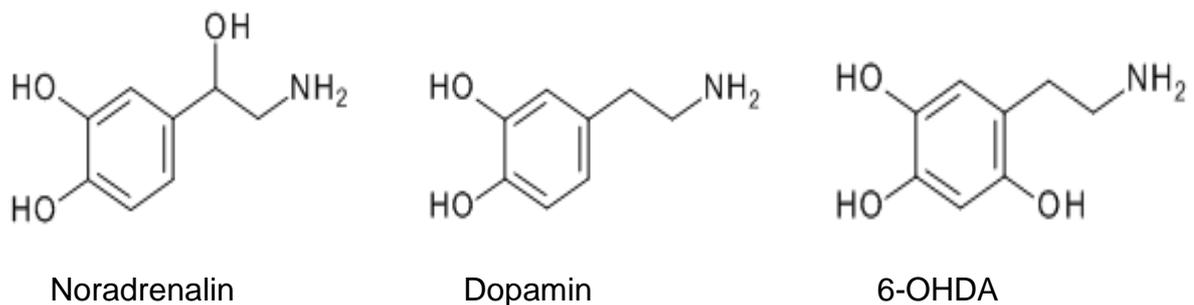


Abbildung 1: Strukturformeln der Katecholamine Noradrenalin und Dopamin und des Neurotoxins 6-OHDA.

Da 6-OHDA die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann, muss es intrazerebral appliziert werden. Typische Applikationsorte sind das mediale Vorderhirnbündel (medial forebrain bundle, MFB), das Striatum, die SN oder der Ventrikel. Um eine unspezifische mechanische Läsion entlang der nigrostriatalen Bahn zu vermeiden, wurde das Toxin in den dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuchen intraventrikulär appliziert. Zudem ist die Topographie des dopaminergen Zellverlustes bei intraventrikulärer 6-OHDA-Applikation als dem Patienten ähnlich beschrieben (Rodriguez et al., 2001).

6-OHDA ähnelt in seiner Struktur (Abbildung 1) katecholaminergen Transmittern und kann daher über den Dopamin- oder Noradrenalintransporter in die Nervenendigungen aufgenommen werden. Um eine spezifische dopaminerge Läsion zu setzen, muss ein Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer wie z.B. Desipramin oder Nortriptylin zum Schutz der noradrenergen Neurone gegeben werden. Das hochreaktive 6-OHDA oxidiert intrazellulär unter Bildung von ROS, die zelluläre Proteine, Membranlipide und die DNA schädigen (Schwartzing and Huston, 1996). Außerdem inhibiert 6-OHDA Komplex I und IV der Atmungskette (Blum et al., 2001; Deumens et al., 2002). Oxidativer Stress und ATP-Mangel führen so zum Zelltod.

Das Ausmaß der Läsion hängt zum einen von der verwendeten Dosis, zum anderen vom Applikationsort und der Empfindlichkeit der verwendeten Spezies ab (Tolwani et al., 1999). Im Gegensatz zur Parkinsonerkrankung beim Menschen findet beim toxischen Modell keine chronisch-progressive, sondern eine akute Neurodegeneration statt, die ihr Maximum einige Tage nach Applikation des Giftes erreicht und dann nicht weiter fortschreitet.

Je nachdem, welches Stadium der Erkrankung im Modell untersucht werden soll, müssen die Dosis und der Applikationsort des 6-OHDA entsprechend gewählt werden (Deumens et al., 2002).

Als Korrelat der Parkinsonsymptome beim Menschen finden sich bei der Ratte nach bilateraler intrazerebraler Administration von 6-OHDA eine abnorme Ruhehaltung, eine verminderte Gleichgewichtskontrolle, Kleinschrittigkeit, verminderte und verlangsamte spontane motorische Aktivität, Muskelsteifigkeit sowie ein Ansprechen auf L-DOPA-Medikation (Cenci et al., 2002). Verschiedene Tests wurden entwickelt, um die Verhaltensveränderungen nach der Läsion im uni- oder bilateralen Modell messen zu können (Deumens et al., 2002; Meredith and Kang, 2006).

Eine starke bilaterale Läsion führt meist zu Aphagie und Adipsie bei den Tieren (Deumens et al., 2002; Ungerstedt, 1971), weswegen häufig das asymmetrische Modell mit unilateraler 6-OHDA Läsion bevorzugt wird. Ein bilaterales Modell bringt jedoch den Vorteil mit sich, dass es der Situation des Patienten näher kommt, bei dem auch beide Hirnhälften betroffen sind. Zudem

könnten von der intakten Hemisphäre bei einer unilateralen Läsion Axone in die lädierte Region einspießen, was möglicherweise zu einer nicht unerheblichen Verfälschung der Ergebnisse führt, wenn kompensatorische Prozesse nach einer Läsion untersucht werden sollen (Deumens et al., 2002). Aus diesen Gründen wurde eine bilaterale Läsion in den der Arbeit zugrunde liegenden Versuchen verwendet. Um eine ausreichende Trainierbarkeit der Tiere zu gewährleisten, wurde eine milde Läsion verursacht, was einem Frühstadium der Erkrankung entsprechen würde.

1.3 Bewegungstherapie bei Parkinsonpatienten

Während vor einigen Jahren noch schädliche Folgen körperlichen Trainings bei zerebralem Parenchymschaden diskutiert wurden (Humm et al., 1999; Humm et al., 1998; Kozlowski et al., 1996), wird heute der Nutzen von Bewegungstherapie in der Neurologie weithin anerkannt und intensiv erforscht. Seit 1981 die erste kontrollierte klinische Studie über Physiotherapie bei Morbus Parkinson veröffentlicht wurde, ist die Zahl der Veröffentlichungen insbesondere in den letzten Jahren exponentiell gestiegen. 2004 wurden die ersten Richtlinien zur evidenzbasierten Durchführung der Physiotherapie auf Grundlage von experimentellen Studien, klinischer Expertise und Patientenerfahrung veröffentlicht (Keus et al., 2009).

Die Physiotherapie hat dabei verschiedene Aufgaben: erstens eine Verbesserung der motorischen Einschränkungen entweder über kompensatorische Strategien, welche eine Umgehung der defizitären Verschaltung in den Basalganglien ermöglichen sollen, oder durch eine Mobilisierung funktioneller Reserven. Beides induziert Lernvorgänge, die durch regelmäßiges Wiederholen Verbesserungen erzielen. Zweitens geht es um das Management möglicher krankheits- oder altersbedingter Folgeprobleme im muskuloskelettalen oder kardiovaskulären Bereich. Drittens soll eine Sturzprävention erfolgen sowie viertens eine generelle Verhaltensänderung beim Patienten durch Anregung zu vermehrter körperlicher Aktivität (Morris et al., 2010).

Obwohl mittlerweile ausreichend Evidenz für die Wirksamkeit gezielten Trainings für die Verbesserung klinischer Scores wie des Unified Parkinson's Disease Rating Scale UPDRS (Ebersbach et al., 2010), der körperlichen Funktionsfähigkeit, der Lebensqualität, der Kraft, des Gleichgewichts, der Ganggeschwindigkeit (Goodwin et al., 2008) und für das Management von Folgeerkrankungen (Morris et al., 2010) vorliegt, erhalten noch immer zu wenige Patienten Zugang zu einer evidenzbasierten Form von Physiotherapie (Hirsch and Farley, 2009; Keus et al., 2009). Jedoch ist es bei einer Erkrankung wie Morbus Parkinson, bei welcher die Patienten unterdurchschnittlich körperlich aktiv sind und Depression, Mangel an Motivation und Initiative als psychische Komorbidität eine Rolle spielen, besonders wichtig, die Patienten zu körperlichem Training anzuleiten (Goodwin et al., 2008; Morris et al., 2010).

Regelmäßige intensive bis mäßige körperliche Aktivität senkt das Parkinsonrisiko (Thacker et al., 2008) bzw. verzögert das Auftreten von Symptomen (Hirsch and Farley, 2009). Verminderte Aktivität ist nicht nur ein Risikofaktor sondern auch eine Folge der Erkrankung (Goodwin et al., 2008; Hirsch and Farley, 2009), die bei starker Ausprägung einen Verlust von Selbstständigkeit und soziale Isolation bedeuten kann (Keus et al., 2007). Diese Mobilitätseinschränkungen sind mit medikamentöser oder neurochirurgischer Therapie nur schwer zu beeinflussen (Keus et al., 2007). Durch körperliches Training jedoch werden selbst bei bereits eingetretenen motorischen Einschränkungen durch die Parkinsonerkrankung positive Effekte auf motorische und kognitive Funktionen erzielt (Goodwin et al., 2008; Hirsch and Farley, 2009; Rosenzweig and Bennett, 1996). Es gibt Hinweise, dass durch körperliches Training in Frühstadien das Fortschreiten der Erkrankung gehemmt werden kann (Fox et al., 2006; Goodwin et al., 2008; Hirsch and Farley, 2009). Erklärt wird dies durch eine aktivitätsabhängige neuronale Plastizität, wobei Synaptogenese, Angiogenese, Neurogenese und ein gesteigerter Glukosestoffwechsel eine Rolle spielen sollen (Hirsch and Farley, 2009). Darüber hinaus werden durch Sport Entzündungsvorgänge im Gehirn gehemmt, oxidativer Stress vermindert, die Kalziumhomöostase stabilisiert und neurotrophe Faktoren ausgeschüttet (Hirsch and Farley, 2009). Durch

Aktivitäten mit Belohnungsgefühl werden die Dopaminspiegel gesteigert, wodurch sich die Lernfähigkeit verbessert; außerdem sind dopaminerge Neurone im Sinne von „*use it or lose it*“ hochempfindlich gegenüber Inaktivität (Fox et al., 2006; Goodwin et al., 2008). Hinweise aus vielen Studien am Tiermodell deuten auf ein frühes Zeitfenster für die Fähigkeit zur Neuroplastizität bei Morbus Parkinson hin, sodass man Patienten so früh wie möglich diagnostizieren und zum Physiotherapeuten überweisen sollte (Hirsch and Farley, 2009).

Trotz des neurodegenerativen Aspekts der Erkrankung scheinen die Gehirne von Parkinsonpatienten daher noch über eine hohe neuroplastische Kapazität zu verfügen, doch bedarf es dazu eines intensiven, gezielten, kontinuierlichen Trainings, was eine große Herausforderung für den Patienten und die ihn betreuenden Gesundheitseinrichtungen darstellt.

1.4 Training im Tiermodell

Viele Erkenntnisse über Wirksamkeit und Wirkweise körperlicher Aktivität bei Morbus Parkinson wurden am Tiermodell gewonnen. In den nachfolgend zitierten Studien verhinderte bzw. verringerte vermehrte körperliche Belastung der lädierten Seite (Tillerson et al., 2003; Tillerson et al., 2001) oder Laufbandtraining (Tajiri et al., 2010) kurz nach der unilateralen Toxinapplikation die motorischen und neurochemischen Defizite (Tajiri et al., 2010; Tillerson et al., 2003; Tillerson et al., 2001; Vergara-Aragon et al., 2003). Zudem potenzierte erzwungene Minderbelastung die Defizite (Tillerson et al., 2002). Training vor der Läsion verhinderte Dopaminverlust und motorische Defizite durch das Toxin (Cohen et al., 2003; Tillerson et al., 2003).

Bei spätem Trainingsbeginn, d.h. 7 Tage nach der Läsion, konnte in diesen Studien kein protektiver Effekt mehr gefunden werden, das Zeitfenster für Nutzen durch Sport scheint also früh zu liegen (Tillerson et al., 2001). Für die bestmöglichen Trainingserfolge sollte darauf geachtet werden, die Übungen gezielt auf die Defizite auszurichten (Ciucci et al., 2008; Vergara-Aragon et al., 2003).

Die zugrunde liegenden Mechanismen konnten noch nicht vollständig geklärt werden, jedoch scheinen die Expression neurotropher Faktoren wie GDNF (Cohen et al., 2003; Smith and Zigmond, 2003) und BDNF (Kleim et al., 2003; Tajiri et al., 2010), Veränderungen in Neurotransmitterspiegeln (Tillerson et al., 2001) sowie vermehrte Dopaminfreisetzung aus den persistierenden Nervenendigungen (Smith and Zigmond, 2003) eine Rolle zu spielen. Diskutiert werden zudem die Erholung der beschädigten Axone (Smith and Zigmond, 2003), das Aussprossen neuronaler Fortsätze (Kleim et al., 2003; Smith and Zigmond, 2003), Synaptogenese (Bury et al., 2000), Neurogenese (Tajiri et al., 2010), Angiogenese (Li et al., 2005) sowie Reaktion bzw. Proliferation der Astrozyten (Bury et al., 2000; Kleim et al., 2003; Li et al., 2005). Möglicherweise werden funktionelle Verbesserungen auch durch Übertragung der Funktion der degenerierten Nervenzellen auf andere Neuronengruppen bzw. neuronale Netze vermittelt (Smith and Zigmond, 2003; Tillerson et al., 2002). Allgemein gesagt scheint körperliche Aktivität über verschiedene Mechanismen die Voraussetzungen für neuronale Plastizität zu begünstigen (Kleim et al., 2003). Diskutiert wird dabei der Unterschied zwischen forciertem Training, das bei den Tieren Stressreaktionen auslösen könnte, und freiwilligem Training. Von Stress ist bekannt, dass er die positiven Wirkungen des Sports reduzieren kann (Howells et al., 2005; Tajiri et al., 2010), wohingegen freiwilliges Training unter Umständen nicht intensiv genug ist, um Neuroprotektion zu bewirken, wenngleich über die Aktivierung kompensatorischer Mechanismen immer noch positive Verhaltenseffekte erzielt werden (O'Dell et al., 2007; Tajiri et al., 2010). Einige Veröffentlichungen beschreiben, dass forciertes Training in einem frühen Zeitfenster nach der Läsion die Auswirkungen kortikaler Eingriffe potenzieren kann, sei es über den Anstieg der Kerntemperatur, Hypermetabolismus oder die Exzitotoxizität von Glutamat (Humm et al., 1999; Humm et al., 1998; Kleim et al., 2003; Kozlowski et al., 1996). Um diesem Problem zu begegnen, begann das Training in den Versuchen dieser Arbeit zu einem späten Zeitfenster und mit milder Intensität. Als wichtiges Argument für milde Intensität kommt dazu, dass ein simples Übertragen der sehr intensiven Trainingsprotokolle auf die Klinik die Compliance der Patienten schmälern würde (O'Dell et al., 2007).

Selbst wenn bei vielen Versuchsdesigns bislang publizierter Studien die Trainingseinheit ausschließlich nach der Läsion angesetzt war, wurden die Ratten schon vor der Toxinapplikation über kürzere oder längere Zeit mit dem Trainingsgerät vertraut gemacht (Poulton and Muir, 2005; Tillerson et al., 2003; Vergara-Aragon et al., 2003). Dabei ist nicht auszuschließen, dass bereits eine kurze Trainingseinheit einen direkten Einfluss auf die Wirksamkeit des Neurotoxins haben könnte. Beispielsweise könnten die durch die Aktivität erhöhten Dopaminspiegel durch kompetitive Hemmung eine verminderte 6-OHDA Aufnahme bewirken (Tillerson et al., 2001). Körperliches Training scheint die Expressionsdichte der Dopamintransporter herunterzuregulieren (Poulton and Muir, 2005; Tillerson et al., 2003) und somit die Toxinaufnahme zu mindern. Außerdem scheint durch Training der GDNF-Spiegel temporär anzusteigen, was im Versuch von Cohen et al. (2003) mit verminderten Dopaminverlusten bei 6-OHDA-Applikation nach Training in Verbindung gebracht wurde (Cohen et al., 2003). Daher wurde im Versuchsdesign der Experimente dieser Dissertation bewusst auf Rotarodeinheiten vor der Operation verzichtet, um spezifisch untersuchen zu können, welche Effekte Training nach bereits abgeschlossener Neurodegeneration bewirken kann.

1.5 Die Bluthirnschranke: Aufbau und Funktion

Das Gehirn gehört gemeinsam mit Lunge und Niere zu den am besten durchbluteten Organen (Wolburg et al., 2009b). Für die sensiblen zerebralen Funktionen ist es von essenzieller Bedeutung, dass ein geregelter Stoffaustausch zwischen dem systemischen Kreislauf und der zerebralen Mikroumgebung stattfindet. Zum einen muss das Gehirn vor neurotoxischen Substanzen geschützt, zum anderen muss der Nährstoffbedarf gedeckt werden. Zu diesem Zweck sind die Kapillaren im Gehirn um den Faktor 50-100 weniger durchlässig als in der Peripherie (Abbott, 2002). Der erste, der eine Schranke zwischen Blut und Gehirn vorschlug, war 1885 Paul Ehrlich, der intravasal appliziertes Trypanblau in allen Körpergeweben, nicht aber im Gehirngewebe von Versuchstieren nachweisen konnte (Ehrlich, 1885). Ergänzend zeigte sein Schüler Edwin Goldman 1913 (Goldmann, 1913), dass eine solche Barriere

zwischen Liquor und Gehirn nicht existiert (Nag et al., 2011; Wolburg et al., 2009a). Obwohl das Konzept somit schon mehr als 100 Jahre alt ist, sind die molekularen Grundlagen dieser hochspezialisierten Barriere bislang erst teilweise verstanden. Man weiß, dass integrale Bestandteile der Bluthirnschranke (blood brain barrier, BBB) die Endothelzellen, die sie umgebende Basalmembran oder auch Membrana limitans gliae perivascularis (Wolburg et al., 2009b) genannt, die damit in Verbindung stehenden Endfüßchen der Astrozyten, die Perizyten, die Mikroglia, Neurone und spezielle Komponenten der extrazellulären Matrix sind (Abbott, 2002; Nag et al., 2011; Wolburg et al., 2009a; Wolburg et al., 2009b). Zusammenfassend wird von der neurovaskulären Einheit (Nag et al., 2011; Zlokovic, 2008) oder dem gliovaskulären Komplex (Wolburg et al., 2009a) gesprochen, um die Bedeutsamkeit des Zusammenspiels der verschiedenen Strukturen zu betonen. Endothelzellen beschränken mit ihren Tight Junctions die parazelluläre Diffusion kleinerer hydrophiler Moleküle wie z.B. Ionen („gate function“), während die Caveolae des Endothels für den transzellulären Transport größerer Moleküle wie z.B. Serumproteine verantwortlich sind. Kleine lipophile Substanzen wie z.B. Kohlendioxid, Sauerstoff und Ethanol können frei über die Lipidmembranen diffundieren, während für den Transport lebenswichtiger polarer Moleküle wie Glucose und Aminosäuren spezifische Transporter nötig sind (Abbott, 2002). Die Ausbildung von Tight Junctions geschieht im Zusammenhang mit Adherens Junctions. Tight Junctions befinden sich am apikalen Ende des Spaltes zwischen den Endothelzellen und grenzen damit den apikalen vom basolateralen Membranbereich ab („fence function“). Darüber hinaus fungieren sie über ihre Interaktion mit zytoplasmatischen Proteinen in der Signaltransduktion (Heiskala et al., 2001; Tsukita et al., 2001). Tight Junctions setzen sich aus verschiedenen membrangebundenen und zytoplasmatischen Proteinen zusammen: Claudine und Occludin durchziehen die Zellmembran vierfach und besitzen zwei zytoplasmatische Domänen. Sogenannte junctional adhesion molecules (JAM), die zur Immunglobulin Superfamilie gehören, haben eine Transmembrandomäne und eine lange extrazelluläre Komponente (Tsukita et al., 2001; Wolburg et al., 2009a). Diese

Membranproteine interagieren miteinander und über Adapterproteine mit PDZ-Domänen wie ZO-Proteine mit dem Zytoskelett, insbesondere Actin, von dem man weiß, dass es Bindestellen für Claudin, Occludin und ZO Proteine hat (Tsukita et al., 2001). In Knock-out-Studien wurde herausgefunden, dass Occludin eher eine regulatorische Funktion zukommt, während Claudine essentiell für den Erhalt der Permeabilitätsbarriere sind (Heiskala et al., 2001; Nag et al., 2011; Wolburg et al., 2009b). Durch die spezielle Kombination unterschiedlicher Claudine, wobei für die BBB Claudin-3, -5 und 12 beschrieben sind, scheint sich eine selektive Durchlässigkeit für bestimmte Ionen zu ergeben (Heiskala et al., 2001; Tsukita et al., 2001; Wolburg et al., 2009a; Wolburg et al., 2009b). Der Verlust von Claudin-3 unter pathologischen Bedingungen wie bei Entzündungen oder Tumoren ist mit einer eingeschränkten Funktion der BBB vergesellschaftet (Wolburg et al., 2003).

Eine besondere Rolle für Induktion und Erhalt der BBB scheint den Astrozyten zuzukommen, die mit ihren Endfüßchen das Endothel überziehen, wo sie wahrscheinlich einen bislang nicht identifizierten löslichen Faktor freisetzen (Abbott, 2002). Nur differenzierte Astrozyten scheinen diese Aufgabe erfüllen zu können (Abbott, 2002; DeBault and Cancilla, 1980; Wolburg et al., 2009b). Da Hinweise auf eine 6-OHDA induzierte Dedifferenzierung von Astrozyten gefunden wurden (Wachter et al., 2010), ist denkbar, dass dies eine Funktionsstörung der BBB zu Folge haben könnte.

Astrozyten und ihrem Wasserkanal Aquaporin 4 (AQP4) wird eine wesentliche Funktion in der Homöostase des Ionen- und Wasserhaushalts des Gehirns zugeschrieben (Vizuete et al., 1999). Unter physiologischen Bedingungen findet sich AQP4 in den Endfüßchen der Astrozyten angeordnet in sogenannten orthogonal arrays of particles (OAP) (Wolburg et al., 2009b), spezialisierten Verbänden von Membranproteinen in polarisierten Astrozyten. Unter pathologischen Einflüssen kann es zum Verlust der OAPs kommen und AQP4 wird auch in anderen Bereichen der Membran exprimiert (Wolburg et al., 2009b).

Ein Verlust der Integrität der BBB geht mit einem gestörten Wasserhaushalt des Gehirns einher. Vasogene Ödeme sind gekennzeichnet durch eine vermehrte

Durchlässigkeit der BBB insbesondere für Plasmaproteine, die vermehrt Flüssigkeit aus den Gefäßen ins Gewebe ziehen (Nag et al., 2009). Bei vasogenen Ödemen ist AQP4 daran beteiligt, die vermehrte extrazelluläre Flüssigkeit aus dem Parenchym wieder in die Gefäße oder den Liquor zu drainieren (Nag et al., 2009).

Im Gegensatz dazu kann die Expression von AQP4 aber auch das Anschwellen von Zellen im Sinne eines zytotoxischen Ödems fördern (Nag et al., 2009). Zytotoxische Ödeme zeichnen sich durch defekte zelluläre Homöostasemechanismen aus, wie beispielsweise den Ausfall der Na⁺/K⁺ Pumpe durch ATP-Mangel, was zu einer osmotischen Überladung führt, die wiederum Wasser in die Zelle zieht. Im Gehirn scheinen hauptsächlich Gliazellen von Schwellung betroffen zu sein, da sie eine wesentliche Rolle in der Transmitter- und Ionenhomöostase einnehmen und außerdem AQP4 exprimieren (Nag et al., 2009).

1.6 Pathologika der Bluthirnschranke bei Morbus Parkinson und Parkinson Tiermodellen

Die Rolle von Veränderungen der BBB in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen erhielt in den letzten Jahren zunehmend wissenschaftliche Aufmerksamkeit (Grammas et al., 2011; Zlokovic, 2008). Es erscheint einleuchtend, dass eine Struktur, die zum einen die Energieversorgung gewährleisten und zum anderen vor systemischen Schadstoffen schützen muss, einen entscheidenden Faktor in der Entstehung von Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) spielen kann. Bisher sind erst einige Störungen der BBB, die bei Morbus Parkinson und seinen entsprechenden Tiermodellen von Bedeutung sind, bekannt. Entzündungsvorgänge werden von vielen Autoren als Verursacher erhöhter Permeabilität genannt (Grammas et al., 2011; McGeer and McGeer, 2004; Whitton, 2007). Die Entzündung könnte durch systemische Stimuli wie z.B. bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), Umwelttoxine etc. getriggert sein und über die begleitende Produktion von ROS, die Aktivierung von Mikrogliazellen und den Übertritt potentiell schädlicher Blutbestandteile ins Gehirnparenchym zur Zerstörung von Neuronen führen. Die

dopaminergen Nervenzellen der SN werden dabei als besonders empfindlich gegenüber oxidativem Stress angegeben, da die Dopaminproduktion per se bereits ROS erzeugt (Whitton, 2007). Darüber hinaus ist dort die Dichte an Mikrogliazellen als vergleichsweise hoch beschrieben (Whitton, 2007). Der resultierende Neuronenuntergang potenziert wiederum die Entzündungsvorgänge. Der initiale Trigger für die Aktivierung von Mikrogliazellen könnte dabei bereits viele Jahre vor dem Auftreten erster Symptome liegen (Whitton, 2007).

Carvey et al. berichteten 2005 von Neuroinflammation mit Mikrogliaaktivierung durch 6-OHDA Injektion in den MFB oder die SN (Carvey et al., 2005). Gleichzeitig lieferten sie durch den Übertritt intravasaler Tracer ins Gehirnparenchym den Beweis für defekte Barrieremechanismen.

Einen möglichen Zusammenhang zwischen der Einwirkung von Umwelttoxinen und genetischer Veranlagung fanden Drożdżik et al. (Drożdżik et al., 2003), die eine Korrelation zwischen eines Polymorphismus des P-Glycoproteintransporter MDR1 Gens, der Einwirkung von Pestiziden und dem Auftreten eines Parkinsonsyndroms bei polnischen Patienten zeigte. Die genetisch bedingte Empfindlichkeit durch die minderaktive Variante des Transporters, der das Gehirn an der BBB normalerweise vor Umwelttoxinen schützt, in Kombination mit der Exposition kann so zum erhöhten Risiko der Parkinsonschen Erkrankung geführt haben.

Den Aspekt der möglichen unzureichenden Nährstoffversorgung durch Veränderungen der BBB beleuchteten Farkas et al. (Farkas et al., 2000), die bei Alzheimer- und Parkinsonpatienten pathologische Verdickungen der perikapillären Basalmembranen fanden.

Die Bedeutung, die diese neuen Erkenntnisse für neue Therapieansätze bzgl. Entzündungsmodulation und BBB haben, wird sich in den folgenden Jahren erweisen müssen. Bereits jetzt sind antiinflammatorische Strategien zur Neuroprotektion bei Morbus Parkinson in Diskussion (Lu and Hu, 2011).

1.7 Fragestellung

1.7.1 Effekte moderaten körperlichen Trainings auf die durch 6-OHDA-induzierten motorischen und neurochemischen Defizite der Ratte

Auf Grundlage von Ergebnissen aus klinischen Studien der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Daniela Berg (Berg, Godau et al., unveröffentlichte Daten; Dissertation von M. Herfurth) bei denen Sport in Form von Nordic Walking und Gymnastik symptomatische Verbesserungen und morphologische Effekte im Kernspintomogramm bewirkt hatte, sollte eine vergleichbare Studie am Tiermodell durchgeführt werden. Ziel war zum einen zu überprüfen, ob man die Ergebnisse der klinischen Studie am Tier reproduzieren kann, ob sich also durch moderates Training der parkinsonoiden Ratte Verhaltensverbesserungen erzielen lassen, und ob sich in der Magnetresonanztomographie (MRT) ein morphologisches Korrelat findet. Zum anderen sollte mittels immunhistochemischer Färbungen nach zellulären Effekten gesucht werden, die den Trainingseffekt vermitteln könnten.

