

Aus der Abteilung Neurodegeneration und Neurorestaurationsforschung
(Prof. Dr. med. J. B. Schulz)
im Zentrum Neurologische Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Einfluss des GDNF-Rezeptors RET auf die akute MPTP-Toxizität in der Maus

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Sebastian Kowsky
aus
Bremen

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

- I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. B. Schulz
- II. Berichterstatter/in: Priv.-Doz. Dr. med. D. Liebetanz
- III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. J. Staiger

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	I
1.1	<i>Das idiopathische Parkinson-Syndrom</i>	1
1.1.1	Mögliche Ursachen und Entstehung des IPS	2
1.1.2	Prävalenz und Inzidenz	3
1.1.3	Diagnostik.....	3
1.2	<i>Anatomie und Organisation der Basalganglien</i>	4
1.2.1	Neurotransmitter der Basalganglien	5
1.2.2	Physiologie der Basalganglien	6
1.2.3	Pathophysiologie der Basalganglien beim IPS	7
1.3	<i>Aktuelle Therapie des IPS</i>	10
1.4	<i>Experimentelles Modell zur Erforschung des IPS</i>	11
1.4.1	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP).....	12
1.4.2	Wirkung von MPTP auf die mitochondriale Atmungskette	13
1.4.3	MPTP und oxidativer Stress	13
1.5	<i>Neurotrophine</i>	14
1.5.1	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)</i>	14
1.5.2	Der GDNF-Rezeptor RET	15
1.6	<i>Zielsetzung der Arbeit</i>	16
2	Material und Methoden	18
2.1	<i>Versuchstiere</i>	18
2.1.1	Tierhaltung	18
2.1.2	Versuchsgruppen	18
2.2	<i>MPTP</i>	19
2.2.1	Herstellung der MPTP-Injektionslösung	19
2.2.2	MPTP-HCl-Injektion.....	19
2.3	<i>Gewebeaufarbeitung</i>	20
2.3.1	Gewebeentnahme	20
2.3.2	Gewebefixierung zur immunozytochemischen Aufarbeitung	21

2.3.3	Gewebeaufarbeitung des Striatums zur Bestimmung der Katecholamin- konzentrationen	22
2.4	<i>Bestimmung der Katecholaminkonzentrationen mittels HPLC</i>	22
2.4.1	MPP ⁺ -Messungen mittels HPLC.....	23
2.5	<i>Histologie und Immunzytochemie</i>	24
2.5.1	Gehirnschnitte	24
2.5.2	Objektträger.....	24
2.5.3	Tyrosinhydroxylase (TH)-Färbung der SNpc.....	25
2.5.4	Nissl-Färbung der SNpc	27
2.5.5	Stereologische Quantifizierung von TH- und Nissl-positiven Zellen der SNpc.....	29
2.5.6	Striatale TH-Färbung	30
2.6	<i>Optische Dichte und nigrostriatale Projektionen rostral der SNpc</i>	32
2.6.1	Bestimmung der optischen Dichte von TH-positiven Fasern des Striatums	32
2.6.2	Bestimmung der Anzahl und Fläche nigrostriatale Projektionen rostral der SNpc.....	33
2.7	<i>Statistik</i>	33
2.8	<i>Materialien</i>	34
2.8.1	Chemikalien.....	34
2.8.2	Antikörper	35
2.8.3	Puffer und Lösungen	35
2.8.4	Kits	37
2.8.5	Verbrauchsmaterial	37
2.8.6	Geräte	37
2.8.7	Programme.....	38
3	Ergebnisse	39
3.1	<i>Versuchstiere</i>	39
3.2	<i>Der Effekt von MPTP auf dopaminerge Neurone der SNpc</i>	39
3.2.1	Der Effekt von MPTP auf TH-positive Zellen der SNpc	39
3.2.2	Der Effekt von MPTP auf Nissl-positive Zellen der SNpc	41
3.2.3	Zusammenfassung	41

3.3	<i>Der Effekt von MPTP auf die optische Dichte des Striatums und auf die nigrostriatalen Projektionen rostral der SNpc</i>	42
3.3.1	Ergebnisse der optischen Dichte TH-positiver Fasern des Striatums..	42
3.3.2	Auswertung TH-positiver nigrostriataler Projektionen rostral der SNpc	44
3.3.3	Zusammenfassung	45
3.4	<i>Veränderungen der Katecholaminkonzentrationen nach MPTP-Behandlung</i>	46
3.4.1	Dopamin	46
3.4.2	DOPAC und HVA	46
3.4.3	Dopaminumsatz.....	48
3.4.4	Zusammenfassung	49
3.5	<i>MPTP-Metabolismus</i>	50
4	Diskussion	51
4.1	<i>RET-defiziente Mäuse zeigen kein Defizit in der Entwicklung von dopaminergen Neuronen</i>	51
4.2	<i>RET-defiziente Mäuse zeigen keine erhöhte MPTP-Toxizität</i>	52
4.3	<i>GDNF und der Rezeptor RET schützen nicht vor MPTP-induzierter Toxizität dopaminerger Neurone und ihrer striatalen Projektionen</i>	53
4.4	<i>Das MPTP-Modell</i>	56
4.5	<i>Klinische Studien mit GDNF</i>	56
4.6	<i>Axonales Sprouting nach MPTP-Injektion</i>	58
4.7	<i>Mögliche weitere Therapieoptionen des IPS</i>	58
5	Zusammenfassung	60
6	Abbildungsverzeichnis	62
7	Tabellenverzeichnis	63
8	Publikationen	64
9	Literaturverzeichnis	65

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
ARTN	Artemin
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>arbitrary units</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
CDNF	<i>Conserved dopamine neurotrophic factor</i>
COMT	Catecholamin-O-Methyltransferase
CPP	zellpenetrierendes Peptid
Cre	<i>Causes recombination protein</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAT	Dopamintransporter
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure
Dyn	Dynorphin
Enk	Enkephalin
GABA	γ -Aminobuttersäure
GDNF	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GFL	<i>GDNF-family ligands</i>
GFR α	<i>GDNF-family receptor-α</i>
GPe	Globus pallidus externus
GPI	Globus pallidus internus
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
HVA	Homovanillinsäure
i.p.	intraperitoneal
IPS	idiopathisches Parkinson-Syndrom
KG	Körpergewicht
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin

MANF	<i>Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor</i>
MAO-B	Monoaminoxidase-B
min	Minuten
MPP ⁺	1-Methyl-4-Phenylpyridinium
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
MPTP-HCl	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin-Hydrochlorid
MRT	Magnetresonanztomographie
MSN	<i>Medium-spiny-neurons</i>
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid (reduziert)
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NC	Nucleus caudatus
NCAM	<i>Neural cell adhesion molecule</i>
NGS	<i>Normal Goat Serum</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NRTN	Neurturin
NST	Nucleus subthalamicus
NTF	Neurotrophine
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PPN	Nucleus pedunculopontinus
PSPN	Persephin
Pu	Putamen
Ras-MAPK	<i>Ras-mitogen activated protein kinase</i>
RET	<i>Rearranged during transfection</i>
ROI	<i>Region of interest</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
s	Sekunden
SNpc	Substantia nigra pars compacta

SNr	Substantia nigra pars reticulata
SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>
SuP	Substanz P
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TH	Tyrosinhydroxylase
THS	Tiefe-Hirnstimulation
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UPDRS	<i>Unified Parkinson´s Disease Rating Scale</i>
VA	Nucleus ventralis anterior
VL	Nucleus ventralis lateralis
VMAT2	vesikulärer Monoamintransporter-2
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Das idiopathische Parkinson-Syndrom

Das bereits schon im Altertum bekannte Krankheitsbild der „Schüttellähmung“ wurde 1817 von dem Londoner Arzt James Parkinson detailliert beschrieben und später nach ihm benannt. In seinem Werk *„An Essay on the Shaking Palsy“* beschrieb er die klassischen Kernbestandteile der „Paralysis agitans“ und legte damit den Grundstein für die Definition des uns heute bekannten Krankheitsbildes des idiopathischen Parkinson-Syndroms (IPS).

Das IPS ist mit 75% die am häufigsten auftretende Form und wird auch als primäres Parkinson-Syndrom bezeichnet. Es kann sporadisch oder erblich auftreten. Neben dem IPS wird zwischen zwei weiteren Gruppen unterschieden: 1) das sekundäre Parkinson-Syndrom, das auf erkennbaren strukturellen, metabolischen oder toxischen Ursachen beruht und 2) das atypische Parkinson-Syndrom, welches im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen auftritt. Dazu zählen die Multisystematrophie, die progressive supranukleäre Blickparese, die kortikobasale Degeneration und die Demenz mit Lewy-Körpern. Diese Arbeit bezieht sich auf das IPS.

Beim IPS handelt es sich um eine chronisch progrediente neurodegenerative Erkrankung, die durch eine Degeneration von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra pars compacta (SNpc) charakterisiert ist. Die Erkrankung führt zu Störungen der willkürlichen und unwillkürlichen Motorik, mit den Kardinalsymptomen Akinese, Tremor, Rigor und posturale Instabilität. Diese Symptome können in unterschiedlichem Ausmaß auftreten. Der Untergang der Dopamin produzierenden Neurone findet vor allem im venterolateralen Bereich der SNpc statt (Fearnley und Lees 1991) und führt zu einer Verminderung von Dopamin in den striatalen Projektionen. Oft kommt es zur Ausbildung fakultativer Begleitsymptome. Diese können aus sensorischen Symptomen (Dysästhesien und Schmerzen), vegetativen Symptomen (Störungen von Blutdruck, Temperaturregulation, Harnblasenfunktion und sexuellen Funktionen) sowie psychischen Symptomen (z.B. Depressionen)

bestehen. Kognitive Symptome wie frontale Störungen und Demenz werden bei ca. 30-40% der Patienten beobachtet und steigen mit zunehmendem Alter (Mayeux et al. 1992).

1.1.1 Mögliche Ursachen und Entstehung des IPS

Wesentliches neuropathologisches Charakteristikum des IPS ist neben dem Untergang von dopaminergen Neuronen das Auftreten von intrazytoplasmatischen Lewy-Körpern. Diese eosinophilen Einschlüsse bestehen aus zahlreichen Lipiden und Proteinen, ihr Hauptbestandteil ist das fibrilläre α -Synuklein (Engelender et al. 1999; Gibb und Lees 1988; Spillantini et al. 1997). In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich die Lewy-Pathologie in einem typischen zeitlichen Muster im Gehirn ausbreitet, bei dem der Bulbus olfactorius und die Medulla oblongata vor der SNpc befallen werden (Braak et al. 2003). Zusätzlich treten diese im Locus coeruleus, Nucleus basalis Meynert sowie dem dorsalen Vagus Kern und Kortex auf (Gibb und Lees 1988).

Die Ausbildung eines IPS ist nach gegenwärtigem Forschungsstand die Folge eines Zusammenspiels aus genetischer Prädisposition und Umwelteinflüssen (Maher et al. 2002; Sveinbjornsdottir et al. 2000; Warner und Schapira 2003). In 5-10% der Fälle beruht die Ursache des IPS auf autosomal-dominant bzw. autosomal-rezessiv vererbten Genmutationen (Fahn und Sulzer 2004; Gasser 2005). Bisher wurden 13 genetische Mutationen (PARK1-13) identifiziert, unter denen fünf Mutationen eine eindeutige Assoziation mit der Erkrankung aufweisen (Thomas und Beal 2007). Mutationen für α -Synuklein (PARK1/PARK4) und für LRRK2 (PARK8) führen zu späten dominanten Parkinson-Syndromen (Singleton et al. 2003; Zimprich et al. 2004), während Mutationen von Parkin (PARK2), PINK1 (PARK6) und DJ-1 (PARK7) frühe rezessive Formen der Erkrankung hervorrufen (Thomas und Beal 2007).

Faktoren wie oxidativer Stress mit der Ausbildung von reaktiven Sauerstoffradikalen (*reactive oxygen species*, ROS), sowie inflammatorische Prozesse und mitochondriale Dysfunktion gelten als wesentliche Auslöser des IPS und unterhalten den Erkrankungsprozess (Jenner und Olanow 2006; Larkin 1999).

Weitere mögliche Pathomechanismen sind Exzitotoxizität, Apoptose, Proteinaggregation und Proteinfehlbildung (Dauer und Przedborski 2003; Olanow 2007; Schulz 2006; Tatton et al. 1998).

1.1.2 Prävalenz und Inzidenz

Das IPS ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach dem Morbus Alzheimer (Cummings 1999). Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr. Ein Erkrankungsbeginn vor dem 30. Lebensjahr ist selten.

Die Inzidenz des IPS wird in Europa mit ca. 16-19 : 100.000 Einwohnern pro Jahr angegeben (Twelves et al. 2003) und nimmt mit steigendem Alter zu. In einer US-Studie betrug die Inzidenz für das IPS ca. 10 : 100.000. Dabei kommt es zu einem kontinuierlichen Anstieg der Inzidenz in der Altersverteilung. Sie beträgt in der Gruppe der 30- bis 49- Jährigen ca. 1 : 100.000 und steigt in der Gruppe der 70- bis 79-Jährigen auf ca. 100 : 100.000 an (Bower et al. 1999). In der Gruppe der über 65-Jährigen beträgt die Prävalenz in Europa 1.800 : 100.000 und steigt bei den über 85-Jährigen auf 2.600 : 100.000 an (DeRijk et al. 2000).

1.1.3 Diagnostik

Der Hauptteil der Parkinsondiagnostik beruht auf anamnestischen und klinischen Diagnosekriterien (Hughes et al. 2001). Es ist vor allem in den Anfangsstadien der Erkrankung schwer, eine klinische Diagnose zu stellen. In mindestens 15% der Fälle entsprechen Patienten mit einem IPS nicht den klinischen Kriterien und werden fehldiagnostiziert (Schrag et al. 2002). Die klinischen Diagnosekriterien basieren auf den Kardinalsymptomen Akinese, Tremor, Rigor und posturale Instabilität (Sian et al. 1999). Kommt es zum Auftreten von Akinese und einem der drei weiteren Kardinalsymptome, gilt die Diagnose als klinisch gesichert (Gelb et al. 1999). Zudem wird das positive Ansprechen auf L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) als ein bestätigendes diagnostisches Kriterium gesehen. Der Krankheitsverlauf eines Patienten mit IPS wird über die *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (UPDRS)

beurteilt. Im L-DOPA-Test ist ein Anstieg von 30% im motorischen UPDRS-III-Score als positiv zu werten (Diener und Putzki 2008). Das IPS beginnt einseitig und/oder mit persistierender Asymmetrie im Krankheitsverlauf.

Bildgebende Verfahren wie die Magnetresonanztomographie (MRT), die *Single Photon Emission Computed Tomography* (SPECT) und das *Positron Emission Tomography* (PET) sind hilfreich, um Veränderungen im Stoffwechsel von IPS-Patienten darzustellen und es von anderen Parkinson-Syndromen abzugrenzen (Benamer et al. 2000; Schulz et al. 1994; Schulz et al. 1999; Schwarz et al. 1993; Varrone et al. 2001). Eine definitive Diagnose kann letztlich erst neuropathologisch gesichert werden.

1.2 Anatomie und Organisation der Basalganglien

Die motorischen Symptome des IPS werden durch den Dopaminmangel in den Basalganglien hervorgerufen. Die Kerne der Basalganglien sind anatomisch und funktionell zwischen dem Großhirnkortex und dem Thalamus lokalisiert. Sie bilden in Ihrer Einheit ein komplexes System, welches auf die Ausführung und Koordination der Bewegungsabläufe Einfluss nimmt.

Die Basalganglien bestehen beim Menschen aus dem Striatum, das sich aus dem Putamen (Pu) und dem Nucleus caudatus (NC) zusammensetzt, dem Globus pallidus (GP), der sich in ein externes (GPe) und ein internes (GPi) Segment unterteilt, der SNpc und Substantia nigra pars reticulata (SNr) sowie dem Nucleus subthalamicus (NST). Bei Nagern sind die beiden Strukturen NC und Pu nicht von einander abgrenzbar und werden zusammen als Striatum bezeichnet.

Bewegungsimpulse, die im Limbischen System entstehen, werden über den Assoziationskortex zum Kleinhirn und den Basalganglien weitergeleitet. Während das Kleinhirn an der Feinsteuerung der Motorik beteiligt ist, modulieren die Basalganglien die Amplitude von Bewegungen und bahnen bzw. unterdrücken Bewegungsimpulse. Diese motorischen Informationen laufen über ein direktes sowie indirektes Projektionssystem im Nucleus ventralis lateralis (VL) und Nucleus ventralis anterior (VA) des Thalamus zusammen und werden von dort an den Motorkortex weitergeleitet (Lang und Lozano 1998).

1.2.1 Neurotransmitter der Basalganglien

Neurotransmitter regulieren die Aktivität der einzelnen Basalganglienkerne. Dopamin kann rezeptorspezifisch sowohl exzitatorisch als auch inhibitorisch wirken. Glutamat wirkt exzitatorisch, γ -Aminobuttersäure (GABA) inhibitorisch. Enkephalin (Enk), Substanz P (SuP) und Dynorphin (Dyn) sind Neuropeptide, die als Kotransmitter GABA-erger Neurone fungieren (Alexander und Crutcher 1990; Obeso et al. 2000). Acetylcholin (ACh) fungiert als Transmitter von striatalen Interneuronen und nimmt modulierenden Einfluss auf die „*Medium-spiny-neurons*“ (MSN) des Striatums (Kawaguchi et al. 1995; Zhou et al. 2002).

Dopamin ist der vorherrschende Neurotransmitter des nigrostriatalen Systems. Es entstammt der Katecholaminbiosynthese und wird über mehrere Vorstufen aus der Aminosäure Phenylalanin gebildet. In der Leber erfolgt die Umsetzung von Phenylalanin zu L-Tyrosin, welches anschließend durch die dopaminergen Neurone aufgenommen wird. Dort erfolgt die Umwandlung durch das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) zu L-DOPA. L-DOPA wird wiederum durch die DOPA-Decarboxylase in Dopamin umgewandelt. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in dieser Synthesekette wird durch die TH vermittelt. Anschließend wird Dopamin über den vesikulären Monoamintransporter-2 (VMAT2) in die Speichervesikel der nigralen Neurone aufgenommen (Riddle et al. 2005).

Durch Eintreffen eines entsprechenden Nervenimpulses erfolgt die exozytotische Freisetzung des Dopamins in den synaptischen Spalt. Die Stimulation präsynaptischer Rezeptoren moduliert die Neurotransmitter-Freisetzung. Im Striatum übt Dopamin seine Wirkung über postsynaptische D1- und D2-Rezeptoren aus (Kebabian und Calne 1979). Dabei bewirkt die Stimulation von D1-Rezeptoren eine Aktivierung und die Stimulation von D2-Rezeptoren eine Hemmung der nachgeschalteten Nervenzelle (Cepeda et al. 1993; Gerfen et al. 1990).

Im Anschluss erfolgt die Beendigung der Dopaminwirkung durch Wiederaufnahme (*Re-uptake*) und enzymatischen Abbau. Die präsynaptische Wiederaufnahme in die dopaminergen Neurone erfolgt über den Dopamintransporter (DAT). Der Abbau des Dopamins erfolgt durch die Enzyme Monoaminoxidase-B (MAO-B) und Catecholamin-O-Methyltransferase (COMT). Dabei entstehen über Zwischenstufen die Dopamin-Metabolite 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC) und Homovanillinsäure (HVA).