1.7.2 Akute Nebenwirkungen der 6-OHDA Läsion auf die Bluthirnschranke und die zerebrale Flüssigkeitshomöostase

In den Kernspinaufnahmen, die mit dem Ziel, Trainingseffekte zu detektieren, angefertigt wurden, fiel eine Hyperintensität an Tag 4 nach der 6-OHDA Injektion auf. Da Hyperintensität in T2w Aufnahmen auf Flüssigkeit hinweist, wurden weitere Untersuchungen angeschlossen, um herauszufinden, ob sich histologisch Hinweise auf ein Hirnödem und einen Defekt der BBB finden. Zu diesem Zweck wurden weitere immunhistochemische und histologische Untersuchungen durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Zunächst wurde in einer ersten Versuchsreihe mit einer niedrigen Tierzahl (n = 14) die adäquate Dosis des Neurotoxins 6-OHDA bestimmt, das zu messbaren motorischen Defiziten führt und gleichzeitig die Trainierbarkeit der Tiere gewährleistet. Die Trainingsmethode auf dem Rotarod wurde etabliert. In T2 gewichteten (T2w) Kernspinaufnahmen sollte untersucht werden, ob sich ein Trainingseffekt in MR morphologischen Veränderungen des Gehirnparenchyms widerspiegelt.

In einer zweiten Versuchsreihe mit durch die zusätzlichen nichttrainierten Kontrollgruppen größerer Tierzahl (n = 38) lag der Schwerpunkt auf der genaueren Analyse des Trainingseffekts auf verhaltensbiologischer und immunhistochemischer Basis. Auf eine erneute MR Messung wurde aus logistischen Gründen verzichtet.

Um den Trainingseffekt immunhistochemisch zu untersuchen wurden in dieser Arbeit Antikörper gegen Tyrosinhydroxylase (TH) als Marker für dopaminerge Zellen und Ki-67 als Marker für proliferierende Zellen verwendet. Auf Basis der MRT-Ergebnisse aus der klinischen Studie von Prof. Berg wurden als zu untersuchende Regionen das Striatum und das Kleinhirn ausgewählt.

Bezüglich der beobachteten Hyperintensität in T2w MRT Aufnahmen nach der 6-OHDA Läsion wurde an zwei zusätzlichen Tieren außerhalb des Trainingsversuches zusätzliche MR Sequenzen mit Diffusionswichtung angefertigt sowie an einzelnen Ratten eine Verlaufsbeobachtung der Hyperintensität an den Tagen 2, 5, 7, 9 und 11 nach Läsion durchgeführt. Um die histologischen Veränderungen im Bereich der Hyperintensität zu untersuchen, wurden Semidünnschnitte und immunhistochemische Färbungen der betroffenen Areale auf Hinweise auf Veränderungen der Bluthirnschranke (Antikörper gegen Claudin-3, AQP4, Fibrinogen) sowie Veränderungen der Zelldichte (Antikörper gegen GFAP, Nestin, Kernfärbung Sytox Green) untersucht.

Zeitplan

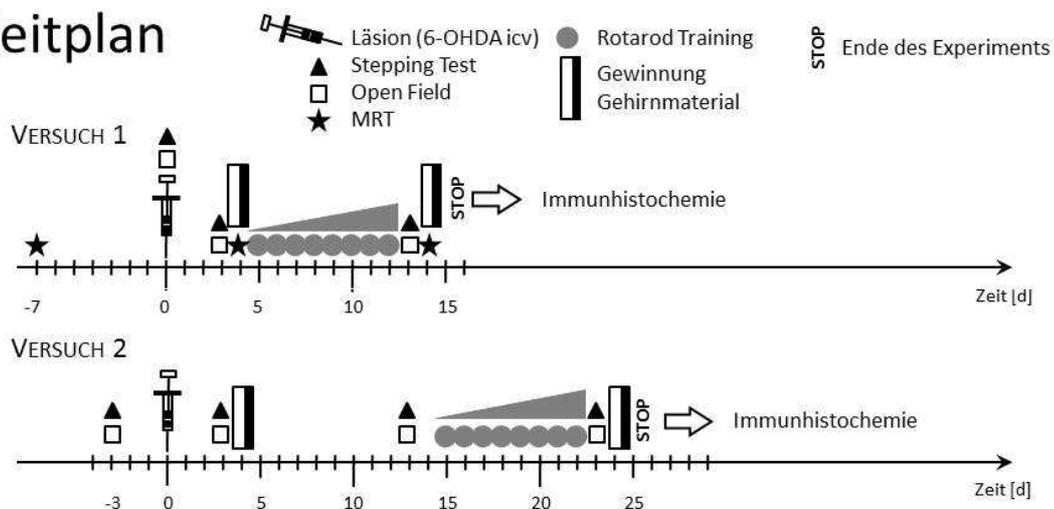


Abbildung 2: Ablauf des ersten und zweiten Trainingsversuches.

In der ersten Versuchsreihe wurden 7 Tage vor der Läsion sowie 4 und 14 Tage danach T2w MRT-Aufnahmen angefertigt. An Tag 4 wurden einzelne, an Tag 14 alle restlichen Gehirne nach dem Kernspin für histologische Untersuchungen gewonnen. Die Verhaltenstestung mittels Open Field Activity Monitoring und Stepping Test erfolgte am Läsionstag unmittelbar vor der Mikroinjektion von Trägerlösung oder 6-OHDA, 3 und 13 Tage im Anschluss. Das Rotarodtraining erfolgte an den Tagen 5-12 nach Läsion.

In der zweiten Versuchsreihe wurde die Verhaltenstestung 3 Tage vor, an den Tagen 3, 13, und 23 nach der Läsion durchgeführt. Aufgrund der höheren Tierzahl war die präoperative Testung direkt am Läsionstag zeitlich nicht möglich. Die Verhaltenstestungen an den Tagen 3 und 13 dienten dazu, eine eventuelle progressive Degeneration der dopaminergen Neurone nach der intraventrikulären 6-OHDA Applikation nachzuweisen. Die Gewinnung von Gehirnen für immunhistochemische Untersuchungen erfolgte an den Tagen 4 und 24 nach Läsion. Das Rotarodtraining erfolgte im Vergleich zum ersten Versuch verzögert, an den Tagen 15-22, um das Training erst nach abgeschlossener toxischer Degeneration durchzuführen.

2.2 Tiere und Läsionsmodell

2.2.1 Versuchstiere

Beide Versuchsreihen wurden mit männlichem Sprague Dawley Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt, die zu Beginn der Experimente 240-300 g wogen. Die Tiere wurden in Gruppen von 4-6 Ratten in mit Streu gefüllten Macrolon IV Käfigen bei 20-22° Celsius, 50-60% Luftfeuchtigkeit unter einem standardisierten Tag-Nacht-Rhythmus (Licht von 7-19 Uhr, Dunkelheit von 19-7 Uhr) gehalten. Sie erhielten täglich 12 g Nagerfutter und unbegrenzt Wasser zur freien Verfügung. Alle Experimente wurden unter hellen Bedingungen durchgeführt. Die Tiere wurden 7 Tage vor Beginn der Verhaltensexperimente an den Untersucher durch täglichen Kontakt gewöhnt. Die Experimente und Bedingungen wurden von der lokalen Ethikkommission im Regierungspräsidium Tübingen genehmigt. Es wurden alle Bemühungen angestellt, um Schmerz und Unwohlsein der Tiere zu minimieren.

2.2.2 Läsion

Die intracerebroventrikuläre (icv) Applikation von 6-OHDA erfolgte gemäß der Methode von Rodriguez (Rodriguez et al., 2001), um ein dem Patienten möglichst ähnliches Muster dopaminerger Degeneration zu erreichen. Um Komplikationen bezüglich einer möglichen Verletzung des Sinus sagittalis bei der Läsion zu vermeiden, erfolgte die Applikation abweichend zu Rodriguez nicht in den 3. Ventrikel, sondern in beide Seitenventrikel (Abb. 3). Die Narkose erfolgte im ersten Versuch mit 65 mg/kg Körpergewicht (KG) Pentobarbital intraperitoneal (ip) (Narcoren®, Merial, Hallbergmoos, Deutschland), im zweiten Versuch aufgrund der besseren Verträglichkeit und flexibleren Dosierungsmöglichkeiten mit 1-2% Isofluran per inhalationem. In beiden Versuchen erfolgte die perioperative Analgesie mit 3-5 µg/kg KG Fentanyl (Fentanyl-ratiopharm®, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) sowie 5 mg/kg KG Carprofen (Rimadyl® Rind, Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Deutschland) zur postoperativen Analgesie. Zum Schutz der noradrenergen Neurone wurde 20 min vor der Injektion von 6-OHDA 30 mg/kg KG Nortriptylin in isotoner

Kochsalzlösung (Nortriptylinhydrochlorid, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) ip appliziert. Der Schädel wurde mittels stereotaktischem Rahmen (Stoelting, Illinois, USA) fixiert. Eine Heizmatte schützte die Tiere vor intraoperativer Hypothermie. Die Augen wurden mit einer geeigneten Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) vor Hornhautschäden durch Austrocknung geschützt. Nach Desinfektion der Kopfhaut mit Povidoniod-Lösung (Braunol, Braun, Deutschland) wurde das Bregma, die Stelle, an der sich Koronarnaht und Sagittalnaht treffen, dargestellt. Es erfolgte die Injektion von je 35 µg oder 105 µg 6-OHDA (6-Hydroxydopaminhydrobromid, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) gelöst in 10 µl Trägerlösung (0,1% Ascorbinsäure / 0,9% NaCl) in beide Seitenventrikel (AP - 0,7 mm, ML +/- 1,3 mm, DV -3,6 mm in Bezug auf das Bregma gemäß (Paxinos and Watson, 1997)) mittels einer Mikrospritze (SGE, Deutschland). Shamgruppen erhielten nur je 10 µl Trägerlösung pro Seitenventrikel. Die Injektionsgeschwindigkeit betrug 2,5 µl/min, im Anschluss wurde die Kanüle weitere vier Minuten belassen, um eine ausreichende Diffusion des Infusats zu gewährleisten.

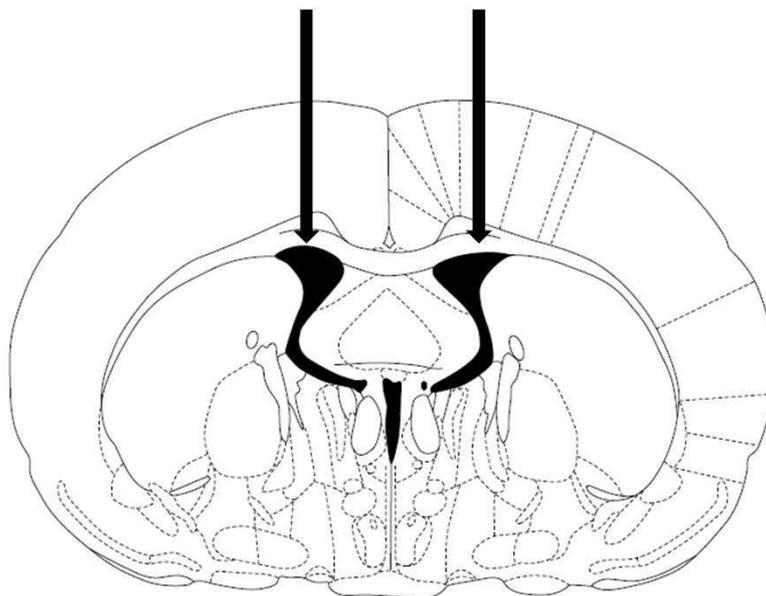


Abbildung 3: Schemazeichnung des Injektionsortes gemäß Paxinos und Watson (1997).

Die Bohrlöcher im Schädel wurden mit Knochenwachs (Ethicon, Johnson & Johnson, Deutschland) verschlossen, eine prophylaktische Antibiose wurde mit

Nebacetinpuder (Nebacetin = Bacitracin + Neomycin, Sandoz, Österreich) durchgeführt und die Wunde mit 4-5 Stichen genäht. Aufgrund des Risikos einer Aphagie und Adipsie bei einer bilateralen Läsion wurde das Körpergewicht postoperativ täglich kontrolliert. Geschwächte Tiere wurden mit Milchbrei und subkutanen Injektionen von 1-2 ml eines 1:1 Gemisches aus Jonosteril®-Glucose (Fresenius Kabi, Deutschland) und Amynin® (Merial, Halbergmoos, Deutschland) unterstützt.

2.3 Training

Von Tag 5-12 im ersten Versuch bzw. von Tag 15-22 im zweiten Versuch wurden alle Tiere der Trainingsgruppen auf dem Accelerating Rota-Rod für Ratten 7750 (TSE, Technical&Scientific Equipment GmbH, Bad Homburg, Deutschland) trainiert.

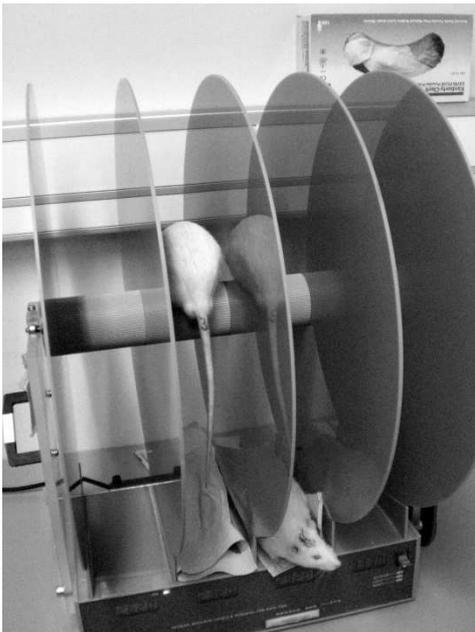


Abbildung 4: Rotarod.

Die Tiere mussten täglich 4 fünfminütige Einheiten absolvieren mit 30 Minuten Pause zwischen den Trainingseinheiten. Die Geschwindigkeit blieb bei jeder einzelnen Trainingseinheit konstant, wurde im Verlauf des Trainings jedoch schrittweise standardisiert erhöht von zunächst 4 Umdrehungen pro Minute (rpm) auf 16 rpm (Trainingsprotokoll vgl. Abb.: 1. Tag: 4-8-8-4 rpm, 2. Tag: 4-8-

8-4 rpm, 3. Tag: 8-8-8-8 rpm, 4. Tag: 8-12-12-8 rpm, 5. Tag: 8-12-12-8 rpm, 6. Tag: 12-12-12-8 rpm, 7. Tag: 12-12-12-12, 8. Tag: 12-12-16-12 rpm). Wenn eine Ratte während des Trainings vom Rotarod fiel, wurde sie wieder auf die Stange gesetzt, um das Training fortzusetzen.

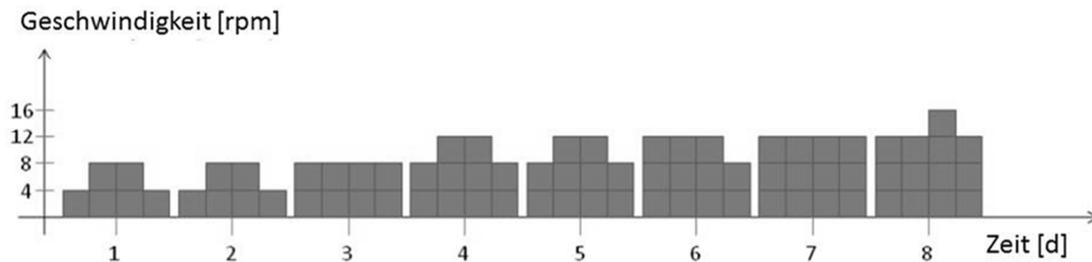


Abbildung 5: Trainingsprotokoll.

2.4 Verhaltenstestung

2.4.1 Stepping Test

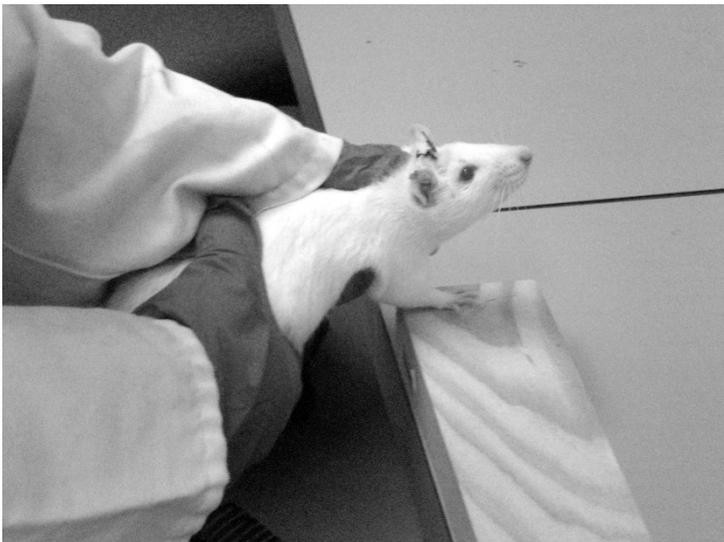


Abbildung 6: Adjusting Stepping Test.

Als Maß für die Hypokinese der Vorderpfoten wurde der Adjusting Stepping Test gemäß Olsson et al. verwendet (Olsson et al., 1995). Das Tier wurde hierfür mit dem Rumpf und der nicht zu untersuchenden Pfote in den Händen des Untersuchers so gehalten, dass lediglich die zu untersuchende Pfote frei beweglich war. Das Tier wurde nun seitlich während 15 s über einen 1 m langen Holzbalken bewegt, sodass die zu untersuchende Pfote das Holz mit

leichtem Druck berührte. Die vom Tier durchgeführten Ausgleichsschritte wurden über eine Distanz von 0,9 m gezählt. Dieser Test wurde pro Pfote und Richtung jeweils zweimal pro Tier durchgeführt, die durchschnittliche Anzahl an Ausgleichsschritten pro Pfote und Richtung wurde statistisch ausgewertet.

2.4.2 Open Field Activity Monitoring

Die Erfassung des spontanen Explorationsverhaltens erfolgte pro Ratte in zwei Aktivitätsboxen (47x44x44 cm; TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland) in der ersten Versuchsreihe an jedem Testtag über jeweils 15 min und in der zweiten Versuchsreihe über jeweils 10 min pro Tier. Vertikale und horizontale Bewegungen wurden als Unterbrechungen von Lichtschranken in 3 und 13 cm über dem Untergrund registriert.



Abbildung 7: Open Field Activity Monitoring Box.

Verarbeitet wurden diese Daten mittels der Software MOTI V 4.14 (TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland). Messparameter wurden in der ersten Versuchsreihe als „aktive Zeit“, „zurückgelegte Strecke“, „Zeit in aufgerichteter Position“ und „Anzahl der Aufrichtungen“ festgelegt. In der zweiten Versuchsreihe wurden „zurückgelegte Strecke“ und „Anzahl der Aufrichtungen“ ausgewertet.

2.4.3 Anzahl der Stürze vom Rotarod

Während des achttägigen Rotarodtrainings in der zweiten Versuchsreihe wurde bei trainierten Läsions- (n = 10) und Shamtieren (n = 8) für die gesamte 20-minütige Trainingszeit (4 x 5 min) mittels Strichliste die Anzahl der Stürze von der Rotarodstange gezählt.

2.5 Histologie

2.5.1 Gewebeaufarbeitung und Präparation für Immunhistochemie

Zur Gewinnung der Gehirne zur immunhistochemischen Untersuchung wurden die Tiere durch ip verabreichtes Pentobarbital in eine tiefe Narkose versetzt (65 mg/kg KG; Narcoren, Merial, Halbergmoos, Deutschland). Abdomen und Thorax wurden zügig eröffnet, um das Herz darzustellen. Mittels einer in den linken Ventrikel des Herzens platzierten Kanüle wurde das Gefäßsystem zunächst mit 0,06 g Xylocain und 0,2 ml Heparin (5000 IE/ml) in 50 ml isotonischer Kochsalzlösung und anschließend mit 200 ml Fixierlösung aus 2% Paraformaldehyd (PFA) in 0,125 M Phosphatpuffer (pH 7,4) gespült. Die Tiere wurden dekapitiert, die Gehirne wurden entnommen und die meisten von ihnen in Hälften geschnitten. Nur einzelne Gehirne von Tieren, die außerhalb der Trainingsversuche für die immunhistochemische Untersuchung des im T2w MRT hyperintensiven Areals dienten, wurden nicht geteilt. Die Gehirnhälfte für die immunhistochemischen Analysen wurde für 2 h bei 4°C in 2% PFA nachfixiert, im Anschluss für 2 h in 10 mM phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4) bei 4°C getränkt und schließlich zur Kryoprotektion über Nacht in 30% Sucrose mit PBS gelegt. Die Gewebestücke wurden in Tissue Tek O.C.T.™ (Sakura, 11% Polyvinyl Alkohol, 5% Carbowax) bei -80°C aufbewahrt. Koronarschnitte (20 µm) von Höhe der Commissura anterior (Bregma -0,26 bis -0,4) wurden mittels Kryotom (HM560, Micro, Walldorf, Deutschland) bei -18 bis -22°C angefertigt.

2.5.2 Immunhistochemische Färbungen

Für die Untersuchung des Trainingseffekts und der Veränderungen durch die Injektion von 6-OHDA wurden die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Primär- und Sekundärantikörper verwendet. Für jeden Antikörper wurden Negativkontrolllexperimente durchgeführt, um unspezifische Reaktionen auszuschließen.

Tabelle 1: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper sowie Zellkernfärbung.

	Zielantigen	Eigenschaften	Verdünnung	Hersteller
Primär-antikörper	Anti-TH	monoklonal, Maus	1:1000	Hudson, USA
	Anti-Ki-67	monoklonal, Maus	1:50	DakoCytomation, Hamburg, Deutschland
	Anti-GFAP	polyklonal, Kaninchen	1:400	
	Anti-AQP4 (H-80)	polyklonal, Kaninchen	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA
	Anti- Claudin-3	polyklonal, Kaninchen	1:50	Zymed, USA
	Anti-Nestin	monoklonal, Maus	1:100	Millipore, USA
	Anti- Fibrinogen	polyklonal, Kaninchen-anti- Maus	1:50	Molecular Innovations, USA
Sekundär-antikörper	Anti- Kaninchen	Ziege, Alexa Fluor 546 nm	1:400	Molecular Probes, USA
	Anti-Maus	Ziege, Alexa Fluor 546 nm	1:1000	
	Anti- Kaninchen	Ziege, biotinyliert	1:100	Dianova, Deutschland
Zellkern-färbung	Sytox® Green		1:10000	Molecular Probes, USA
	Syto® 60		1:10000	

Die gefrorenen 20 µm dicken Koronarschnitte wurden zunächst für 90 min mit Präinkubationspuffer (4 % Ziegenserum, 1 % Albumin aus Rinderserum, 0,25 % Triton X-100) und im Anschluss über Nacht mit dem jeweiligen Primärantikörper in entsprechender Verdünnung mit Präinkubationspuffer bei 4°C inkubiert. Nach einer Waschphase wurde der passende fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper für 90 min bei Raumtemperatur aufgebracht. Manche Schnitte wurden mit einer Kernfärbung behandelt. Sekundärantikörper und Kernfärbung wurden mit destilliertem Wasser abgewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit FluorSave™ (Calbiochem, San Diego, USA) und Deckplättchen abgedeckt. Bis zur zeitnah durchgeführten Mikroskopie wurden die gefärbten Schnitte lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

Vor der Färbung mit Anti-Ki-67 wurden die gefrorenen Koronarschnitte zunächst für 5 min mit erwärmtem 10 mM Zitratpuffer vorbehandelt. Die Fluoreszenz wurde mittels eines konfokalen Laserscanmikroskops detektiert (LSM510, Zeiss, Deutschland).

Für die Detektion von Anti-Fibrinogen wurde der in der Tabelle aufgeführte biotinylierte Ziege-anti-Kaninchen IgG Sekundärantikörper verwendet zusammen mit Alkalinphosphatase-konjugiertem Streptavidin (DakoCytomation, Deutschland). Als Substrat diente entweder Naphthol AS-D Chloracetat (Sigma-Aldrich, Deutschland, rot) oder BCIP/NBT (Sigma-Aldrich, Deutschland, blau).

Die Quantifizierung der Fluoreszenz erfolgte jeweils mit dem Intensitätsmessungstool der Software ImageJ (Rasband, 1997-2009) in verschiedenen a priori definierten Zielausschnitten (regions of interest, ROIs). Zunächst wurden an einer zufällig ausgewählten Shamratte die Aufzeichnungsparameter des Laserscanmikroskops so eingestellt, dass die Fluoreszenzfärbung optimal abgebildet wurde. Die zu vergleichenden Aufnahmen der anderen Sham und mit 6-OHDA behandelten Tiere wurden am selben Tag unter Beibehalt der eingestellten Parameter angefertigt, um vergleichbare Intensitäten der Fluoreszenz zu erhalten.

Die Intensitätsmessungen der AQP4 Fluoreszenz wurde in je 3 ROIs im Striatum durchgeführt: dorsales Striatum, ventrikelnahes Striatum und zentrales Striatum. Bei AQP4 wurde zum einen die Intensität der Fluoreszenz um die in

den 3 ROIs zufällig angeschnittenen Blutgefäße bestimmt. Zum anderen wurden 6 zufällig gewählte ROIs ohne angeschnittene Blutgefäße angefertigt, um die Intensität der Fluoreszenz im Neuropil zu messen. Die Ergebnisse der 6-OHDA Tiere (n = 3) wurden als prozentualer Anteil der entsprechenden Ergebnisse von Sham-Tieren (n = 3) angegeben.

Um die Claudin-3 Expression zu messen, wurde ein Tile Scan (921,36 µm x 921,36 µm) aus je 3 Abschnitten des Striatums pro Tier bei 63facher Vergrößerung mit Ölimmersion angefertigt und die Anzahl der Claudin-3 positiven Punkte pro Kapillare manuell verblindet ausgezählt. Auf diese Weise wurde die durchschnittliche Anzahl Claudin-3 positiver Punkte pro Kapillare in Sham- (n = 5) und 6-OHDA-Tieren (n = 4) bestimmt. Durchschnittlich wurden 30 Kapillaren pro Tier untersucht.

Die Färbungen mit GFAP, Nestin, AQP4 und Sytox Green auf den ungeteilten Hirnschnitten dienten zum Erstellen exemplarischer Tile Scans mit niedriger Vergrößerung und wurden nicht quantifiziert.

Die Messung der TH Intensität in der zweiten Versuchsreihe erfolgte in 4 striatalen ROIs pro Tier aus den Gruppen Sham mit Training, Sham ohne Training, 6-OHDA mit Training und 6-OHDA ohne Training (n = jeweils 6). Als Zielregionen dienten das zentrale, das dorsale (nahe des Corpus callosum), das ventrale und das mediale, ventrikelnahes Striatum.

Für die Bestimmung der Ki-67 positiven Zellen in der zweiten Versuchsreihe wurden an Tag 24 nach der Läsion (1 Tag nach Ende des Rotarodtrainings) von je 3 Tieren pro Gruppe (Sham Training, Sham ohne Training, 6-OHDA Training, 6-OHDA ohne Training) Koronarschnitte vom Bereich der Commissura anterior mit Ki-67 und der Kernfärbung Syto 60 gefärbt. Aufnahmen vom Bereich der subventrikulären Zone (SVZ) wurden mit dem konfokalen Zeiss Laserscanmikroskop angefertigt. Ki-67 positive Zellen wurden in 10 ROIs aus der SVZ verblindet manuell ausgezählt.

2.5.3 Gewebeaufarbeitung, Präparation und Auswertung der Semidünnschnitte

Die Gehirnhälfte für die Semidünnschnitte wurde in 4% PFA und 2,5% Glutardialdehyd in 0,125 M PBS nachfixiert. Ein Block aus dem Striatum wurde auf Höhe der Commissura anterior präpariert, mit 1% Osmiumtetroxid (Roth, Deutschland) in 0,12 M Phosphatpuffer gemäß Sørensen's (pH 7.4) für 3 h fixiert, in abgestuften Alkoholreihen dehydriert und über Nacht in Aceton getränkt. Anschließend wurde das Gewebe mit Propylenoxid und aufsteigenden Mischungen aus Propylenoxid und Epon (3:1, dann 1:1, dann 1:3; Fluka, Deutschland) für jeweils 90 min gebracht und schließlich über Nacht in reinem Epon unter Vakuum aufbewahrt. Das auf diese Weise in Epon eingebettete Material wurde für zwei Tage unter 60°C auspolymerisiert. Koronarschnitte (0,5-2 µm) aus dem Striatum wurden mittels eines Ultramikrotoms (Leica, Deutschland) angefertigt und gemäß Richardson (Richardson et al., 1960) gefärbt. Die Semidünnschnitte wurden lichtmikroskopisch (Axioplan2, Zeiss, Deutschland) untersucht. Für jedes Tier wurden sechs Bilder bei niedriger Vergrößerung (20x/0,50 DICII) gemacht. Die Anzahl der Kapillaren pro Bild und die relative Häufigkeit perivaskulärer Höfe wurde verblindet manuell ausgezählt in Sham (n = 5) und 6-OHDA behandelten (n = 3) Tieren. Die Ausdehnung des perivaskulären Hofes wurde mit der AxioVision Software von Zeiss ausgemessen. Durchschnittlich wurden 102 Kapillaren pro Tier vermessen.

2.6 MRT

Die MRT Aufnahmen erfolgten in der ersten Versuchsreihe für alle Tiere 7 Tage vor sowie 4 und 14 Tage nach der icv Mikroinjektion (Sham: n = 6; 35 µg 6-OHDA n = 4; 105 µg 6-OHDA n = 4). Zusätzlich wurden 2 Ratten, welche mit 105 µg 6-OHDA behandelt worden waren, wiederholt an den Tagen 2, 5, 7, 9 und 11 nach der Läsion im MRT untersucht mit zusätzlichen diffusionsgewichteten Sequenzen (DWI und ADC) 7 Tage vor, 2 und 5 Tage nach der Läsion. Die Aufnahmen wurden an einem 7 Tesla MR Tierscanner (ClinScan, Bruker Biospin GmbH, Deutschland) mit Syngo Software Version

B15 (Siemens Medical Solutions, Deutschland) und einer speziellen Quadratur-Empfangs-Oberflächenspule für Rattengehirne angefertigt. Die Ratten wurden unter Isofluran-Narkose (1,5% in 0,8 l/min Sauerstoff) auf einer temperaturkontrollierten Liege gelagert. Während des Scans wurde die Atmung kontinuierlich überwacht, was auch als Trigger für die DWI Aufnahmen diente. Als Standardaufnahmen wurden 3D T2w turbo spin-echo (TSE) Sequenzen mit den folgenden Parametern angefertigt: Wiederholungszeit/repetition time TR = 3500 ms, Echozeit/echo time TE = 355 ms, Bildfeld/field of view FOV = 57,0 x 35,6 x 22,9 mm³, Matrixgröße/matrix size = 256 x 160 x 104, Voxelgröße/resulting nominal voxel size = 0,22 x 0,22 x 0,22 mm³, Aufnahmezeit/acquisition time TA = 7 min. Die Parameter für die atmungsgetriggerten 2D DWI Sequenzen waren: TR = 4000 ms, TE = 48 ms, b-Werte = 0, 300 und 600 s/mm², FOV = 20 x 20 mm², matrix size = 64 x 64, Schichtdicke/slice thickness = 1,1 mm, Voxelgröße/resulting nominal voxel size = 0,31 x 0,31 x 1,1 mm³, TA = 30 min.

Das Volumen der hyperintensiven Region wurde mit Inveon Research Workplace Software (Siemens Medical Solutions, Deutschland) halbautomatisiert mit manueller Korrektur bestimmt. Zunächst wurden die Grenzen der Hyperintensität definiert: Als Untergrenze diente der höchste Intensitätswert aus 7 ROIs von verschiedenen Regionen der grauen Substanz plus 2 Standardabweichungen. Obergrenze war der höchste Intensitätswert aus einer ROI im Bereich des hyperintensiven Areals. Diese Grenzen wurden in einer zylindrischen ROI, welche über das ganze Gehirn gelegt wurde, gesetzt, um hieraus eine ROI selektiv des hyperintensiven Areals zu erhalten. Diese ROI wurde manuell korrigiert, um Artefakte zu entfernen. In Shamtieren und präoperativen Aufnahmen wurde auf die gleiche Weise das Volumen der Ventrikel bestimmt. In einem exemplarischen T2w Koronarschnitt einer 4 Tage zuvor mit 105 µg 6-OHDA behandelten Ratte wurde der Umriss der Hyperintensität eingezeichnet. Dieser Umriss wurde auf die Abbildung eines exemplarischen mit Anti-GFAP behandelten immunhistochemischen Koronarschnittes übertragen.

Die DWI Aufnahmen und ADC Maps wurden exemplarisch mit den koronaren Rekonstruktionen der T2w Aufnahmen verglichen, um für die hyperintensiven Areale in T2w eine Aussage über die Diffusion der Wassermoleküle treffen zu können.

2.7 Auswertung und Statistik

Eine erste Datenanalyse erfolgte mit Microsoft Office 2003 und 2010 (Microsoft, USA). Hiermit wurden die meisten Graphen erstellt. Weitere Abbildungen wurden mit Microcal Origin (Version 6.0, USA) sowie Adobe Illustrator (Version 15, USA) erstellt. Die statistischen Analysen erfolgten mit GB-STAT (Version 7.0, Dynamic Microsystems Inc., USA, 2000), SigmaStat (Version 3.5, USA) und JMP (Version 9, SAS, USA). Die statistische Signifikanz wurde a priori als $\alpha=0,05$ festgelegt. Für die statistischen Analysen der Verhaltensexperimente wurden jeweils getrennte ANOVAs der Messzeitpunkte vor und nach Mikroinjektion zur Analyse des Läsionseffektes sowie vor und nach Rotarodtraining zur Analyse des Trainingseffektes durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Verhaltenstestung

3.1.1 Stepping Test der ersten Versuchsreihe

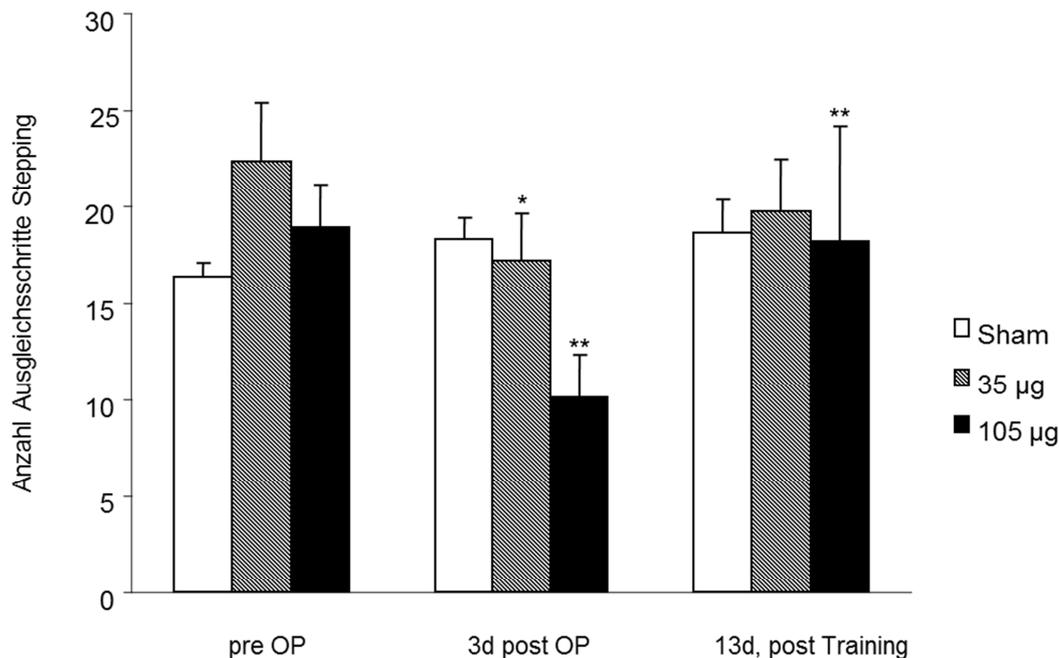


Abbildung 8: Mittlere Anzahl der Ausgleichsschritte im Stepping Test, gemittelt über beide Pfoten und beide Untersuchungsrichtungen vor der Läsion, 3 Tage nach der Läsion und an Tag 13 nach der Läsion, 1 Tag nach Abschluss des Trainings. Sham (weiße Balken): n=6; 35 µg 6-OHDA (gestreifte Balken): n=4; 105 µg 6-OHDA (schwarze Balken): n=4. Alle Daten sind Mittelwerte + SEM. Statistik: 3-faktorielle ANOVA + Fisher's LSD . *p<0,05 / **p<0,01 versus entsprechendes Ergebnis zum vorherigen Messzeitpunkt.

3 Tage nach der icv Mikroinjektion von Trägerlösung oder 6-OHDA zeigten beide Läsionsgruppen eine signifikant niedrigere Anzahl an Ausgleichsschritten. Eine 3-faktorielle ANOVA mit Fisher's LSD als post hoc Test zeigte einen signifikanten Effekt für den Zeitverlauf sowie die Interaktion von Zeit und Behandlung ($F_{\text{Zeit}}(1,11)=41,9$, $p<0,0001$; $F_{\text{Läsion*Zeit}}(2,11)=26,09$, $p<0,0001$). Die Defizite waren in der Gruppe mit der höheren Toxindosis größer. Nach dem Training, an Tag 13 nach der Läsion, war die Anzahl der Ausgleichsschritte bei

Tieren, die 105 µg 6-OHDA erhalten hatten, wieder signifikant höher. In der 3-faktoriellen ANOVA plus Fisher's LSD erreichte der Faktor Training einen hochsignifikanten ($F_{\text{Training}}(1,11)=12,36$, $p=0,005$), die Interaktion von Training und Behandlung einen signifikanten Effekt ($F_{\text{Training}^* \text{Läsion}}(2,11)=4,79$, $p=0,032$). Für Tiere mit der schwachen Läsion zeigten sich keine signifikanten Veränderungen nach dem Training im Vergleich zu Tag 3. An Tag 13 ließ sich bei Läsionstieren kein signifikanter Unterschied zu den Messungen präoperativ feststellen.

3.1.2 Explorationsverhalten im Open Field Activity Monitoring der ersten Versuchsreihe

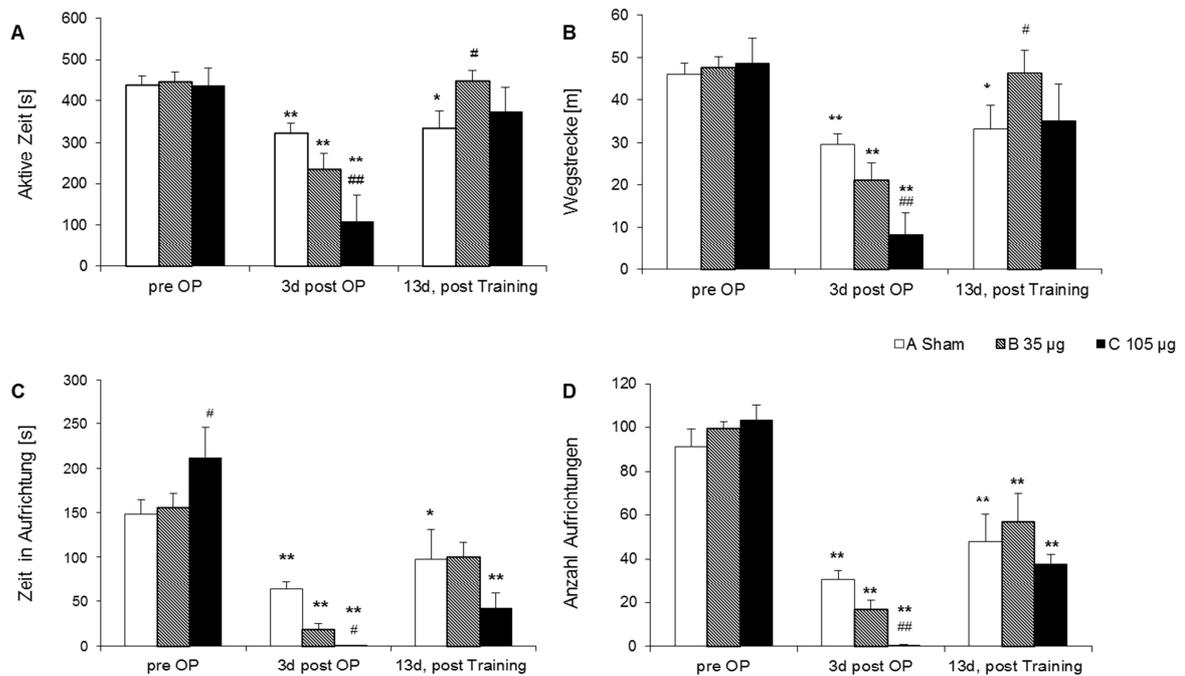


Abbildung 9: Explorationsverhalten in Open Field Activity Monitoring Boxen vor der Läsion, 3 Tage nach der Läsion und an Tag 13 nach der Läsion, 1 Tag nach Abschluss des Trainings. A Aktive Zeit [s]; B Wegstrecke [m]; C Zeit in aufgerichteter Position [s]; D Anzahl der Aufrichtungen. Sham (weiße Balken): n=6; 35 µg 6-OHDA (gestreifte Balken): n=4; 105 µg 6-OHDA (schwarze Balken): n=4. Alle Daten sind Mittelwerte + SEM. Statistik: 3-faktorielle ANOVA + Fisher's LSD . * $p<0,05$ / ** $p<0,01$ versus entsprechendes pre OP Ergebnis. # $p<0,05$ / ## $p<0,01$ versus Sham zum selben Messzeitpunkt.

In einer 3-faktoriellen ANOVA mit Fisher's LSD ergaben sich für die drei Gruppen signifikante Effekte im Explorationsverhalten im Open Field in ihrer aktiven Zeit (A) ($F_{\text{Behandlung}}(2,11)=3,78$, $p=0,056$; $F_{\text{Zeit}}(2,22)=37,84$, $p<0,0001$; $F_{\text{Behandlung*Zeit}}(4,22)=5,28$, $p=0,0039$), der zurückgelegten Strecke (B) ($F_{\text{Behandlung}}(2,11)=3,90$, $p=0,052$; $F_{\text{Zeit}}(2,22)=40,71$, $p<0,0001$; $F_{\text{Behandlung*Zeit}}(4,22)=4,08$, $p=0,013$), Zeit in aufgerichteter Position ($F_{\text{Behandlung}}(2,11)=0,91$, $p=0,43$; $F_{\text{Zeit}}(2,22)=55,99$, $p<0,0001$; $F_{\text{Behandlung*Zeit}}(4,22)=5,42$, $p=0,0034$) und Anzahl der Aufrichtungen ($F_{\text{Behandlung}}(2,11)=2,37$, $p=0,14$; $F_{\text{Zeit}}(2,22)=119,91$, $p<0,0001$; $F_{\text{Behandlung*Zeit}}(4,22)=3,04$, $p=0,039$). Die Defizite waren am stärksten in der Gruppe, die 105 μg 6-OHDA erhalten hatte, moderat in der Gruppe mit der milden Dosis und am geringsten bei Sham operierten Tieren. Nach Abschluss des Trainings, an Tag 13 nach der Läsion, hatte sich das Explorationsverhalten bei beiden Läsionsgruppen signifikant gegenüber dem vorherigen Messzeitpunkt verbessert.

3.1.3 Stepping Test der zweiten Versuchsreihe

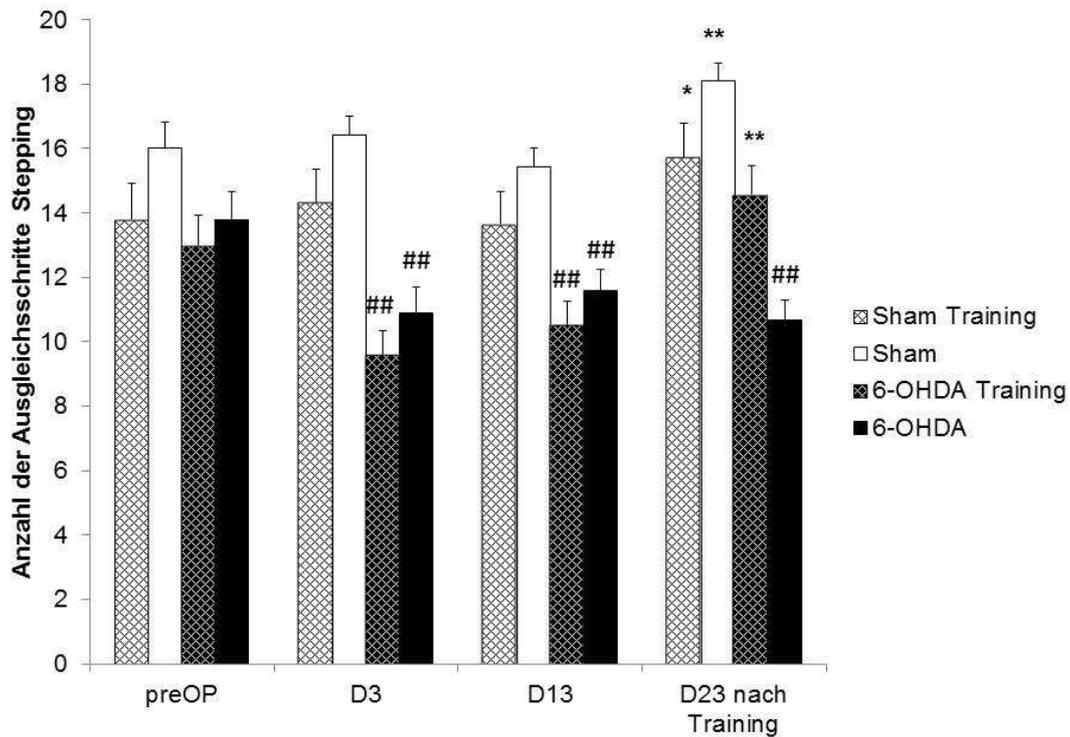


Abbildung 10: Mittlere Anzahl der Ausgleichsschritte im Stepping Test, gemittelt über beide Pfoten und beide Untersuchungsrichtungen 3 Tage vor der Läsion (preOP), 3 und 13 Tage nach der Läsion und an Tag 23 nach der Läsion, 1 Tag nach Abschluss des Trainings. Sham mit Training (weiße karierte Balken): n=8; Sham ohne Training (weiße Balken): n=9; 105 µg 6-OHDA mit Training (schwarze karierte Balken): n=10, 105 µg 6-OHDA ohne Training (schwarze Balken): n=11. Alle Daten sind Mittelwerte + SEM. Statistik: 3-faktorielle repeated measures ANOVA + Fisher's LSD. *p<0,05 / **p<0,01 für D13 vs. D23 in der entsprechenden Gruppe. ##p<0,01 vs. Sham zum selben Messzeitpunkt.

Die icv Injektion von 105 µg 6-OHDA führte zu einer signifikanten Abnahme der Ausgleichsschritte an Tag 3, was an Tag 13 unverändert zu beobachten war. Eine 3-faktorielle ANOVA der drei Messzeitpunkte vor Beginn des Trainings (preOP, D3, D13) mit Fisher's LSD als post hoc Test zeigte einen signifikanten Effekt für Läsion, Zeit und die Interaktion von Läsion und Zeit ($F_{\text{Läsion}}(1,34)=20,4$, $p<0,0001$; $F_{\text{Zeit}}(2,68)=6,18$, $p=0,0034$; $F_{\text{Läsion*Zeit}}(2,68)=8,28$, $p=0,0006$). Bei den Sham behandelten Tieren hingegen war keine signifikante

Abnahme der Ausgleichsschritte messbar. Statistisch bestand ein geringer Unterschied zwischen den trainierenden und nicht trainierenden Gruppen zu diesen Messzeitpunkten ($F_{\text{Training}}(1,34)=4,16$, $p=0,049$) aber nicht für die Interaktion von Training mit Zeit oder Läsion ($F_{\text{Training*Zeit}}(2,68)=0,04$, $p=0,96$; $F_{\text{Läsion*Training}}(2,68)=0,42$, $p=0,52$). Dies mag an der zufälligen Verteilung der Ratten auf die Behandlungsgruppen und der für die zufälligen Unterschiede zu niedrigen Tierzahl gelegen haben. Ein statistisch signifikanter Unterschied für die trainierte vs. nicht trainierte Gruppe, die mit 6-OHDA behandelt wurde, ergab sich zu den drei Messzeitpunkten vor dem Training jedoch nicht.

Das achttägige Rotarodtraining war mit einem signifikanten Anstieg der Ausgleichsschritte in Abhängigkeit von der Läsion verbunden. Die 6-OHDA behandelten Tiere zeigten nach dem Training mehr Ausgleichsschritte, während sich die Sham behandelten Tiere nicht verbesserten. Eine 3-faktorielle ANOVA mit Fisher's LSD zur Erfassung des Trainingseffekts (D13 vs. D23) zeigte erneut einen signifikanten Effekt der Läsion, der Zeit und für die Interaktion von Läsion und Zeit, Läsion und Training sowie für die Interaktion aller drei Faktoren ($F_{\text{Läsion}}(1,34)=24,9$, $p<0,0001$; $F_{\text{Läsion*Zeit}}(1,34)=5,0$, $p=0,03$; $F_{\text{Zeit}}(1,34)=34,8$, $p<0,0001$; $F_{\text{Training*Zeit}}(1,34)=10,8$, $p=0,002$; $F_{\text{Läsion*Training*Zeit}}(1,34)=17,6$, $p=0,0002$).

3.1.4 Explorationsverhalten im Open Field Activity Monitoring der zweiten Versuchsreihe

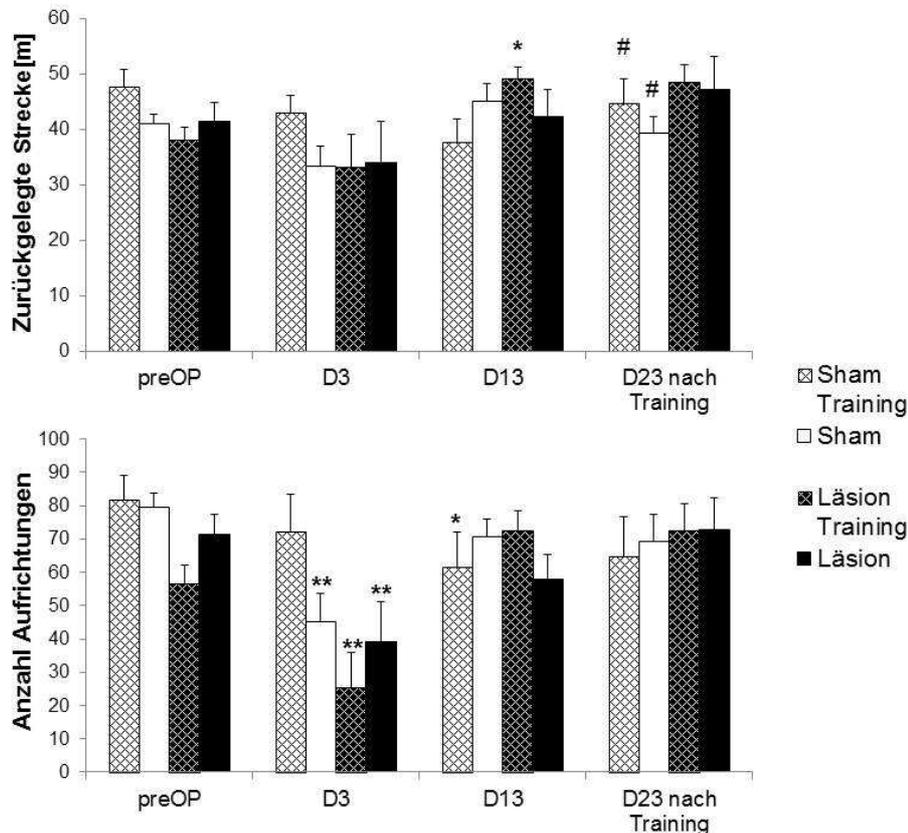


Abbildung 11. Horizontales und vertikales Explorationsverhalten im Open Field Activity Monitoring gemessen als zurückgelegte Strecke in [m] und Anzahl der Aufrichtungen. Sham mit Training (weiße karierte Balken) n=8, Sham ohne Training (weiße Balken) n=9, 6-OHDA Läsion mit Training (schwarze karierte Balken) n=10, 6-OHDA Läsion ohne Training (schwarze Balken) n=11. Statistik: 2 3-faktorielle ANOVAs+Fisher's LSD: preOP vs. D3 oder D13 (Läsionseffekt) *p<0,05, **p<0,01; und D13 vs. D23 (Trainingseffekt): #p<0,05 jeweils gegenüber dem vorherigen Messergebnis der entsprechenden Gruppe.

An Tag 3 nach der Mikroinjektion von 6-OHDA oder Trägersubstanz war das im Open Field Activity Monitoring bestimmte horizontale (zurückgelegte Strecke) und vertikale (Aufrichtungen) Explorationsverhalten aller Gruppen reduziert. Eine 3-faktorielle ANOVA der präoperativen Daten der zurückgelegten Strecke vs. D3 und D13 ergab lediglich einen signifikanten Zeiteffekt ($F_{\text{Zeit}(2,68)}=6,7$, $p=0,002$), Interaktionen zwischen den Faktoren waren nahezu signifikant oder signifikant ($F_{\text{Läsion*Zeit}(2,68)}=2,8$, $p=0,07$; $F_{\text{Läsion*Training*Zeit}(2,68)}=5,0$, $p=0,009$).

Die Analyse der vertikalen Aktivität für die präoperativen Daten, D3 und D13 zeigte eindeutige signifikante Effekte für 6-OHDA Behandlung, Zeit und die Interaktion der Faktoren ($F_{\text{Läsion}}(1,34)=6,2$, $p=0,02$; $F_{\text{Zeit}}(2,68)=21,4$, $p=0,0003$; $F_{\text{Läsion*Zeit}}(2,68)=4,5$, $p=0,015$; $F_{\text{Läsion*Training*Zeit}}(2,68)=7,4$, $p=0,0013$). An Tag 3 nach der Läsion ließ also sowohl die horizontale als auch die vertikale Explorationsaktivität nach, hochsignifikant jedoch nur die vertikale im Sinne einer verminderten Anzahl an Aufrichtungen nach der Läsion. Insofern als eine verminderte Aktivität auch bei Shamtieren gefunden wurde, spiegelte dies am ehesten die akuten postoperativen Beeinträchtigungen wider, beide Parameter erholten sich bis Tag 13.

Das Training zeigte ebenfalls nur schwache Effekte: Eine 3-faktorielle ANOVA für die horizontale Aktivität, gemessen als zurückgelegte Strecke, an Tag 13 vs. Tag 23 zeigte nur eine Signifikanz in der Interaktion der drei Faktoren ($F_{\text{Läsion*Training*Zeit}}(1,34)=13,2$, $p=0,0009$), die Einzelfaktoren oder die Interaktion zweier Faktoren zeigte keine Signifikanz ($F_{\text{Läsion}}(1,34)=1,9$, $p=0,18$; $F_{\text{Training}}(1,34)=0,12$, $p=0,73$; $F_{\text{Zeit}}(1,34)=1,2$, $p=0,28$; $F_{\text{Läsion*Zeit}}(1,34)=0,33$, $p=0,57$; $F_{\text{Training*Zeit}}(1,34)=2,08$, $p=0,16$). In der Analyse der Daten von Tag 13 und 23 der vertikalen Aktivität waren keine signifikanten Unterschiede oder Interaktionen zu finden ($F_{\text{Läsion}}(1,34)=0,1$, $p=0,75$; $F_{\text{Training}}(1,34)=0,002$, $p=0,97$; $F_{\text{Zeit}}(1,34)=1,77$, $p=0,19$; $F_{\text{Läsion*Zeit}}(1,34)=1,12$, $p=0,30$; $F_{\text{Training*Zeit}}(1,34)=0,71$, $p=0,41$; $F_{\text{Läsion*Training*Zeit}}(1,34)=2,50$, $p=0,12$).