1.2.2 Physiologie der Basalganglien

Die wichtigste Eingangsstruktur (*Input-Region*) der Basalganglien ist das Striatum. Die Aktivität wird durch dopaminerge Impulse der SNpc moduliert (Abb. 1). Zudem erhält das Striatum zahlreiche glutamaterge Afferenzen von ausgedehnten Arealen des Kortex. Diese sind der prämotorische- und supplementär-motorische Kortex, der primär-motorische Kortex und der Assoziationskortex. Afferenzen von Thalamuskernen werden bahnbrechende Funktionen zugeschrieben (Alexander und Crutcher 1990). Die inhibitorischen, GABA-ergen MSN machen etwa 95% der striatalen Neurone aus. Ihnen stehen ca. 2% cholinerge Interneurone gegenüber (Smith und Bolam 1990). Es können zwei Subpopulationen der MSN unterschieden werden. Die erste Neuronenpopulation stellt den Anfang des direkten Projektionssystems dar und exprimiert GABA, SuP und Dyn. Diese monosynaptische Projektion wirkt inhibitorisch auf die Ausgangskerne der Basalganglien, GPi und SNr. Der Anfang des indirekten Projektionssystems wird über die zweite Subpopulation der MSN gebildet. Diese exprimieren GABA sowie Enk und projizieren zum GPe, dessen GABA-erge Neurone zum NST projizieren. Das indirekte Projektionssystem wirkt somit über den NST glutamaterg exzitatorisch auf den GPi und die SNr. GPi und SNr stellen die *Output-Region* der Basalganglien dar. Sie besitzen eine tonische Daueraktivität, welche durch das direkte Projektionssystem herabgesetzt und durch das indirekte gesteigert wird. Der GPi und die SNr projizieren GABA-erg zu den intralaminären Thalamuskernen, insbesondere zum VL und VA sowie zum Nucleus pedunculo-pontinus (PPN) und zum Colliculus superior. Von dem VL und VA aus erfolgt die glutamaterge und somit exzitatorische Projektion zum Motorkortex (Alexander und Crutcher 1990; DeLong 1990; Joel und Weiner 1997; Lang und Lozano 1998; Schiel 2004).

Aus der SNpc projizieren dopaminerge Neurone über das mediale Vorderhirnbündel in das Striatum und enden an den MSN und an Interneuronen. Im direkten Projektionssystem wird die dopaminerge Wirkung über D1-Rezeptoren (aktivierend) vermittelt, im indirekten Projektionssystem über D2-Rezeptoren (inhibierend). Die Rolle der dopaminergen Projektionen besteht im Erhalt eines Gleichgewichtes zwischen den antagonistischen Einflüssen des direkten und indirekten Projektionssystems.

Zusammenfassend fördert das direkte Projektionssystem motorische Funktionen während das indirekte Projektionssystem diese hemmt (Schiel 2004).

1.2.3 Pathophysiologie der Basalganglien beim IPS

Durch die striatale Dopaminverarmung kommt es im direkten Projektionssystem zu einer abgeschwächten D1-vermittelten Inhibition des GPi. Gleichzeitig kommt es im indirekten Projektionssystem zu einer verminderten Inhibition des GPe, der dadurch seinen ebenfalls inhibitorischen Effekt auf den NST verliert. Es folgt somit eine verstärkte Aktivierung des GPi und der SNr durch den NST (Bergman et al. 1990; Wichmann et al. 1994). Das Resultat ist eine Inhibition des Thalamus und eine verminderte thalamokortikale Aktivierung (Abb. 2). Die vermehrte Hemmung des Hirnstamms wird vor allem für die Ausbildung von Symptomen, die sich auf Körperhaltung und Gang auswirken, verantwortlich gemacht (Lang und Lozano 1998; Wichmann und DeLong 1993).

Zur klinischen Manifestation des IPS kommt es bei einer Degeneration von ca. 50% der dopaminergen Neurone in der SNpc bzw. einer Verminderung des Dopamingehalts von 70-80% im Striatum (Bernheimer et al. 1973). Die im Vergleich zur Neuropathologie späten Funktionseinbußen werden damit erklärt, dass einerseits der striatale Dopaminumsatz als Zeichen eines präsynaptischen Kompensationsmechanismus zunimmt und andererseits die postsynaptische Dopaminrezeptordichte und Dopaminrezeptorensensitivität ansteigt (Hefti et al. 1980; Rinne et al. 1990; Rinne et al. 1993).

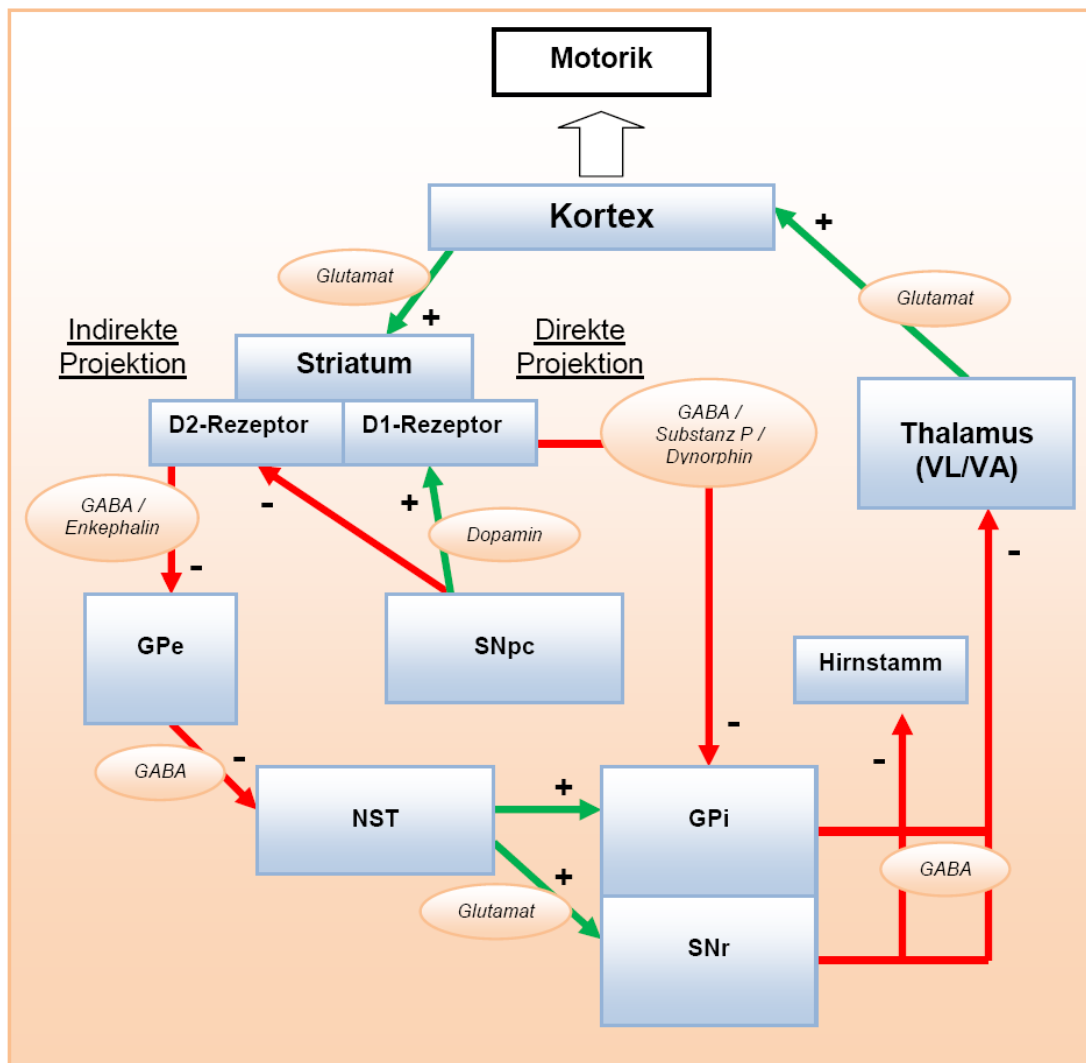


Abb. 1 Modifizierte Darstellung der Basalganglien nach Lang und Lozano (1998), S.1132

Die Abbildung zeigt den Regelkreis der Basalganglien bei Personen mit einer normalen motorischen Funktion.

Eingangsstruktur der Basalganglien ist das Striatum, welches zahlreiche Afferenzen von ausgedehnten Arealen des Kortex erhält. Vom Striatum ziehen inhibitorische Fasern des direkten Projektionsweges zum Globus pallidus internus (GPI) und der Substantia nigra pars reticulata (SNr). Striatale Fasern des indirekten Projektionssystems wirken inhibitorisch auf den Globus pallidus externus (GPe), der wiederum hemmenden Einfluss auf den Nucleus subthalamicus (NST) hat. Dieser sendet exzitatorische Efferenzen zu den Ausgangskernen der Basalganglien GPI und SNr, welche wiederum hauptsächlich hemmenden Einfluss auf den venterolateralen und venteroanterioren Anteil des Thalamus sowie den Hirnstamm ausüben. Weitere Efferenzen wie z.B. der Nucleus pedunculopontius (PPN) sind nicht abgebildet. Exzitatorische thalamokortikale Efferenzen zu motorischen Kortexarealen werden somit beeinflusst. Dopamin wirkt modulierend auf das Striatum über den D1-Rezeptor (exzitatorisch) und den D2-Rezeptor (inhibitorisch).

Grüne Pfeile symbolisieren exzitatorische Wege und inhibitorische Wege werden mit roten Pfeilen abgebildet. Rund umrandete Substanzen bezeichnen die Neurotransmitter und deren Neuropeptide.

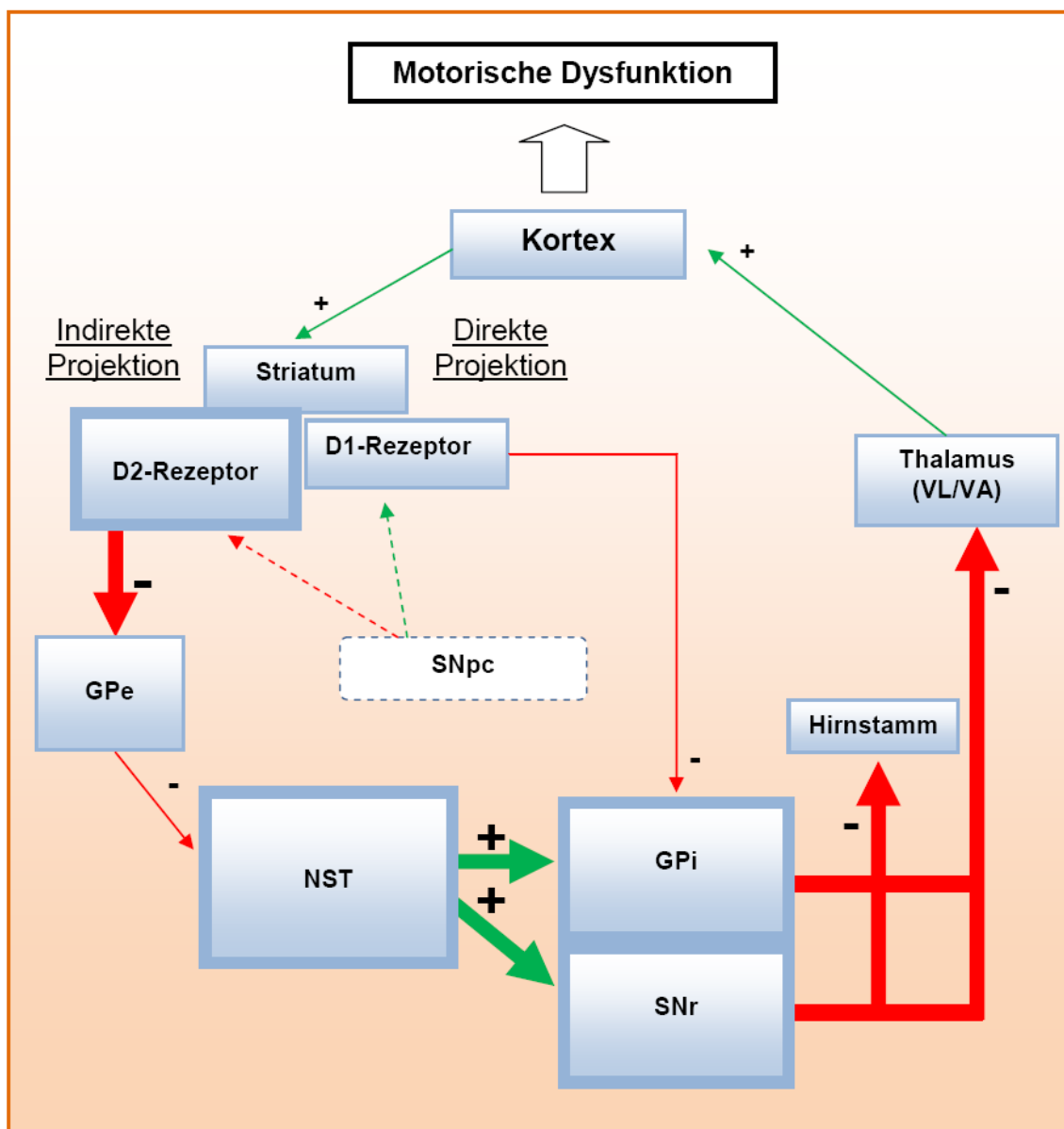


Abb. 2 Modifizierte Darstellung der Basalganglien beim IPS nach Lang und Lozano (1998), S.1132

Die Abbildung zeigt den veränderten Regelkreis der Basalganglien bei Patienten mit IPS. Dabei kommt es zu einem Verlust von dopaminergen Neuronen der SNpc und einem Mangel des Neurotransmitters Dopamin. Es folgt ein Ungleichgewicht zwischen der verminderten Hemmung des Globus pallidus internus (GPi) und der Substantia nigra pars reticulata (SNr) durch das direkte Projektionssystem und der gesteigerten Aktivität des Nucleus subthalamicus (NST) auf den GPi und die SNr im indirekten Projektionssystem. Das Resultat ist eine verminderte thalamokortikale Aktivierung, bedingt durch die Überaktivität der Hemmung vom GPi und SNr auf den Thalamus und Hirnstamm. Es kommt zur Ausbildung der typischen Symptome Akinese, Tremor, Rigor und posturale Instabilität.

Grüne Pfeile symbolisieren exzitatorische Wege und inhibitorische Wege werden mit roten Pfeilen abgebildet. Die Breite der Pfeile steht für die allgemeine Aktivität der einzelnen Verknüpfungen. Die Rahmengröße der einzelnen Hirnregionen steht für die Aktivität dieser Region im Vergleich zur normalen Funktion (Abb. 1).

1.3 Aktuelle Therapie des IPS

Die derzeitige Therapie des IPS beschränkt sich auf die Behandlung der Symptome und die Aufrechterhaltung einer weitgehend normalen physiologischen Funktion. Ein wichtiger Stützpfeiler dieser Therapie ist die Substitution von L-DOPA, welches die Blut-Hirn-Schranke passieren kann. Die Ergänzung dieses Medikaments durch einen peripher wirksamen Decarboxylasehemmer (Benserazid oder Carbidopa) verhindert den peripheren Abbau des L-DOPA. L-DOPA wird nach Aufnahme in die dopaminergen Neurone von der DOPA-Decarboxylase zu Dopamin umgewandelt und kann dem entstandenen Mangel entgegenwirken (Cotzias et al. 1969; Fahn et al. 2004). Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer verringerten Wirkung und Wirkdauer des L-DOPA. Dabei ist entscheidend, dass sich die neurodegenerativen Prozesse vor allem präsynaptisch abspielen. Postsynaptisch bleibt die Rezeptordichte und Sensibilität zunächst erhalten. Erst im Verlauf der Erkrankung kommt es auch dort zu funktionellen Veränderungen, so dass ein Wirkverlust von L-DOPA auftritt (Bravi et al. 1994). Dadurch nimmt der Substitutionsbedarf überproportional zu (Fahn 1999; Rascol et al. 2002) und unerwünschte zentrale sowie periphere Nebenwirkungen steigen an (Javoy-Agid und Agid 1980; Rascol et al. 2003; Thanvi und Lo 2004).

Eine weitere Therapieoption sind Dopaminagonisten (z.B. Bromcriptin). Bei Patienten unter 70 Jahren ohne wesentliche Komorbidität sollte die Therapie mit einem Dopaminagonisten begonnen werden (Oertel et al. 2006). Durch die Kombination von Dopaminagonisten mit L-DOPA kann L-DOPA gespart und das Auftreten von Wirkungsfluktuationen verzögert werden (Diener und Putzki 2008).

MAO-B- und COMT-Inhibitoren verhindern den enzymatischen Abbau von Dopamin und verlängern die Wirkungszeit des Dopamins im synaptischen Spalt und an postsynaptischen Rezeptoren. Hierzu zählen MAO-B-Inhibitoren wie das Selegilin oder Rasagilin, die den oxidativen Abbau von Dopamin blockieren. Dies führt zu einer verminderten Bildung von freien Radikalen. Aufgrund der schwachen Wirksamkeit von Selegilin als Monotherapie (Elizan et al. 1989) wird es vor allem in Kombination mit L-DOPA eingesetzt und verstärkt dessen Wirkung (Gerlach et al. 1996). Hierdurch kann in der Kombinationstherapie bei 50 % der Patienten eine Dosisreduktion von L-DOPA um 10% bis 15% erreicht werden, ohne dass es zu einer Verschlechterung der motorischen Symptome kommt (Heinonen und Rinne

1989). COMT-Inhibitoren (z.B. Entacapon und Tolcapon) sind in Kombination mit L-DOPA bei einem Vorliegen von motorischen Wirkungsfluktuationen zugelassen. In den meisten Fällen kann somit eine L-DOPA-Reduktion von 20% erreicht werden (Merello et al. 1994; Myllyla et al. 2001; Ruottinen und Rinne 1996).

Anticholinergika (z.B. Biperiden und Bornaprin) führen zu einer Blockade von striatalen Muskarinrezeptoren und wirken hemmend auf das Überwiegen des cholinergen Einflusses der Basalganglien beim IPS. Sie greifen regulierend in ein Ungleichgewicht zwischen den Neurotransmittern ACh und Dopamin ein. Trotz fehlender kontrollierter Studien sind Anticholinergika insbesondere bei vorherrschendem Ruhetremor als klinisch nützlich einzustufen (Diener und Putzki 2008). Bei dieser Substanzklasse kommt es jedoch oft zu unangenehmen peripheren und zentralen Nebenwirkungen (Brocks 1999).

Amantadin ist ein nicht-kompetitiver Hemmer des N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptors an Glutamat-gesteuerten Ionenkanälen der Basalganglien (Kornhuber und Weller 1997). Amantadin kann bei sehr geringen Symptomen und bei L-DOPA-assoziierten Dyskinesien eingesetzt werden (Crosby 2003).

Die funktionelle Tiefe-Hirnstimulation (THS) kommt überwiegend bei Patienten zum tragen, die an einem starken Tremor oder komplizierten L-DOPA-induzierten Spätsymptomen leiden (Volkman 2004).

Hoffnungen beruhen auf der Entwicklung neuroprotektiver Therapien. Bis heute gibt es jedoch keine Therapie, die der Degeneration von dopaminergen Neuronen überzeugend entgegenwirkt.

1.4 Experimentelles Modell zur Erforschung des IPS

Tierexperimentelle Untersuchungen spielen im Bereich der IPS-Forschung eine große Rolle. Diese ermöglichen die pathologischen Prozesse des IPS darzustellen und tragen zur Entwicklung neuer Therapieoptionen bei. Das Toxin 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP) führt beim Menschen und im Tierexperiment zu einem selektiven Untergang der dopaminergen Neurone und vereint dadurch eine Vielzahl der pathologischen Vorgänge des IPS.

1.4.1 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP)

Anfang der achtziger Jahre kam es in den USA bei jungen Drogenabhängigen nach einer intravenösen Injektion eines mit MPTP verunreinigten Heroin-Analogons zu ausgeprägten Parkinson-Symptomen (Langston et al. 1983). Diese Symptome zeigten ein gutes Ansprechen auf eine L-DOPA Therapie (Langston und Ballard 1984). In post-mortem-Untersuchungen zeigte sich eine Degeneration von dopaminergen Neuronen in der SNpc (Langston et al. 1999) sowie ein Verlust von Dopamin und seiner Metabolite in den nigrostriatalen Projektionen (Heikkila et al. 1985).