3.1.5 Anzahl der Stürze vom Rotarod beim Training in der zweiten Versuchsreihe

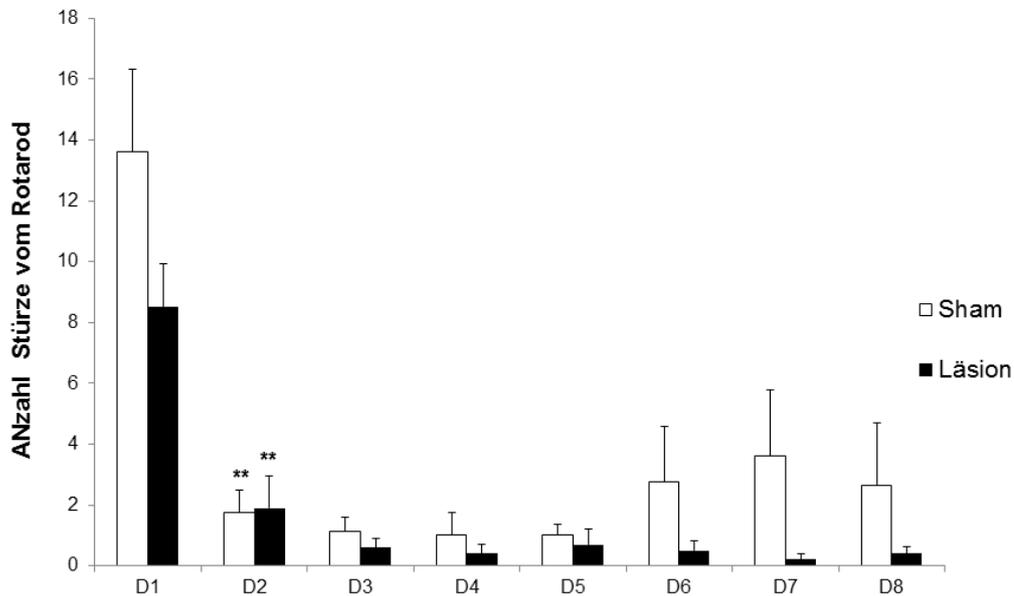


Abbildung 12: Mittlere Anzahl der Stürze vom Rotarod während des Trainings an den Trainingstagen 1-8 (D1-D8; entsprechend 15-22d nach Läsion). Sham (weiße Balken): n=8; 105 µg 6-OHDA (schwarze Balken): n=10. Alle Daten sind Mittelwerte + SEM. 2-faktorielle ANOVA, ** p<0,01 im Vergleich zum jeweils vorangehenden Messzeitpunkt der entsprechenden Gruppe.

In einer 2-faktoriellen ANOVA der Anzahl der Stürze vom Rotarod ergab sich ein hochsignifikanter Zeiteffekt ($F_{\text{Zeit}(7,112)}=11,237$, $p=0,001$), wohingegen der Effekt der Behandlung statistisch lediglich eine Tendenz zeigte ($F_{\text{Läsion}(1,16)}=2,562$, $p=0,129$) und die Interaktion von Zeit und Behandlung nicht signifikant war ($F_{\text{Zeit*Behandlung}(7,112)}=0,915$, $p=0,533$). An D1 kam es bei Sham und Läsionsgruppe im Vergleich zu allen anderen Tagen zu einer hochsignifikant höheren Anzahl an Stürzen ($p<0,001$). Tendenziell schienen an D1, D6, D7 und D8 Shamtiere häufiger vom Rotarod zu stürzen als Läsionstiere, aufgrund der hohen Standardabweichung erreichte dieser Unterschied jedoch keinen signifikanten Wert. Läderte Tiere zeigten bereits nach dem ersten Trainingstag eine deutliche Reduktion der Sturzanzahl, die bis Tag 3 weiter absank und nicht mehr signifikant anstieg. Shamtiere stürzten an

den letzten drei Trainingstagen wieder häufiger vom Rotarod, ohne jedoch einen signifikanten Unterschied zum jeweils vorangehenden Messzeitpunkt oder zu den Stürzen der Läsionstiere zu erreichen.

3.2 Histologische Ergebnisse

3.2.1 TH positive Fasern im Striatum nach dem Rotarodtraining (D24)

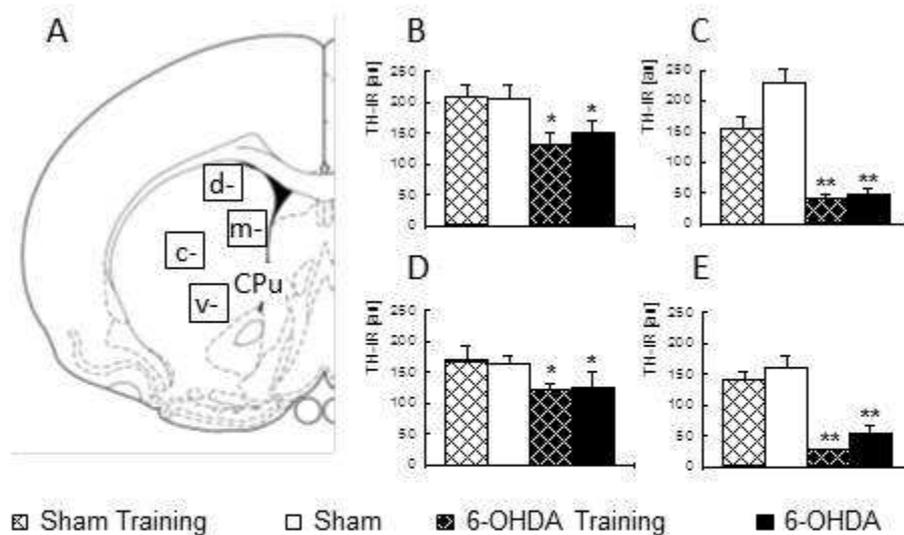


Abbildung 13: Intensität der TH Fluoreszenz in 4 striatalen ROIs D24, 1 Tag nach Abschluss des Trainings. A Schemazeichnung der 4 gewählten striatalen ROIs (Paxinos and Watson, 1997). d = dorsal, m = medial, c = zentral, v = ventral. B-E Ergebnisse der Intensitätsmessung der TH Fluoreszenz abhängig von der untersuchten striatalen ROI für die Gruppen Sham Training (weiße karierte Balken, n=6), Sham ohne Training (weiße Balken, n=6), 6-OHDA Training (graue karierte Balken, n=6) und 6-OHDA ohne Training (graue Balken, n=6). ROIs: B zentrales Striatum/Caudatoputamen (c-CPu), C dorsales Striatum (d-CPu), D ventrales Striatum (v-CPu), E mediales, ventrikelnahes Striatum (m-CPu). *p<0,05 / **p<0,0001.

Die icv Injektion von 6-OHDA führte zu einer signifikanten Abnahme der TH-Immunoreaktivität in allen ausgewählten ROIs im Vergleich zu Sham behandelten Tieren. Die Reduktion war am stärksten im medialen, ventrikelnahen Caudatoputamen (73,4% TH-Reduktion im Vergleich zu Sham) sowie dem dorsalen Striatum (77% TH-Reduktion im Vergleich zu Sham) unmittelbar ventral des Corpus callosum. In den zentralen und ventralen

striatalen ROIs fand sich nur eine leichte Reduktion (25,4% TH-Reduktion on v-CPu, 32,4% in c-CPu jeweils im Vergleich zu Sham). Ein Unterschied zwischen trainierten und nicht trainierten Tieren wurde für die gemessene Intensität der TH Immunfluoreszenz nicht nachgewiesen.

Statistisch zeigte sich in einer 2-faktoriellen ANOVA mit den Faktoren Läsion und Training, welche für jede ROI separat berechnet wurde, ein signifikanter Behandlungseffekt, jedoch kein signifikanter Effekt des Trainings: v-CPu: $F_{\text{Läsion}}(1,20)=4,71$, $p=0,042$; c-CPu: $F_{\text{Läsion}}(1,20)=9,71$, $p=0,0055$; d-CPu: $F_{\text{Läsion}}(1,20)=88,44$, $p<0,0001$; m-CPu: $F_{\text{Läsion}}(1,20)=62,44$, $p<0,0001$.

3.2.2 Ki-67 positive Zellen in der SVZ nach dem Rotarodtraining (D24)

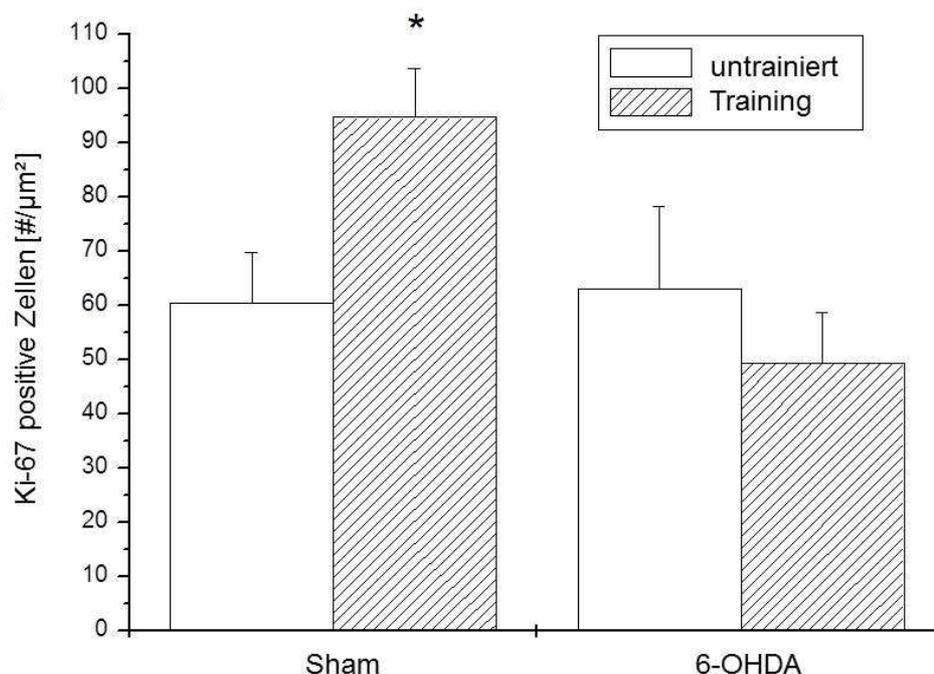


Abbildung 14: Ki-67 positive Zellen in der SVZ 24 Tage nach Mikroinjektion von Trägerlösung (Sham, linke Seite) oder 105 µg 6-OHDA (6-OHDA, rechte Seite) jeweils mit (gestreifte Balken) oder ohne (weiße Balken) vorangegangenem Rotarodtraining. Gezeigt werden die Mittelwerte der Ki-67 positiven Zellen pro µm² ± SEM. n=jeweils 3 pro Gruppe. Statistik: ANOVA mit Fisher's LSD post hoc Test: * $p<0,05$ trainiert vs. nicht trainierte Tiere.

In Sham operierten Tieren zeigte sich 24 Tage nach der Behandlung mit Trägerlösung ein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit vom Training: Tiere, die von Tag 15-22 auf dem Rotarod trainiert worden waren, zeigten eine signifikant höhere Anzahl Ki-67 positiver Zellen in der SVZ im Vergleich zu allen anderen Gruppen ($F_{\text{Läsion*Training}}(1,19)=5,07$; $p=0,036$). In der Gruppe, die mit 6-OHDA behandelt worden war, konnte kein trainingsabhängiger Unterschied in der Ki-67 Expression gefunden werden. Die Anzahl Ki-67 positiver Zellen zeigte sich bei beiden 6-OHDA Gruppen auf dem Niveau der nicht trainierten Sham Tiere.

3.2.3 Hinweise für Veränderungen der BBB (D4)

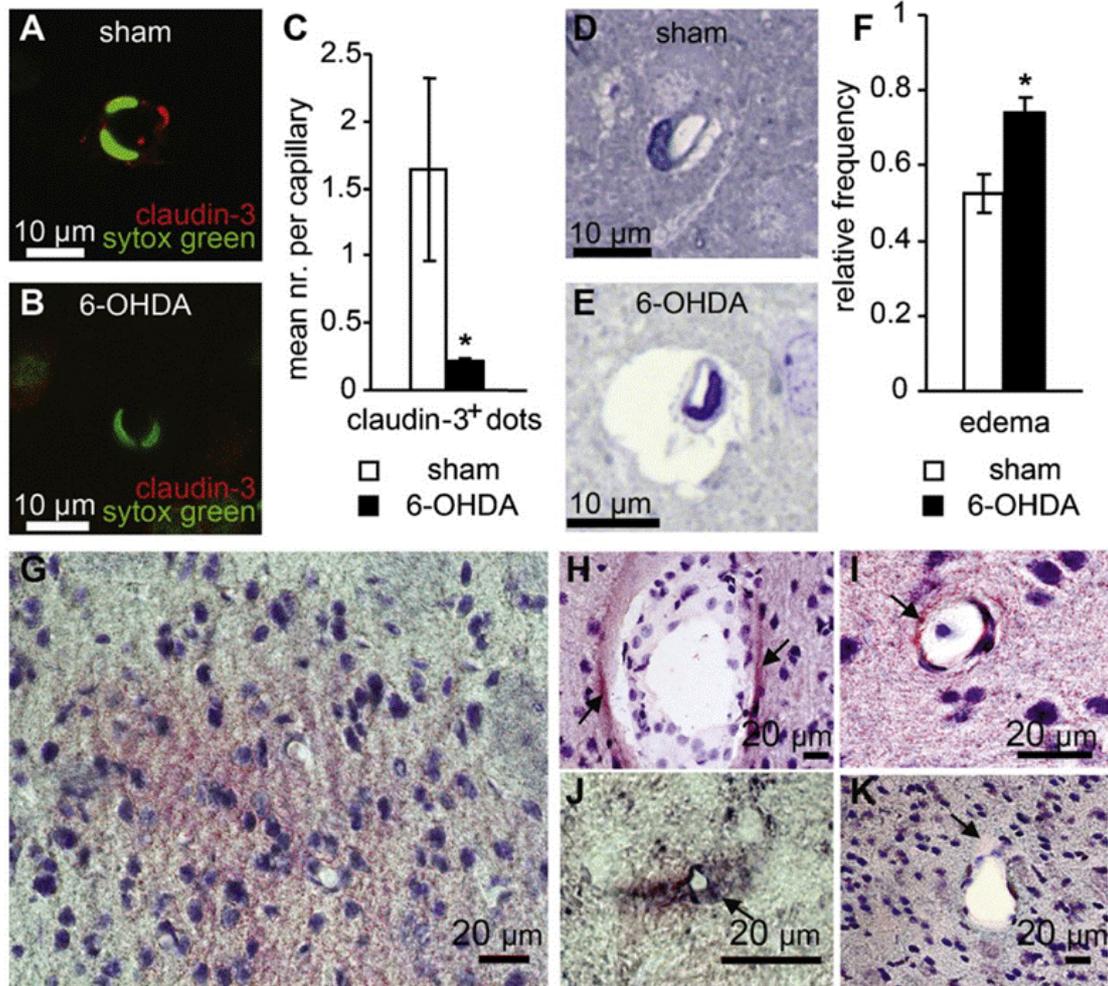


Abbildung 15: Hinweise auf Beeinträchtigungen der BBB im Striatum 4 Tage nach icv Mikroinfusion von 6-OHDA. A und B Immunhistochemische Darstellung von Claudin-3 (rot), Zellkerne werden grün dargestellt. C Quantitative Analyse von Claudin-3 positiven Punkten pro Kapillare in Sham (n=5) und 6-OHDA behandelten Tieren (n=4). *p=0,016. D und E Exemplarische Semidünnschnitte mit angeschnittenen Kapillaren mit perivaskulären Höfen (Färbung gemäß Richardsons). *p=0,028. Alle Daten sind Mittelwerte + SEM. G-K Fibrinogen Immunoreaktivität in striatalen Kryoschnitten 6-OHDA behandelte Tiere 4 Tage nach Mikroinfusion. (Abbildung entnommen aus (Wachter et al., 2012)).

Der immunhistochemische Nachweis von Claudin-3 als Bestandteil der Tight Junctions der BBB zeigte ein punkartiges Muster entlang der Kapillaren. An striatalen Kapillaren der 4 Tage zuvor mit 105 µg 6-OHDA behandelte Tiere ließ sich vermindert Claudin-3 nachweisen. Hier war im Vergleich zu Sham

behandelten Tieren die Anzahl Claudin-positiver Punkte in der quantitativen Analyse entlang der Kapillaren um 87% reduziert (Kruskal–Wallis 1-faktorielle ANOVA + Dunn's Methode, *p=0,016).

Die koronaren Semidünnschnitte aus dem Striatum offenbarten einen ungefärbten perivaskulären Hof, welcher in 6-OHDA behandelten Tieren signifikant größer war und häufiger auftrat als in Sham behandelten Tieren (1-faktorielle ANOVA + Holm–Sidak Methode *p=0,028). Quantitativ zeigte sich bei ca. 52,5 +/- 3,8% der Sham, jedoch bei 74,1 +/- 3,8% der 6-OHDA behandelten Tiere ein perivaskulärer Hof. Die Flächenanalyse ergab als durchschnittliche Gesamtfläche der perivaskulären Höfe 29,97 +/- 2,96 cm² für Sham und 53,44 +/- 17,94 cm² für 6-OHDA behandelte Tiere.

Um eine erhöhte Durchlässigkeit der BBB zu demonstrieren, wurden exemplarische striatale Kryoschnitte von Ratten mit 6-OHDA bzw. Sham Behandlung mit Anti-Fibrinogen behandelt. Hierbei ließ sich im Parenchym um die kleinen Kapillaren und größeren Blutgefäße lediglich bei 6-OHDA Tieren Fibrinogen nachweisen, nicht bei Sham behandelten Tieren (nicht dargestellt).

3.2.4 Veränderung der AQP4 Immunoreaktivität (D4)

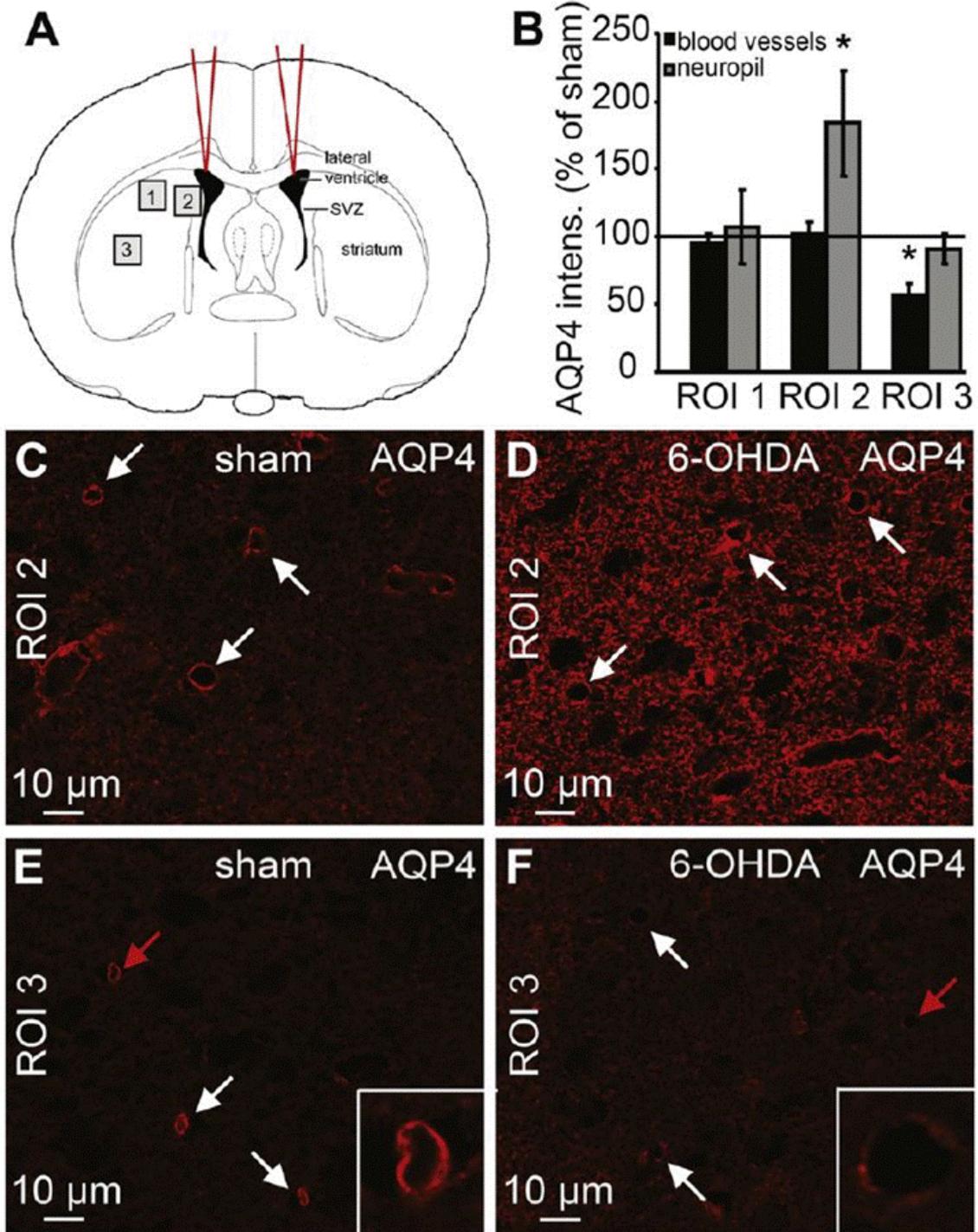


Abbildung 16: Striatale AQP4 Immunoreaktivität bei Sham und 6-OHDA behandelten Ratten 4 Tage nach Mikroinjektion. A Koronare Schemazeichnung zur Darstellung der gewählten ROIs (Paxinos and Watson, 1997). ROI 1 dorsales Striatum. ROI 2 ventrikelnahes Striatum. ROI 3 zentrales Striatum. B Messergebnisse der Immunoreaktivität in den gewählten ROIs in 6-OHDA behandelten Tieren (n=3) als Prozentsatz der Sham behandelten (n=3) im Neuropil (graue Balken) und perivaskulär (schwarze Balken). Die Daten sind Mittelwerte +/- SEM. Statistik: t-Test für ungepaarte Daten. *p=0,01. C und D Exemplarische Aufnahmen der immunhistochemischen Färbung mit AQP4 aus ROI 2 von Sham (C) und 6-OHDA behandelten Tieren (D). E und F Exemplarische Aufnahmen aus ROI 3 von Sham (E) und 6-OHDA behandelten Tieren (F). Die Pfeile zeigen jeweils auf quer angeschnittene Kapillaren. Der rote Pfeil deutet auf die Kapillaren, die im Ausschnitt stärker vergrößert wurden. (Abbildung entnommen aus (Wachter et al., 2012)).

Die Untersuchung der striatalen Koronarschnitte auf Expression von AQP4 4 Tage nach der icv Mikroinjektion von Trägerlösung zeigte bei Sham Tieren eine klare AQP4 Expression entlang der Blutgefäße (C und E) und eine eher diffuse Immunoreaktivität im Neuropil (C und E). Nach Injektion von 6-OHDA ergab sich ein signifikanter Anstieg der AQP4 Expression im Neuropil der ventrikelnahen striatalen ROIs (ROI 2, D) um ca. 84%. Im Neuropil des zentralen Striatums hingegen war keine signifikante Änderung der AQP4 Expression im Neuropil messbar (ROI 3, F). Hier zeigte sich allerdings eine signifikante Minderung der AQP4 Reaktivität um die Kapillaren der 6-OHDA behandelten Tiere (F) um ca. 43% im Vergleich zu Sham behandelten Tieren. In den dorsalen striatalen ROIs (ROI 1) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Sham und 6-OHDA behandelten Tieren.

3.3 Auswertung der MRT Daten

3.3.1 Hyperintensität und Diffusion

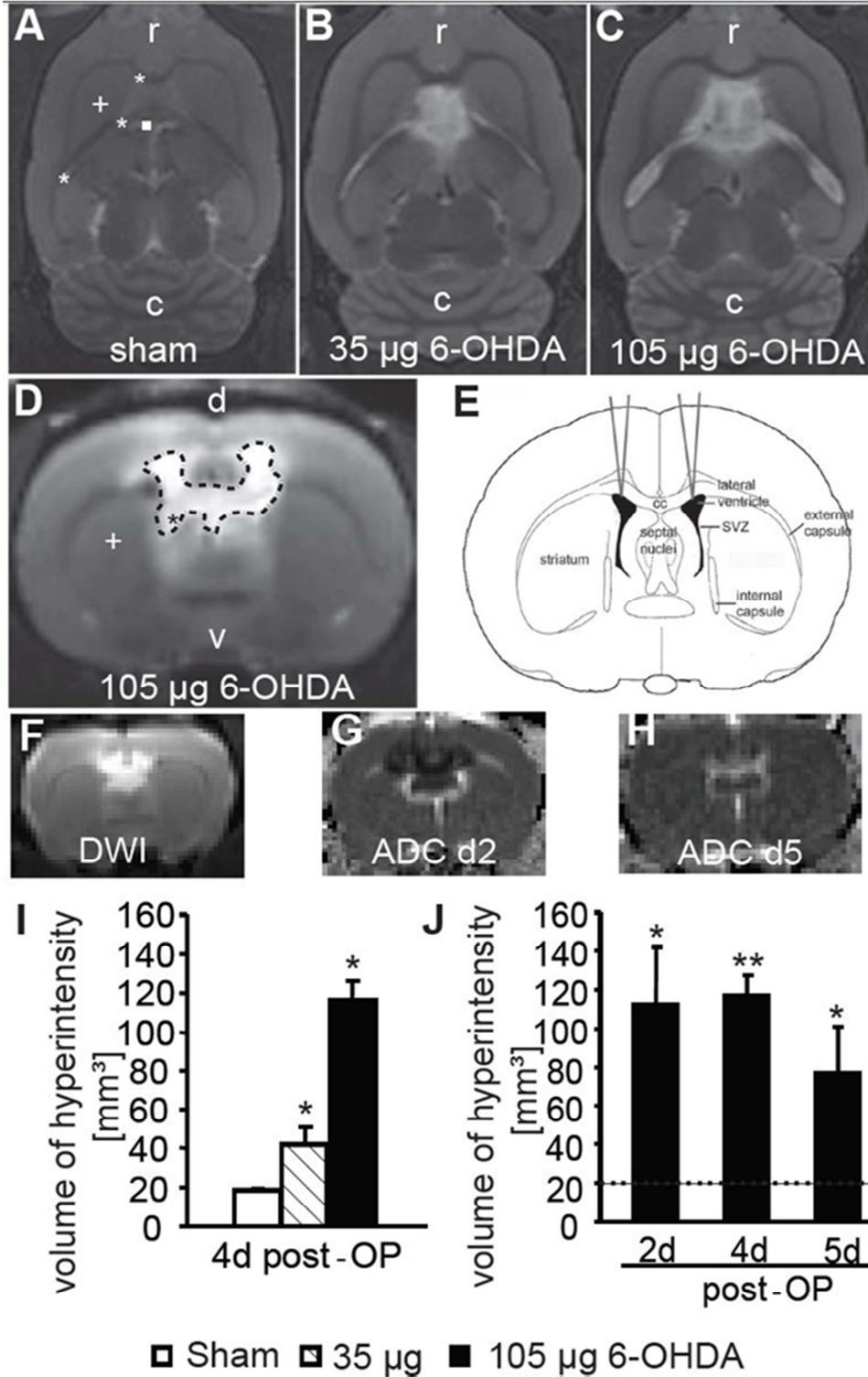


Abbildung 17: MRTs von Sham und 6-OHDA behandelten Rattengehirnen. A-C Transversale T2w MRTs 4 Tage nach Mikroinjektion von Trägerlösung (A), 35 µg 6-OHDA (B) oder 105 µg 6-OHDA (C). D Koronares T2w MRT 4 Tage nach Mikroinjektion von 105 µg 6-OHDA. Die gestrichelte Linie umrandet das hyperintense Areal. E Schematische Darstellung des Injektionsareals (Paxinos and Watson, 1997). F Koronare DWI Darstellung 2 Tage nach Mikroinjektion von 105 µg 6-OHDA. G Entsprechende ADC map 2 Tage und H 5 Tage nach Mikroinjektion von 105 µg 6-OHDA. I Gemessene Volumina der hyperintensiven Areale 4 Tage nach Mikroinjektion von Trägerlösung (Sham, weiße Balken, n=6), 35 µg 6-OHDA (gestreifte Balken, n=4) oder 105 µg 6-OHDA (schwarze Balken, n=4). Alle Daten sind Mittelwerte + SEM. Mann-Whitney Rank Sum Test: Sham vs. 6-OHDA *p=0,01. J Volumina der hyperintensiven Areale 2 (n=2), 4 (n=4) und 5 Tage (n=2) nach Mikroinjektion von 105 µg 6-OHDA. Die gestrichelte Linie zeigt die Baseline an (Mittelwert der präoperativ bestimmten hyperintensiven Volumina, n=20). Alle Daten sind Mittelwerte + SEM. Mann-Whitney Rank Sum Test: Baseline vs. 6-OHDA *p=0,026; **p=0,002. r=rostral, c=caudal, d=dorsal, v=ventral, *=Seitenventrikel, X=3. Ventrikel, +=Striatum, SVZ=subventrikuläre Zone, cc=Corpus callosum. (Abbildung entnommen aus (Wachter et al., 2012)).

4 Tage nach Mikroinjektion von 6-OHDA in die Seitenventrikel wurde ein hyperintenses Areal im Bereich der Injektionsstelle beobachtet, welches in Sham Tieren nicht nachweisbar war. Nach Injektion von Trägerlösung blieb die Hyperintensität auf die Ventrikel begrenzt und damit identisch zu den Messzeitpunkten vor der Mikroinjektion. Der Mittelwert aus präoperativen und postoperativen Shamwerten ergab die Baseline, welche bei 18,8 mm³ lag. Die Hyperintensität der 6-OHDA behandelten Tiere war bei der höheren Dosierung deutlich ausgedehnter (durchschnittlich 116,5 mm³) als bei der niedrigeren (durchschnittlich 42,2 mm³). Die Hyperintensität erstreckte sich von den Ventrikeln und dem Stichkanal im frontalen Kortex ausgehend in das Corpus callosum, die septalen Kerngebiete, die Capsula interna und am ehesten die SVZ. Das Striatum stellte sich in T2w nicht, bzw. allenfalls marginal in den an die Ventrikel angrenzenden Zonen, hyperintens dar. Die Volumenmessung der hyperintensiven Region ergab an Tag 4 nach der Mikroinjektion ein im Vergleich zu Sham bzw. Baseline verdoppeltes Volumen nach Behandlung mit 35 µg 6-OHDA und ein 6fach vergrößertes Volumen nach 105 µg 6-OHDA. Im Zeitverlauf erreichte die Hyperintensität am 4. Tag nach Mikroinjektion ihr

Maximum und verkleinerte sich bereits an Tag 5 auf ein 4Faches der Baseline. Einzelne Ratten wurden zusätzlich an den Tagen 7, 9, 11 und 14 gemessen, was einen kontinuierlichen Rückgang der Hyperintensität und eine Rückkehr zur Baseline an Tag 14 zeigte. Zusätzlich wurden bei zwei Tieren 2 und 5 Tage nach 105 µg 6-OHDA Mikroinjektion diffusionsgewichtete MRT Aufnahmen angefertigt. Hierbei zeigte sich im DWI (F) ein hyperintenser Bereich, welcher etwa der T2w Hyperintensität entsprach. In der ADC Map ließ sich für den korrespondierenden Bereich ein hypointenses Signal nachweisen (G und H), welches sich bis Tag 5 wieder verringerte. Die ADC Werte nahmen also nach der Läsion im betroffenen Areal zunächst ab, um dann wieder anzusteigen.

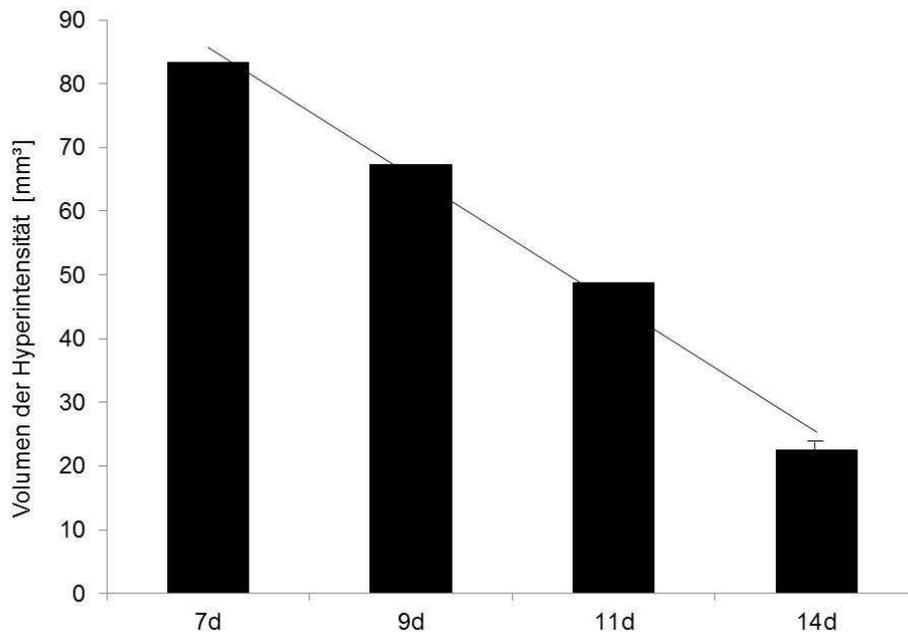


Abbildung 18: Volumina der hyperintensiven Bereiche einzelner Ratten, die 7, 9, 11 (n=jeweils 1) und 14 Tage (n=2) zuvor mit 105 µg 6-OHDA behandelt worden waren. Gezeigt sind die Einzelmesswerte von Tag 7-11 bzw. der Mittelwert an Tag 14 + SEM. Die Trendlinie deutet einen linearen kontinuierlichen Rückgang der Hyperintensität an.

3.3.2 Histologie und MRT (D4)

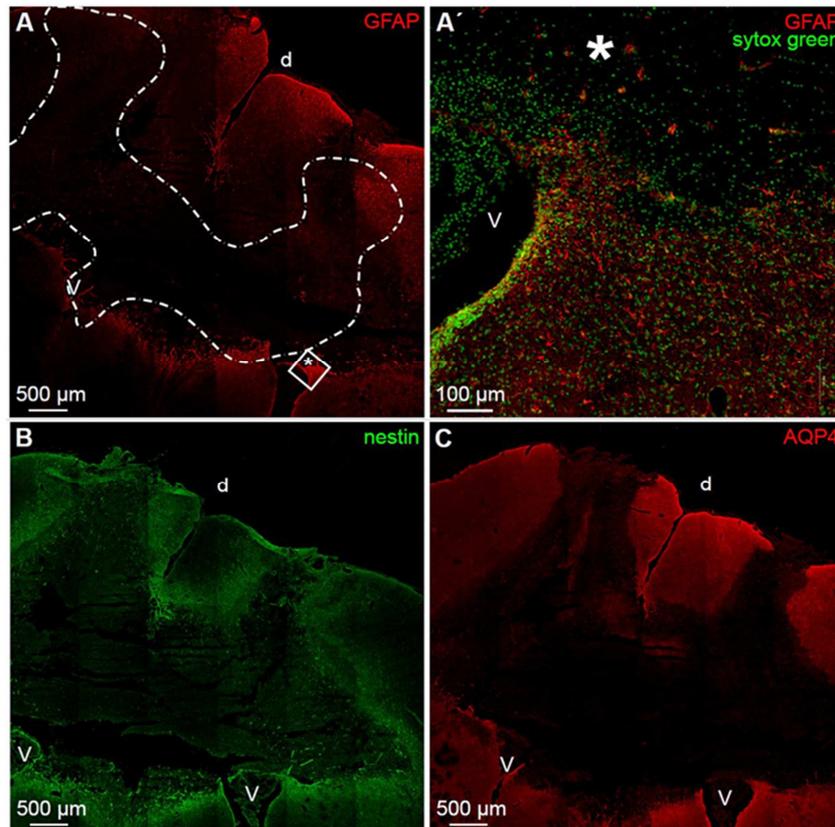


Abbildung 19: Exemplarische immunhistochemisch gefärbte Koronarschnitte von Höhe der Commissura anterior von Rattenhirnen 4 Tage nach Behandlung mit 105 µg 6-OHDA. A Primärfärbung gegen GFAP. Die gestrichelte Linie zeigt den hyperintensiven Bereich an, wie er im koronaren T2w MRT abgegrenzt wurde (vgl. 3.3.1). Der quadratisch umzeichnete Ausschnitt in A ist in A' vergrößert. B Primärfärbung gegen Nestin. C Primärfärbung gegen AQP4. v=Ventrikel, d=dorsal. (Abbildung entnommen aus (Wachter et al., 2012)).

Mittels verschiedener Primärfärbungen wurde der Bereich, welcher sich im T2w Kernspin hyperintens darstellte, immunhistochemisch in korrespondierenden Koronarschnitten auf die Expression der Astrozytenmarker GFAP und Nestin sowie des Wasserkanals AQP4 untersucht. Es zeigte sich 4 Tage nach Mikroinjektion von 105 µg 6-OHDA im frontalen Kortex ein Bereich, in welchem immunhistochemisch nahezu kein GFAP, Nestin und AQP4 nachweisbar waren. Dieser Bereich korrespondierte, soweit vergleichbar, etwa mit dem hyperintensiven Areal im T2w MRT und war bei Sham Tieren nicht nachweisbar

(nicht abgebildet). Die Kernfärbung mit Sytox Green zeigte in diesem Bereich einen deutlichen Mangel an Zellen bzw. Zellkernen. Unmittelbar das zellarme Areal abgrenzend wurde eine im Vergleich zum umliegenden Hirngewebe übermäßige Expression von GFAP und Nestin, histologisch damit im Sinne einer reaktiven Gliose nachgewiesen.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit wurde auf Grundlage einer Studie mit Parkinsonpatienten durchgeführt, bei der durch Bewegungstherapie positive Effekte auf die motorischen Fähigkeiten erzielt werden konnten und strukturelle Effekte im Kernspin zu beobachten waren (Berg, Godau et al., unveröffentlichte Daten). Analog sollte im toxisch induzierten Tiermodell untersucht werden, ob sich durch körperliches Training motorische Verbesserungen erzielen lassen, die MR morphologischen Effekte nachzubilden sind und ob mittels histologischer Untersuchungen Hinweise auf die zugrundeliegenden zellulären Prozesse gefunden werden können. Hierzu wurden 2 Versuchsreihen mit 6-OHDA Läsion, Training auf dem Rotarod, Verhaltenstestung und immunhistochemischen Untersuchungen durchgeführt. In der ersten Versuchsreihe erfolgten zusätzlich MRT-Aufnahmen, wo sich eine 6-OHDA abhängige Hyperintensität zeigte, weswegen zusätzliche Untersuchungen zur Wirkung des Toxins durchgeführt wurden.

4.1 Verhaltensdaten

In den durchgeführten Experimenten an mit 6-OHDA dopamindepletierten Ratten konnte ein positiver Effekt milden körperlichen Rotarod-Trainings auf die motorischen Defizite in entsprechenden Verhaltenstests nachgewiesen und reproduziert werden.

In der ersten Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass alle Tiere am dritten Tag nach der Läsion ein vermindertes Explorationsverhalten im Open Field Activity Monitoring zeigten, was auf unspezifische postoperative Beeinträchtigungen durch die Narkose mit Pentobarbital oder den kranialen Eingriff hinweisen kann. Die Verhaltensdefizite waren jedoch bei Sham operierten Tieren am geringsten und bei Tieren mit der höchsten Dosis 6-OHDA am stärksten, sodass zusätzlich von einem toxinspezifischen Effekt ausgegangen werden muss. Im Stepping Test zeigte sich nur bei Tieren, die das Neurotoxin erhalten hatten, eine signifikante Verminderung der

Ausgleichsschritte. Dass 6-OHDA dosisabhängige Verhaltensdefizite induziert, wurde bereits von anderen Autoren gezeigt (Rodriguez et al., 2001). Da nur bei Ratten, die die höhere Toxindosis erhielten, deutliche Defizite erreicht wurden, ohne die Trainierbarkeit auf dem Rotarod zu beeinträchtigen, wurde diese Dosis für die Folgeversuche verwendet.

Nach dem achttägigen Training auf dem Rotarod konnte bei allen Tieren eine signifikante Verhaltensverbesserung im Stepping Test des ersten Versuchs erreicht werden. Da in diesen Versuchsaufbau jedoch keine Kontrollgruppe ohne Training integriert worden war, konnte nicht sicher zwischen trainingsbedingten Verbesserungen und einem unspezifischen spontanen Erholungseffekt differenziert werden. Spontane Erholung von motorischen Defiziten nach 6-OHDA Läsionen sind bereits beschrieben worden, insbesondere für icv Injektionen trotz bestehender Katecholamindepletion (Longo et al., 1974). Aus diesem Grund wurde im folgenden zweiten Versuch für Sham und lädierte Tiere jeweils eine Kontrollgruppe ohne Training vorgesehen. Um unspezifische postoperative Beeinträchtigungen des Verhaltens auszuschließen und um den Abschluss einer möglichen progressiven toxininduzierten Neurodegeneration abzuwarten, wurden die Verhaltenstests zusätzlich zu Tag 3 auch an Tag 13 durchgeführt und erst im Anschluss mit dem Rotarodtraining begonnen. Tatsächlich fand sich jedoch kein signifikanter Progress der Defizite im Stepping Test bei Tieren, die 105 µg 6-OHDA pro Seitenventrikel erhalten hatten. Dies ist nicht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Sauer und Oertel (Sauer and Oertel, 1994), die demonstrierten, dass die durch 6-OHDA induzierte dopaminerge Degeneration progressiver Natur ist. Möglicherweise liegt dies an den insgesamt nur diskreten motorischen Defiziten durch die milde Läsion.

Nach dem Rotarodtraining ließ sich bei den trainierten Tieren kein signifikanter Unterschied zu den Sham operierten Tieren mehr feststellen. Die positiven Effekte körperlichen Trainings sind bereits mehrfach an 6-OHDA lädierten Tieren gezeigt worden (Cohen et al., 2003; Tajiri et al., 2010; Tillerson et al., 2003; Tillerson et al., 2001; Vergara-Aragon et al., 2003). Als Voraussetzung für eine Wirksamkeit des Trainings war bislang jedoch immer ein frühes Zeitfenster

nach der Läsion genannt worden; körperliche Belastung zu einem späteren Zeitpunkt hatte keine Verbesserungen erbracht (Smith and Zigmond, 2003; Tillerson et al., 2001). Zudem hielt es sich beim Training in der Regel um forcierte intensive Bewegung, wie z.B. erzwungene Belastung der lädierten Pfote durch erzwungenes Ruhigstellen der gesunden (Tillerson et al., 2002; Tillerson et al., 2001). In den hier aufgeführten Experimenten konnte nun erstmals gezeigt werden, dass ein mildes Training von vier Einheiten à 5 min bei mittlerer Geschwindigkeit auf dem Rotarod auch 2 Wochen nach der Läsion noch Verbesserungen im Stepping Test erzielen konnte. Die in einer nachfolgenden Arbeit an Tag 41 und 148 nach der Läsion durchgeführten Langezeitfolgeuntersuchungen erbrachten jedoch auch bei untrainierten lädierten Ratten einen Verlust der Verhaltensdefizite, weswegen zusätzlich von einer Spontanerholung nach der milden 6-OHDA Läsion ausgegangen werden muss (Gittinger et al., in Vorbereitung). Das Training auf dem Rotarod schien den Erholungsprozess jedoch zu beschleunigen.

Viele Autoren begannen bereits vor der Applikation des Neurotoxins mit der körperlichen Belastung der Tiere bzw. mit der Einführung des Trainingsgeräts (O'Dell et al., 2007; Poulton and Muir, 2005; Tillerson et al., 2003; Vergara-Aragon et al., 2003). In den hier aufgeführten Experimenten wurde dies bewusst vermieden, um zum einen kein motorisches Lernen im gesunden Hirn zu induzieren, welches nach der Läsion die Verhaltensverbesserungen durch Abruf bereits erlernter Muster erleichtern könnte. Zum anderen ist nicht auszuschließen, dass Training, über den vermehrten extrazellulären Gehalt an Dopamin, das mit der Aufnahme von 6-OHDA konkurrieren könnte (Tillerson et al., 2001), oder die Hochregulation neurotropher Faktoren (Smith and Zigmond, 2003) wie GDNF oder BDNF, die toxische Wirkung von 6-OHDA vermindert. Das Ziel der Experimente im Rahmen dieser Dissertation war jedoch, am erkrankten Gehirn Kompensationsmechanismen zu untersuchen, daher wäre eine mögliche Minderung der Toxinwirkung während der Läsion durch ein Vortraining nicht zuträglich gewesen.

4.2 Grundlagen der Verhaltensveränderungen

Ziel der Experimente war es, im Tierversuch mittels histologischer Untersuchungen Hinweise darauf zu finden, welche zellulären Prozesse den am Patienten beobachteten motorischen Verbesserungen zugrunde liegen könnten. In den durchgeführten Versuchen konnte jedoch mit den verwendeten Methoden keine Ursache für die erzielten Verhaltensverbesserungen nachgewiesen werden. Es ergaben sich in der Immunhistochemie weder Hinweise auf eine erhöhte Dopaminsynthese bei trainierten im Vergleich zu untrainierten lädierten Tieren, noch konnte in der SVZ, wo sich neuronale Stammzellen befinden (Ming and Song, 2011), ein Hinweis auf Zellproliferation bei lädierten Tieren gefunden werden. Der fehlende Dopaminanstieg durch Training konnte in einem nachfolgenden Versuch mittels HPLC (Gittinger et al., in Vorbereitung) bestätigt werden.

Dass sich der Dopamingehalt bei spät nach der 6-OHDA Läsion begonnenem körperlichen Training nicht erholt, wurde bereits von Tillerson et al. gezeigt (Tillerson et al., 2001). Dies könnte damit erklärt werden, dass die durch Training induzierten biochemischen Prozesse nicht mit der 6-OHDA Läsion interagieren können, da diese bereits abgeschlossen ist, wenn man mit dem Training mehr als 7 Tage nach der Toxinapplikation beginnt (vgl. 1.4). Im Gegensatz zu Tillerson konnte in den Versuchen der hier präsentierten Arbeit aber dennoch Verhaltensverbesserungen nachgewiesen werden. Jedoch unterschieden sich trainierte und untrainierte Tiere nur zum Messzeitpunkt direkt nach dem Training (Tag 24) signifikant voneinander. Zu den späteren Zeitpunkten (Tag 41 und 148) ließ sich kein signifikanter Unterschied mehr nachweisen (Gittinger et al., in Vorbereitung). Man muss daher davon ausgehen, dass im beschädigten Gehirn auch spontan kompensatorische Mechanismen stattfinden, deren Effekt jedoch durch das Training beschleunigt werden konnte. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von O'Dell et al., die bei unilateral mit 6-OHDA lädierten Ratten nach einer freiwilligen Laufradübung zwar eine schnelle Verbesserung der Verhaltensdefizite im Vergleich zu untrainierten Tieren, aber keine Protektion oder Erholung der dopaminergen Neurone nachweisen konnten (O'Dell et al., 2007). Da es zu

einem Verlust der Korrelation zwischen Dopamingehalt und Verhalten kam, der Dopamingehalt sich trotz Verhaltensverbesserung also nicht änderte, muss angenommen werden, dass andere Transmittersysteme, vielleicht auch andere motorische Schaltkreise jenseits der Basalganglien, beteiligt sind oder dass die Neurone der Basalganglien z.B. über eine erhöhte Dichte an Dopaminrezeptoren sich an den verminderten Dopaminspiegel anpassen konnten. Die initialen motorischen Defizite wären demnach auf die Plötzlichkeit des Dopaminverlustes zurückzuführen, der nicht sofort ausreichend kompensiert werden konnte. Beim Parkinsonpatienten hingegen kann dem langsam progredienten Dopaminverlust parallel begegnet werden, sodass hier eine Dekompensation des Systems mit motorischen Symptomen erst auftritt, wenn bereits ca. 60% der dopaminergen Neurone degeneriert sind (Berg, 2006; FitzGerald et al., 2007).

Ki-67 ist ein etablierter Marker, um proliferierende Zellen zu kennzeichnen, da dieses Protein in allen Phasen des Zellzyklus, außer in ruhenden Zellen in der G₀ Phase, exprimiert wird (Scholzen and Gerdes, 2000). Ki-67 positive Zellen in der SVZ zeigten sich nur bei trainierten Sham Tieren signifikant vermehrt. Bei Tieren mit einer 6-OHDA-Läsion fand sich kein Unterschied zwischen der trainierten und nicht trainierten Gruppe. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Dopamin für die Proliferation der Vorläuferzellen notwendig ist. Es ist bereits bekannt, dass die SVZ dopaminerge Projektionen erhält, welche die Proliferation der neuronalen Vorläuferzellen kontrollieren (O'Keefe et al., 2009). In welcher Gehirnregion sich trainingsinduzierte kompensatorische Prozesse abspielen, konnte in dieser Arbeit leider nicht herausgefunden werden. Da der zerebello-thalamo-kortikale Schaltkreis für die Koordination von Bewegungen (Holschneider et al., 2007; Horne and Butler, 1995) und motorisches Lernen (Holschneider et al., 2003; Horne and Butler, 1995) wichtig ist, wäre es jedoch nahe liegend, dort neuroplastische Vorgänge zu suchen. Insofern als die Tiere beim Training auf dem Rotarod ihre Pfotenbewegung exakt auf die Bewegung der Stange abstimmen müssen, um nicht herunter zu fallen, erscheint diese Trainingsmethode recht komplex (Willson et al., 2008), weswegen Effekte in einer Gehirnregion, die für die Feinabstimmung von Bewegungen zuständig ist,

zu erwarten wären. Passend hierzu konnte in der bereits zitierten Studie von Holschneider et al. ein erhöhter Blutfluss in den Kleinhirnkernen nach Rotarodtraining nachgewiesen werden (Holschneider et al., 2007). In Folgeversuchen dieser Arbeit wurden daher Kryoschnitte der Kleinhirnkernkerne mit einer c-fos Färbung behandelt, die endgültigen Ergebnisse dieser Untersuchungen sind Thema einer anderen Dissertation (Dissertation von J. Rolinger) bzw. einer nachfolgenden Veröffentlichung. C-fos wurde 1987 erstmals im erwachsenen Gehirn beschrieben (Dragunow and Robertson, 1987) und ist mittlerweile als Marker für neuronale Aktivität gut etabliert (Herrera and Robertson, 1996). Es wird zur Gruppe der immediate early genes gerechnet, der Gene, die als erste bei externen Stimuli wie z.B. Neurotransmittern, Wachstumsfaktoren oder Hormonen exprimiert werden, um damit die Expression nachfolgender Effektorgene zu beeinflussen (Herrera and Robertson, 1996; Iwamoto et al., 1996). C-fos bildet dabei mit c-jun ein Heterodimer, das im Zellkern als Transkriptionsfaktor AP-1 wirksam ist (Iwamoto et al., 1996), wodurch extrazelluläre Signale in mittel- bis längerfristige zelluläre Veränderungen der Genexpression übersetzt werden können (Morgan and Curran, 1991). Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass körperliche Aktivität die c-fos Expression im Striatum steigert (Liste et al., 1997). Dies geschah in der Studie von Liste et al. (1997) allerdings in Abhängigkeit von der Stimulation von striatalen D1 Rezeptoren. Wurden diese Rezeptoren mit einem Antagonisten blockiert oder Dopamin durch eine 6-OHDA Läsion depletiert, verringerte sich signifikant die c-fos Expression. Dahingehend erscheint es nicht überraschend, dass auch wir keine gesteigerte c-fos Expression im Striatum mit 6-OHDA behandelte Tiere nachweisen konnten (Daten in Vorbereitung für eine nachfolgende Veröffentlichung, Bestandteil der Dissertation von J. Rolinger). Dass jedoch auch in den motorischen Kleinhirnkernen eine Erhöhung der c-fos Expression ausblieb (Daten in Vorbereitung), wirft die interessante Frage auf, ob auch die dortigen Zellen nur dopaminabhängig c-fos exprimieren können und woher die entsprechenden dopaminabhängigen Projektionen stammen. Hinweise auf eine Verbindung zwischen Basalganglien und Kleinhirn sind bereits beschrieben

worden (Bostan et al., 2010; Bostan and Strick, 2010; Moers-Hornikx et al., 2011), insbesondere auch im Zusammenhang mit der Steuerung von Kognition und Verhalten. Ob in einer Fehlsteuerung dieser Schaltkreise durch die 6-OHDA Läsion der Grund für die erhöhte Reizbarkeit der Tiere, die in den Experimenten dieser Arbeit auffiel, liegt, könnte Thema für Nachfolgeexperimente sein.

Auf welche Art und Weise körperliches Training seinen Nutzen bringt, konnte durch die Experimente im Rahmen dieser Dissertation also nicht sicher geklärt werden. Andere Autoren haben bislang mehrere verschiedene Erklärungsmodelle für die Verhaltensverbesserungen entwickelt (vgl. 1.4). Entsprechend dieser Theorien könnte man in Folgeversuchen mit dem in dieser Doktorarbeit verwendeten Modell weitere Aspekte wie neurotrophe Faktoren (Cohen et al., 2003; Kleim et al., 2003; Smith and Zigmond, 2003; Tajiri et al., 2010) oder gliale Marker (Bury et al., 2000; Kleim et al., 2003; Li et al., 2005) untersuchen. Insbesondere im Hinblick auf die beobachteten durch 6-OHDA induzierten Veränderungen der BBB wäre eine Untersuchung von Markern der Angiogenese (Li et al., 2005), von inflammatorischen Mediatoren oder von Mikrogliaaktivierung interessant gewesen, da es Hinweise gibt, dass Sport Entzündungsprozesse moduliert (Cotman and Berchtold, 2002).

4.3 Hyperintensität in T2w Kernspinaufnahmen

Die Kernspinaufnahmen dieser Arbeit wurden mit dem Ziel angefertigt, die an Patienten durch MRT Analysen gemessenen strukturellen Effekte körperlichen Trainings im Tiermodell nachzubilden. Zwar gelang dies aufgrund der beobachteten 6-OHDA bedingten hyperintensiven Areale in T2w nicht, jedoch wurden auf diese Weise zusätzliche Untersuchungen zur Wirkung des Toxins und dessen MR morphologischer Darstellung durchgeführt.

MRT ist ein weit verbreitetes Verfahren in der klinischen Forschung und Diagnostik, das auch in der präklinischen Forschung zunehmend Anwendung findet.

Mittels MRT bietet sich die Möglichkeit durch ein nichtinvasives Schnittbildverfahren wiederholte Messungen am selben Tier durchzuführen und

so den morphologischen Verlauf einer Erkrankung und ggf. die Wirksamkeit therapeutischer Strategien zu überprüfen (Lauwers et al., 2007; Van Camp et al., 2010). Ohne bildgebende Verfahren kann das Ausmaß einer Läsion erst durch histologische Verfahren post mortem dargestellt werden. Mit Hilfe des MRT hingegen kann eine Läsion, sofern sich im Kernspin ein reliables Korrelat für sie findet, bereits vor Beginn verhaltensbiologischer Experimente visualisiert und quantifiziert werden.