Die Entdeckung und Anwendung des Neurotoxins MPTP gilt bisher als eines der besten und wichtigsten tierexperimentellen Instrumente zur Auslösung des IPS (Bloem et al. 1990; Dauer und Przedborski 2003; Heikkila et al. 1985; Przedborski und Jackson-Lewis 1998; Przedborski et al. 2000; Przedborski und Vila 2003; Schulz und Falkenburger 2004). Ähnlich wie beim IPS des Menschen kommt es bei Primaten nach MPTP-Behandlung zu einem Verlust der dopaminergen Neurone in der SNpc (Varastet et al. 1994). Zusätzlich können sämtliche klinische Symptome des IPS beobachtet werden (Bloem et al. 1990; Burns et al. 1983; Markey et al. 1984). Es kommt nach systemischer MPTP-Injektion bei Primaten zur Ausbildung von neuronalen Einschlusskörperchen, welche Lewy-Körpern ähneln (Beal 2001; Forno et al. 1993; Kowall et al. 2000). MPTP-Versuche mit Mäusen zeigen im Gegensatz zu Primaten kaum klinische Symptome (Beal 2001). Es kommt jedoch ebenso zum dopaminergen Zellverlust der SNpc, vergleichbar dem IPS des Menschen (German et al. 1996). Die höchste Sensitivität und Toxizität unter den Mäusen zeigen Tiere des C57BL/6-Stammes und werden deshalb gewöhnlich bei tierexperimentellen Untersuchungen mit MPTP und in dieser Arbeit eingesetzt. Zudem wurde ein altersabhängiger Unterschied in der Neurotoxizität beobachtet, bei dem ältere Mäuse empfindlicher auf MPTP reagieren als jüngere Tiere (Sugama et al. 2003).

Das MPTP-Modell hat im Wesentlichen dazu beigetragen, den Untergang von dopaminergen Neuronen und Therapieansätze zu erforschen.

1.4.2 Wirkung von MPTP auf die mitochondriale Atmungskette

MPTP ist eine lipophile Substanz. Diese Eigenschaft erleichtert die Passage der Blut-Hirn-Schranke und zellulärer Membranen (Markey et al. 1984; O'Callaghan et al. 1990). Nach der Aufnahme von MPTP kommt es in den Astrozyten durch die MAO-B zur Umwandlung des MPTP in seinen aktiven Metaboliten 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (MPP^+) (Marini et al. 1992; Ransom et al. 1987; Salach et al. 1984; Singer et al. 1986). Der aktive und toxische Metabolit MPP^+ wird von Gliazellen freigesetzt (Russ et al. 1996) und über den DAT in die dopaminergen Neurone aufgenommen (Javitch et al. 1985; Mayer et al. 1986). Dort inhibiert MPP^+ spezifisch die NADH-Ubichinon-Reduktase (Komplex-I) der mitochondrialen Atmungskette (Cleeter et al. 1992; Nicklas et al. 1987; Ramsay et al. 1991). Es kommt zu einer Hemmung der Zellatmung mit verminderter Synthese von Adenosintriphosphat (ATP). Dieser Mangel wird für den neurotoxischen Effekt von MPTP und die Generierung von ROS verantwortlich gemacht (Chan et al. 1991; Cosi und Marien 1998; Scotcher et al. 1990).

1.4.3 MPTP und oxidativer Stress

Als oxidativer Stress wird eine Stoffwechsellage bezeichnet, bei der es zu einer vermehrten Ausbildung von ROS kommt. ROS entstehen z.B. im Rahmen von physiologischen Stoffwechselfvorgängen der mitochondrialen Atmungskette (Rossetti et al. 1988). Untersuchungen an Gehirnen von Parkinson-Patienten post-mortem belegen einen Zusammenhang zwischen der Schädigung des mitochondrialen Komplex-I und oxidativem Stress (Bindoff et al. 1989; Janetzky et al. 1994; Schapira et al. 1990) mit einem Anstieg von ROS im Nervengewebe (Fahn und Cohen 1992).

MPTP führt zu oxidativem Stress und der damit verbundenen Degeneration dopaminergener Neurone in der SNpc (Pennathur et al. 1999). Neben einem Mangel an ATP wird dieser Vorgang möglicherweise durch eine MPP^+ bedingte massive Freisetzung von Dopamin aus den Vesikeln der Nervenendigungen unterstützt (Chiueh und Rauhala 1998). Das freigesetzte Dopamin wird im synaptischen Spalt enzymatisch und nicht-enzymatisch metabolisiert und setzt dabei weitere Radikale frei (Johnson 1988). Dies führt zu destruktiven Schäden an der

Desoxyribonukleinsäure (DNS) sowie zu Zellfunktionsstörungen bis hin zum Zelltod (Bowling und Beal 1995; Dexter et al. 1994; Schulz et al. 2000; Yoritaka et al. 1996). Weiter gibt es Hinweise, dass apoptotische Vorgänge, vermittelt durch Bax, c-Jun-N-terminale Kinase und p53, an der Toxizität des MPTP beteiligt sind (Eberhardt und Schulz 2003; Hartmann et al. 2000; Przedborski und Vila 2003; Saporito et al. 1999; Saporito et al. 2000; Trimmer et al. 1996; Vila et al. 2001).

1.5 Neurotrophine

Neurotrophine (NTF) sind Komponenten eines komplexen Signalnetzwerkes, die insbesondere für die Entwicklung und das Überleben des Nervensystems von Bedeutung sind (Kriegelstein 2004; Levi-Montalcini 1987).

Während der Entwicklung werden zunächst zu viele Neurone produziert. Neurotrophe Faktoren regulieren die Anzahl durch einen ontogenetisch programmierten Zelltod (Andressoo und Saarma 2008). Welche genaue Rolle die NTF bei der Entwicklung von dopaminergen Neuronen spielen bleibt nicht vollständig geklärt. Die ihnen zugeschriebenen neuroprotektive Eigenschaften sind in den Fokus der Forschung gerückt.

1.5.1 *Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)*

GDNF wurde anfangs beschrieben als ein neurotropher Faktor, der am Überleben und an der Ausdifferenzierung von dopaminergen Neuronen beteiligt ist (Lin et al. 1993). GDNF und drei weitere neurotrophe Faktoren: Neurturin (NRTN), Artemin (ARTN) und Persephin (PSPN) gehören zu den *GDNF-family ligands* (GFL). GFL wirken über eine RET (*Rearranged during transfection*)-Tyrosinkinase durch die primäre Bindung am Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-vermittelten *GDNF-family receptor- α* (GFR α 1-4) (Airaksinen und Saarma 2002; Baloh et al. 2000; Sariola und Saarma 2003).

Es wurde beobachtet, dass GDNF am Überleben von Motorneuronen, noradrenergen Neuronen, sensorischen sowie autonomen Neuronen beteiligt ist (Arenas et al. 1995; Henderson et al. 1994; Trupp et al. 1995). *In vitro* gilt GDNF als

Überlebensfaktor für mesenzephalen dopaminerge Neurone und schützt diese vor toxischen Einflüssen (Krieglstein 2004).

GDNF wurde schnell zum Gegenstand von neuen Therapiestrategien des IPS und genießt seitdem eine große Aufmerksamkeit (Kirik et al. 2004). Versuche mit 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) und Axotomie-induziertem Verlust dopaminerger Neurone zeigten eindeutige neuroprotektive Effekte nach GDNF-Applikation (Akerud et al. 2001; Beck et al. 1995; Bilang-Bleuel et al. 1997; Choi-Lundberg et al. 1997). Versuche an Nagern und Primaten zeigten, dass GDNF zu einer Protektion von dopaminergen Neuronen, einer Verbesserung der motorischen Funktionen und zu einer Regeneration der striatalen Faserdichte bei MPTP-Gabe führte (Gash et al. 1996; Kordower et al. 2000; Schober et al. 2007; Tomac et al. 1995).

Hingegen zeigten Versuche mit adenoviral vermittelter Freisetzung von GDNF im Striatum und anschließender MPTP-Gabe keinen protektiven Effekt (Eberhardt et al. 2000). Die Kombination von GDNF mit einem zellpenetrierenden Peptid (CPP) im MPTP-Mausmodell führte ebenfalls zu keiner Neuroprotektion dopaminerger Neurone (Dietz et al. 2006).

Erste klinische Untersuchungen mit intraputaminale GDNF-Infusion an IPS-erkrankten Patienten führten zu deutlichen klinischen Verbesserungen (Gill et al. 2003; Slevin et al. 2005). Eine randomisierte Doppelblind-Studie an IPS-erkrankten Patienten zeigte jedoch in der Auswertung keine signifikante motorische Verbesserung der UPDRS und wurde teilweise bei einigen Patienten aufgrund von Komplikationen abgebrochen (Lang et al. 2006). Eine mehrfache intraventrikuläre Verabreichung von GDNF führte zur Verschlechterung eines an IPS-erkrankten Patienten und rief schwere Nebenwirkungen hervor (Kordower et al. 1999).

1.5.2 Der GDNF-Rezeptor RET

Im Jahre 1996 wurde der transmembrane Tyrosinkinase-Rezeptor RET erstmals als Rezeptor für GDNF identifiziert (Durbec et al. 1996; Trupp et al. 1996). Die einzelnen GFR α 1-4 wirken als Ko-Rezeptoren der GFL und besitzen unterschiedliche Ligandenspezifität (Airaksinen und Saarma 2002; Baloh et al. 2000). GDNF bindet zuerst an der GFR α 1-Untereinheit und aktiviert dadurch die RET gebundene Tyrosinkinase (Airaksinen und Saarma 2002). Es folgt eine Aktivierung

unterschiedlicher intrazellulärer Signalkaskaden, die an Überleben, Proliferation und Differenzierung der Zelle beteiligt sind. Die Signalwege Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), die *Ras-mitogen activated protein kinase* (Ras-MAPK) sowie die Tyrosinkinase-Src werden diskutiert, am Überleben und Neuritenwachstum von Neuronen beteiligt zu sein (Airaksinen und Saarma 2002; Kaplan und Miller 2000). Der GFR α 1-Ko-Rezeptor ist selbst in einigen Regionen des Nervensystems exprimiert, in denen kein RET detektiert werden konnte. Daher ist anzunehmen, dass GFR α 1 auch mit anderen Rezeptoren interagieren kann und der Signalweg komplexer ist als bisher angenommen (Airaksinen und Saarma 2002; Sariola und Saarma 2003).

Mäuse mit einem kompletten Mangel an RET, GDNF oder GFR α 1 sterben kurz nach der Geburt infolge von Nierenfehlbildung und einem Verlust an enterischen und parasymphathischen Neuronen (Airaksinen und Saarma 2002). In Versuchen mit selektiver Defizienz für RET und GFR α 1 in spezifischen Zellpopulationen war es schließlich möglich, ein postnatales Überleben zu erreichen (Baudet et al. 2008; Jain et al. 2006; Kramer et al. 2007; Kramer et al. 2006). In zwei Studien mit einer RET-Deletion in dopaminergen Neuronen konnte eine normale Entwicklung und Ausbildung des nigrostriatalen Systems beobachtet werden (Jain et al. 2006; Kramer et al. 2007). Während bei Jain et al. kein Neuronenverlust bis zu einem Lebensalter von 12 Monaten festgestellt werden konnte, kam es bei Kramer et al. zu einem progressiven Verlust von dopaminergen Neuronen und ihrer TH-positiven Projektionen ab einer Überlebenszeit von 12 Monaten.

Obwohl GDNF ursprünglich als Überlebensfaktor für dopaminerge Neurone während der Entwicklung beschrieben wurde, zeigten diese Analysen mit RET-defizienten-Mäusen, dass GFR α 1/RET nicht essentiell für die Entwicklung von dopaminergen Neuronen ist. Dies illustriert das komplexe Netzwerk an Regulations- und Kompensationsmechanismen, die an der Modulation und Entwicklung des neuronalen Systems beteiligt sind.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das IPS ist durch das steigende Alter unserer Bevölkerung eine häufige Erkrankung. Die Therapieoptionen sind bislang symptomatisch und wirken nur initial. Es ist

deshalb wichtig, nach kausalen Therapiemethoden zu suchen, die der Degeneration von dopaminergen Neuronen entgegenwirken bzw. zur Regeneration beitragen. Es besteht daher ein Bedarf an experimentellen Modellen mit induziertem Zelltod dopaminergener Neurone. Die Verwendung des Neurotoxins MPTP gilt als eines der wichtigsten neurotoxischen Modelle zur Auslösung des IPS.

NTF können zukünftige Therapieoptionen darstellen, um das Absterben von dopaminergen Neuronen zu verhindern und das Wiederauswachsen von Projektionsbahnen zu fördern. GDNF ist auf diesem Hintergrund Gegenstand vieler Untersuchungen und Diskussionen. In präklinischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des RET-Rezeptors durch GDNF einen wichtigen Bestandteil in der Differenzierung und dem Überleben von dopaminergen Neuronen darstellt. Klinische Untersuchungen mit GDNF-Applikation an Parkinson-erkrankten Patienten führten zu kontroversen Ergebnissen. Es konnte bisher nicht ausreichend geklärt werden, ob und wie weit es sich bei den durch GDNF modulierten Zellfunktionen um einen neuroprotektiven Effekt handelt. Weiterhin bleibt unklar, welche Rolle der GDNF-Rezeptor RET bei dem Überleben von dopaminergen Neuronen spielt.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die selektive Ablation des RET-Rezeptors in dopaminergen Neuronen eine MPTP-induzierte Degeneration dieser Neurone und ihrer striatalen Projektionen verändert. Da Tiere mit einem kompletten Verlust an RET nicht lebensfähig sind, wurden in dieser Arbeit Mäuse mit einer selektiven RET-Defizienz in dopaminergen Neuronen verwendet. Hierzu wurden Mäuse mit geflochtenen Allelen für RET mit einer Mauslinie verkreuzt, die die Cre (*Causes recombination protein*)-Rekombinase unter Kontrolle des DAT-Promotors exprimierten. Die Nachkommen weisen somit eine gewebespezifische Deletion des RET-Rezeptors in dopaminergen Neuronen auf.

Für diese Arbeit wurde das MPTP-Mausmodell gewählt. Hierfür wurden die Versuchstiere an fünf aufeinanderfolgenden Tagen mit MPTP behandelt und anschließend nach 14 Tagen getötet. Post mortem wurde der Einfluss des GDNF-Rezeptors RET auf die akute MPTP-Toxizität in der Maus, durch die Quantifizierung dopaminergener Neurone, nigrostriataler Projektionen und Katecholamin-konzentrationen im Striatum, untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Alle Versuchstiere basierten auf einem C57BL/6-Hintergrund, waren männlich und 12 bis 16 Wochen alt.

Um eine selektive Deletion des RET-Rezeptors in dopaminergen Neuronen der SNpc zu erreichen, wurden Mäuse mit einem geflochtenen Allel für RET (RET^{lx}) mit einer Mauslinie verkreuzt, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des DAT-Promotors exprimierten (DAT-Cre). Das Resultat war eine gewebespezifische Deletion des RET-Rezeptors ($DAT-RET^{lx/lx}$) in dopaminergen Neuronen (Kramer et al. 2007; Kramer et al. 2006). Alle $DAT-RET^{lx/lx}$ waren fruchtbar und lebensfähig. Als Kontrollen dienten DAT-Cre- und RET^{lx} -Mäuse.

2.1.1 Tierhaltung

Die Haltung der Mäuse erfolgte in Tierkäfigen mit je 4-5 Tieren einer Versuchsgruppe. Wasser und Futter standen ad libitum zur Verfügung. Die Umgebungstemperatur betrug konstant 25°C ($\pm 1.0^\circ\text{C}$), die Luftfeuchtigkeit lag bei 60% ($\pm 5\%$). Der Tag-Nacht-Zyklus wurde in zwölfstündigen Intervallen (Helligkeitsphase von 6.00 Uhr bis 18.00 Uhr) durch ein Lichtprogramm geregelt. Die durchgeführten Tierversuche waren von dem Regierungspräsidium Braunschweig (Aktenzeichen: 33.42502/01-15.05) genehmigt.

2.1.2 Versuchsgruppen

Die Versuchstiere wurden innerhalb ihres Genotyps $DAT-RET^{lx/lx}$, DAT-Cre und RET^{lx} in eine mit Natriumchlorid (NaCl)- und eine MPTP-behandelte Versuchsgruppe eingeteilt. Es wurden 4-7 Versuchstiere pro Gruppe verwendet. Die entsprechenden

Genotypen waren nicht erkennbar. Zur späteren Auswertung waren die Tiere mit nummerierten Ohrmarkierungen gekennzeichnet. Die jeweiligen Käfige wurden entsprechend mit NaCl oder MPTP gekennzeichnet.

2.2 MPTP

2.2.1 Herstellung der MPTP-Injektionslösung

Material: MPTP-HCl (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin-Hydrochlorid)

Herstellung: Die Herstellung der MPTP-HCl-Injektionslösung erfolgte unter strengen Sicherheitsvorkehrungen (Abzug, Schutzkleidung und Atemmaske) (Przedborski et al. 2001). Das Trockenpulver wurde bei 4°C gelagert. Zur Injektion wurde eine freie Basen-Konzentration von 30 mg/kg Körpergewicht (KG) angesetzt. Nach Berechnung der anteiligen freien Base, wurden 100 mg MPTP mit 27,55 ml 0.9% NaCl verdünnt. Die Herstellung erfolgte an jedem Injektionstag neu.

2.2.2 MPTP-HCl-Injektion

Versuchsprinzip: Die Injektion erfolgte an fünf aufeinander folgenden Tagen, in einem 24-Stunden-Intervall (Abb. 3). Die Injektion erfolgte ebenfalls unter strengen Sicherheitsvorkehrungen (Abzug, Schutzkleidung und Atemmaske) (Przedborski et al. 2001). Die Tiere wurden vor jeder Injektion gewogen und mit 30 mg/kg MPTP injiziert. Die Injektion der NaCl-Mäuse erfolgte jeweils am gleichen Tag mit einem äquivalenten Volumen 0,9% NaCl-Lösung.

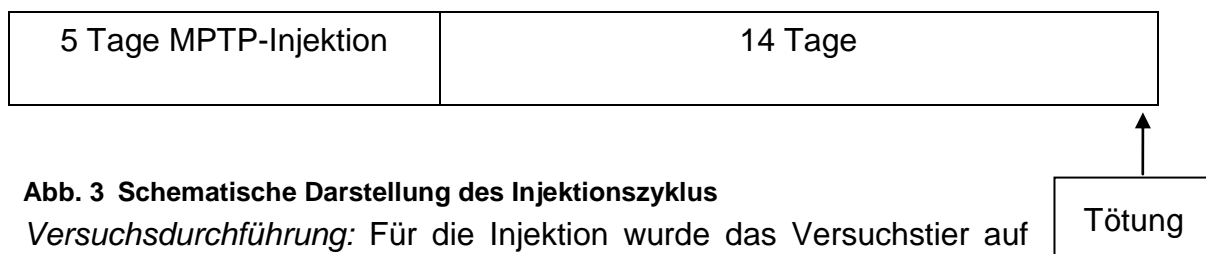


Abb. 3 Schematische Darstellung des Injektionszyklus

Versuchsdurchführung: Für die Injektion wurde das Versuchstier auf

dem Boden des Käfigeinsatzes mit der Hand am Schwanz fixiert. Mit Daumen und Zeigefinger wurde das Nackenfell des Tieres gegriffen. Die Maus wurde in Rücklage gebracht und der Kopf abgesenkt. Dies führte zu einem kranialen Absinken und besseren Schutz der inneren Organe bei der intraperitonealen (i.p.) Injektion. Die Injektion erfolgte ca. 0,5-0,6 cm oberhalb des Leistenbandes im linken unteren Quadranten. Zur Injektion wurde eine 1 ml Injektionsspritze mit einer 0,45x12 mm Injektionskanüle verwendet. Anschließend wurde der Käfig speziell als MPTP-Käfig gekennzeichnet. Um mögliche MPTP-Verunreinigungen von Arbeitsflächen und Instrumenten zu vermeiden, wurden diese mit einer Natriumhypochlorit-Lösung (Danklorix®) gesäubert und anschließend desinfiziert.

2.3 Gewebeaufarbeitung

2.3.1 Gewebeentnahme

Die Tiere wurden 14 Tage nach MPTP- bzw. NaCl-Behandlung durch Dekapitation getötet (Abb. 4). Die Schädelkalotte wurde entlang der Sutura sagittalis eröffnet und durch zwei weitere seitliche Schnitte aufgeklappt. Nach Entfernen der Dura mater wurde das Gehirn entnommen. Die Präparation erfolgte auf einer umgedrehten Petrischale, welche mit einem feuchten Filterpapier bedeckt war. Die komplette Einheit wurde konstant durch Eis gekühlt.

Die Präparation wurde von ventral durchgeführt. Es wurde der linke frontale Quadrant entfernt, begrenzt von der Mediosagittalebene und einer koronaren Ebene durch den kaudal des optischen Nerven gelegenen Hypothalamus (Resektionsanteil 1 in Abb. 4). Mit Hilfe eines Auflichtmikroskopes wurde das Striatum aus diesem Resektionsanteil heraus präpariert und in abgewogenen 1,5 ml Reaktionsgefäßen auf Trockeneis schockgefroren. Die striatalen Proben wurden bis zur weiteren Aufarbeitung (2.3.3) und Messung der Katecholaminkonzentrationen (2.4) bei -80°C aufbewahrt.

Der Resektionsanteil 2 diente zur Untersuchung der dopaminergen Neurone der SNpc (2.5.5), der striatalen Faserdichte (optische Dichte) und der nigrostriatalen

Projektionen rostral der SNpc (2.6). Dieser wurde zur histologischen Aufarbeitung in eine Fixierlösung überführt (2.3.2).

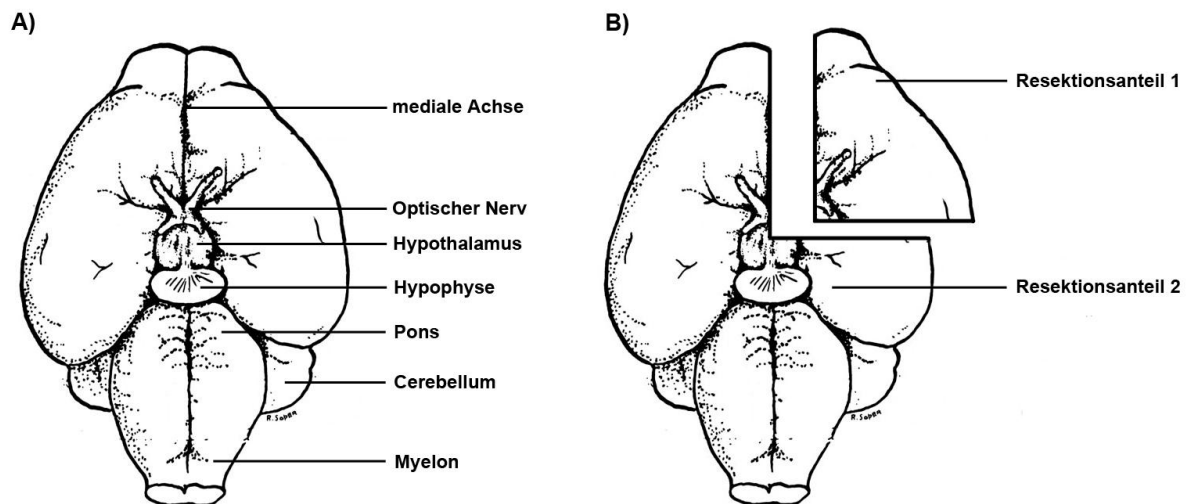


Abb. 4 Modifizierte Darstellung des Mausgehirns von ventral (A) mit Resektionsanteilen der Gewebeentnahme (B)

(Quelle: www.informatics.jax.org/greenbook/figures/figure13-11.shtml)

(A) Die Abbildung dient der allgemeinen Übersicht der unter 2.3.1 aufgeführten Gewebeentnahme. (B) Der Resektionsanteil 1 diente der striatalen Gewebeentnahme und anschließender Quantifizierung der Katecholaminkonzentrationen. Der Resektionsanteil 2 diente der Auswertung der dopaminergen Neurone in der SNpc, der striatalen Faserdichte (optische Dichte) und der nigrostriatalen Projektionen rostral der SNpc.

2.3.2 Gewebefixierung zur immunozytochemischen Aufarbeitung

Vorbereitung der Paraformaldehyd-Lösung (PFA): Zur Herstellung der Fixierlösung wurden 8 g PFA pro 100 ml destillierten H₂O für 20-30 min auf 60°C erhitzt. Um die Lösung aufzuklären, wurden unter ständigem Rühren ein bis zwei Tropfen konzentrierter Natronlauge (4N) hinzugefügt. Die Lösung wurde abgedeckt und über Nacht abgekühlt. Um eine 0,1 M 4% PFA-Lösung zu erhalten, wurde die Lösung im Anschluss mit 0,2 M Phosphatpuffer (PB) im Verhältnis 1:1 verdünnt und der pH-Wert auf pH 7,4 eingestellt.

Vorbereitung der Sucrose-Lösung: Für die Herstellung der 30% Sucrose-Lösung wurden 30 g Sucrose auf 100 ml 0,1 M PB angesetzt.

PB 0,2 M: 21,8 g/l Na₂HPO₄, 6,28 g/l NaH₂PO₄, pH 7,2-7,4

PB 0,1 M: 10,9 g/l Na₂HPO₄, 3,14 g/l NaH₂PO₄, pH 7,2-7,4

Durchführung: Zur weiteren Untersuchung wurde der Resektionsanteil 2 (Abb. 4) in 4% PFA für 24 Stunden bei 4°C fixiert. Anschließend folgte die Überführung in 30% Sucrose für 48 Stunden bei 4°C. Zur schnellen Gefrierfixation wurde ein Gefäß mit 2-Methylbutan mittels Trockeneis auf -40°C herunter gekühlt und die einzelnen Resektionsanteile für 30 Sekunden schockgefroren. Diese wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

2.3.3 Gewebeaufarbeitung des Striatums zur Bestimmung der Katecholamin-konzentrationen

Die Striata aus dem Resektionsanteil 1 wurden in einzeln abgewogene 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und erneut gewogen. Die einzelnen Gewichte wurden von einander subtrahiert und gewichtsadaptiert in einem Verhältnis von 1:3 mit 0,1 M Perchlorsäure (eiskalt) versetzt. Nach dem Zusetzen der Perchlorsäure wurden die Striata durch Ultraschall bei 4°C für ca. 10 Sekunden homogenisiert. Um eine quantitative Proteinfällung zu erreichen, wurden die Proben für 30 Minuten bei 4°C gelagert. Anschließend erfolgte eine erneute Ultraschallhomogenisierung für weitere 10 Sekunden. Nach einer Ruhezeit von 20 Minuten wurde der gelöste Zellbestandteil bei 4°C und 13.000 Umdrehungen pro Minute für 20 Minuten abzentrifugiert. Die auf diesem Wege gewonnenen Überstände konnten direkt mittels der *High pressure liquid chromatography* (HPLC) analysiert werden.

2.4 Bestimmung der Katecholaminkonzentrationen mittels HPLC

Versuchsprinzip: Mit der HPLC ist es möglich, die einzelnen Katecholamine des Striatums aufzutrennen und deren Konzentrationen zu bestimmen. Die

Konzentrationen von Dopamin und seinen Metaboliten DOPAC und HVA sind ein Maß für die Integrität nigrostriataler Terminalen.

Versuchsdurchführung: Zur Messung von Dopamin und seinen Metaboliten DOPAC und HVA mittels HPLC (Gynkotek P580A) wurden 20 µl Proben auf eine *Reverse-Phase-Säule* (Bischoff Pronto SIL 120-3-C18 AQ) gegeben und durch elektrochemische Detektion bei 400 mV gemessen (ESA Coulchem II). Als Fließmittel wurde ein Puffer verwendet, welcher sich aus 935 ml destilliertem Wasser, 105 ml Methanol, 6,937 g Natriumacetat, 0,048 g Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure, 7,355 g Zitronensäure und 0,105 g Natrium-Octansulfonsäure zusammensetzt. Der pH-Wert des Puffers wurde auf pH 2,5 eingestellt und durch einem *Bottle-top-Filter* (Satorius 11307 50 N Poren 0,2 µm) gefiltert. Die Flussgeschwindigkeit lag bei 1 ml pro Minute.

Für jedes Katecholamin wurde eine typische Retentionszeit ermittelt, welche es ermöglichte, die Zugehörigkeit der Signalkurven zu den einzelnen Katecholaminen festzustellen. Die Berechnung erfolgte dann über das Flächenintegral der identifizierten Signalkurven in Bezug zu den aus der Eichung erhaltenen Referenzkurven (Software: Chromeleon 6.60; Gynkotek). Der bestimmte Katecholamingehalt der Proben konnte anschließend mit denen bei der Aufbereitung gemessenen striatalen Gewichten verrechnet werden. Die somit ermittelten Konzentrationen wurden in ng/mg Nassgewebe angegeben.

2.4.1 MPP⁺-Messungen mittels HPLC

Versuchsprinzip: Die Toxizität von MPTP beruht auf dem aktiven Metabolit MPP⁺. Um mögliche Unterschiede im MPTP-Metabolismus auszuschließen, wurden Tiere der verschiedenen Genotypen DAT-Cre, RET^{lx} und DAT-RET^{lx/lx} mit 30 mg/kg KG MPTP i.p. injiziert (siehe 2.2.2). Die Detektion von MPP⁺ im Striatum erfolgte mittels HPLC 90 Minuten nach MPTP-Injektion.

Versuchsdurchführung: Die verwendeten Striata wurden wie unter 2.3.1 und 2.3.3 entnommen und aufgearbeitet. 20 µl Proben wurden auf eine *Reverse-Phase-Säule* (Nucleosil-100 C18, Knauer) gegeben und durch UV-Absorption bei 300 nm (UVD340U, Dionex) gemessen. Als Fließmittel wurden 697/1000 ml Acetonitril in

Phosphatpuffer (pH 2,5) verwendet. Die Flussgeschwindigkeit lag bei 0,5 ml pro Minute. Die gewonnenen Daten wurden mittels der Software Chromeleon 6.60 (Gynkotek) ausgewertet und die ermittelten Konzentrationen in ng/mg Nassgewebe angegeben. Zur Kalibrierung wurden Lösungen mit bekannter MPP⁺-Konzentration gemessen.

2.5 Histologie und Immunzytochemie

2.5.1 Gehirnschnitte

Mit einem Gefriermikrotom (Leica CM 3050s) wurden 30 µm dicke Gehirnschnitte der SNpc und des Striatums angefertigt (Resektionsanteil 2) und bis zur weiteren Färbung in Phosphat-gepufferter Salzlösung (*Phosphate-buffered saline*; PBS: 10,9 g Na₂HPO₄, 3,14 g NaH₂PO₄, 9 g NaCl, 1 g Natriumazid, 1000 ml destilliertes H₂O; pH 7,2-7,4) bei 4°C in 48er-Wellplatten aufbewahrt. Zur besseren Seitendifferenzierung und Ausrichtung unter dem Mikroskop wurde mit einer 0,45x12 mm dicken Injektionskanüle die linke Großhirnhemisphäre markiert. Die genaue Ausrichtung und Orientierung erfolgte nach anatomischen Richtlinien (Paxinos und Franklin 2004).

2.5.2 Objektträger

Im Anschluss an die folgende TH-Färbung wurden die Gehirnschnitte auf Objektträger (Menzel Gläser, 76x26 mm) gezogen. Für eine bessere Haftung der Gehirnschnitte bei der Nissl-Färbung der SNpc und Entwässerung der Striata wurden die Objektträger mit einer Gelatineschicht versehen.

Zunächst wurden 5 g Gelatine in 500 ml zweifach destilliertem H₂O gelöst und unter ständigem Rühren auf 80°C erhitzt. Die Gelatinelösung wurde auf 40°C abgekühlt und zum besseren Aufklaren der Lösung mit 0,5 g Chrom-III-Kaliumsulfat versetzt. Nach anschließender Filtration durch einen *Bottle-top*-Filter wurden die Objektträger für 30 Sekunden in die Gelatinelösung getaucht, 20 Minuten bei Raumtemperatur

getrocknet und für 15 Minuten in 1% PFA-Lösung (NaCl frei) fixiert. Die Objektträger mussten anschließend für 12 Stunden staubfrei bei 63°C getrocknet werden.

2.5.3 Tyrosinhydroxylase (TH)-Färbung der SNpc

Versuchsprinzip: Die Darstellung der TH-positiven Zellen der SNpc beruht auf einer Antikörper gebundenen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Färbung. Dabei wurde das zunächst farblose Chromogen DAB durch einen Peroxidase-vermittelnden Oxidationsprozess in ein bräunliches Endprodukt umgewandelt. Vor Beginn der Färbung wurde die endogene Peroxidase, welche vorrangig in Erythrozyten und Leukozyten vorkommt, mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) blockiert. Hierdurch wurde eine Anfärbung vermieden. Die Präinkubation mit *Normal Goat Serum* (NGS) diente der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Der primäre Antikörper richtete sich gegen die in dopaminergen Neuronen exprimierte TH (Chemicon International; *Rabbit-Anti-Tyrosine-Hydroxylase-Antibody*; polyklonal 1:1000). Der sekundäre Biotin-gekoppelte Antikörper (Vector Laboratories; *Biotinylated Anti-Rabbit IgG*; 1:200) richtete sich gegen den primären TH-gebundenen Antikörper. Das dritte Reagenz war ein peroxidasegekoppelter Avidin-Biotin-Komplex. Die freien Bindungsstellen des Avidins ermöglichten die Bindung von Biotin (Vector Laboratories; *ABC Kit Standard PK-4000*). Dieser peroxidasegebundene-Antikörper-Komplex wurde anschließend mit DAB gefärbt (Tab. 1).

Es wurden zehn 30 µm dicke Gehirnschnitte der SNpc im Abstand von 120 µm verwendet. Als Waschmedium diente 0,1 M Tris-gepufferte Salzlösung (*Tris-buffered saline*; TBS).

Die gefärbten Gehirnschnitte wurden auf die gelatinisierten Objektträger überführt und für 12 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

Das überschüssige DAB-Reagenz wurde anschließend mit einer Natriumhypochlorit-Lösung (Danklorix®) inaktiviert.

Puffer:

0,1 M TBS: 12,11 g/l Tris(hydroxymethyl)-aminomethan,
9 g/l NaCl; (pH 7,2-7,4)

Tris-Puffer: 12,11 g/l Tris (pH 7,6)

Versuchsdurchführung:

Art des Vorgangs	Inkubationszeit	Zusammensetzung der Lösung
Waschen	3 x 5 min	0,1 M TBS
Peroxidaseblockung	5 min	10% Methanol und 3% H ₂ O ₂ in 0,1 M TBS
Waschen	3 x 5 min	0,1 M TBS
Präinkubation	60 min	5% NGS in 0,1 M TBS
Prim. Antikörper	48 Stunden	<i>Rabbit-Anti-Tyrosine-Hydroxylase- Antibody</i> (1:1000); 2% NGS in 0,1 M TBS bei 4°C
Waschen	3 x 5 min	0,1 M TBS
Sek. Antikörper	60 min	<i>Biotinylated Anti-Rabbit IgG</i> (1:200) , 2% NGS in 0,1 M TBS
Waschen	3 x 5 min	0,1 M TBS
Enzymkomplex	60 min	ABC Kit Standard (PK-4000) (2 Tropfen A und 2 Tropfen B pro 10 ml) in 0,1 M TBS
Waschen	3 x 5 min	0,1 M TBS
DAB-Färbung	15 min	In 50 ml Tris-Puffer (pH 7,6): 25 mg DAB, 100 µl NH ₄ Cl, 150 µl Glucoseoxidase, 400 µl Glucose

Waschen	3 x 5 min	0,1 M TBS
---------	-----------	-----------

Tab. 1 Tabellarische Darstellung der TH-Färbung der SNpc

2.5.4 Nissl-Färbung der SNpc

Versuchsprinzip: Bei der Nissl-Färbung handelt es sich um eine Thionin-Färbung, bei der die Zellkörper von Neuronen angefärbt werden. Dabei kommt es zur Anlagerung basischer Farbstoffe an sauer reagierende Zellbestandteile des rauen endoplasmatischen Retikulums (Nisslschollen) (Bohlen und Halbach und Dermietzel 1999). Dadurch werden alle Neurone innerhalb und außerhalb der SNpc angefärbt.

Bei der Anwendung des MPTP-Mausmodell kann es zu einer vorübergehenden Herabregulation der TH in den dopaminergen Neurone kommen, ohne dass eine Degeneration der Zelle vorliegt (Jackson-Lewis et al. 1995). Als ausschließlich Nissl-positive Zellen in der SNpc werden Neurone beschrieben, die sich nicht für TH anfärben lassen. Bei der anschließenden stereologischen Zählung (2.5.5) ist zu beachten, dass jede TH-positive Zelle auch Nissl-positiv ist. Da sich auch Gliazellen durch die Nissl-Färbung anfärben lassen, bedarf es Auswahlkriterien zur Bestimmung einer Nissl-positiven Zelle in der SNpc. Diese Auswahlkriterien sind neben der Anfärbung und Lokalisation innerhalb der SNpc, die Größe der Zelle und die Größe des Nucleus. Nissl-positive Zellen der SNpc können das 5-fache an TH-positiven Zellen ausmachen (Kramer et al. 2007). Die Auswertung von TH- und Nissl-positiven Zellen lässt auf die gesamte Neuronenzahl in der SNpc und Aktivität der TH schließen. Zusätzlich gilt die gleichzeitige Erniedrigung von TH-positiven und Nissl-positiven Zellen als Neurodegenerationsmarker für dopaminerge Neurone.

Versuchsdurchführung: Für die Nissl-Färbung wurden die zuvor TH-gefärbten 30 µm dicken Gehirnschnitte auf Objektträger gebunden angefärbt (Tab. 2). Die Gegenfärbung ermöglichte eine gleichzeitige Auszählung der TH- und Nissl-positiven Zellen in der Stereologie (2.5.5).

Für die Nissl-Färbung wurden folgende Lösungen angesetzt:

Chloroform-Lösung: 480 ml Chloroform; 60 ml 95% Ethanol; 60 ml Diethylether
(Reihenfolge wichtig !)

Färbelösung: 455 ml Standardfärbelösung, 45 ml Pufferlösung

Pufferlösung: 7 g Natriumacetat
2 ml Eisessigsäure
1100 ml destilliertes Wasser

Standardfärbelösung: 1 g Thionin
100 ml kochendes destilliertes
Wasser

Formalin-Essig-Lösung: 1 ml Eisessigsäure; 1 ml 39% Formaldehyd; 100 ml
destilliertes Wasser

Reagenz	Inkubationszeit
95% Ethanol	20 min
Chloroform-Lösung	10 min
95% Ethanol	2 min
100% Ethanol	2 min
Xylol	5 min
100% Ethanol	5 min
95% Ethanol	2 min
95% Ethanol	2 min
Destilliertes Wasser	2 min
Färbelösung	7 min
Destilliertes Wasser	2 min
Destilliertes Wasser	2 min
Destilliertes Wasser	2 min

Formalin-Essig-Lösung	8 s
Destilliertes Wasser	2 min
Destilliertes Wasser	2 min
Destilliertes Wasser	2 min
95% Ethanol	2 min
95% Ethanol	2 min
95% Ethanol	2 min
100% n-Butanol	10 min
Cedernholzöl	10 min
Xylol	10 min
Xylol	10 min
Eindeckeln mit Entellan	

Tab. 2 Tabellarische Darstellung der Nissl-Färbung der SNpc

2.5.5 Stereologische Quantifizierung von TH- und Nissl-positiven Zellen der SNpc

Um die Gesamtzahl der TH- und Nissl-gefärbten Neurone in der SNpc zu bestimmen, wurden anhand der 30 µm dicken Gehirnschnitte stereologische Zählungen durchgeführt. Bei der Stereologie wurde nur ein *Subset* der gefärbten Gehirnschnitte (jeder vierte, im Abstand von 120 µm) sowie ein Bruchteil der gesamten Fläche (ca. 20%) ausgezählt (West 1993; West et al. 1991). Pro Tier wurden zehn Gehirnschnitte aus dem Bereich der SNpc stereologisch auf TH- und Nissl-positive Zellen untersucht. Als Referenz für die Grenzen der SNpc wurde der Maushirnatlas (Paxinos und Franklin 2004) verwendet. In jedem Schnitt wurde zunächst die *Region of interest* (ROI), die SNpc, bei niedriger Vergrößerung (10x Objektiv) umfahren. Die Auswahl der auszählenden Felder (*counting frame*, 50x50 µm) in jedem Schnitt erfolgte randomisiert durch ein Computerprogramm (Stereoinvestigator, MicroBrightField; USA). Die Felder wurden in einem zufällig platzierten Raster (*grid size*, 100x125 µm) angeordnet. Die Zählung erfolgte manuell

unter Verwendung eines Zeiss Axioskop 2. TH- und Nissl-positive Zellen wurden dabei unterschiedlich markiert. Gezählt wurde mit einem 63x Objektiv und Immersionsöl. Nicht gezählt wurden Zellen, die die rote Grenze des Zählrahmens überschritten. Die Auswertung erfolgte für jede Hemisphäre gleich. Genotyp und Versuchsreihe waren bei Durchführung der Auswertung verblindet.