Trotz dieser vielversprechenden Möglichkeiten sind bislang erst wenige Studien über die Anwendung der Kernspintomographie in neurotoxischen Tiermodellen publiziert worden (Dhawan et al., 1998; Guzman et al., 2000; John et al., 1996; Kondoh et al., 2005; Norman et al., 1990; Sauer et al., 1992; Smith et al., 1993; Van Camp et al., 2010; Vernon et al., 2010; Wachter et al., 2012) und es bedarf noch viel weiterer Forschung, um die Möglichkeiten und Grenzen des MRTs in verschiedenen Tiermodellen zu beleuchten.

Die ursprüngliche Idee, die Kernspinaufnahmen im Rahmen dieser Dissertation anzufertigen, bestand darin, mittels Subtraktionsanalysen die vor und nach dem Training hergestellten Bildserien miteinander zu verrechnen und so einen Anhalt für trainingsbedingte morphologische Effekte in motorisch relevanten Strukturen wie beispielsweise dem Kleinhirn zu finden. Hinweise darauf hatten sich aus Daten von Patientenstudien ergeben (Berg, Godau et al., unveröffentlichte Daten; Dissertation von M. Herfurth). Was sich jedoch zeigte, war eine dosisabhängige Hyperintensität im Bereich der Injektionsstelle, die bereits 2 Tage nach der Injektion von 6-OHDA vorhanden war, an Tag 4 ihr Maximum erreichte, sich dann verkleinerte und an Tag 14 verschwunden war. Anatomisch reichte das hyperintense Signal von den Ventrikeln und dem Injektionskanal ausgehend in die Septumkerne, die Capsula interna und, soweit abgrenzbar, den medialen Rand des Striatums inklusive der SVZ. Das Ausmaß der Hyperintensität war bei Tieren, die nur mit 35 µg 6-OHDA lädiert worden waren, deutlich niedriger; Sham Tiere zeigten kein über die Ventrikel hinausgehendes hyperintenses Signal.

Diese Hyperintensität verhinderte wie ein großes Artefakt die Durchführung von Subtraktionsanalysen, sodass über mögliche durch das Training bedingte

strukturelle Veränderungen im MRT keine Aussage gemacht werden konnte. Das Auftreten der T2 Hyperintensität warf jedoch neue Fragen über die Genese derselben auf.

T2 bezeichnet die transversale Relaxationszeit, also die Zeit, in der die durch das transversale Wechselfeld erzeugte Quermagnetisierung abnimmt. Festkörper haben durch die starke Einschränkung der Beweglichkeit ihrer Protonen i.d.R. kurze T2 Zeiten, Flüssigkeiten zeichnen sich hingegen durch hohe T2 Werte aus (FitzGerald et al., 2007). Hyperintensität in T2w Bildern weist daher in der Regel auf vermehrte Flüssigkeit hin, wie in Ödemen oder zystischen Strukturen (Bekiesinska-Figatowska, 2004; FitzGerald et al., 2007; Poloni et al., 2011; Zivadinov and Bakshi, 2004), oder auf eine Vermehrung freier Protonen wie bei demyelinisierenden Läsionen (FitzGerald et al., 2007). T2 Hyperintensität zeigt sich zudem in Regionen mit sehr niedriger Faser- und Zelldichte (Garbelli et al., 2011). In der klinischen Anwendung finden sich zahlreiche Ursachen für hyperintense Läsionen in T2w Kernspinaufnahmen, wie z.B. bei ischämischen Läsionen, demyelinisierenden Erkrankungen, entzündlichen oder tumorösen Prozessen, sodass aus der Bildmorphologie alleine oft nur unzureichend differenziert werden kann, um welche Art von Läsion es sich handelt (Bekiesinska-Figatowska, 2004; Poloni et al., 2011; Zivadinov and Bakshi, 2004). Auf den pathologischen Prozess kann meist nur in Zusammenschau mit weiteren spezialisierten Kernspinsequenzen, wie z.B. diffusionsgewichteten Aufnahmen oder MR-Spektroskopie (Poloni et al., 2011), Laborparametern und klinischen Befunden geschlossen werden.

In Tierstudien ist Hyperintensität in T2w Aufnahmen als Korrelat einer Läsion mit neurotoxischen Substanzen wie Kainsäure (Norman et al., 1990), NMDA (John et al., 1996; Sauer et al., 1992) oder 6-OHDA (Dhawan et al., 1998; Guzman et al., 2000; Kondoh et al., 2005) bereits in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben worden. Die im Rahmen dieser Dissertation angefertigten MRT Aufnahmen zeigten erstmals eine Hyperintensität nach intraventrikulärer 6-OHDA Applikation. In Übereinstimmung mit bereits von Kondoh et al. (Kondoh et al., 2005) publizierten Daten korrelierte die Hyperintensität mit der 6-OHDA Dosis und den Verhaltensdefiziten, während es nach Injektion von

Trägerlösung zu keiner Hyperintensität kam. Die Injektion einer in Bezug auf das Liquorvolumen der Ratte beträchtlichen Flüssigkeitsmenge und die resultierende Zunahme des vom Ventrikel ausgehenden hydrostatischen Druckes können daher nicht alleinig ursächlich für die Hyperintensität sein. Bislang ist keine umfassende Erklärung zur Ursache der Hyperintensität veröffentlicht worden. Als zugrunde liegende Mechanismen wurden ein Anschwellen der Axone oder Neurone (Dhawan et al., 1998; John et al., 1996), Ödembildung (Dhawan et al., 1998; John et al., 1996) oder ausgedehnte Nekrosen mit Hohlraumbildung (John et al., 1996) vorgeschlagen als Korrelat der biochemischen Vorgänge, die mit der Zerstörung dopaminergischer Zellen einhergehen (Dhawan et al., 1998). In den meisten Studien korrelierte die Hyperintensität mit dem Bereich der dopaminergen Degeneration (John et al., 1996; Kondoh et al., 2005) und Gliose (Kondoh et al., 2005). In manchen Berichten gingen die MRT Veränderungen über den histologisch verifizierten Bereich der dopaminergen Degeneration hinaus (Dhawan et al., 1998; John et al., 1996).

Keine dieser Studien untersuchte bislang jedoch gezielt Störungen der zerebralen Flüssigkeitshomöostase im Hinblick auf Veränderungen der BBB oder der zellulären Wasserkanäle.

In unserer Studie korrelierte das Auftreten der Hyperintensität mit dem Bereich um die Injektionsstelle, jedoch nicht eindeutig mit der Zone der dopaminergen Denervierung, da das Striatum, in dem eine deutliche Minderung des Dopamingehalts und der TH-Expression nachgewiesen werden konnte, sich nur marginal hyperintens zeigte. Die Hyperintensität betraf die Bereiche, welche lokal von der höchsten Toxinkonzentration betroffen waren, insbesondere die Septumregion, welche zwischen den beiden Injektionsstellen liegt. An Tag 2 nach der Läsion zeigte sich in der korrespondierenden Region eine Hyperintensität in der diffusionsgewichteten Bildgebung DWI sowie Verminderung des apparenten Diffusionskoeffizienten ADC; was eine Verringerung der Diffusion freier Wassermoleküle anzeigt, wie sie bei zytotoxischen Ödemen vorkommt. Wenn Zellen im Rahmen eines zytotoxischen Prozesses anschwellen, wird die freie extrazelluläre Diffusion durch eine

Verringerung des Extrazellularraumes behindert, wodurch der ADC abnimmt (Schaefer et al., 2000; Sevick et al., 1992). Passend hierzu zeigte sich histologisch im an den Ventrikel grenzenden Striatum eine vermehrte AQP4 Expression. Eine Hochregulation von AQP4 in Astrozyten erleichtert das Anschwellen dieser Zellen durch die Möglichkeit zu vermehrtem Wassereinstrom. An Tag 4 konnte histologisch in dem Bereich, der der Hyperintensität entspricht, eine deutliche Abnahme der Zellkerndichte, insbesondere der Astrozyten, dargestellt als GFAP-, Nestin- und AQP4 positive Zellen, gezeigt werden. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Strömberg et al. (1986), die nach 6-OHDA Injektion in den MFB einen Verlust an GFAP-Immunoreaktivität fanden, am ehesten durch eine Zerstörung der residenten Astrozyten durch die hohe lokale Toxinkonzentration (Stromberg et al., 1986). Wir gehen davon aus, dass die geschwollenen Astrozyten, die für den niedrigen ADC und die Hyperintensität im diffusionsgewichteten Bild DWI an Tag 2 verantwortlich sein könnten, an Tag 4 schon weitgehend nekrotisiert waren, was den Wiederanstieg des ADC an Tag 5 erklären könnte. In nekrotischen Arealen mit niedriger Zelldichte kann eine gute Diffusion von Wasser stattfinden, sodass der ADC nicht vermindert sein kann. Die so erzeugte Armut an Zellen und Fasern in Verbindung mit Flüssigkeitsvermehrung könnte daher, passend zu den Ergebnissen von Garbelli et al. (2011), für die Hyperintensität verantwortlich sein (Garbelli et al., 2011). Im Randbereich dieser Zone fand sich als Hinweis auf eine reaktive Gliose eine Vermehrung der GFAP (Sofroniew and Vinters, 2010) und Nestin (Frisen et al., 1995) Expression, vermutlich im Sinne einer Demarkierung des zerstörten Gewebes vom restlichen Gehirnparenchym.

Da T2 Hyperintensität auf eine Zunahme von Flüssigkeit im Gewebe hinweist, untersuchten wir zusätzlich Veränderungen der BBB mit der Frage, ob es sich um ein vasogenes Ödem handeln könnte. In der Tat konnten dabei Störungen der BBB und der Flüssigkeitshomöostase nachgewiesen werden, jedoch überraschenderweise im gesamten Striatum, welches im MRT nicht durch Hyperintensität aufgefallen war.

4.4 Veränderungen der Bluthirnschranke und Ödembildung

Die angefertigten Semidünnschnitte des striatalen Gewebes zeigten in mit 6-OHDA lädierten Tieren deutliche perivaskuläre Höfe, wie sie auch nach Hirnkontusionen beschrieben sind (Vaz et al., 1997). Solche Höfe können als Hinweis auf den vermehrten Übertritt vaskulärer Bestandteile in den perivaskulären Raum gesehen werden, was Flüssigkeit nach sich zieht. Als weiteren Nachweis defekter Barrieremechanismen konnten wir eine Extravasation des Plasmaproteins Fibrinogen nachweisen. Dies kann nur auf Grundlage einer defekten BBB geschehen, die unter physiologischen Bedingungen den Stofftransport zwischen Blut und Gehirnparenchym stark einschränkt. Der parazelluläre Transport wird durch Tight Junctions behindert, die sich aus Claudinen, Occludin und JAM Proteinen zusammensetzen (vgl. Einleitung). In den immunhistologischen Untersuchungen im Rahmen dieser Studie wurden strukturelle Veränderungen der Tight Junctions im Sinne einer Verminderung der Expression von Claudin-3 an den Kapillaren im Striatum gefunden. Wolburg et al. (2003) beschrieben, dass der Verlust dieses Tight Junction Proteins mit einer eingeschränkten Funktion der BBB einhergeht (Wolburg et al., 2003). In Zusammenschau der Ergebnisse aus den Semidünnschnitten und der Immunhistologie ergeben sich daher Hinweise auf ein vasogenes Ödem außerhalb der hyperintensiven Region im T2w MRT.

Der spezifischere direkte Beweis einer erhöhten Permeabilität der BBB wäre durch die Applikation eines speziellen intravasalen Tracers zu erbringen gewesen, der nur unter pathologischen Umständen ins Gehirnparenchym übertreten kann. Je nach Wahl des Tracers kann man so eine erhöhte Durchlässigkeit für kleine Moleküle wie Ionen über defekte Tight Junctions zeigen, wozu Lanthanum (Nag et al., 2011) verwendet werden kann. Die Extravasation von HRP (horseradish peroxidase) oder Evans Blue zeigt einen Barriereverlust für Makromoleküle (Nag et al., 2011), zu denen auch das in unserer Studie verwendete Fibrinogen gezählt wird. Letzteres ist beschrieben im Zusammenhang mit einer Zunahme der Caveolae, spezialisierter membrangebundener Vesikel, die für den transzellulären vesikulären Transport großer Moleküle bzw. die Bildung transzellulärer Kanäle zuständig sind

(Lossinsky and Shivers, 2004; Nag et al., 2011). Daher wäre es zusätzlich interessant zu untersuchen, ob sich nach 6-OHDA Applikation die Anzahl oder Struktur der Caveolae ändert.

Einen Übertritt von HRP, markiertem Albumin und dem kleineren Molekül des medikamentösen Wirkstoffes Domperidon in die SN und das Striatum nach 6-OHDA Applikation ist bereits von Carvey et al. (2005) demonstriert worden (Carvey et al., 2005). Als Grundlage für die erhöhte Permeabilität der BBB schlugen die Autoren einen Entzündungsvorgang im Bereich der durch 6-OHDA induzierten dopaminergen Degeneration vor. Bei dieser Entzündung käme es zur Aktivierung von Mikrogliazellen und der Freisetzung entzündlicher Mediatoren, die die Durchlässigkeit der BBB erhöhen.

Entzündungsvorgänge durch 6-OHDA sind bereits mehrfach beschrieben worden (Cicchetti et al., 2002; He et al., 2001; Mogi et al., 1999; Whitton, 2007) und scheinen auch bei Parkinsonpatienten eine Rolle zu spielen (Whitton, 2007). Entzündungsmediatoren aktivieren Matrix Metalloproteinasen (MMP), die Proteine der extrazellulären Matrix zerstören und die Funktion der BBB beeinträchtigen, was wiederum die Entzündung fördert (Grammas et al., 2011), sodass diese Enzyme als zentrale Amplifikatoren im Entzündungsprozess betrachtet werden müssen. In weiteren Untersuchungen zur Abklärung der Ursachen der Hyperintensität und den Effekten von 6-OHDA könnte dementsprechend auch nach aktivierten Mikrogliazellen, Veränderungen entzündlicher Mediatoren und MMP gesucht werden.

Zusätzlich ist von ROS bekannt, dass sie die Permeabilität der BBB steigern und den zerebralen Blutfluss erhöhen (Nag et al., 2009; Wei et al., 1986). Da 6-OHDA ein hochreaktives Molekül ist, kommt es rasch zur Oxidation unter Bildung von ROS (Glinka et al., 1997), was so über den Barriereverlust der BBB zu einem vasogenen Ödem beitragen mag.

Reparaturmechanismen, die nach Hirnläsionen einsetzen, sind in der Regel von Neovaskularisation begleitet. Neugebildete Gefäße verfügen noch nicht über die hochspezialisierte Barrierefunktion reifer Hirngefäße (Wang et al., 2005). Veränderte Expression von Angiopoietinen und vaskulären Wachstumsfaktoren

erhöhen zusätzlich die Permeabilität der BBB (Fischer et al., 2002; Nag et al., 2011), sodass auch durch Restaurierungsvorgänge die BBB durchlässig wird.

Interessant erscheint, dass die Veränderungen der Bluthirnschranke sich in striatalen Regionen nachweisen lassen, die zwar von dopaminergem Degeneration, nicht jedoch von der Hyperintensität der T2w Aufnahmen betroffen waren, sodass hier die durch 6-OHDA verursachten Veränderungen im Flüssigkeitshaushalt des Gehirns nicht stark genug waren, ein morphologisches Korrelat im T2w MRT zu erzeugen.

Das Ödem in dem in dieser Studie verwendeten Modell setzt sich am ehesten aus einer vasogenen und zytotoxischen Komponente zusammen. Die zytotoxische Wirkung von 6-OHDA auf dopaminerge Zellen ist bereits mehrfach belegt (Schober, 2004). 6-OHDA inhibiert mitochondriale Enzyme der Atmungskette (Deumens et al., 2002; Glinka et al., 1997), wodurch die Energieversorgung der Zelle eingeschränkt wird. Wenn Energie fehlt, können aktive Transportmechanismen wie z.B. die Na⁺/K⁺-Pumpe nicht aufrecht erhalten werden. Die Folge ist die Akkumulation von Ionen und Stoffwechselprodukten in der Zelle, die osmotische Überladung führt zu vermehrtem Wassereinstrom, damit einem zytotoxischen Ödem. Diese Überlegungen sind stimmig mit den Ergebnissen von Avila-Costa et al. (Avila-Costa et al., 2005), die eine Schwellung präsynaptischer dopaminergem Endigungen in der SN nach 6-OHDA Injektion beschrieben.

Zusätzlich zu neuronaler Schwellung ist von einer Volumenzunahme bis zur Zerstörung der Astrozyten auszugehen. Ein Hinweis darauf ist die Zunahme des Wasserkanals AQP4 in den Zellmembranen der Astrozyten, von dem bekannt ist, dass er das Anschwellen von Zellen im Sinne eines zytotoxischen Ödems fördert (Nag et al., 2009). Da Gliazellen eine zentrale Rolle in der extrazellulären Ionen- und Transmitterhomöostase ausmachen, sind sie für den Ausfall von Transportmechanismen besonders anfällig und können leicht ein zelluläres Ödem ausbilden, wozu die Hochregulation von AQP4 beiträgt (Nag et al., 2009).

Dass Astrozyten durch intraventrikulär gegebenes 6-OHDA verändert werden und dedifferenzieren, wurde in immunhistochemischen Versuchen mit

Gehirnmaterial aus Tieren dieser Arbeit von Wachter et al. (Wachter et al., 2010) gezeigt. Da polarisierte Astrozyten im gliovaskulären Komplex der BBB wichtige Induktoren und Bewahrer der Barriere sind (Abbott, 2002; DeBault and Cancilla, 1980; Wolburg et al., 2011), könnte eine veränderte Interaktion zwischen den astrozytären Endfüßchen und den Gefäßen ein weiterer Faktor in der Störung der BBB sein.

Um die Veränderungen der BBB umfassender zu erforschen, könnten zusätzlich zu den oben bereits genannten noch viele weitere Faktoren wie extrazelluläre Matrixproteine, die Elemente des Zytoskeletts und die Perizyten untersucht werden.

4.5 Läsionsmodell

Von den meisten Forschern, die mit 6-OHDA arbeiten, wird das asymmetrische Läsionsmodell mit einer einseitigen Injektion in das Striatum, das MFB oder die SN bevorzugt (Cenci et al., 2002). Vorteile beim unilateralen Modell bestehen darin, dass es erlaubt, am selben Tier direkt die lädierte mit der gesunden Pfote beispielsweise im Stepping Test zu vergleichen. Zudem ist medikamenteninduziertes Rotationsverhalten, das auf asymmetrischer Pfotenbewegung durch ungleiche dopaminerge Innervierung der Striata beruht, ein gut etablierter Test zur Einschätzung der Läsionsstärke (Cenci et al., 2002; Longo et al., 1974). Zusätzlich wurde von bilateralen 6-OHDA-Läsionen vielfach beschrieben, dass sie Aphagie und Adipsie bei den Tieren hervorrufen können (Deumens et al., 2002; Ungerstedt, 1971).

Andererseits sind bei Parkinsonpatienten beide Hemisphären betroffen, sodass das bilaterale Modell dies besser nachbildet (Cenci et al., 2002), wenngleich bei Patienten in der Regel auch eine Asymmetrie der dopaminergen Degeneration und der motorischen Symptomatik vorliegt (Scherfler et al., 2012). Wenn man untersuchen will, ob durch Training selbst im kranken Gehirn Restaurationsprozesse induziert werden können, ist es sogar wichtig, eine bilaterale Läsion zu verwenden, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass von der gesunden Gehirnhälfte dopaminerge Nervenzellfortsätze auf die lädierte Seite aussprossen können bzw. das kontralaterale Striatum durch eine

Steigerung seiner Funktion das lädierte kompensiert (Deumens et al., 2002; Schwarting and Huston, 1996). Da von Rodriguez et al. (Rodriguez et al., 2001) für die icv 6-OHDA-Injektion beschrieben wurde, dass sie gut verträglich ist und gleichzeitig der Topographie des dopaminergen Zellverlustes dem bei M. Parkinson ähnelt, wurde dies für die Versuche dieser Dissertation verwendet.

Der Trainingsversuch an diesem Modell wurde insgesamt dreimal unter verschiedenen Aspekten durchgeführt. Im ersten Versuch wurden zwei verschiedene 6-OHDA Dosierungen getestet, um die beste Kombination aus Verträglichkeit, Trainierbarkeit und nachweisbaren Verhaltensdefiziten zu finden. Für die Läsion mit 105 µg 6-OHDA pro Ventrikel schien dies gewährleistet zu sein, da sich im Stepping Test und im Open Field Activity Monitoring Defizite zeigten, die Tiere aber dennoch auf dem Rotarod trainieren konnten. In der Wiederholung des Versuches mit größerer Tierzahl und untrainierten Kontrollgruppen zeigten sich allerdings nur noch im Stepping Test, nicht mehr im Open Field signifikante Defizite an Tag 3. Dies könnte daran liegen, dass im ersten Versuch durch die Injektionsnarkose mit Pentobarbital eine verlängerte postoperative Rekonvaleszenzphase im Vergleich zur Narkose mit Isofluran, die für die weiteren Versuche verwendet wurde, nötig gewesen sein könnte. In diesen Experimenten könnte die induzierte dopaminerge Degeneration zu gering gewesen sein, um das Explorationsverhalten signifikant zu reduzieren. Explorationsverhalten wird zudem stärker vom ventralen Striatum mit dem Nucleus accumbens im Rahmen des mesostriatalen Systems reguliert (Schmidt and Kretschmer, 1997; Schwarting and Huston, 1996). Dieses wurde im hier verwendeten Läsionsmodell, das am stärksten das dorsomediale Striatum denervierte, weniger beeinflusst. Andererseits widersprechen unsere Ergebnisse auch den Studien von Chang et al. (Chang et al., 1999), die fanden, dass Ausgleichsschritte im Stepping Test nur nach Läsionen des dorsolateralen, ventrolateralen oder ventrozentralen Kaudatoputamens vermindert seien, aber nicht nach Läsionen des dorsomedialen Bereichs (Deumens et al., 2002).

In einem nachfolgenden Projekt, das nicht Bestandteil dieser Arbeit war, wurde eine weitere Wiederholung des Trainingsversuches im Hinblick auf den

Langzeitverlauf des Trainingseffekts sowie eine genauere Analyse des Dopaminstoffwechsels mittels HPLC durchgeführt (Gittinger et al., in Vorbereitung).

Eine milde Läsion erscheint sinnvoll als Modell für die Frühphase des Parkinsonsyndroms, in dem Bewegungstraining noch in Eigeninitiative möglich ist. Jedoch ist zu bedenken, dass viele Parkinsonpatienten unter Depression und Antriebslosigkeit leiden, was das selbstständige Training erschwert (Goodwin et al., 2008; Morris et al., 2010). Auch bei den mit 6-OHDA behandelten Ratten dieser Experimente fielen mögliche nichtmotorische Verhaltensveränderungen auf, die jedoch nicht vollständig durch gezielte Tests erfasst werden konnten. Shamtiere fielen beim Rotarodtraining durch vergleichsweise höheres Explorationsverhalten auf. Sie schienen durch die Trainingsaufgabe unterfordert, richteten sich auf der sich drehenden Stange wiederholt auf, sodass es im Rahmen der Erkundung des Trainingsgeräts zu vermehrten Stürzen kam. Die 6-OHDA Tiere hingegen folgten geradlinig der zu erledigenden Aufgabe, möglicherweise weil das Training die motorischen Kapazitäten der Tiere voll in Anspruch nahm oder weil der Antrieb zu Explorationsverhalten durch die Läsion doch reduziert wurde, obgleich sich dies im Open Field nicht deutlich zeigte. Die andere Auffälligkeit bestand in der erhöhten Reizbarkeit der Läsionstiere – sie verhielten sich deutlich ängstlicher und aggressiver, was leider zu drei Bissverletzungen der Untersucher geführt hatte. Erhöhte Irritierbarkeit ist bereits für 6-OHDA Läsionen vorbeschrieben (Longo et al., 1974; Nakamura and Thoenen, 1972). Welche neuronalen Schaltkreise für diese Verhaltensauffälligkeiten verantwortlich sein könnten, müsste in weiteren Untersuchungen analysiert werden.

Das dorsomediale Striatum dient laut bisherigem Kenntnisstand dem Erlernen und Ausführen zielgerichteter Verhaltensweisen im Zusammenspiel mit der prälimbischen Region des präfrontalen Kortex (Balleine and O'Doherty, 2010; Yin et al., 2005), möglicherweise auch unter dem Einfluss dopaminergischer Belohnungsprozesse. Daher wären zusätzliche Konditionierungsexperimente zum Untersuchen des Lernverhaltens der dorsomedial lädierten Tiere in dieser Studie interessant gewesen.

Die 6-OHDA-Läsion zur dopaminergen Denervierung ist nicht immer unumstritten gewesen. In den 70er Jahren, als die Forschung mit 6-OHDA-Modellen begann, zweifelten Forscher die Katecholaminspezifität des Toxins an und verglichen die Effekte von 6-OHDA Injektionen mit unspezifischen Läsionen durch Elektrokoagulation (Poirier et al., 1972) oder unselektiven Neurotoxinen (Butcher et al., 1974). Sotelo et al. fanden lokale Nekrosezonen rund um die Injektionsstelle, die von unspezifischer glialer und neuronaler Destruktion und einer peripheren Zone selektiver dopaminergener Degeneration umgeben war (Sotelo et al., 1973). Diese selektive Degeneration könnte jedoch auch durch eine Infarzierung und Zerstörung der Nervenzellfortsätze im Bereich der Injektionszone mit folgender anterograder neuronaler Degeneration verursacht worden sein (Butcher et al., 1974). Die Selektivität würde die Läsion demnach durch die Wahl der anatomischen Injektionsstelle erhalten. In Folge wurden neue Experimente durchgeführt, um doch die Selektivität von 6-OHDA zu bestätigen (Javoy et al., 1976). Die initialen Bedenken fanden schließlich kaum noch Beachtung und 6-OHDA ist mittlerweile in der Parkinsonforschung weit verbreitet.

Mit der Injektion in den Ventrikel sollten unspezifische mechanische Läsionen der dopaminergen Bahn in den aufgeführten Experimenten dieser Arbeit vermieden werden. Dennoch zeigten sich auch hierbei erhebliche Nebenwirkungen: Im MRT ergaben sich Hinweise auf ein Ödem rund um die Ventrikel und eine Nekrose der Septumkerne, welche in der histologischen Aufarbeitung aufgrund der schlecht erhaltenen Gewebestruktur nicht mehr darstellbar waren. Zusätzlich zeigten sich Veränderungen der BBB im Striatum auch fernab der Hyperintensität im MRT. Da eine pathologische Permeabilität der BBB die zerebrale Ionen- und Wasserhomöostase stört und schädliche vaskuläre Bestandteile vermehrt übertreten können, können die Neuronen in ihrer Funktion beeinträchtigt werden (Berislav V, 2005; Hawkins and Davis, 2005; Zlokovic, 2008). Da Hinweise auf ein vasogenes Ödem im Striatum gefunden wurden, muss dieser Aspekt der 6-OHDA Läsion daher bei der Beurteilung von motorischen Verhaltenseffekten beachtet werden. Eine interessante Frage wäre, wie sich körperliche Aktivität auf die BBB auswirkt, da

bereits gezeigt wurde, dass sie Entzündungsvorgänge moduliert und oxidativen Stress reduziert (Cotman and Berchtold, 2002; Dishman et al., 2006). Andererseits wurde von Yu et al. (Yu et al., 2001) gezeigt, dass Training den Spiegel systemischer Entzündungsmediatoren (IL-6) über vermehrte Katecholamin- und Steroidproduktion anheben kann, wobei 6-OHDA jedoch durch die Zerstörung zentraler katecholaminerger Zellen den Anstieg von IL-6 mindert.