Am Ende der Auswertung wurde anhand der einzelnen Stichproben die Gesamtneuronenzahl der TH- und Nissl-positiven Zellen beider Hemisphären computergestützt berechnet (Stereoinvestigator, MicroBrightField; USA).

2.5.6 Striatale TH-Färbung

Versuchsprinzip: Die striatale TH-Färbung diente der Quantifizierung von TH-positiven Fasern zur Bestimmung der optischen Dichte. Das Versuchsprinzip beruhte ebenfalls auf einer TH-gebundenen DAB-Färbung (Tab. 3). Zur Auswertung des gesamten Striatums wurden 30 µm dicke striatale Gehirnschnitte im Abstand von 240 µm (jeder achte Schnitt) verwendet. Der Versuchsaufbau ähnelte der unter (2.5.3) beschriebenen Färbemethode für dopaminerge Neurone in der SNpc. Es wurde ebenfalls ein peroxidasegekoppelter Avidin-Biotin-Komplex verwendet, jedoch mit einem anderen Reagenz (ABC Kit Vectastain *Elite* Standard PK-6100; Vector). Der Unterschied im *Elite Kit* liegt in der höheren Affinität zum Antikörper-Komplex. Dadurch kann die Konzentration gesenkt und die Anfärbung des Hintergrundes vermindert werden. Die Inkubation der Striata mit DAB betrug zudem 20 Minuten.

Versuchsdurchführung:

Art des Vorgangs	Inkubationszeit	Zusammensetzung der Lösung
Waschen	3 x 5 min	0,1 M TBS
Peroxidaseblockung	5 min	10% Methanol und 3% H ₂ O ₂ in 0,1 M TBS
Waschen	3 x 5 min	0,1 M TBS

Präinkubation	60 min	5% NGS in 0,1 M TBS
Prim. Antikörper	48 Stunden	<i>Rabbit-Anti-Tyrosine-Hydroxylase-Antibody</i> (1:1000); 2% NGS in 0,1 M TBS bei 4°C
Waschen	3 x 5 min	0,1 M TBS
Sek. Antikörper	60 min	<i>Biotinylated Anti-Rabbit IgG</i> (1:200) , 2% NGS in 0,1 M TBS
Waschen	3 x 5 min	0,1 M TBS
Enzymkomplex	60 min	ABC Kit <i>Elite Standard</i> (PK-6100) (2 Tropfen A und 2 Tropfen B pro 10 ml) in 0,1 M TBS
Waschen	3 x 5 min	0,1 M TBS
DAB-Färbung	20 min	In 50 ml Tris-Puffer (pH 7,6): 25 mg DAB, 100 µl NH ₄ Cl, 150 µl Glucoseoxidase, 400 µl Glucose
Waschen	3 x 5 min	0,1 M TBS

Tab. 3 Tabellarische Darstellung der striatalen TH-Färbung

Die TH-gefärbten striatalen Gehirnschnitte wurden auf gelatinisierte Objektträger überführt und bei Raumtemperatur für 12 Stunden getrocknet. Anschließend wurden die Objektträger durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und fixiert (Tab. 4).

Entwässerung:

Reagenz	Zeit
Destilliertes Wasser	5 min
70% Ethanol	10 min
95% Ethanol	10 min

100% Ethanol	10 min
100% Ethanol	10 min
Xylol	10 min
Xylol	10 min
Eindeckeln mit Entellan	

Tab. 4 Tabellarische Darstellung der Entwässerungsreihe von TH-gefärbten striatalen Gehirnschnitten

2.6 Optische Dichte und nigrostriatale Projektionen rostral der SNpc

Das Striatum stellt das terminale Feld der nigrostriatalen Fasern dar. Neben der Faserdichte im Striatum (optische Dichte) wurde zudem die Anzahl und Fläche der nigrostriatalen Fasern nahe ihres Ursprungs, ca. 120-240 μm rostral der SNpc gemessen.

2.6.1 Bestimmung der optischen Dichte von TH-positiven Fasern des Striatums

Die Objektträger gebundenen Striata wurden als digitale Bilddateien eingescannt (Durchlicht-Modus, 8-bit) und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Scion Image 4.0.3.2 Software (Scion Corporation; Frederick, Maryland, USA). Das Striatum wurde in jedem einzelnen Schnitt markiert und die mittlere Intensität bestimmt. Da es sich um Durchlichtaufnahmen handelte, entsprechen die gemessenen Werte willkürlichen Einheiten *arbitrary units* (AU) = optische Dichte. Um Färbeunterschiede zwischen den einzelnen Schnitten auszugleichen, wurde in jedem Schnitt ein äquivalentes Areal der Großhirnrinde gemessen und die mittlere Dichte im Kortex vom Wert für das Striatum subtrahiert (Burke et al. 1990). Pro Versuchstier wurden zwölf TH-gefärbte striatale Gehirnschnitte ausgewertet. Genotyp und Versuchsreihe waren bei Durchführung der Auswertung verblindet.

2.6.2 Bestimmung der Anzahl und Fläche nigrostriataler Projektionen rostral der SNpc

Versuchsprinzip: Zur Evaluation der nigrostriatalen Projektionen wurden pro Versuchstier je drei unilaterale, 30 µm dicke Gefrierschnitte im Bereich 120-240 µm rostral der SNpc verwendet. Die quer angeschnittenen nigrostriatalen Projektionen wurden mittels TH-Färbung (siehe 2.5.6) angefärbt.

Versuchsdurchführung: Zur Analyse der TH-gefärbten Projektionen wurden diese in 20-facher mikroskopischer Vergrößerung (Leica DMI 6000 B) eingescannt (Durchlicht-Modus). Die anschließende Auswertung erfolgte durch das Programm Image J (Version 1.63 B; Wayne Rasband, USA). Durch das *Plugin* "threshold_colour" (von Gabriel Landini; *School of Dentistry, University of Birmingham*) wurde der sichtbare Farbbereich auf die TH-gefärbten Projektionen beschränkt und auf 8-Bit reduziert. Das Areal der entsprechenden Projektionsbahnen wurde manuell markiert und die Anzahl der nigrostriatalen Projektionen durch eine automatisierte Partikel-Analyse bestimmt. Eine Erniedrigung der Anzahl und der gemessenen Fläche (mm²) von TH-positiven Projektionen lässt auf eine Degeneration schließen. Genotyp und Versuchsreihe waren bei Durchführung der Auswertung verblindet.

2.7 Statistik

Daten in Text und Abbildungen entsprechen Mittelwerten ± Standardabweichung. Zur statistischen Analyse wurde i.d.R. eine ANOVA mit zwei Faktoren durchgeführt. Dabei war der erste Faktor die Behandlung mit NaCl oder MPTP, und der zweite Faktor der Genotyp. Verwendet wurde die Software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, USA). Falls nicht anders angegeben wurde die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 abgewiesen.

2.8 Materialien

2.8.1 Chemikalien

Acetonitril	Sigma-Aldrich, München
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Cedernholzöl	Sigma-Aldrich, München
Chloroform	Sigma-Aldrich, München
Chrom-III-Kaliumsulfat	Sigma-Aldrich, München
3,3`-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich, München
Diethylether	Sigma-Aldrich, München
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Roth, Karlsruhe
Eisessigsäure	Sigma-Aldrich, München
Ethanol	GeReSo GmbH, Dassel-Lauenberg
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, München
Gelatine	Merck, Darmstadt
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glucoseoxidase	Sigma-Aldrich, München
Methanol	Roth, Karlsruhe
1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP)	Sigma-Aldrich, München
2-Methylbutan	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid-Lösung, isoton 0,9%	Braun, Melsungen
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck, Darmstadt

Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure	Roth, Karlsruhe
Natrium-Octansulfonsäure	Roth, Karlsruhe
Natronlauge	Roth, Karlsruhe
n-Butanol	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe
Perchlorsäure 70%	Sigma-Aldrich, München
Sucrose	Roth, Karlsruhe
Thionin-Acetat	Sigma-Aldrich, München
Tris	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt
Xylol	Roth, Karlsruhe
Zitronensäure	Sigma-Aldrich, München

2.8.2 Antikörper

<i>Biotinylated Anti-Rabbit IgG; 1:200</i>	Vector Laboratories
<i>Normal Goat Serum (NGS)</i>	PAA Laboratories
<i>Rabbit-Anti-Tyrosine-Hydroxylase Antibody; polyklonal 1:1000</i>	Chemicon international

2.8.3 Puffer und Lösungen

Ammoniumchlorid	40 mg / 200 µl Tris-Puffer
Chloroform-Lösung	480 ml Chloroform 60 ml 95% Ethanol 60 ml Diethylether Reihenfolge einhalten

Färbelösung	455 ml Standardfärbelösung, 45 ml Pufferlösung <u>Pufferlösung:</u> 7 g Natriumacetat 2 ml Eisessigsäure 1100 ml destilliertes Wasser <u>Standardfärbelösung:</u> 1 g Thionin 100 ml kochendes destilliertes Wasser
Formalin-Essig-Lösung:	1 ml Eisessigsäure 1 ml 39% Formaldehyd 100 ml destilliertes Wasser
Glucose	200 mg / 800 µl Tris-Puffer
Glucoseoxidase	30 mg/ 10 ml Tris-Puffer
0,1 M PB	10,9 g/l Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) 3,14 g/l Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4) pH 7,2-7,4
0,2 M PB	21,8 g/l Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) 6,28 g/l Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4) pH 7,2-7,4
0,1 M PBS	10,9 g/l Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4), 3,14 g/l Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4), 9 g NaCl 0,1% Natriumazid pH 7,2-7,4
0,1 M TBS	12,11 g/l Tris; 9 g/l NaCl; pH 7,2-7,4
Tris-Puffer	12,11 g/l Tris pH 7,6

2.8.4 Kits

ABC <i>Kit Elite</i> Standard PK-6100	Vector Laboratories
ABC <i>Kit</i> Standard PK 4000	Vector Laboratories

2.8.5 Verbrauchsmaterial

Einbettmedium	Jung, Leica Instruments GmbH, Nussloch
Entellan	Merck, Darmstadt
Eppendorfggefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Immersionsöl	Merck, Darmstadt
Injektionskanüle Sterican	Braun, Melsungen
Injektionspritze Omnifix	Braun, Melsungen
Natriumhypochlorit	Danklorix®; Colgate Palmolive GmbH, Hamburg
Nitril-Handschuhe, Nitra Tex	Ansell, München
Objektträger (76x26 mm)	Menzel, Braunschweig
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Spitzen für Multipipette, Combitips 12,5 ml, Combitips plus 50 ml	Eppendorf, Hamburg
Wellplatten 12er/ 48er	Corning incorporated, NY, USA

2.8.6 Geräte

Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Gefriermikrotom, CM 3050s	Leica Microsystems GmbH, Nussloch
HPLC, P580A	Gynkotek

Magnetrührer	Heidolph Instruments, Schwabach
Mikroskop, Axioskop 2	Zeiss, Jena
Mikroskop, DMI 6000 B	Leica Microsystems GmbH, Nussloch
Multipipette, Ripette	Ritter, Schwabmünchen
pH-Meter	SCHOTT Instruments, Mainz
Pipette	Eppendorf, Hamburg
Schüttler, Rotamax 120	Heidolph Instruments, Schwabach
Trockenschrank Heraeus	Thermo Scientific, Karlsruhe
Ultraschallhomogenisator, Sonoplus	Bandelin, Berlin
Zentrifuge 1-15k	Sigma, Osterode

2.8.7 Programme

Chromeleon 6.60	Gynkotek, Germering
GraphPad Prism 4.0	GraphPad Software, San Diego, USA
Image J, Version 1.63 B	Wayne Rasband, USA
Scion Image 4.0.3.2	Scion Corporation; Frederick, Maryland, MD, USA
Stereoinvestigator Software	MicroBrightField Bioscience, Magdeburg

3 Ergebnisse

3.1 Versuchstiere

Verwendet wurden C57BL/6-Mäuse der Genotypen DAT-Cre, RET^{lx} und DAT- $RET^{lx/lx}$. Die Versuchstiere wurden an 5 aufeinander folgenden Tagen mit jeweils 30 mg/kg KG MPTP behandelt und nach 14 Tagen getötet. Die Behandlung der NaCl-Mäuse erfolgte mit einem äquivalenten Volumen 0,9% NaCl-Lösung.

3.2 Der Effekt von MPTP auf dopaminerge Neurone der SNpc

Um den Effekt von MPTP auf die SNpc zu untersuchen, wurden zur Quantifizierung dopaminerger Neurone die TH-positiven Zellen in der SNpc ausgezählt (*Optical-Fractionator*-Methode). Da es zu einer Herunterregulation von TH nach MPTP kommen kann, wurden zusätzlich alle Neurone (Nissl-positive Zellen) in der SNpc ausgezählt (siehe 2.5.5).

3.2.1 Der Effekt von MPTP auf TH-positive Zellen der SNpc

Die Auswertung der NaCl-behandelten Tiere ergab keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der TH-positiven Zellen zwischen den einzelnen Genotypen DAT-Cre ($9,130 \pm 942$), RET^{lx} ($9,650 \pm 556$) und DAT- $RET^{lx/lx}$ ($8,580 \pm 460$).

Die Quantifizierung der MPTP-behandelten Mäuse ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der TH-positiven Zellen zwischen den Genotypen DAT-Cre ($4,256 \pm 370$), RET^{lx} ($4,390 \pm 938$) und DAT- $RET^{lx/lx}$ ($4,350 \pm 266$).

Im Vergleich zu den NaCl-behandelten Genotypen kam es 14 Tage nach der letzten MPTP-Injektion bei allen Genotypen zu einer ca. 50%-igen signifikanten Erniedrigung der TH-positiven Zellen ($p < 0,001$; ANOVA) (Tab. 5).

Genotyp	Injektion	TH-positive Zellen	Nissl- positive Zellen
DAT-Cre	NaCl	9,130 ± 942	12,720 ± 1,780
	MPTP	4,256 ± 370	6,563 ± 732
RET ^{lx}	NaCl	9,650 ± 556	13,640 ± 1,021
	MPTP	4,390 ± 938	7,570 ± 562
DAT-RET ^{lx/lx}	NaCl	8,580 ± 460	11,940 ± 1,029
	MPTP	4,350 ± 266	6,700 ± 359

Tab. 5 Stereologische Quantifizierung von TH-positiven und Nissl-positiven Zellen in der SNpc

Zum Nachweis der Degeneration wurden die Gehirnschnitte durch eine TH- und Nissl-Färbung doppelt gefärbt. Die stereologische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Stereoinvestigator (MicroBrightField; USA) 14 Tage nach der letzten MPTP-Injektion. Die Werte beziehen sich auf die durchschnittliche Gesamtzahl der gezählten Zellen beider Hemisphären unter Angabe der \pm Standardabweichung. Die Auswertung ergab eine signifikante Erniedrigung von TH-positiven und Nissl-positiven Zellen nach MPTP-Injektion bei allen Genotypen ($p < 0,001$; ANOVA).

Analog zur stereologischen Quantifizierung (Tab. 5) zeigte die photographische Übersicht (Abb. 5) einen deutlichen Untergang von TH-positiven Zellen in der SNpc.

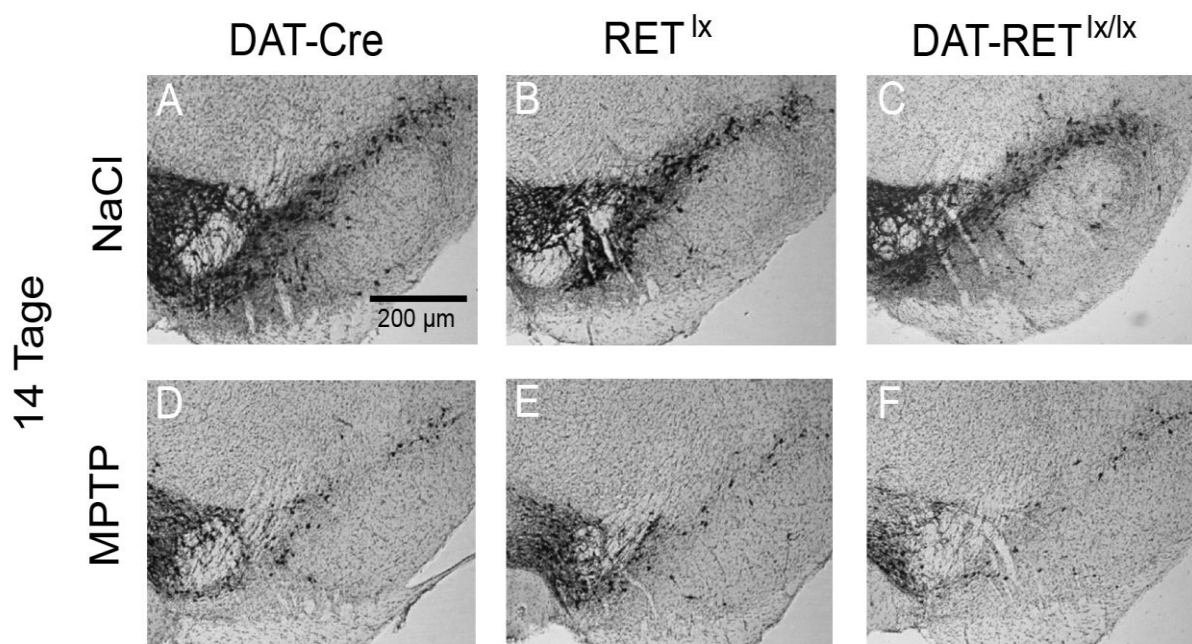


Abb. 5 MPTP-induzierter Verlust von TH-positiv gefärbten Zellen in der SNpc

Die 30 µm dicken Schnitte liegen auf der Höhe des Bregma (-3,52 mm). Es konnte kein Unterschied in der Anzahl der TH-positiven Zellen der mit NaCl-behandelten Genotypen DAT-Cre, RET^{lx} und DAT-RET^{lx/lx} detektiert werden (A-C). 14 Tage nach MPTP-Behandlung kam es zu einer deutlichen Erniedrigung in der Anzahl der TH-positiven Zellen im Vergleich zu NaCl-behandelten Kontrollen (D-F). Die Genotypen DAT-Cre, RET^{lx} und DAT-RET^{lx/lx} zeigten untereinander nach MPTP- und NaCl-Behandlung im photographischen Vergleich keinen wesentlichen Unterschied von TH-positiven Zellen in der SNpc.

3.2.2 Der Effekt von MPTP auf Nissl-positive Zellen der SNpc

Die stereologische Auswertung der Nissl-positiven Zellen der NaCl-behandelten Mäuse ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Genotypen DAT-Cre (12,720 ± 1,780), RET^{lx} (13,640 ± 1,021) und DAT-RET^{lx/lx} (11,940 ± 1,029).

Der Vergleich von Nissl-positiven Zellen der mit MPTP-behandelten Mäuse erbrachte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Genotypen DAT-Cre (6,563 ± 732), RET^{lx} (7,570 ± 562) und DAT-RET^{lx/lx} (6,700 ± 359).

Im Vergleich zu den NaCl-behandelten Genotypen kommt es 14 Tage nach der letzten MPTP-Injektion bei allen Genotypen zu einer ca. 53%-igen signifikanten Erniedrigung der Nissl-positiven Zellen ($p < 0,001$; ANOVA) (Tab. 5).

3.2.3 Zusammenfassung

Die Auszählung der TH-positiven und Nissl-positiven Zellen der NaCl-behandelten Mäuse zeigte keinen Unterschied zwischen den einzelnen Genotypen. Eine spontane Degeneration der dopaminergen Neurone konnte somit ausgeschlossen werden. Zudem wurde gezeigt, dass eine Deletion für RET (DAT-RET^{lx/lx}) zu keinem Unterschied in der Entwicklung dopaminergen Neurone führt.

14 Tage nach MPTP-Injektion zeigte sich bei allen Genotypen eine signifikante Erniedrigung der TH-positiven und Nissl-positiven Zellen. Die Deletion des RET-Rezeptors (DAT-RET^{lx/lx}) führte bei den MPTP-behandelten Mäusen zu keiner erhöhten Vulnerabilität im Vergleich zu den MPTP-behandelten Genotypen DAT-Cre und RET^{lx}. Die gleichzeitige Erniedrigung von TH-positiven Zellen und Nissl-positiven

Zellen nach MPTP-Behandlung lässt eine Verminderung in der TH-Expression ausschließen und zeigt den degenerativen Effekt der MPTP-Behandlung mit Verlust dopaminerger Neurone in der SNpc. Da es bei RET-defizienten Mäusen zu keiner vermehrten Toxizität nach MPTP-Gabe kam, vermittelt endogenes GDNF über den RET-Rezeptor keine Protektion dopaminerger Neurone.

3.3 Der Effekt von MPTP auf die optische Dichte des Striatums und auf die nigrostriatalen Projektionen rostral der SNpc

Der Verlust von dopaminergen Neuronen in der SNpc durch MPTP führt ebenfalls zu einem axonalen Verlust dieser Zellen. Um diesen Effekt zu untersuchen, wurden die optische Dichte im Striatum und die Anzahl und Fläche von nigrostriatalen Projektionen rostral der SNpc bestimmt.

3.3.1 Ergebnisse der optischen Dichte TH-positiver Fasern des Striatums

Verwendet wurden zwölf 30 µm dicke TH-gefärbte Gehirnschnitte des Striatums. Der Abstand zwischen den Schnitten betrug 240 µm. Zur Auswertung wurden die TH-gefärbten Striata eingescannt und die optische Dichte computergestützt (Scion Image 4.0.3.2 Software) gemessen.

Im photographischen Vergleich der TH-gefärbten striatalen Gehirnschnitte konnte kein Unterschied in der Farbintensität für die Gruppe der mit NaCl-behandelten Genotypen festgestellt werden. Hingegen zeigte sich bei allen mit MPTP-behandelten Genotypen (DAT-Cre, RET^{lx} und DAT-RET^{lx/lx}) ein erheblicher und gleichmäßiger Intensitätsverlust der striatalen Schnitte (Abb. 6).

Die Messung der optischen Dichte (Abb. 7) der mit NaCl-behandelten Genotypen ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen DAT-Cre, RET^{lx} und DAT-RET^{lx/lx} (ANOVA).

Im Vergleich zur NaCl-Gruppe ergab die Auswertung der mit MPTP-behandelten Tiere (Abb. 7) eine deutliche Erniedrigung in der optischen Dichte für die Genotypen DAT-Cre, RET^{lx} und DAT-RET^{lx/lx} ($p < 0,0001$, ANOVA).

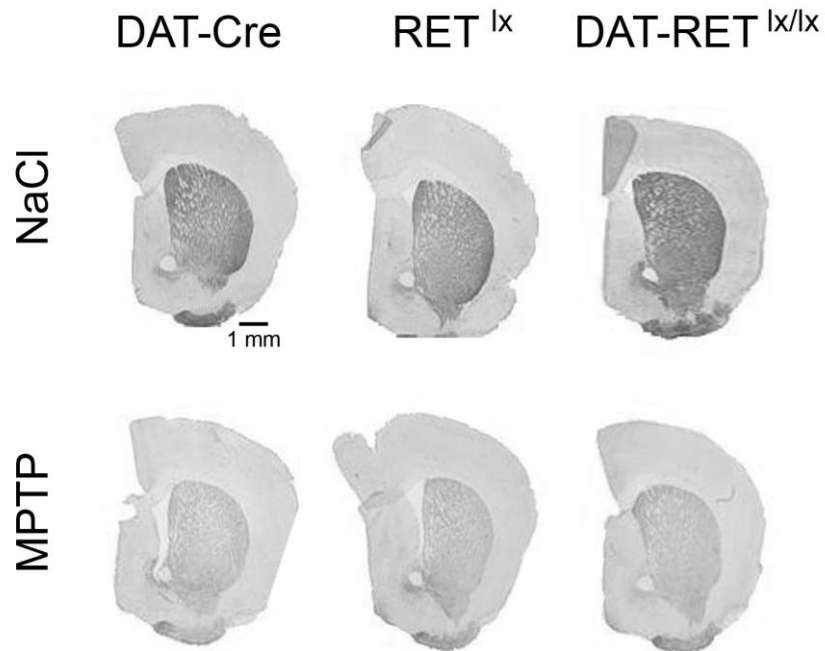


Abb. 6 TH-gefärbte striatale Gehirnschnitte zur Messung der optischen Dichte

Der bildliche Vergleich zeigt eine deutliche Reduktion in der TH-Intensität aller Genotypen 14 Tage nach MPTP-Behandlung. Zwischen den Genotypen DAT-Cre, RET^{lx} und DAT-RET^{lx/lx} ergibt sich kein Unterschied in der Intensität nach MPTP-Behandlung.

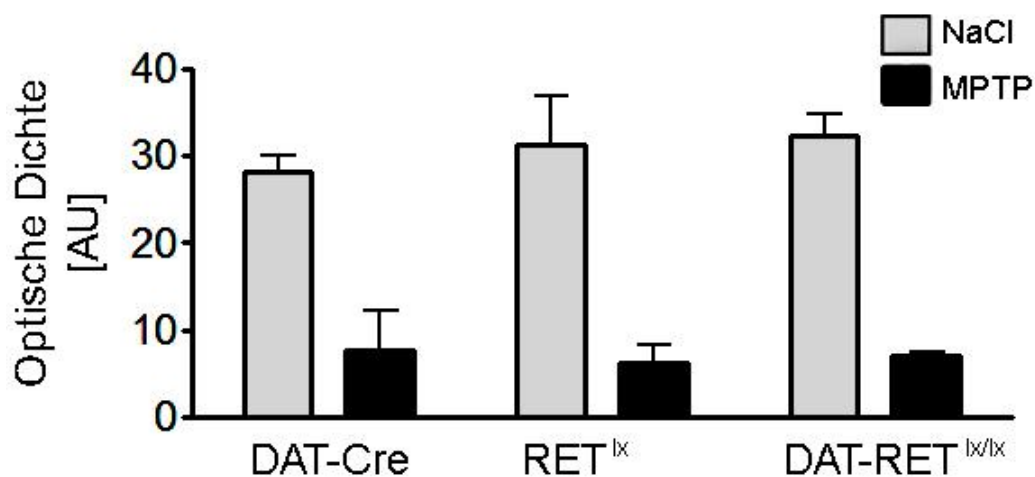


Abb. 7 Bestimmung der optischen Dichte von TH-positiven Fasern des Striatums

Im Vergleich zur NaCl-Gruppe ergab die Auswertung der mit MPTP-behandelten Mäuse 14 Tage nach MPTP-Gabe eine deutliche Erniedrigung der optischen Dichte für die Genotypen DAT-Cre, RET^{lx} und DAT-RET^{lx/lx} ($p < 0,0001$, ANOVA). Werte sind angegeben in willkürlichen Einheiten, *arbitrary units* (AU).

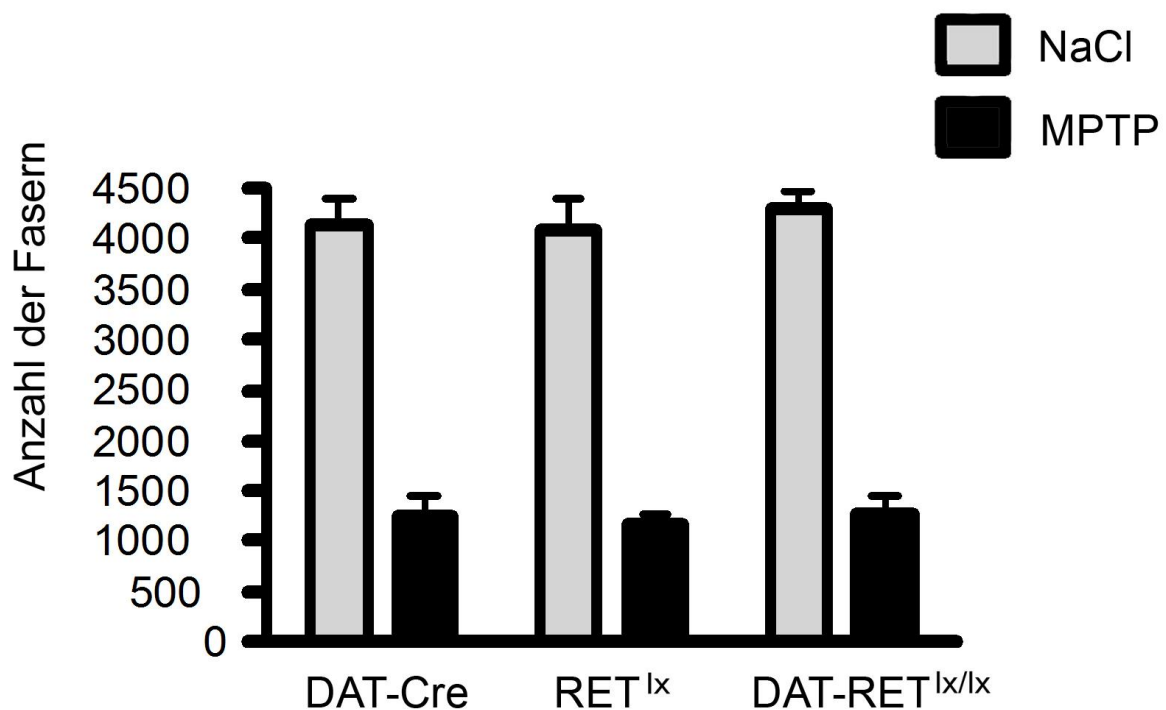
3.3.2 Auswertung TH-positiver nigrostriataler Projektionen rostral der SNpc

Gemessen wurde die Anzahl und Fläche von nigrostriatalen Projektionen, ausgehend von ihrem Ursprung, ca. 120-240 μm rostral der SNpc. Die verwendeten Gehirnschnitte wurden für TH angefärbt und computergestützt ausgewertet.

Die Auswertung der NaCl-behandelten Mäuse ergab keinen Unterschied in der Anzahl und Fläche von nigrostriatalen Projektionen zwischen den Genotypen DAT-Cre, RET^{lx} und $\text{DAT-RET}^{\text{lx/lx}}$ (Abb. 8).

14 Tage nach MPTP-Behandlung konnte eine signifikante Reduktion sowohl in der Anzahl der TH-positiven Projektionen als auch in der Fläche für alle Genotypen beobachtet werden (ANOVA).

(A)



(B)

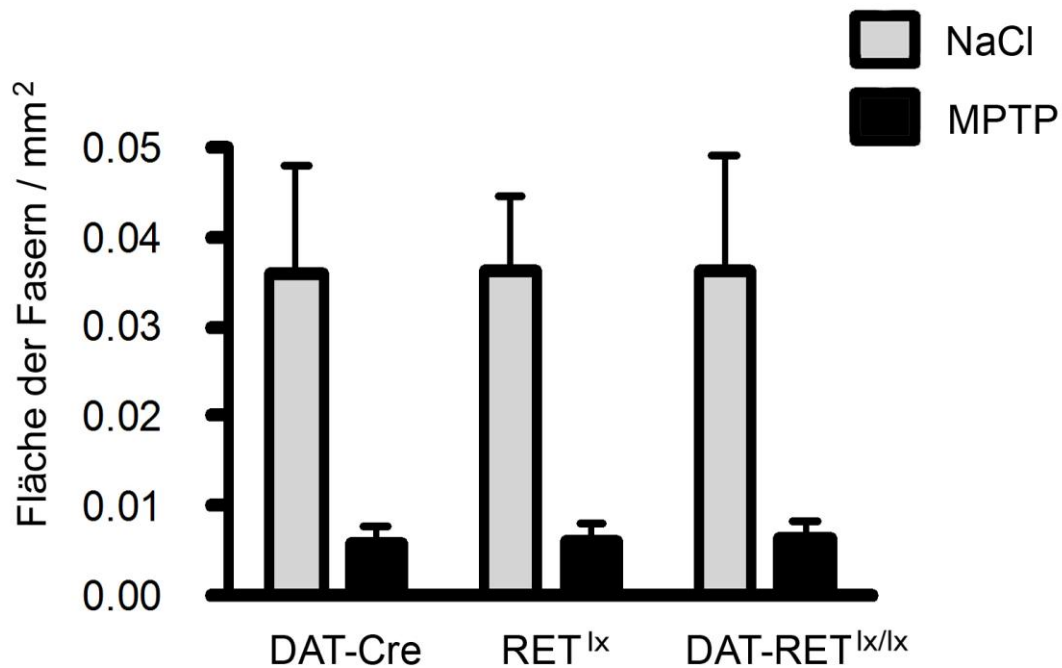


Abb. 8 Bestimmung der Anzahl (A) und Fläche (B) nigrostriataler Projektionen rostral der SNpc

Verwendet wurden drei 30 µm dicke TH-gefärbte Gehirnschnitte, ca. 120-240 µm rostral der SNpc. 14 Tage nach MPTP-Gabe kam es zu einer gleichmäßigen und deutlichen Erniedrigung in der Anzahl der Fasern (A) und der Fläche in mm² (B) aller Genotypen DAT-Cre, RET^{lox} und DAT-RET^{lox/lox}.

3.3.3 Zusammenfassung

NaCl-behandelte Mäuse zeigten sowohl in der optischen Dichte (Abb. 6 und 7) als auch in der Anzahl und Fläche der nigrostriatalen Projektionen (Abb. 8) keinen Unterschied zwischen den Genotypen DAT-Cre, RET^{lox} und DAT-RET^{lox/lox}. Somit führt die Abwesenheit von RET (DAT-RET^{lox/lox}) zu keinem Unterschied in der Ausbildung und Entwicklung von nigrostriatalen Projektionen.

14 Tage nach MPTP-Behandlung ergab die Auswertung der optischen Dichte und der nigrostriatalen Projektionen eine gleichmäßige Erniedrigung aller Genotypen. In beiden Untersuchungen konnte keine erhöhte Vulnerabilität von DAT-RET^{lox/lox} gegenüber MPTP im Vergleich zu den Genotypen DAT-Cre und RET^{lox} detektiert werden. Die Reduktion der optischen Dichte des Striatums und der nigrostriatalen Projektionen rostral der SNpc nach MPTP-Behandlung korreliert mit dem MPTP-induzierten Verlust dopaminerger Neurone der SNpc (3.2.3). Der durch endogenes

GDNF ausgelöste RET-Signalweg vermittelt keine Protektion nigrostriataler Projektionen gegenüber MPTP-Toxizität.

3.4 Veränderungen der Katecholaminkonzentrationen nach MPTP-Behandlung

Die Bestimmung der striatalen Konzentrationen von Dopamin und seiner Metabolite DOPAC und HVA erfolgte mittels HPLC 14 Tage nach der letzten MPTP-Injektion. Angegeben sind die Werte in ng/mg Nassgewebe. Eine Abnahme von striatalen Katecholaminkonzentrationen gilt als zusätzlicher Neurodegenerationsmarker bei Verlust von dopaminergen Neuronen in der SNpc.

3.4.1 Dopamin

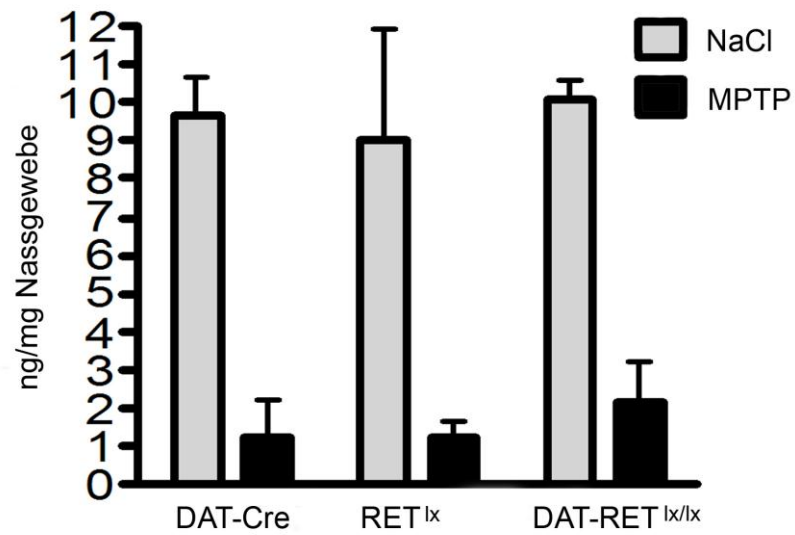
Die Bestimmung der Dopaminkonzentrationen der NaCl-behandelten Mäuse ergab keinen Unterschied zwischen den Genotypen. 14 Tage nach MPTP-Behandlung kam es bei allen Genotypen zu einer signifikanten Erniedrigung von Dopamin im Striatum (ANOVA). Die RET-defizienten Mäuse (DAT-RET^{lx/lx}) zeigten keine erhöhte Vulnerabilität gegenüber MPTP im Vergleich zu den Genotypen DAT-Cre und RET^{lx} (Abb. 9).

3.4.2 DOPAC und HVA

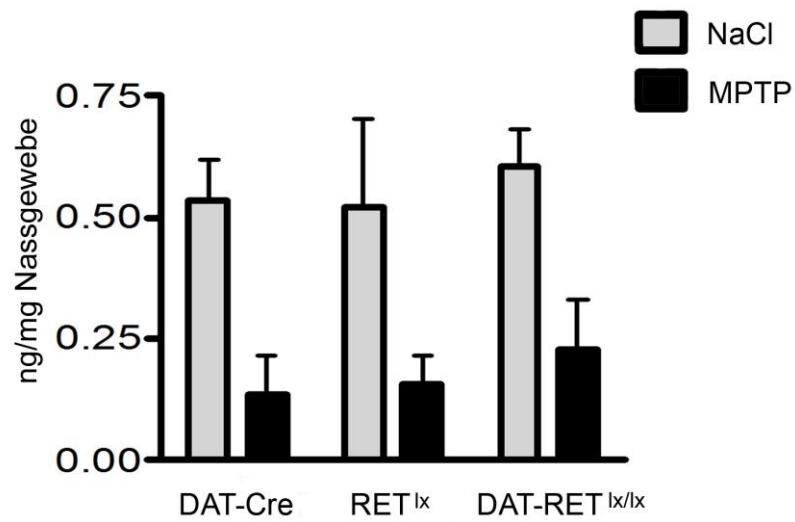
Die Konzentrationen der Dopaminmetabolite DOPAC und HVA von NaCl-behandelten Mäusen zeigten keinen Unterschied zwischen den einzelnen Genotypen DAT-Cre, RET^{lx} und DAT-RET^{lx/lx} (Abb. 9).

Es kam 14 Tage nach MPTP-Behandlung zu einer signifikanten Erniedrigung der DOPAC- und HVA-Konzentrationen (ANOVA). Diese Werte korrelieren mit den erniedrigten Dopaminkonzentrationen nach MPTP-Behandlung (Abb. 9).

A) DOPAMIN



B) DOPAC



C) HVA

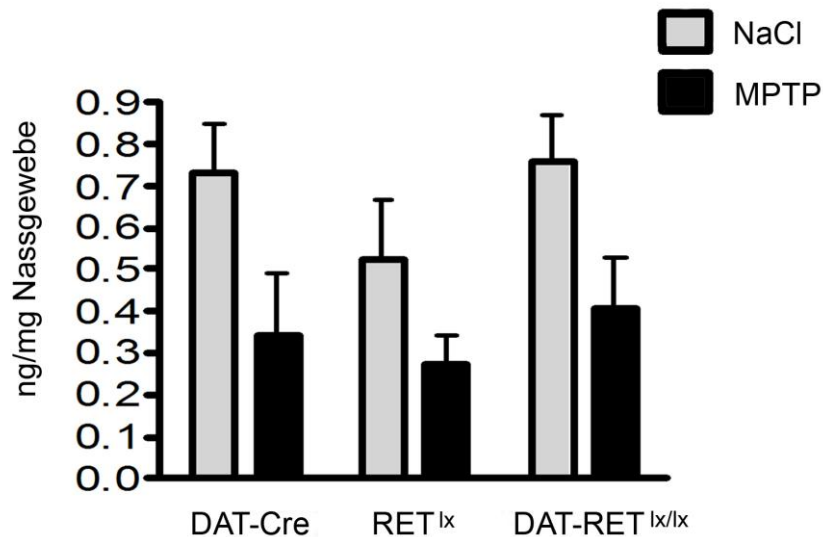


Abb. 9 Konzentrationen von Dopamin (A), DOPAC (B) und HVA (C) im Striatum

Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung in ng/mg Nassgewebe. 14 Tage nach MPTP-Injektion kam es im Vergleich zu den NaCl-behandelten Mäusen zu einer signifikanten Abnahme der Konzentrationen für Dopamin, DOPAC und HVA in allen drei Genotypen (ANOVA). Zwischen den MPTP-behandelten Genotypen konnte kein signifikanter Unterschied für Dopamin, DOPAC und HVA gemessen werden.