Bei Tieren, die 6-OHDA intraventrikulär verabreicht bekamen, zeigten sich zudem 4 Tage nach der Läsion im Striatum und lateralen Kortex Zeichen reaktiver Gliose mit Hinweisen auf dedifferenzierte Astrozyten (Wachter et al., 2010). Da nur differenzierte Astrozyten befähigt sind, den Erhalt der BBB zu gewährleisten (Abbott, 2002; DeBault and Cancilla, 1980; Wolburg et al., 2009b), könnte in der Dedifferenzierung der Astrozyten ein weiterer pathogenetischer Faktor des vasogenen Ödems liegen. Inwiefern die dedifferenzierten Gliazellen zu Regenerationsvorgängen im Läsionsbereich beitragen und ob sich dies durch Training positiv beeinflussen lassen kann, müsste in weiteren histologischen Untersuchungen mit Fokus auf gliale Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert werden. Es wäre denkbar, dass diese Zellen durch Proliferation und vielleicht sogar Differenzierung zu neuronalen Zellen eine Rolle bei der Spontanerholung nach 6-OHDA Läsionen, die im Nachfolgeprojekt dieser Arbeit (Gittinger et al., in Vorbereitung) und anderen Studien bereits gefunden wurden (Alvarez-Fischer et al., 2008; Monville et al., 2006; Schwarting and Huston, 1996), spielen. Möglicherweise konnten diese Restaurationsvorgänge durch das Training beschleunigt werden.

Letztlich gäbe es in diesem Rahmen noch viele weitere Fragen in Folgeversuchen zu klären. Die Relevanz der Forschung über die Wirkungen von 6-OHDA auf Gehirngewebe erscheint wegen der weiten Verbreitung in der Forschung am Tiermodell offensichtlich.

4.6 Limitationen

In Bezug auf die Interpretation der Daten sowie deren Übertragung auf die klinische Situation sind einige Einschränkungen zu bedenken.

4.6.1 Limitationen im Versuchsaufbau

Erstens sind Verhaltenstestungen an Versuchstieren allgemein störanfällig, z.B. kann eine Veränderung von Umgebungsgeräuschen, Gerüchen, Luftfeuchtigkeit oder Lichtverhältnissen, aber auch der sich möglicherweise verändernde Gesundheits- und Ernährungszustand des Tieres deutlichen Einfluss auf die Performance nehmen, unabhängig von der Variable, die man testen möchte (Zutphen, 2001). Zwar wurde durch ein entsprechend standardisiertes Versuchsprotokoll und kontrollierte Umgebungsbedingungen versucht, diese Fehler zu minimieren, gänzlich vermeiden lassen sich einige Störvariablen jedoch nicht. Beispielsweise wurden durch die parallel zu den Verhaltenstestungen durchgeführten histologischen Untersuchungen einzelne Ratten aus der Gruppe entfernt und eine derartige Änderung der Haltungsbedingungen kann einen Einfluss auf die Performance in den motorischen Tests genommen haben.

Darüber hinaus war dadurch, dass die Verhaltenstesterin auch das Training durchführte sowie an den Operationen und der Versorgung der Tiere beteiligt war, eine verblindete Messung nicht möglich, was auf die Ergebnisse Einfluss genommen haben könnte.

Zufällige Störfaktoren sowie bestehende interindividuelle Varianz können durch eine entsprechend hohe Tierzahl zwar statistisch minimiert werden, aus ethischen, aber auch aus logistischen Gründen werden dem jedoch Grenzen gesetzt.

Bezüglich der Analyse der den Verhaltenseffekten zugrundeliegenden Mechanismen ist die Aussage der histologischen Untersuchungen begrenzt. Beispielsweise konnten die Dopaminrezeptoren mittels der durchgeführten Methoden nicht untersucht werden. Hierfür wären andere Methoden, wie z.B. ein Western Blot hilfreicher gewesen, was aufgrund der Fixierung des Gewebes nachträglich jedoch nicht mehr möglich war. Zudem hätten außer dem Striatum und der SVZ immunhistochemisch weitere Regionen, wie z.B. der Hippocampus, bei dem bereits nachgewiesen wurde, dass körperliche Aktivität die Neurogenese anregt (van Praag et al., 1999), untersucht werden müssen.

4.6.2 Limitationen in Bezug auf das Modell und die Übertragung auf den Patienten

Einige Einschränkungen des hier verwendeten 6-OHDA Modells sind bereits in den vorangehenden Kapiteln diskutiert worden in Bezug auf die Wahl des Läsionsortes, akut toxische Nebenwirkungen und Einflussnahme auf die BBB. Zudem ist zu beachten, dass beim Patienten die Situation einer chronisch-progressiven multisystemischen Erkrankung vorliegt, wohingegen es sich bei toxischen Modellen um eine akute, in der Regel nicht oder nur begrenzt progrediente Schädigung eines Transmittersystems handelt. Es gilt immer zu bedenken, dass eine Erkrankung, deren Entsprechung es im Tierreich nicht gibt und deren Ätiopathogenese beim Menschen noch nicht vollständig verstanden ist, auch immer nur in Teilaspekten im Modell reproduziert werden kann. Die Übertragung im Modell gewonnener Daten auf den Patienten ist daher mit Vorsicht vorzunehmen.

Hinzu kommt, dass in Tierversuchen wie diesem in der Regel Jungtiere eines Geschlechtes aus Inzuchtstämmen verwendet werden, um möglichst standardisierte Gruppen zu schaffen (Hartung, 2008) und Kosten zu reduzieren. Dies minimiert zwar erneut zufällige Fehler und ermöglicht kleinere Gruppengrößen, andererseits wird auf diesem Weg auch der Breite des Spektrums genetischer und epigenetischer Varianz bei Patienten nicht begegnet. Auch ist unklar, inwieweit die Daten, die aus „jungen“ Gehirnen gewonnen werden, auf Patienten, die in der Regel bereits betagter sind, übertragbar sind.

Nicht zuletzt ist die Frage, inwieweit die angewendete Trainingsmethode auf die Situation beim Patienten übertragbar ist. Zum einen sind hier nichtmotorische Symptome wie Antriebsmangel, aber auch stärkere motorische Einschränkungen sowie eventuelle kardiovaskuläre oder muskuloskelettale Begleiterkrankungen für das körperliche Training limitierend.

Trotz der Limitationen bleiben Tiermodelle die einzige Möglichkeit, gewisse Faktoren unter kontrollierten Bedingungen zu testen und beispielsweise gezielt histologische Untersuchungen durchzuführen, was beim Menschen nicht möglich wäre.

4.7 Schlussfolgerungen

Die Verhaltensversuche der vorliegenden Arbeit ergaben, dass auch ein verzögert nach der Läsion begonnenes, leichtes körperliches Training die Parkinsonsymptomatik bei einem milden 6-OHDA induzierten Tiermodell lindern kann, ohne jedoch den Dopaminverlust auszugleichen. Obwohl die zugrunde liegenden Effekte nicht aufgeklärt werden konnten, wurden Hinweise gefunden, dass Training kompensatorische Effekte beschleunigen könnte, die auch bei untrainierten Ratten spontan, aber verzögert ablaufen. Es zeigte sich folglich, dass auch in einem beschädigten Gehirn noch plastische Prozesse ablaufen können, die zu funktionellen Verbesserungen führen.

Die Situation beim Parkinsonpatienten, der unter einer chronisch-progredienten multisystemischen Neurodegeneration leidet, ist weitaus komplexer als im vorliegenden Modell. Dass sich die Grundaussage über den therapeutischen Effekt körperlichen Trainings dennoch übertragen lässt, ist jedoch bereits mehrfach in klinischen Studien demonstriert worden.

Um für die klinische Umsetzung relevante Daten im Tierversuch erheben zu können, bedarf es eines geeigneten Modells. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die intrazerebrale Applikation von 6-OHDA weit mehr bewirkt, als eine rein selektive dopaminerge Neurodegeneration. Lokale Nekrosen um die Injektionsstelle sowie Veränderungen der Bluthirnschranke mit Ödembildung ließen sich neben einer Minderung des Dopamingehalts und der TH-Expression nachweisen. Da 6-OHDA ein in der Forschung häufig angewandtes Neurotoxin darstellt, ist es von hoher Bedeutung, sich dieser Nebenwirkungen bewusst zu sein und die erhobenen Daten und Befunde in diesem Rahmen zu bewerten.

Als Ausblick auf nachfolgende Projekte sollten in Bezug auf den Trainingseffekt weitere zerebrale Strukturen, insbesondere das Kleinhirn, auf neuronale und gliale Marker histologisch untersucht werden. Zur weiteren Einordnung der toxischen Effekte von 6-OHDA könnten weitere Untersuchungen zur BBB und zu Entzündungsprozessen ergänzt werden.

5 Zusammenfassung

In den Experimenten dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich die motorischen Defizite von Ratten, denen durch eine beidseitige intraventrikuläre Injektion von 6-OHDA eine milde Parkinsonsymptomatik induziert wurde, durch ein mildes körperliches Training auch in einem späteren Zeitfenster nach der Läsion verbessern lassen. Die Tiere wurden dazu über 8 Tage für 4 mal 5 min bei mittlerer Geschwindigkeit auf dem Rotarod trainiert. Vor und nach der Läsion sowie nach dem Training wurden Verhaltenstestungen mittels Stepping Test und Open Field Activity Monitoring durchgeführt. Dabei konnte bei lädierten Ratten eine Verbesserung der Defizite im Stepping Test erlangt werden, die in den 2 Versuchen jeweils reproduziert werden konnten.

Signifikante Effekte bezüglich des spontanen Explorationsverhaltens ließen sich allerdings nur im initialen Versuch nachweisen. In der Wiederholung zeigten sich weder eindeutige Defizite im Open Field nach der 6-OHDA Läsion noch eine signifikante Verbesserung nach dem Training.

Ursachen für die erzielten Verbesserungen nach dem Training konnten nicht sicher identifiziert werden. Es kam weder zu einer Erholung des Dopamingehalts bei trainierten Tieren noch zu einer vermehrten Proliferation in der SVZ. Die beobachtete Verbesserung der motorischen Defizite erfolgte demnach unabhängig von der gemessenen dopaminergen Innervation des Striatums.

Auch in der T2w MRT konnten keine strukturellen Effekte durch das Training gefunden werden, da die Auswertung bezüglich dieser Fragestellung durch das Auftreten einer dosisabhängigen Hyperintensität nach der Toxininjektion behindert wurde. Die Hyperintensität bestand bereits an Tag 2, erreichte ihr Maximum an Tag 4 und bildete sich bis Tag 14 nach der Läsion zurück. Sie betraf die Bereiche um die Injektionsstelle und breitete sich von den Ventrikeln insbesondere in die Septumregion aus. Histologisch zeigte sich in diesem Bereich eine stark verminderte Expression von GFAP, der von einer Zone reaktiver Gliose, mit GFAP- und Nestin- Hochregulation umgeben war. Wir deuteten daher die Hyperintensität als Ausdruck einer glialen Nekrose und

vermuteten zudem ein zytotoxisches Ödem, welches in der verminderten Diffusion in diffusionsgewichteten Kernspinaufnahmen angedeutet wurde.

Da Hyperintensität in T2 auf vermehrte Flüssigkeit im Gewebe hindeutet, wurde zudem auf das Vorhandensein eines vasogenen Ödems untersucht. Dabei zeigten sich im gesamten Striatum, das nur marginal von der Hyperintensität betroffen war, Zeichen einer veränderten Bluthirnschranke: Es fanden sich in Tieren, die mit 6-OHDA behandelt worden waren, vermehrt perivaskuläre Höfe als Ausdruck eines vasogenen Ödems sowie eine Extravasation von Fibrinogen. Die Expression des Tight Junction Proteins Claudin-3 war signifikant vermindert und es zeigte sich eine veränderte Expression des glialen Wasserkanals AQP4.

Folglich muss bei der Verwendung von 6-OHDA Läsionen als Parkinsonmodell beachtet werden, dass die Toxinapplikation akute Nebenwirkungen im Sinne eines zerebralen Ödems und lokaler Nekrosen um die Injektionsstelle nach sich zieht, was unter Umständen initiale Verhaltenstestungen unabhängig von der dopaminergen Denervation beeinflussen könnte. Da Veränderungen der Bluthirnschranke jedoch auch beim Parkinsonpatienten berichtet wurden, muss dieser Befund aber nicht grundsätzlich gegen die Verwendung dieses toxischen Modells sprechen.

6 Literaturverzeichnis

- Abbott, N.J., 2002. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat* 200, 629-638.
- Allam, M.F., Del Castillo, A.S., Navajas, R.F., 2005. Parkinson's disease risk factors: genetic, environmental, or both? *Neurol Res* 27, 206-208.
- Alvarez-Fischer, D., Guerreiro, S., Hunot, S., Saurini, F., Marien, M., Sokoloff, P., Hirsch, E.C., Hartmann, A., Michel, P.P., 2008. Modelling Parkinson-like neurodegeneration via osmotic minipump delivery of MPTP and probenecid. *J Neurochem* 107, 701-711.
- Avila-Costa, M.R., Colin-Barenque, L., Montiel-Flores, E., Aley-Medina, P., Valdez, A.L., Librado, J.L., Martinez, E.F., Martinez, V.A., Mussali-Galante, P., Fortoul, T.I., 2005. Bromocriptine treatment in a murine Parkinson's model: ultrastructural evaluation after dopaminergic deafferentation. *Int J Neurosci* 115, 851-859.
- Balleine, B.W., O'Doherty, J.P., 2010. Human and rodent homologues in action control: corticostriatal determinants of goal-directed and habitual action. *Neuropsychopharmacology* 35, 48-69.
- Bekiesinska-Figatowska, M., 2004. T2-hyperintense foci on brain MR imaging. *Med Sci Monit* 10 Suppl 3, 80-87.
- Berg, D., 2006. Marker for a preclinical diagnosis of Parkinson's disease as a basis for neuroprotection. *J Neural Transm Suppl*, 123-132.
- Berg, D., 2008. Biomarkers for the early detection of Parkinson's and Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 5, 133-136.
- Berg, D., Gaenslen, A., 2010. Place value of transcranial sonography in early diagnosis of Parkinson's disease. *Neurodegener Dis* 7, 291-299.
- Berislav V, Z., 2005. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends in Neurosciences* 28, 202-208.
- Betarbet, R., Sherer, T.B., Greenamyre, J.T., 2002. Animal models of Parkinson's disease. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 24, 308-318.
- Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M., Benabid, A.L., Sadoul, R., Verna, J.M., 2001. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 65, 135-172.
- Bostan, A.C., Dum, R.P., Strick, P.L., 2010. The basal ganglia communicate with the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 8452-8456.
- Bostan, A.C., Strick, P.L., 2010. The cerebellum and basal ganglia are interconnected. *Neuropsychology review* 20, 261-270.
- Braak, H., Del Tredici, K., 2008a. Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. *Neurology* 70, 1916-1925.
- Braak, H., Del Tredici, K., 2008b. Neue Sicht des kortiko-striato-thalamo-kortikalen Regelkreises bei M. Parkinson. *Der Nervenarzt* 79, 1440-1445.
- Bury, S.D., Eichhorn, A.C., Kotzer, C.M., Jones, T.A., 2000. Reactive astrocytic responses to denervation in the motor cortex of adult rats are sensitive to

- manipulations of behavioral experience. *Neuropharmacology* 39, 743-755.
- Butcher, L.L., Eastgate, S.M., Hodge, G.K., 1974. Evidence that punctate intracerebral administration of 6-hydroxydopamine fails to produce selective neuronal degeneration. Comparison with copper sulfate and factors governing the department of fluids injected into brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 285, 31-70.
- Carvey, P.M., Zhao, C.H., Hendey, B., Lum, H., Trachtenberg, J., Desai, B.S., Snyder, J., Zhu, Y.G., Ling, Z.D., 2005. 6-Hydroxydopamine-induced alterations in blood–brain barrier permeability. *European Journal of Neuroscience* 22, 1158-1168.
- Cenci, M.A., Whishaw, I.Q., Schallert, T., 2002. Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nat Rev Neurosci* 3, 574-579.
- Chang, J.W., Wachtel, S.R., Young, D., Kang, U.J., 1999. Biochemical and anatomical characterization of forepaw adjusting steps in rat models of Parkinson's disease: studies on medial forebrain bundle and striatal lesions. *Neuroscience* 88, 617-628.
- Cicchetti, F., Brownell, A.L., Williams, K., Chen, Y.I., Livni, E., Isacson, O., 2002. Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. *Eur J Neurosci* 15, 991-998.
- Ciucci, M.R., Ma, S.T., Kane, J.R., Ahrens, A.M., Schallert, T., 2008. Limb use and complex ultrasonic vocalization in a rat model of Parkinson's disease: Deficit-targeted training. *Parkinsonism & Related Disorders* 14, Supplement 2, S172-S175.
- Cohen, A.D., Tillerson, J.L., Smith, A.D., Schallert, T., Zigmond, M.J., 2003. Neuroprotective effects of prior limb use in 6-hydroxydopamine-treated rats: possible role of GDNF. *J Neurochem* 85, 299-305.
- Cotman, C.W., Berchtold, N.C., 2002. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends in Neurosciences* 25, 295-301.
- de Lau, L.M.L., Breteler, M.M.B., 2006. Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology* 5, 525-535.
- DeBault, L.E., Cancilla, P.A., 1980. gamma-Glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells: induction by glial cells in vitro. *Science* 207, 653-655.
- DeKosky, S.T., Marek, K., 2003. Looking backward to move forward: early detection of neurodegenerative disorders. *Science* 302, 830-834.
- Deumens, R., Blokland, A., Prickaerts, J., 2002. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol* 175, 303-317.
- Dhawan, J.K., Kumar, V.M., Govindaraju, V., Raghunathan, P., 1998. Changes in magnetic resonance imaging and sex behavior after 6-OHDA injection in the medial preoptic area. *Brain Res Bull* 45, 333-339.
- Dishman, R.K., Berthoud, H.R., Booth, F.W., Cotman, C.W., Edgerton, V.R., Fleshner, M.R., Gandevia, S.C., Gomez-Pinilla, F., Greenwood, B.N., Hillman, C.H., Kramer, A.F., Levin, B.E., Moran, T.H., Russo-Neustadt, A.A., Salamone, J.D., Van Hoomissen, J.D., Wade, C.E., York, D.A.,

- Zigmond, M.J., 2006. Neurobiology of exercise. *Obesity* (Silver Spring) 14, 345-356.
- Dragunow, M., Robertson, H.A., 1987. Kindling stimulation induces c-fos protein(s) in granule cells of the rat dentate gyrus. *Nature* 329, 441-442.
- Drozdik, M., Bialecka, M., Mysliwiec, K., Honczarenko, K., Stankiewicz, J., Sych, Z., 2003. Polymorphism in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene: a possible link between environmental and genetic factors in Parkinson's disease. *Pharmacogenetics* 13, 259-263.
- Ebersbach, G., Ebersbach, A., Edler, D., Kaufhold, O., Kusch, M., Kupsch, A., Wissel, J., 2010. Comparing exercise in Parkinson's disease--the Berlin LSVT(R)BIG study. *Mov Disord* 25, 1902-1908.
- Ehrlich, P. 1885. Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus: Eine farbenanalytische Studie. (Berlin, August Hirschwald).
- Farkas, E., De Jong, G.I., de Vos, R.A., Jansen Steur, E.N., Luiten, P.G., 2000. Pathological features of cerebral cortical capillaries are doubled in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 100, 395-402.
- Fischer, S., Wobben, M., Marti, H.H., Renz, D., Schaper, W., 2002. Hypoxia-induced hyperpermeability in brain microvessel endothelial cells involves VEGF-mediated changes in the expression of zonula occludens-1. *Microvasc Res* 63, 70-80.
- FitzGerald, M.J.T., Gruener, G., Mtui, E., FitzGerald, M.J.T.C.n., related, n., 2007. *Clinical neuroanatomy and neuroscience*, 5th ed. / M J Turlough FitzGerald, Gregory Gruener, Estomih Mtui. Edition. Elsevier Saunders, [Edinburgh], xi, 428 p. pp.
- Fox, C.M., Ramig, L.O., Ciucci, M.R., Sapir, S., McFarland, D.H., Farley, B.G., 2006. The science and practice of LSVT/LOUD: neural plasticity-principled approach to treating individuals with Parkinson disease and other neurological disorders. *Semin Speech Lang* 27, 283-299.
- Frisen, J., Johansson, C.B., Torok, C., Risling, M., Lendahl, U., 1995. Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *J Cell Biol* 131, 453-464.
- Gaenslen, A., Berg, D., 2010. Early diagnosis of Parkinson's disease. *Int Rev Neurobiol* 90, 81-92.
- Gaenslen, A., Gasser, T., Berg, D., 2008. Nutrition and the risk for Parkinson's disease: review of the literature. *J Neural Transm* 115, 703-713.
- Garbelli, R., Zucca, I., Milesi, G., Mastropietro, A., D'Incerti, L., Tassi, L., Colombo, N., Marras, C., Villani, F., Minati, L., Spreafico, R., 2011. Combined 7-T MRI and histopathologic study of normal and dysplastic samples from patients with TLE. *Neurology* 76, 1177-1185.
- Gerlach, M., Hendrich, A., Hueber, R., Jost, W., Winkler, J., Woitalla, D., Riederer, P., 2008. Early detection of Parkinson's disease: unmet needs. *Neurodegener Dis* 5, 137-139.
- Gleixner, C., Müller, M., Wirth, S.-B., 2009/2010. *Neurologie und Psychiatrie für Studium und Praxis*, 7 Edition. Müller, Markus, Breisach am Rhein, X; 444 p.
- Glinka, Y., Gassen, M., Youdim, M.B., 1997. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *J Neural Transm Suppl* 50, 55-66.

- Godau, J., Herfurth, M., Kattner, B., Gasser, T., Berg, D., 2010. Increased serum insulin-like growth factor 1 in early idiopathic Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 81, 536-538.
- Goldmann, E.E., 1913. Vitalfärbung am Zentralnervensystem. *Abh. Preuss. Akd. Wiss. Phys.*, 1–13.
- Goodwin, V.A., Richards, S.H., Taylor, R.S., Taylor, A.H., Campbell, J.L., 2008. The effectiveness of exercise interventions for people with Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord* 23, 631-640.
- Gorell, J.M., Johnson, C.C., Rybicki, B.A., Peterson, E.L., Richardson, R.J., 1998. The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology* 50, 1346-1350.
- Gorell, J.M., Rybicki, B.A., Cole Johnson, C., Peterson, E.L., 1999. Occupational metal exposures and the risk of Parkinson's disease. *Neuroepidemiology* 18, 303-308.
- Grammas, P., Martinez, J., Miller, B., 2011. Cerebral microvascular endothelium and the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Expert Rev Mol Med* 13, e19.
- Greenamyre, J.T., Betarbet, R., Sherer, T.B., 2003. The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environment and mitochondria. *Parkinsonism Relat Disord* 9 Suppl 2, S59-64.
- Guzman, R., Lovblad, K.O., Meyer, M., Spenger, C., Schroth, G., Widmer, H.R., 2000. Imaging the rat brain on a 1.5 T clinical MR-scanner. *J Neurosci Methods* 97, 77-85.
- Hartung, T., 2008 Vor- und Nachdenkliches zu Tierversuchen. . *ALTEX* 25, 3 - 9.
- Hawkins, B.T., Davis, T.P., 2005. The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease. *Pharmacological Reviews* 57, 173-185.
- He, Y., Appel, S., Le, W., 2001. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain Res* 909, 187-193.
- Heiskala, M., Peterson, P.A., Yang, Y., 2001. The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport. *Traffic* 2, 93-98.
- Herrera, D.G., Robertson, H.A., 1996. Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol* 50, 83-107.
- Hirsch, M.A., Farley, B.G., 2009. Exercise and neuroplasticity in persons living with Parkinson's disease. *Eur J Phys Rehabil Med* 45, 215-229.
- Holschneider, D.P., Maarek, J.M.I., Yang, J., Harimoto, J., Scremin, O.U., 2003. Functional Brain Mapping in Freely Moving Rats During Treadmill Walking. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 925-932.
- Holschneider, D.P., Yang, J., Guo, Y., Maarek, J.M.I., 2007. Reorganization of functional brain maps after exercise training: Importance of cerebellar–thalamic–cortical pathway. *Brain Research* 1184, 96-107.
- Horne, M.K., Butler, E.G., 1995. The role of the cerebello-thalamo-cortical pathway in skilled movement. *Prog Neurobiol* 46, 199-213.
- Howells, F.M., Russell, V.A., Mabandla, M.V., Kellaway, L.A., 2005. Stress reduces the neuroprotective effect of exercise in a rat model for Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 165, 210-220.

- Humm, J.L., Kozlowski, D.A., Bland, S.T., James, D.C., Schallert, T., 1999. Use-dependent exaggeration of brain injury: is glutamate involved? *Exp Neurol* 157, 349-358.
- Humm, J.L., Kozlowski, D.A., James, D.C., Gotts, J.E., Schallert, T., 1998. Use-dependent exacerbation of brain damage occurs during an early post-lesion vulnerable period. *Brain Res* 783, 286-292.
- Iwamoto, G.A., Wappel, S.M., Fox, G.M., Buetow, K.A., Waldrop, T.G., 1996. Identification of diencephalic and brainstem cardiorespiratory areas activated during exercise. *Brain Res* 726, 109-122.
- Javoy, F., Sotelo, C., Herbet, A., Agid, Y., 1976. Specificity of dopaminergic neuronal degeneration induced by intracerebral injection of 6-hydroxydopamine in the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 102, 201-215.
- John, J., Govindaraju, V., Raghunathan, P., Kumar, V.M., 1996. Magnetic resonance imaging of temporal changes of neurotoxic lesion in the rat. *Brain Res Bull* 40, 273-277.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., 2000. Principles of neural science, 4th ed. Edition. McGraw-Hill, Health Professions Division, New York ; London, xli, 1414 p. pp.
- Keus, S.H., Bloem, B.R., Hendriks, E.J., Bredero-Cohen, A.B., Munneke, M., 2007. Evidence-based analysis of physical therapy in Parkinson's disease with recommendations for practice and research. *Mov Disord* 22, 451-460; quiz 600.
- Keus, S.H., Munneke, M., Nijkrake, M.J., Kwakkel, G., Bloem, B.R., 2009. Physical therapy in Parkinson's disease: evolution and future challenges. *Mov Disord* 24, 1-14.
- Kleim, J.A., Jones, T.A., Schallert, T., 2003. Motor enrichment and the induction of plasticity before or after brain injury. *Neurochem Res* 28, 1757-1769.
- Kondoh, T., Bannai, M., Nishino, H., Torii, K., 2005. 6-Hydroxydopamine-induced lesions in a rat model of hemi-Parkinson's disease monitored by magnetic resonance imaging. *Exp Neurol* 192, 194-202.
- Kozlowski, D.A., James, D.C., Schallert, T., 1996. Use-dependent exaggeration of neuronal injury after unilateral sensorimotor cortex lesions. *J Neurosci* 16, 4776-4786.
- Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, J.W., Irwin, I., 1983. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219, 979-980.
- Lapointe, N., St-Hilaire, M., Martinoli, M.G., Blanchet, J., Gould, P., Rouillard, C., Cicchetti, F., 2004. Rotenone induces non-specific central nervous system and systemic toxicity. *FASEB J* 18, 717-719.
- Lauwers, E., Beque, D., Van Laere, K., Nuyts, J., Bormans, G., Mortelmans, L., Casteels, C., Vercaemmen, L., Bockstael, O., Nuttin, B., Debyser, Z., Baekelandt, V., 2007. Non-invasive imaging of neuropathology in a rat model of alpha-synuclein overexpression. *Neurobiol Aging* 28, 248-257.
- Li, J., Ding, Y.H., Rafols, J.A., Lai, Q., McAllister, J.P., 2nd, Ding, Y., 2005. Increased astrocyte proliferation in rats after running exercise. *Neurosci Lett* 386, 160-164.