3.4.3 Dopaminumsatz

Läsionen des dopaminergen nigrostriatalen Systems, die mehr als $\frac{2}{3}$ der SNpc betreffen, führen zu einer erhöhten Synthese, Ausschüttung und Metabolisierung von Dopamin in den von der Schädigung nicht erfassten Neuronen. Ein Maß hierfür sind die erhöhten Dopaminmetabolite im Vergleich zum Dopamingehalt des Striatums (Hefti et al., 1980). Berechnet wird die Dopaminumsatzrate unter Berücksichtigung von DOPAC und HVA im Verhältnis zu Dopamin im Striatum.

$$\text{Dopaminumsatzrate} = [\text{DOPAC (ng/mg)} + \text{HVA (ng/mg)}] / \text{Dopamin (ng/mg)}$$

Die Auswertung ergab eine signifikante Erhöhung des Quotienten $[\text{DOPAC (ng/mg)} + \text{HVA (ng/mg)}] / \text{Dopamin (ng/mg)}$ bei allen drei Genotypen DAT-Cre, RET^{lx} und DAT-RET^{lx/lx} nach MPTP-Behandlung (Abb. 10). Der Anstieg des striatalen

Dopaminumsatzes ist ein Zeichen für den gesteigerten präsynaptischen Kompensationsmechanismus beim Verlust dopaminerger Neurone. Zwischen den einzelnen Genotypen bei NaCl- bzw. MPTP-Behandlung konnte kein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden (ANOVA).

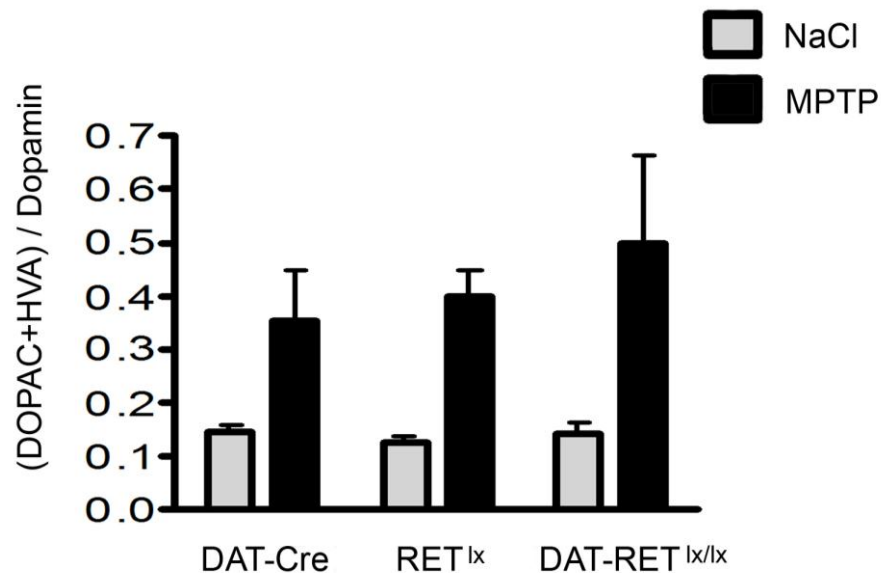


Abb. 10 Ergebnisse des Dopaminumsatzes der Genotypen DAT-Cre, RET^{lx} und DAT-RET^{lx/lx}

Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung und werden aus den vorangegangenen Werten der HPLC-Messung (Dopamin, DOPAC und HVA) nach der Formel Dopaminumsatzrate = [DOPAC (ng/mg) + HVA (ng/mg)] / Dopamin (ng/mg) berechnet. Im Vergleich zur NaCl-Gruppe ergab die Auswertung der MPTP-behandelten Tiere eine signifikante Erhöhung des striatalen Dopaminumsatzes für die Genotypen DAT-Cre, RET^{lx} und DAT-RET^{lx/lx} (ANOVA).

3.4.4 Zusammenfassung

MPTP führte zu einer deutlichen Verminderung von Dopamin und seinen Metaboliten im Striatum (Abb. 9) und zu einer Erhöhung der Dopaminumsatzrate (Abb. 10) als Ausdruck eines durch partielle Denervation ausgelösten, kompensatorisch erhöhten Dopaminumsatzes. Weiter bestand kein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Erniedrigung der Katecholaminkonzentrationen und in der Erhöhung des striatalen Dopaminumsatzes zwischen den einzelnen Genotypen.

3.5 MPTP-Metabolismus

Um mögliche Unterschiede im MPTP-Metabolismus zwischen den einzelnen Genotypen auszuschließen wurden MPP⁺-Messungen durchgeführt.

Tiere der verschiedenen Genotypen DAT-Cre, RET^{lx} und DAT-RET^{lx/lx} wurden mit 30 mg/kg KG MPTP i.p. injiziert. Die Detektion der striatalen MPP⁺-Level erfolgte mittels HPLC 90 Minuten nach MPTP-Injektion. Werte sind angegeben in ng pro mg Nassgewebe.

Bei den gemessenen Konzentrationen von MPP⁺ konnten zwischen den einzelnen Genotypen DAT-Cre (n=4; 504 ± 50,5), RET^{lx} (n=3; 544,6 ± 53,8) und DAT-RET^{lx/lx} (n=3; 501 ± 14,2) keine Unterschiede festgestellt werden (Tab. 6).

	DAT-Cre	RET^{lx}	DAT-RET^{lx/lx}
MPP⁺	504 ± 50,5	544,6 ± 53,8	501 ± 14,2

Tab. 6 Messung der MPP⁺-Konzentrationen

Angegeben sind die striatalen Konzentrationen von MPP⁺ als ng/mg Nassgewebe ± Standardabweichung. Die Messung erfolgte 90 Minuten nach MPTP-Injektion mit 30 mg/kg KG.

Die Defizienz des RET-Rezeptors (DAT-RET^{lx/lx}) führte zu keinem Unterschied im MPTP-Metabolismus (Tab. 6) gegenüber den Genotypen DAT-Cre und RET^{lx}.

4 Diskussion

Zielsetzung der Arbeit war es zu ermitteln, ob der RET-Rezeptor und physiologische Konzentrationen des Neurotrophins GDNF die Toxizität von MPTP beeinflussen und dopaminerge Neurone vor MPTP schützen. Hierfür wurde das MPTP-Mausmodell verwendet. Die spezifische Deletion von RET (DAT-RET^{lx/lx}) in den dopaminergen Neuronen der SNpc machte es möglich, den Einfluss von GDNF unter physiologischen Bedingungen im *in-vivo*-Modell zu betrachten. GDNF gilt als potenter Wachstumsfaktor, der am Überleben und an der Ausdifferenzierung von dopaminergen Neuronen beteiligt ist (Airaksinen und Saarma 2002; Lin et al. 1993).

4.1 RET-defiziente Mäuse zeigen kein Defizit in der Entwicklung von dopaminergen Neuronen

Es konnte kein Unterschied in der Anzahl der dopaminergen Neurone der SNpc (Abb. 5 und Tab. 5), in der optischen Dichte (Abb. 6 und 7) und den Katecholaminkonzentrationen des Striatums (Abb. 9) zwischen den einzelnen Genotypen der NaCl-Mäuse beobachtet werden. Die spezifische Deletion des RET-Rezeptors (DAT-RET^{lx/lx}) in dopaminergen Neuronen führte zu keinem spontanen Verlust dopaminergener Neurone und zu keinem Defizit in der Entwicklung. Auf den ersten Blick widerspricht dies den Befunden, GDNF sei ein wichtiger Wachstums- (Oo et al. 2003) und postnataler-Überlebensfaktor (Krieglstein 2004; Sariola und Saarma 2003) für dopaminerge Neurone. Mäuse mit einer kompletten Deletion für RET sind nicht lebensfähig (Sariola und Saarma 2003). Mäuse mit einer selektiven RET-Defizienz zeigen bis zu einem Alter von 12 Monaten eine normale Ausbildung des dopaminergen Systems ohne Zellverlust. Nach dem 12. Lebensmonat kommt es zu einem progressiven Verlust von TH-positiven Neuronen in der SNpc und der nigrostriatalen Projektionen (Jain et al. 2006; Kramer et al. 2007). Um eine spontane Degeneration von dopaminergen Neuronen auszuschließen, wurden Tiere mit einem Lebensalter von 12-16 Wochen untersucht. Das Fehlen eines primären Unterschieds zwischen den Genotypen erleichtert zudem den Vergleich des MPTP-Effekts in

dieser Arbeit. Der Verlust von dopaminergen Neuronen im höheren Lebensalter lässt vermuten, dass die Transduktion von GDNF über den RET-Rezeptor eher am Erhalt als am Aufbau des dopaminergen Systems beteiligt ist (Kowsky et al. 2007; Kramer et al. 2007).

Die Aktivierung des RET-Rezeptors durch GDNF benötigt die Anwesenheit von GFR α 1 (Airaksinen et al. 1999; Baloh et al. 2000). Im gesamten Zentralnervensystem (ZNS) ist GFR α 1 weitaus häufiger exprimiert als RET (Trupp et al. 1997; Yu et al. 1998). Es wird vermutet, dass GFR α 1 durch ein weiteres transmembranes Protein, unabhängig von RET, an der Modulation von intrazellulären Signalkaskaden beteiligt ist (Poteryaev et al. 1999; Trupp et al. 1999). Die Aktivierung des *Neural cell adhesion molecule* (NCAM) durch GDNF in Verbindung mit GFR α 1 führt zur Aktivierung RET-unabhängiger Signalkaskaden, die an der Migration von Schwann'schen Zellen sowie an der Modulation von axonalem und neuronalem Wachstum beteiligt sind (Paratcha et al. 2003). Ferner wird die präsynaptische GDNF-induzierte neuronale Differenzierung nicht von RET, sondern von GFR α 1 vermittelt (Ledda et al. 2007). Diese Erkenntnisse erweitern die Diskussion, dass GDNF möglicherweise auch über andere Rezeptoren als RET Überlebenssignale vermittelt.

4.2 RET-defiziente Mäuse zeigen keine erhöhte MPTP-Toxizität

Die MPP⁺-Messungen zeigten eine gleichmäßige Aufnahme von MPTP in die dopaminergen Neurone (Tab. 6). Die gewebespezifische Deletion des RET-Rezeptors führte zu keinem Unterschied im MPTP-Metabolismus. Die Behandlung mit MPTP führte zu einem signifikanten Verlust dopaminergener Neurone in der SNpc, gemessen an der Erniedrigung von TH-positiven Zellen um ca. 50% sowie der Erniedrigung von Nissl-positiven Zellen um ca. 53% bei allen verwendeten Genotypen (Tab. 5). Bei DAT-RET^{lx/lx} kommt es zu keiner erhöhten MPTP-Toxizität im Vergleich zu den Genotypen DAT-Cre und RET^{lx}. Bei einfachen Wildtypen mit einem vergleichbaren MPTP-Modell kam es ebenfalls zu einer ca. 50%-igen Reduktion in der Anzahl TH-positiver Zellen und einer ca. 54%-igen Reduktion von Nissl-positiven Zellen (Nagel et al. 2008).

Eine Überexpression von TH-DAT kann zu einer erhöhten MPTP-Toxizität führen (Donovan et al. 1999). Der DAT-Promotor wurde für die selektive Deletion des RET-Rezeptors verwendet. Westernblot-Analysen und die Auszählung von DAT-positiven Fasern vor MPTP-Gabe zeigten keinen Unterschied zwischen den einzelnen Genotypen (Kowsky et al. 2007). Demnach ist es unwahrscheinlich, dass es Faktoren gab, die den MPTP-Metabolismus beeinflusst haben.

Es wird kontrovers diskutiert, ob MPTP zu einem Untergang von dopaminergen Neuronen führt oder ob es nur zu einer Atrophie und Dysfunktion dieser Zellen kommt (Ourednik et al. 2002). Als Degenerationsmarker für den nigralen Neuronenverlust gelten die Abnahme der TH-Immunreaktivität und die Abnahme der neuronenspezifischen Nissl-Substanz. Beide Parameter müssen anfangs nicht zwingend miteinander korrelieren, da schwächer geschädigte Zellen ihre TH-Aktivität nur vorübergehend verlieren, sich aber während der nächsten Tage wieder erholen können (Jackson-Lewis et al. 1995). Das Maximum der Degeneration von nigralen Neuronen wird nach 2-7 Tagen erreicht (Sundstrom et al. 1988). Die Untersuchungen in dieser Arbeit ergaben eine gleichmäßige Erniedrigung von TH-positiven und Nissl-positiven Zellen 14 Tage nach MPTP-Injektion bei allen verwendeten Genotypen. 90 Tage nach MPTP-Behandlung zeigten sich die TH- und Nissl-positiven Zellen weiterhin erniedrigt (Kowsky et al. 2007). Als zusätzlicher Degenerationsmarker gilt die Abnahme der Katecholaminkonzentrationen im Striatum nach MPTP-Behandlung. Die Erniedrigung der Katecholaminkonzentrationen nach MPTP-Injektion in dieser Arbeit korreliert mit dem Untergang der dopaminergen Neurone. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse eine klare Degeneration der dopaminergen Neurone in der SNpc. Eine alleinige Abnahme der TH-Aktivität konnte somit ausgeschlossen werden.

4.3 GDNF und der Rezeptor RET schützen nicht vor MPTP-induzierter Toxizität dopaminergener Neurone und ihrer striatalen Projektionen

Die gleichmäßige Reduktion der dopaminergen Neurone, der optischen Dichte und der Katecholaminkonzentrationen im Striatum bei allen verwendeten Genotypen (DAT-Cre, RET^{lx} und DAT-RET^{lx/lx}) sind ein sicheres Indiz für eine MPTP-induzierte

Neurodegeneration. Somit wird die MPTP-induzierte Degeneration von dopaminergen Neuronen in der SNpc und deren striatalen Projektionen nicht durch RET-abhängige Signalkaskaden moduliert. Die Aktivierung des RET-Rezeptors durch physiologische Konzentrationen von GDNF schützt dopaminerge Neurone und deren striatale Projektionen nicht vor MPTP. Im Falle einer über den RET-Rezeptor vermittelten Neuroprotektion durch GDNF wäre es zu einer erhöhten Vulnerabilität der DAT-RET^{lx/lx}-Mäuse gegenüber MPTP gekommen. Protektive Effekte von GDNF gegenüber 6-OHDA-induziertem und Axotomie-induziertem Verlust dopaminergener Neurone gelten als unumstritten (Beck et al. 1995; Bilang-Bleuel et al. 1997; Choi-Lundberg et al. 1997). Es gibt jedoch nur wenige Studien, die einen protektiven Effekt von GDNF nach MPTP-Behandlung beschreiben (Kordower et al. 2000; Schober et al. 2007; Tomac et al. 1995). Ferner konnte nachgewiesen werden, dass die alleinige Anwesenheit von GDNF zu keinem protektiven Effekt führt. Die Protektion ist abhängig von der Anwesenheit des *transforming growth factor-β* (TGF-β) (Schober et al. 2007) und dessen Rekrutierung von GFRα1 (Peterziel et al. 2002). In Mäusen mit einem heterozygoten *Knockout* für GFRα1 kommt es vor und nach MPTP-Behandlung zu einem größeren Verlust von TH-positiven Neuronen und nigrostriatalen Projektionen im Vergleich zu Wildtypen (Boger et al. 2008). Dies verdeutlicht die Komplexität dieses Systems.

Andere Studien zeigten keinen protektiven Effekt von GDNF bei MPTP-Gabe (Dietz et al. 2006; Eberhardt et al. 2000). Bei Untersuchungen an Mäusen mit einer adenoviralen GDNF-Expression im Striatum konnte kein vermehrtes Überleben von dopaminergen Neuronen gegenüber MPTP festgestellt werden (Eberhardt et al. 2000). Dennoch zeigte sich eine Protektion gegenüber MPTP-induzierter Erniedrigung der striatalen Katecholaminkonzentrationen. Verwendet wurde ein subchronisches MPTP-Modell von 5x30 mg/kg KG, vergleichbar mit dieser Arbeit. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt wäre die Beteiligung von GDNF an der Erhaltung dopaminergener Terminalen im Striatum. Der Vergleich von Katecholaminen 14 und 90 Tage nach MPTP-Injektion zeigte einen Anstieg von Dopamin und seiner Metabolite bei den Genotypen DAT-Cre und RET^{lx} (Kowsky et al. 2007). Dieser Anstieg ließ sich bei den DAT-RET^{lx/lx} nicht feststellen. Dies lässt vermuten, dass GDNF eher an der Regeneration und der Langzeiterhaltung des dopaminergen Systems beteiligt ist als an einem Schutz der dopaminergen Neurone vor MPTP-induzierter Neurodegeneration. Diskrepanzen zwischen protektiven und nicht-

protektiven Effekten verschiedener Studien beruhen möglicherweise auf den unterschiedlichen MPTP-Schemata zur Auslösung der Neurodegeneration. Tomac et al. (1995) verwendeten zwei subkutane Injektionen mit je 40 mg/kg KG MPTP. Schober et al. (2007) verwendeten Injektionen mit 3x20 mg/kg KG i.p., während bei Kordower et al. (2000) mit einer 5x30 mg/kg KG und intraarteriellen Injektionsform gearbeitet wurde. Eine kurzfristige, hochdosierte MPTP-Gabe führt vermutlich zu einer geringeren MPTP-Toxizität, als die Verwendung eines subchronischen Injektionsregimes von 5x30 mg/kg KG MPTP in dieser Arbeit. Diese Hypothese wird unterstützt durch eine Arbeit von Cheng und Kollegen (Cheng et al. 1998), die mit einem subchronischen MPTP-Schema (35 mg/kg KG) über sieben Tage und wiederholter intrastriatler GDNF-Applikationen nur einen kleinen protektiven Effekt auf den Verlust dopaminergener Neurone der SNpc beobachten konnten, während Tomac et al. (1995) mit zwei subkutanen Injektionen (40 mg/kg KG) eine vollständige Protektion beobachten konnten. In mesenzephalen Kulturen konnte GDNF ebenfalls dopaminerge Neurone nicht vor MPP⁺-Toxizität schützen. Es kam jedoch zu einer Protektion vor weiterem Zellverlust nach Absetzen der MPP⁺-Behandlung und zu einer Wachstumsstimulation von dopaminergen Projektionen (Hou et al. 1996).

Neben GDNF werden noch weitere Neurotrophine für das Überleben und die Modulation von dopaminergen Neuronen verantwortlich gemacht. Der *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) vermittelt seine Funktion über den TrkB-Tyrosin-Kinase Rezeptor und ist im gesamten ZNS, inklusive der dopaminergen Neurone und dem Striatum, weit verbreitet (Numan und Seroogy 1999; Seroogy et al. 1994). BDNF moduliert nigrostriatale Funktionen und schützt dopaminerge Neurone bei IPS angewandten Tiermodellen (Guillin et al. 2001; Krieglstein 2004; Levivier et al. 1995). Ferner können andere Neurotrophine wie der *Conserved dopamine neurotrophic factor* (CDNF) und der *Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor* (MANF) eine weitaus größere Rolle bei der Neuroprotektion von dopaminergen Neuronen spielen als bisher angenommen (Lindholm et al. 2007; Petrova et al. 2003).

In dieser Arbeit zeigte endogenes GDNF über den RET-Signalweg keine Protektion dopaminergener Neurone und deren striatler Projektionen im MPTP-Modell. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit wäre es interessant, die Wirkung von exogen zugeführtem GDNF in RET-defizienten Mäuse zu untersuchen.