- Liste, I., Guerra, M.J., Caruncho, H.J., Labandeira-Garcia, J.L., 1997. Treadmill running induces striatal Fos expression via NMDA glutamate and dopamine receptors. *Exp Brain Res* 115, 458-468.
- Longo, V.G., Scotti de Carolis, A., Liuzzi, A., Massotti, M., 1974. A study of the central effects of 5,6-dihydroxytryptamine. *Adv Biochem Psychopharmacol* 10, 109-120.
- Lossinsky, A.S., Shivers, R.R., 2004. Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the blood-brain barrier during inflammatory conditions. *Review. Histol Histopathol* 19, 535-564.
- Lu, M., Hu, G., 2011. Targeting metabolic inflammation in Parkinson's disease: Implications for prospective therapeutic strategies. *Clin Exp Pharmacol Physiol*.
- McGeer, P.L., McGeer, E.G., 2004. Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 10 Suppl 1, S3-7.
- Meredith, G.E., Kang, U.J., 2006. Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem. *Mov Disord* 21, 1595-1606.
- Ming, G.-I., Song, H., 2011. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron* 70, 687-702.
- Miyake, Y., Tanaka, K., Fukushima, W., Sasaki, S., Kiyohara, C., Tsuboi, Y., Yamada, T., Oeda, T., Miki, T., Kawamura, N., Sakae, N., Fukuyama, H., Hirota, Y., Nagai, M., 2011. Lack of association of dairy food, calcium, and vitamin D intake with the risk of Parkinson's disease: A case-control study in Japan. *Parkinsonism & related disorders* 17, 112-116.
- Moers-Hornikx, V.M., Vles, J.S., Tan, S.K., Cox, K., Hoogland, G., Steinbusch, W.M., Temel, Y., 2011. Cerebellar nuclei are activated by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *Neurosci Lett* 496, 111-115.
- Mogi, M., Togari, A., Tanaka, K., Ogawa, N., Ichinose, H., Nagatsu, T., 1999. Increase in level of tumor necrosis factor (TNF)-alpha in 6-hydroxydopamine-lesioned striatum in rats without influence of systemic L-DOPA on the TNF-alpha induction. *Neurosci Lett* 268, 101-104.
- Monville, C., Torres, E.M., Dunnett, S.B., 2006. Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model. *J Neurosci Methods* 158, 219-223.
- Morgan, J.I., Curran, T., 1991. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annual review of neuroscience* 14, 421-451.
- Morris, M.E., Martin, C.L., Schenkman, M.L., 2010. Striding out with Parkinson disease: evidence-based physical therapy for gait disorders. *Phys Ther* 90, 280-288.
- Mortimer, J.A., Borenstein, A.R., Nelson, L.M., 2012. Associations of welding and manganese exposure with Parkinson disease: review and meta-analysis. *Neurology* 79, 1174-1180.
- Nag, S., Kapadia, A., Stewart, D.J., 2011. Review: molecular pathogenesis of blood-brain barrier breakdown in acute brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol* 37, 3-23.
- Nag, S., Manias, J.L., Stewart, D.J., 2009. Pathology and new players in the pathogenesis of brain edema. *Acta Neuropathol* 118, 197-217.

- Nakamura, K., Thoenen, H., 1972. Increased irritability: a permanent behavior change induced in the rat by intraventricular administration of 6-hydroxydopamine. *Psychopharmacologia* 24, 359-372.
- Norman, A.B., Thomas, S.R., Pratt, R.G., Samaratinga, R.C., Sanberg, P.R., 1990. T1 and T2 weighted magnetic resonance imaging of excitotoxin lesions and neural transplants in rat brain in vivo. *Exp Neurol* 109, 164-170.
- O'Dell, S.J., Gross, N.B., Fricks, A.N., Casiano, B.D., Nguyen, T.B., Marshall, J.F., 2007. Running wheel exercise enhances recovery from nigrostriatal dopamine injury without inducing neuroprotection. *Neuroscience* 144, 1141-1151.
- O'Keefe, G.C., Barker, R.A., Caldwell, M.A., 2009. Dopaminergic modulation of neurogenesis in the subventricular zone of the adult brain. *Cell Cycle* 8, 2888-2894.
- Olsson, M., Nikkhah, G., Bentlage, C., Bjorklund, A., 1995. Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *J Neurosci* 15, 3863-3875.
- Park, M., Ross, G.W., Petrovitch, H., White, L.R., Masaki, K.H., Nelson, J.S., Tanner, C.M., Curb, J.D., Blanchette, P.L., Abbott, R.D., 2005. Consumption of milk and calcium in midlife and the future risk of Parkinson disease. *Neurology* 64, 1047-1051.
- Paxinos, G., Watson, C. 1997. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (San Diego, Academic Press).
- Poirier, L.J., Langelier, P., Roberge, A., Boucher, R., Kitsikis, A., 1972. Non-specific histopathological changes induced by the intracerebral injection of 6-hydroxy-dopamine (6-OH-DA). *J Neurol Sci* 16, 401-416.
- Poloni, G., Minagar, A., Haacke, E.M., Zivadinov, R., 2011. Recent developments in imaging of multiple sclerosis. *Neurologist* 17, 185-204.
- Poulton, N.P., Muir, G.D., 2005. Treadmill training ameliorates dopamine loss but not behavioral deficits in hemi-parkinsonian rats. *Exp Neurol* 193, 181-197.
- Rasband, W. 1997-2009. *ImageJ* (National Institutes of Health, Bethesda, Md., USA).
- Ravenstijn, P.G., Merlini, M., Hameetman, M., Murray, T.K., Ward, M.A., Lewis, H., Ball, G., Mottart, C., de Ville de Goyet, C., Lemarchand, T., van Belle, K., O'Neill, M.J., Danhof, M., de Lange, E.C., 2008. The exploration of rotenone as a toxin for inducing Parkinson's disease in rats, for application in BBB transport and PK-PD experiments. *J Pharmacol Toxicol Methods* 57, 114-130.
- Richardson, K.C., Jarett, L., Finke, E.H., 1960. Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain technology* 35, 313-323.
- Rieker, C., Engblom, D., Kreiner, G., Domanskyi, A., Schober, A., Stotz, S., Neumann, M., Yuan, X., Grummt, I., Schutz, G., Parlato, R., 2011. Nucleolar disruption in dopaminergic neurons leads to oxidative damage and parkinsonism through repression of mammalian target of rapamycin signaling. *J Neurosci* 31, 453-460.

- Rodriguez, M., Barroso-Chinea, P., Abdala, P., Obeso, J., Gonzalez-Hernandez, T., 2001. Dopamine cell degeneration induced by intraventricular administration of 6-hydroxydopamine in the rat: similarities with cell loss in parkinson's disease. *Exp Neurol* 169, 163-181.
- Rosenzweig, M.R., Bennett, E.L., 1996. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav Brain Res* 78, 57-65.
- Sauer, D., Allegrini, P.R., Thedinga, K.H., Massieu, L., Amacker, H., Fagg, G.E., 1992. Evaluation of quinolinic acid induced excitotoxic neurodegeneration in rat striatum by quantitative magnetic resonance imaging in vivo. *J Neurosci Methods* 42, 69-74.
- Sauer, H., Oertel, W.H., 1994. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: A combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* 59, 401-415.
- Schaefer, P.W., Grant, P.E., Gonzalez, R.G., 2000. Diffusion-weighted MR imaging of the brain. *Radiology* 217, 331-345.
- Scherfler, C., Seppi, K., Mair, K.J., Donnemiller, E., Virgolini, I., Wenning, G.K., Poewe, W., 2012. Left hemispheric predominance of nigrostriatal dysfunction in Parkinson's disease. *Brain* 135, 3348-3354.
- Schmidt, W.J., Kretschmer, B.D., 1997. Behavioural pharmacology of glutamate receptors in the basal ganglia. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 21, 381-392.
- Schober, A., 2004. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res* 318, 215-224.
- Scholzen, T., Gerdes, J., 2000. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology* 182, 311-322.
- Schwartz, R.K., Huston, J.P., 1996. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae. *Prog Neurobiol* 49, 215-266.
- Sevick, R.J., Kanda, F., Mintorovitch, J., Arief, A.I., Kucharczyk, J., Tsuruda, J.S., Norman, D., Moseley, M.E., 1992. Cytotoxic brain edema: assessment with diffusion-weighted MR imaging. *Radiology* 185, 687-690.
- Smith, A.D., Zigmond, M.J., 2003. Can the brain be protected through exercise? Lessons from an animal model of parkinsonism. *Exp Neurol* 184, 31-39.
- Smith, D.A., Clarke, L.P., Fiedler, J.A., Murtagh, F.R., Bonaroti, E.A., Sengstock, G.J., Arendash, G.W., 1993. Use of a clinical MR scanner for imaging the rat brain. *Brain Res Bull* 31, 115-120.
- Sofroniew, M.V., Vinters, H.V., 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119, 7-35.
- Sotelo, C., Javoy, F., Agid, Y., Glowinski, J., 1973. Injection of 6-hydroxydopamine in the substantia nigra of the rat. I. Morphological study. *Brain Res* 58, 269-290.
- Staal, R.G., Hogan, K.A., Liang, C.L., German, D.C., Sonsalla, P.K., 2000. In vitro studies of striatal vesicles containing the vesicular monoamine

- transporter (VMAT2): rat versus mouse differences in sequestration of 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J Pharmacol Exp Ther* 293, 329-335.
- Stromberg, I., Bjorklund, H., Dahl, D., Jonsson, G., Sundstrom, E., Olson, L., 1986. 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. *Brain Res Bull* 17, 225-236.
- Tajiri, N., Yasuhara, T., Shingo, T., Kondo, A., Yuan, W., Kadota, T., Wang, F., Baba, T., Tayra, J.T., Morimoto, T., Jing, M., Kikuchi, Y., Kuramoto, S., Agari, T., Miyoshi, Y., Fujino, H., Obata, F., Takeda, I., Furuta, T., Date, I., 2010. Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's disease model of rats. *Brain Res* 1310, 200-207.
- Thacker, E.L., Chen, H., Patel, A.V., McCullough, M.L., Calle, E.E., Thun, M.J., Schwarzschild, M.A., Ascherio, A., 2008. Recreational physical activity and risk of Parkinson's disease. *Mov Disord* 23, 69-74.
- Tillerson, J.L., Caudle, W.M., Reveron, M.E., Miller, G.W., 2003. Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of Parkinson's disease. *Neuroscience* 119, 899-911.
- Tillerson, J.L., Cohen, A.D., Caudle, W.M., Zigmond, M.J., Schallert, T., Miller, G.W., 2002. Forced nonuse in unilateral parkinsonian rats exacerbates injury. *J Neurosci* 22, 6790-6799.
- Tillerson, J.L., Cohen, A.D., Philhower, J., Miller, G.W., Zigmond, M.J., Schallert, T., 2001. Forced limb-use effects on the behavioral and neurochemical effects of 6-hydroxydopamine. *J Neurosci* 21, 4427-4435.
- Tolwani, R.J., Jakowec, M.W., Petzinger, G.M., Green, S., Waggle, K., 1999. Experimental models of Parkinson's disease: insights from many models. *Lab Anim Sci* 49, 363-371.
- Tsukita, S., Furuse, M., Itoh, M., 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 285-293.
- Ungerstedt, U., 1971. Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand Suppl* 367, 95-122.
- Van Camp, N., Vreys, R., Van Laere, K., Lauwers, E., Beque, D., Verhoye, M., Casteels, C., Verbruggen, A., Debyser, Z., Mortelmans, L., Sijbers, J., Nuyts, J., Baekelandt, V., Van der Linden, A., 2010. Morphologic and functional changes in the unilateral 6-hydroxydopamine lesion rat model for Parkinson's disease discerned with microSPECT and quantitative MRI. *MAGMA* 23, 65-75.
- van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H., 1999. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2, 266-270.
- Vaz, R., Sarmiento, A., Borges, N., Cruz, C., Azevedo, I., 1997. Ultrastructural study of brain microvessels in patients with traumatic cerebral contusions. *Acta Neurochir (Wien)* 139, 215-220.
- Vergara-Aragon, P., Gonzalez, C.L., Wishaw, I.Q., 2003. A novel skilled-reaching impairment in paw supination on the "good" side of the hemi-Parkinson rat improved with rehabilitation. *J Neurosci* 23, 579-586.

- Vernon, A.C., Johansson, S.M., Mado, M.M., 2010. Non-invasive evaluation of nigrostriatal neuropathology in a proteasome inhibitor rodent model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci* 11, 1.
- Vizuete, M.L., Venero, J.L., Vargas, C., Ilundain, A.A., Echevarria, M., Machado, A., Cano, J., 1999. Differential upregulation of aquaporin-4 mRNA expression in reactive astrocytes after brain injury: potential role in brain edema. *Neurobiol Dis* 6, 245-258.
- Wachter, B., Schurger, S., Rolinger, J., von Ameln-Mayerhofer, A., Berg, D., Wagner, H.J., Kueppers, E., 2010. Effect of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) on proliferation of glial cells in the rat cortex and striatum: evidence for de-differentiation of resident astrocytes. *Cell Tissue Res* 342, 147-160.
- Wachter, B., Schurger, S., Schmid, A., Groger, A., Sadler, R., Speidel, A., Rolinger, J., Pichler, B.J., Berg, D., Wagner, H.J., von Ameln-Mayerhofer, A., Kueppers, E., 2012. 6-Hydroxydopamine leads to T2 hyperintensity, decreased claudin-3 immunoreactivity and altered aquaporin 4 expression in the striatum. *Behav Brain Res* 232, 148-158.
- Wang, Y., Kilic, E., Kilic, U., Weber, B., Bassetti, C.L., Marti, H.H., Hermann, D.M., 2005. VEGF overexpression induces post-ischaemic neuroprotection, but facilitates haemodynamic steal phenomena. *Brain* 128, 52-63.
- Wei, E.P., Ellison, M.D., Kontos, H.A., Povlishock, J.T., 1986. O₂ radicals in arachidonate-induced increased blood-brain barrier permeability to proteins. *Am J Physiol* 251, H693-699.
- Whitton, P.S., 2007. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol* 150, 963-976.
- Willson, M.L., McElnea, C., Mariani, J., Lohof, A.M., Sherrard, R.M., 2008. BDNF increases homotypic olivocerebellar reinnervation and associated fine motor and cognitive skill. *Brain* 131, 1099-1112.
- Wolburg, H., Noell, S., Mack, A., Wolburg-Buchholz, K., Fallier-Becker, P., 2009a. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res* 335, 75-96.
- Wolburg, H., Noell, S., Wolburg-Buchholz, K., Mack, A., Fallier-Becker, P., 2009b. Agrin, aquaporin-4, and astrocyte polarity as an important feature of the blood-brain barrier. *Neuroscientist* 15, 180-193.
- Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Fallier-Becker, P., Noell, S., Mack, A.F., 2011. Structure and functions of aquaporin-4-based orthogonal arrays of particles. *Int Rev Cell Mol Biol* 287, 1-41.
- Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Kraus, J., Rascher-Eggstein, G., Liebner, S., Hamm, S., Duffner, F., Grote, E.H., Risau, W., Engelhardt, B., 2003. Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol* 105, 586-592.
- Yin, H.H., Ostlund, S.B., Knowlton, B.J., Balleine, B.W., 2005. The role of the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. *Eur J Neurosci* 22, 513-523.

- Yu, X.N., Komaki, G., Sudo, N., Kubo, C., 2001. Central and peripheral catecholamines regulate the exercise-induced elevation of plasma interleukin 6 in rats. *Life Sci* 69, 167-174.
- Zivadinov, R., Bakshi, R., 2004. Role of MRI in multiple sclerosis I: inflammation and lesions. *Front Biosci* 9, 665-683.
- Zlokovic, B.V., 2008. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57, 178-201.
- Zutphen, L.F.M.v., 2001. Principles of laboratory animal science : a contribution to the humane use and care of animals and to the quality of experimental results, Rev. ed Edition. Elsevier, Amsterdam [u.a.], xii, 416 S pp.

7 Aus der Dissertation hervorgegangene Publikationen

Daten, die im Rahmen dieser Arbeit bzw. den daraus hervorgegangenen Projekten entstanden sind, wurden in den folgenden zwei Publikationen veröffentlicht:

Wachter B, Schürger S, Schmid A, Gröger A, Sadler R, Speidel A, Rolinger J, Pichler BJ, Berg D, Wagner HJ, von Ameln-Mayerhofer A, Küppers E. 6-Hydroxydopamine leads to T2 hyperintensity, decreased claudin-3 immunoreactivity and altered aquaporin 4 expression in the striatum. *Behav Brain Res.* 2012 Jun 15; 232(1):148-58. Epub 2012 Apr 10.

Wachter, B., Schürger, S., Rolinger, J., von Ameln-Mayerhofer, A., Berg, D., Wagner, H.J., Kueppers, E., 2010, Effect of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) on proliferation of glial cells in the rat cortex and striatum: evidence for de-differentiation of resident astrocytes. *Cell Tissue Res* 342, 147-160.

8 Erklärung zum Eigenanteil

Diese Doktorarbeit ist unter der Leitung von Prof. Dr. Daniela Berg, Leiterin der Arbeitsgruppe für klinische Neurodegeneration am Hertie-Institut für klinische Hirnforschung in Tübingen, in Kooperation mit Dr. Andreas von Ameln-Mayerhofer von der Abteilung für Neuropharmakologie der Universität Tübingen und mit PD Dr. Eva Küppers aus der Abteilung für zelluläre Neurobiologie am anatomischen Institut Tübingen unter Prof. Dr. Hans-Joachim Wagner sowie dem Labor für präklinische Bildgebung unter Prof. Dr. Bernd Pichler entstanden.

Prof. Dr. Daniela Berg initiierte, leitete, betreute und koordinierte das Projekt, wirkte am Entwerfen des Studiendesigns mit, besprach regelmäßig die Ergebnisse sowie die weitere Versuchsplanung, leistete wesentlichen finanziellen Beitrag und gab in Vorbesprechungen und beim Korrekturlesen wichtige Impulse für die Veröffentlichungen.

Dr. Andreas von Ameln-Mayerhofer betreute diese Arbeit über fünf Jahre, wirkte am Entwerfen des Studiendesigns mit, stellte Labor und Know-how für die Durchführung des verhaltensexperimentellen Teils zur Verfügung, schrieb den Ethikantrag, organisierte die Tierhaltung, half bei der Auswertung der Verhaltensergebnisse und der Immunhistochemie, führte die verschiedenen Ergebnisse aus HPLC, Immunhistochemie und Verhalten zusammen, las sowohl die Veröffentlichung in Behavioral Brain Research als auch die in Cell Tissue Research Korrektur.

Dr. Britta Wachter fertigte im Rahmen eines Projektes ihrer Doktorarbeit Färbungen und Auswertung von Ki-67 an und verwendete von mir angefertigte Gehirnschnitte von Ratten aus dem zweiten Versuch dieser Arbeit für ihre Untersuchungen für die Veröffentlichung in Cell Tissue Research, die sie zusammen mit PD Dr. E. Küppers verfasste. Für die Veröffentlichung in Behavioral Brain Research komplettierte sie die mikroskopischen Messungen von Claudin-3, wertete diese Aufnahmen und Teile der Semidünnschnitte aus

und fertigte die Immunhistochemie und die RT-PCR und Western Blots von AQP4 an. Das Verfassen der Publikation für Behavioral Brain Research erfolgte in Gemeinschaftsarbeit mit mir, wobei ihr Schwerpunkt im Bereich der Immunhistochemie und des Western Blots lag, meiner bei der MRT und den Verhaltensdaten.

Dr. Jana Godau initiierte zusammen mit Prof. Dr. Daniela Berg das Projekt, betreute es über die ersten Monate und leistete damit einen wichtigen Beitrag zum Entwerfen des Studiendesigns.

Prof. Dr. Hans-Joachim Wagner stellte Labor und z.T. Materialien für die immunhistochemischen Untersuchungen zur Verfügung und hatte eine beratende Rolle bei deren Durchführung.

PD Dr. Eva Küppers entwickelte das Studiendesign und die Fragestellung zu den in Cell Tissue Research veröffentlichten Daten, beriet wesentlich bei der in Behavioral Brain Research dargestellten Daten und betreute intensiv Durchführung und Interpretation der immunhistochemischen Färbungen und molekularbiologischen Experimente. Sie leistete durch Schreiben, intensive Beratung und Korrektur einen wesentlichen Beitrag zu allen Veröffentlichungen. Ein Teil der finanziellen Aufwendungen wurde von ihr über Drittmittel übernommen.

Prof. Dr. Bernd Pichler leitete und koordinierte mit seiner Expertise die Durchführung der MRT-Aufnahmen, stellte Labor, Scanner und Auswertungsarbeitsplätze zur Verfügung.

Dr. Andreas Schmid führte in Zusammenarbeit mit Jens Rolinger und mir die MRT-Messungen durch und beriet bei der Auswertung.

Dr. Adriane Gröger versuchte Subtraktionsanalysen der MRT-Bilder anzufertigen und beriet exzellent und konstruktiv bei der Planung weiterer MRT-

Messungen, insbesondere der diffusionsgewichteten Aufnahmen und deren Auswertung und las die Publikation in Behavioral Brain Research Korrektur.

Katrin Gittinger wiederholte den Verhaltensversuch mit Langzeitmessungen im Rahmen ihrer Diplomarbeit und fertigte HPLC-Analysen an, die in einer folgenden Publikation veröffentlicht werden sollen.

Jens Rolinger war als medizinischer Mitdoktorand an der Planung der Versuche beteiligt, an der Läsion der Tiere und Durchführung der MRTs, führte die Perfusionen und initiale Aufarbeitung des Gehirnmaterials durch und fertigte Teile der Aufnahmen am Laserscanmikroskop an.

Anna Speidel fertigte als wissenschaftliche Hilfskraft die in der Publikation in Behavioral Brain Research aufgeführten Western Blots an.

Rüdiger Sadler half bei den Operationen und Perfusionen eines Teils der Ratten, die im zweiten Versuch untersucht wurden.

Dr. Silke Nuber stellte das Rotarod zur Verfügung und beriet bei dessen Verwendung als Trainingsgerät.

Meine Aufgaben bei diesem Projekt waren demzufolge:

- Mitwirken beim Studiendesign auf Basis einer intensiven eigenständigen Literaturrecherche und durch interdisziplinärem Austausch in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Berg, Dr. Godau, Dr. von Ameln-Mayerhofer, Prof. Dr. Pichler, Dr. Nuber, Jens Rolinger
- Operation der Tiere zusammen mit Jens Rolinger, Mitarbeitern der Abteilung für Neuropharmakologie unter der Leitung von Dr. von Ameln-Mayerhofer
- Betreuen und Versorgen der Tiere mit Unterstützung durch das Labor der Neuropharmakologie
- Planung des Trainings in Rücksprache mit Dr. Silke Nuber

- Durchführung des Trainings der Tiere auf dem Rotarod
- Planung, Auswahl, Durchführung, Datenverarbeitung der Verhaltenstests
- Auswertung der Verhaltensdaten in Rücksprache mit Dr. von Ameln-Mayerhofer
- Durchführen der MRT-Aufnahmen unter Vorbereitung der Tiere mit Isofluran-Narkose mit Dr. Andreas Schmid und Jens Rolinger
- Entwerfen der Auswertstrategie, Ausmessen und Auswerten der Hyperintensität im MRT
- Auswerten der diffusionsgewichteten Aufnahmen in Rücksprache mit Dr. Adriane Gröger
- Anfertigen von Ultradünnschnitten mit dem Kryotom von Striatum und Kleinhirn
- Immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen TH, c-fos, GFAP (letztere führten zu weitergehenden Untersuchungen durch Dr. Britta Wachter)
- Aufnahmen am Laserscanmikroskop unter Anleitung von und in Rücksprache mit Herrn Mattheus, Dr. Küppers, Dr. Wachter, Dr. Mack aus dem anatomischen Labor
- Auswertung der immunhistochemischen Aufnahmen und der Semidünnschnitte zusammen mit Dr. von Ameln-Mayerhofer (c-fos), PD Dr. Küppers (Semidünnschnitte) und Dr. Wachter (TH, Semidünnschnitte)
- Verfassen der Publikation in Behavioral Brain Research mit Dr. Britta Wachter
- Herstellung der Gehirnschnitte für die immunhistochemischen Färbungen, Besprechung der Daten und Korrekturlesen der Veröffentlichung in Cell Tissue Research

9 Danksagung

Ich schulde meine Dankbarkeit vielen Menschen, ohne die ich diese Arbeit nicht hätte erstellen können.

Zunächst möchte ich meiner Doktormutter Prof. Dr. Daniela Berg tiefen Dank aussprechen, die mir ermöglicht hat, diese vielseitige und anspruchsvolle Arbeit durchzuführen, immer wieder mit ihrem reichen Fachwissen und ihrer wissenschaftlichen Erfahrung beratend und organisierend zur Seite stand und die mich auch darüber hinaus stets förderte und unterstützte. Mein Dank gilt auch ihrer Arbeitsgruppe, insbesondere Dr. Jana Godau für die Initiierung und anfängliche Betreuung des Projekts und Dr. Adriane Gröger für die Hilfe bei der Erstellung und Auswertung der MRT-Aufnahmen.

Ganz besonderen Dank möchte ich an Dr. Andreas von Ameln-Mayerhofer richten, der diese Arbeit über fünf Jahre gut betreut hat und mir nicht nur mit fachlichen Anregungen, Kreativität und seiner Forschungserfahrung eine große Bereicherung war, sondern es auch immer aufs Neue verstand, mich bei Rückschlägen wieder mit seiner Begeisterung anzustecken und zu motivieren. Ich möchte auch seiner neuropharmakologischen Arbeitsgruppe danken, die bei der Durchführung und Auswertung der Experimente eine große Hilfe war.

Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Wagner und PD Dr. Eva Küppers gebührt mein tiefer Dank für die Betreuung des histologischen Teils dieser Arbeit. Ohne die gute Zusammenarbeit mit dem Team der Anatomie, insbesondere Ulrich Mattheus, Elke Maier und Dr. Britta Wachter wäre eine immunhistochemische Untersuchung des Gehirngewebes nicht möglich gewesen. Auch Dr. Andreas Mack möchte ich danken für seine Unterstützung bei der Bedienung des Laserscanmikroskops.

Herrn Prof. Dr. Bernd Pichler und seiner Arbeitsgruppe möchte ich herzlich danken, dass wir die Einrichtungen und das fachliche Know-how des Labors für präklinische Bildgebung nutzen durften, insbesondere Dr. Andreas Schmid, der die MR-Messungen mit uns durchgeführt hat.

An Dr. Silke Nuber und Prof. Dr. Olaf Riess geht mein Dank für das Bereitstellen des Rotarods und die Beratung bei der Planung des Trainings und der Messungen.

Den Verantwortlichen des Interdisziplinären Zentrums für klinische Forschung/Promotionskollegs Tübingen danke ich sehr für die Förderung meiner Arbeit und die guten Einblicke in die Forschungswelt unserer Fakultät.

Meinem Kommilitonen und Kollegen Jens Rolinger danke ich für die langjährige Zusammenarbeit.

Meinen Freunden möchte ich meinen aufrichtigen Dank aussprechen, dass sie mich immer wieder motiviert und unterstützt haben. Besonderer Dank geht an Anna Speidel, der ich das kritische Korrekturlesen dieser Arbeit zumuten durfte. Christoph Fritsch danke ich für die große Hilfe bei der Formatierung.

Schließlich möchte ich tiefe Dankbarkeit meiner Familie gegenüber zum Ausdruck bringen, die mich in allem immer tatkräftig unterstützt hat und ohne deren Hilfe ich nicht diese Doktorarbeit, geschweige denn das Medizinstudium hätte durchführen können.