4.4 Das MPTP-Modell

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit gelten für das MPTP-Mausmodell und können im Vergleich zu anderen Modellen abweichen. Das 6-OHDA-Modell ist ebenfalls zur Erforschung des IPS geeignet. Die Behandlung mit 6-OHDA oder MPTP führen zu einem selektiven Untergang von dopaminergen Neuronen. Ihre Mechanismen sind jedoch unterschiedlich und protektive Effekte nach einer Behandlung nicht sicher miteinander vergleichbar (Eberhardt et al. 2000). Das 6-OHDA Modell eignet sich vor allem bei der Untersuchung medikamentöser Behandlungsprinzipien (Beal 2001).

Das MPTP-Mausmodell hat sich als sehr nützlich erwiesen (Heikkila und Sonsalla 1992), da es eine Vielzahl der irreversiblen klinischen, biochemischen und neuropathologischen Effekte des IPS vereinigt (Bloem et al. 1990). Es gilt daher als zuverlässiges Modell, um die Mechanismen der Degeneration von dopaminergen Neuronen zu untersuchen und Strategien zur Restauration von dopaminergen Neuronen zu entwickeln (Beal 2001; Dawson und Dawson 2002; Tatton und Kish 1997). Eine tägliche Applikation von MPTP über 5 Tage bei Mäusen führt zu einem apoptotischen Zelltod in der SNpc (Tatton und Kish 1997), während bei einer kurzfristigen Applikation (4 Injektionen im Abstand von 2 Stunden) keine apoptotischen Vorgänge gefunden werden können (Jackson-Lewis et al. 1995).

Tierexperimentelle Untersuchungen mit MPTP sind für die Grundlagenforschung unerlässlich, bleiben jedoch weiterhin ein Modell. Die Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen machen es möglich klinische Studien zur Erforschung des IPS zu entwickeln und neue Therapieansätze zu finden.

4.5 Klinische Studien mit GDNF

Aufgrund der anfänglich positiven experimentellen Befunde über einen möglichen protektiven Effekt von GDNF auf dopaminerge Neurone wurden klinische Studien an Menschen mit intrakraniell verabreichtem GDNF durchgeführt.

In zwei kleineren *Open-label*-Studien wurde GDNF direkt in das Putamen appliziert. Dies führte zu einem signifikanten Anstieg der motorischen Funktionen der UPDRS (Gill et al. 2003; Slevin et al. 2005). Dies konnte in einer randomisierten Doppelblind-

Studie nicht bestätigt werden und wurde teilweise bei einigen Patienten aufgrund von Komplikationen abgebrochen (Lang et al. 2006).

Pathologische post-mortem Untersuchungen eines Patienten mit multiplen intraventrikulären GDNF-Applikationen zeigten keine signifikante Regeneration von dopaminergen Neuronen in der SNpc (Kordower et al. 1999). Die intraventrikuläre Verabreichung von GDNF führte zu keiner Verbesserung der Symptome, sondern rief schwere Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Depressionen und Halluzinationen hervor. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Freisetzung und Diffusion von GDNF ineffizient waren (Kordower et al. 1999; Nutt et al. 2003). Ferner sollten weitere Nebenwirkungen einer intrakraniellen GDNF-Applikation berücksichtigt werden. Bei einigen Patienten kam es zur Bildung von GDNF-neutralisierenden Antikörpern sowie zu einer variablen, katheterabhängigen Diffusion von GDNF in das umliegende Gewebe (Sherer et al. 2006; Tatarewicz et al. 2007). Primaten, die einer hohen GDNF-Dosis ausgesetzt waren, zeigten unerwartete zerebelläre Neurodegenerationen (Hovland et al. 2007). Eine solche Neurotoxizität wurde in Patienten bisher noch nicht beobachtet. Für zukünftige Studien mit GDNF-Applikationen ist es wichtig, die toxikologische Wirkweise zu kennen. Weiterhin wäre zu klären, inwieweit die Verabreichungsform von GDNF die Neuroprotektion beeinflusst. Die meisten GDNF-Studien beruhen auf intrakraniellen Injektionsformen. Diese Injektionsform birgt immer ein Verletzungsrisiko umliegender Strukturen und das Risiko einer Operation. Eine systemische Applikation ist schwierig, da GDNF aufgrund seiner Molekülgröße nicht durch die Blut-Hirn-Schranke penetrieren kann (Pardridge 2002). In einer Arbeit von Dietz et al. wurde eine Methode entwickelt, um dieses Problem zu umgehen. Dabei wurde GDNF mit einem CPP fusioniert und dadurch die Blut-Hirn-Schranke überwunden. Es kam zu einer Anreicherung von GDNF in dopaminergen Neuronen. Nach einer anschließenden MPTP-Injektion (5x28 mg/kg KG) konnte jedoch kein neuroprotektiver Effekt von dopaminergen Neuronen beobachtet werden. Eine solche Verabreichungsform ist zudem immer durch die Löslichkeit des Proteins und dessen maximaler Volumendosis limitiert (Dietz et al. 2006).

4.6 Axonales *Sprouting* nach MPTP-Injektion

Sprouting bezeichnet das Auswachsen von striatalen Axonkollateralen. Mögliche Hinweise für einen solchen Prozess lieferten die Untersuchungen an RET-defizienten Mäusen 90 Tage nach MPTP-Injektion (Kowsky et al. 2007). Die Genotypen DAT-Cre und RET^{kx} zeigten einen Anstieg der striatalen TH-positiven Faserdichte und der striatalen Neurotransmitter Dopamin, DOPAC und HVA zwischen Tag 14 und Tag 90 nach MPTP-Gabe. Dieser Anstieg fehlte in RET-defizienten Mäusen (DAT-RET^{lx/lx}). Alle Genotypen zeigten jedoch eine gleichbleibende Erniedrigung von dopaminergen Neuronen und ihrer nigrostriatalen Projektionen rostral der SNpc zum Zeitpunkt von 14 und 90 Tagen nach MPTP-Injektion. Durch die Messung der nigrostriatalen Fasern rostral der SNpc konnte das Auswachsen neuer Axone von dopaminergen Neuronen der SNpc ausgeschlossen werden (Kowsky et al. 2007). GDNF vermittelt über den RET-Rezeptor die Aussprossung von Axonkollateralen im Striatum. Dies kann eine Erklärung für die Erhaltung von dopaminergen Terminalen bei adenoviraler GDNF-Überexpression sein (Eberhardt et al. 2000). Ob und welche Rolle ein solcher *Sprouting*-Prozess bei einem an IPS erkrankten Patienten spielt, bleibt bislang unklar.

4.7 Mögliche weitere Therapieoptionen des IPS

Die bisherige Therapie des IPS beschränkt sich auf die Behandlung der Symptome und die Herstellung einer weitgehend normalen physiologischen Funktion. Zur symptomatischen Therapie werden dabei heute u.a. L-DOPA, Dopaminagonisten, anticholinerge Substanzen, COMT- und MAO-B-Inhibitoren sowie NMDA-Rezeptorantagonisten eingesetzt (siehe 1.3). Der degenerative Prozess von dopaminergen Neuronen kann durch diese symptomatischen Therapieformen nicht aufgehalten werden. Der Einsatz von Neurotrophinen weckt die Hoffnung den degenerativen Verlauf aufzuhalten und eine mögliche Neuroregeneration zu fördern. Es bedarf jedoch noch weiterer Grundlagenforschung, um diese Therapieoption beim Menschen anzuwenden. Obwohl in dieser Arbeit kein neuroprotektiver Effekt nachgewiesen werden konnte, zeigt ein GDNF-vermitteltes *Sprouting* (Kowsky et al. 2007) einen möglichen therapeutischen Ansatz. Da bisherige exogen zugeführte

Verabreichungsformen zu kontroversen Ergebnissen mit Nebenwirkungen führten, sollten diese verbessert werden. Eine weitere Möglichkeit wäre eine direkte Überexpression von Neurotrophinen im Gehirn, z.B. durch viralen Gentransfer. Rekombinante adenovirale Vektoren konnten effizient zu einer Langzeit-Expression von verschiedenen Proteinen führen ohne das Überleben, die elektrophysiologischen Funktionen und das Zytoskelett zu beeinflussen (Le Gal La Salle et al. 1993; Slack und Miller 1996). Gentherapeutische Transduktion des Neurotrophins NRTN mit einem *adeno-associated type-2 vector-neurturin* (AAV2-NRTN) an Parkinson-Patienten zeigte, dass die Behandlung sicher war, gut verträglich und zu einer Verbesserung der motorischen Funktionen führte (Marks et al. 2008). Diese Ergebnisse konnten in einer Doppelblind-Phase-2-Studie nicht bestätigt werden. Es kam zu keiner signifikanten Verbesserung der motorischen Funktionen. Zudem kam es bei 13 von 38 Patienten zu einem Auftreten von schwerwiegenden unerwünschten Ereignissen (Marks et al. 2010). Obwohl lentivirale Vektoren schon mit hoher biologischer und immunologischer Sicherheit konstruiert werden, verbleibt zusätzlich eine hohe psychologische Barriere, um diese bei Patienten einzusetzen (Debyser 2003).

Nach MPTP-Injektion bei Primaten führten lentivirale Vektoren mit einer Überexpression von GDNF zu einer Verbesserung der motorischen Symptome und verhinderten die nigrostriatale Degeneration (Kordower et al. 2000; Palfi et al. 2002). Dieser Effekt konnte bei MPTP-behandelten Mäusen nicht beobachtet werden (Eberhardt et al. 2000). In diesem Zusammenhang wäre es interessant, welchen Effekt eine adenovirale Überexpression von GDNF auf die Neurodegeneration von Mäusen mit einer selektiven Deletion des RET-Rezeptors hat.

5 Zusammenfassung

Das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS) ist eine häufige altersassoziierte Erkrankung, die mit der Degeneration dopaminergener Neurone in der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) einhergeht. Der Verlust dieser Neurone führt im Verlauf zu den typischen Symptomen Akinese, Tremor, Rigor sowie posturaler Instabilität. Die derzeitige Therapie beschränkt sich auf die Behandlung der Symptome, die Degeneration der Neurone kann bisher nicht aufgehalten werden.

Endogene neurotrophe Faktoren regulieren physiologische Apoptosen während der neuronalen Entwicklung, fördern das Wachstum von neuronalen Strukturen und sind an dem postnatalen Erhalt von neuronalen Netzwerken beteiligt.

Die Aktivierung des RET (*rearranged during transfection*)-Rezeptors durch das Neurotrophin *Glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) wurde in präklinischen Untersuchungen als wichtiger Überlebensfaktor von dopaminergen Neuronen identifiziert. Klinische Studien mit GDNF führten zu widersprüchlichen Resultaten. Um die Wirkungsweise von GDNF über den RET-Rezeptor im Zusammenhang mit neuroprotektiven Eigenschaften genauer zu untersuchen, wurden tierexperimentelle Untersuchungen in einem Parkinson-Modell durchgeführt. Hierfür wurde das Neurotoxin MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin) verwendet, welches am besten die neurodegenerativen Vorgänge des IPS reproduziert. Verwendet wurden Mäuse mit einer selektiven RET-Defizienz in dopaminergen Neuronen. Hierzu wurden Mäuse mit einem geflochten Allel für RET (RET^{lx}) mit einer Mauslinie verkreuzt, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Dopamintransporter (DAT)-Promotors (DAT-Cre) exprimiert. Das Resultat ist eine gewebespezifische Deletion des RET-Rezeptors in dopaminergen Neuronen (DAT-RET^{lx/lx}).

Die Versuchstiere wurden gewichtsadaptiert an fünf aufeinander folgenden Tagen mit 30 mg/kg KG MPTP oder mit einem äquivalenten Volumen 0,9% Natriumchlorid-Lösung (NaCl) behandelt. Um die akuten Effekte von GDNF über den RET-Rezeptor auf die dopaminergen Neurone der SNpc im MPTP-Modell bewerten zu können, wurden die Mäuse 14 Tage nach MPTP-Injektion getötet. Es folgte die Bestimmung der dopaminergen Neurone in der SNpc, der optischen Faserdichte und der

Katecholaminkonzentrationen im Striatum sowie die Anzahl der striatalen Projektionen rostral der SNpc.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass Mäuse mit einer selektiven RET-Defizienz keine initialen Defizite oder spontane Degeneration von dopaminergen Neuronen aufwiesen. MPTP führte 14 Tage nach der letzten Injektion zu einem ausgeprägten Verlust dopaminergener Neurone in der SNpc, zu einer deutlichen Erniedrigung der Katecholaminkonzentrationen und der optischen Dichte im Striatum sowie zu einem Verlust von nigrostriatalen Projektionen rostral der SNpc bei allen Genotypen. Zwischen den einzelnen Genotypen bestand kein Unterschied. Die Anwesenheit von RET in den Kontrollen schützt die dopaminergen Neurone daher nicht im Vergleich zu den RET-defizienten Tieren. Daraus lässt sich folgern, dass RET-abhängige Signalkaskaden keine Protektion gegen MPTP-induzierte Degeneration dopaminergener Neurone in der SNpc vermitteln. Die Aktivierung des RET-Rezeptors durch endogenes GDNF reichte nicht aus, um dopaminerge Neurone und deren striatale Projektionen gegenüber MPTP zu schützen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der GDNF-Rezeptor RET in dem hier angewendeten MPTP-Mausmodell keine Neuroprotektion vermittelte. Dieses Ergebnis kann möglicherweise helfen, die negativen klinischen Effekte von GDNF bei Patienten mit IPS zu erklären.

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Modifizierte Darstellung der Basalganglien nach Lang und Lozano (1998), S.1132	8
Abb. 2	Modifizierte Darstellung der Basalganglien beim IPS nach Lang und Lozano (1998), S.1132.....	9
Abb. 3	Schematische Darstellung des Injektionszyklus.....	19
Abb. 4	Modifizierte Darstellung des Mausgehirns von ventral (A) mit Resektionsanteilen der Gewebeentnahme (B).....	21
Abb. 5	MPTP-induzierter Verlust von TH-positiv gefärbten Zellen in der SNpc.....	40
Abb. 6	TH-gefärbte striatale Gehirnschnitte zur Messung der optischen Dichte.....	43
Abb. 7	Bestimmung der optischen Dichte von TH-positiven Fasern des Striatums	43
Abb. 8	Bestimmung der Anzahl (A) und Fläche (B) nigrostriataler Projektionen rostral der SNpc	45
Abb. 9	Konzentrationen von Dopamin (A), DOPAC (B) und HVA (C) im Striatum.....	48
Abb. 10	Ergebnisse des Dopaminumsatzes der Genotypen DAT-Cre, RET ^{lx} und DAT-RET ^{lx/lx}	49

7 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Tabellarische Darstellung der TH-Färbung der SNpc.....	27
Tab. 2	Tabellarische Darstellung der Nissl-Färbung der SNpc.....	29
Tab. 3	Tabellarische Darstellung der striatalen TH-Färbung.....	31
Tab. 4	Tabellarische Darstellung der Entwässerungsreihe von TH-gefärbten striatalen Gehirnschnitten.....	32
Tab. 5	Stereologische Quantifizierung von TH-positiven und Nissl-positiven Zellen in der SNpc.....	40
Tab. 6	Messung der MPP ⁺ -Konzentrationen	50

8 Publikationen

Kowsky S*, Poeppelmeyer C*, Kramer ER*, Falkenburger BH, Kruse A, Klein R, Schulz JB (2007): RET signaling does not modulate MPTP toxicity but is required for regeneration of dopaminergic axon terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20049-20054

*gleichberechtigte Erstautoren

Nagel F, Falkenburger BH, Tonges L, Kowsky S, Poeppelmeyer C, Schulz JB, Bahr M, Dietz GP (2008): Tat-Hsp70 protects dopaminergic neurons in midbrain cultures and in the substantia nigra in models of Parkinson's disease. *J Neurochem* 105, 853-864

9 Literaturverzeichnis

Airaksinen MS, Saarma M (2002): The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 3, 383-394

Airaksinen MS, Titievsky A, Saarma M (1999): GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? *Mol Cell Neurosci* 13, 313-325

Akerud P, Canals JM, Snyder EY, Arenas E (2001): Neuroprotection through delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 21, 8108-8118

Alexander GE, Crutcher MD (1990): Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 13, 266-271

Andressoo JO, Saarma M (2008): Signalling mechanisms underlying development and maintenance of dopamine neurons. *Curr Opin Neurobiol* 18, 297-306

Arenas E, Trupp M, Akerud P, Ibanez CF (1995): GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo. *Neuron* 15, 1465-1473

Baloh RH, Enomoto H, Johnson EM, Jr., Milbrandt J (2000): The GDNF family ligands and receptors - implications for neural development. *Curr Opin Neurobiol* 10, 103-110

Baudet C, Pozas E, Adameyko I, Andersson E, Ericson J, Ernfors P (2008): Retrograde signaling onto Ret during motor nerve terminal maturation. *J Neurosci* 28, 963-975

Beal MF (2001): Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2, 325-334

- Beck KD, Valverde J, Alexi T, Poulsen K, Moffat B, Vandlen RA, Rosenthal A, Hefti F (1995): Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain. *Nature* 373, 339-341
- Benamer TS, Patterson J, Grosset DG, Booij J, de Bruin K, van Royen E, Speelman JD, Horstink MH, Sips HJ, Dierckx RA, et al. (2000): Accurate differentiation of parkinsonism and essential tremor using visual assessment of [123I]-FP-CIT SPECT imaging: the [123I]-FP-CIT study group. *Mov Disord* 15, 503-510
- Bergman H, Wichmann T, DeLong MR (1990): Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science* 249, 1436-1438
- Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F (1973): Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci* 20, 415-455
- Bilang-Bleuel A, Revah F, Colin P, Locquet I, Robert JJ, Mallet J, Horellou P (1997): Intrastriatal injection of an adenoviral vector expressing glial-cell-line-derived neurotrophic factor prevents dopaminergic neuron degeneration and behavioral impairment in a rat model of Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8818-8823
- Bindoff LA, Birch-Machin M, Cartlidge NE, Parker WD, Jr., Turnbull DM (1989): Mitochondrial function in Parkinson's disease. *Lancet* 2, 49
- Bloem BR, Irwin I, Buruma OJ, Haan J, Roos RA, Tetrad JW, Langston JW (1990): The MPTP model: versatile contributions to the treatment of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 97, 273-293
- Boger HA, Middaugh LD, Zaman V, Hoffer B, Granholm AC (2008): Differential effects of the dopamine neurotoxin MPTP in animals with a partial deletion of the GDNF receptor, GFR alpha1, gene. *Brain Res* 1241, 18-28
- Bohlen und Halbach Ov, Dermietzel R (1999): Methoden der Neurohistologie. 1. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin

- Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Rocca WA (1999): Incidence and distribution of parkinsonism in Olmsted County, Minnesota, 1976-1990. *Neurology* 52, 1214-1220
- Bowling AC, Beal MF (1995): Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Life Sci* 56, 1151-1171
- Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E (2003): Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24, 197-211
- Bravi D, Mouradian MM, Roberts JW, Davis TL, Sohn YH, Chase TN (1994): Wearing-off fluctuations in Parkinson's disease: contribution of postsynaptic mechanisms. *Ann Neurol* 36, 27-31
- Brocks DR (1999): Anticholinergic drugs used in Parkinson's disease: An overlooked class of drugs from a pharmacokinetic perspective. *J Pharm Pharm Sci* 2, 39-46
- Burke RE, Cadet JL, Kent JD, Karanas AL, Jackson-Lewis V (1990): An assessment of the validity of densitometric measures of striatal tyrosine hydroxylase-positive fibers: relationship to apomorphine-induced rotations in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *J Neurosci Methods* 35, 63-73
- Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ (1983): A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 4546-4550
- Cepeda C, Buchwald NA, Levine MS (1993): Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9576-9580
- Chan P, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW, Di Monte D (1991): Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain. *J Neurochem* 57, 348-351

- Cheng FC, Ni DR, Wu MC, Kuo JS, Chia LG (1998): Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced neurotoxicity in C57BL/6 mice. *Neurosci Lett* 252, 87-90
- Chiueh CC, Rauhala P (1998): Free radicals and MPTP-induced selective destruction of substantia nigra compacta neurons. *Adv Pharmacol* 42, 796-800
- Choi-Lundberg DL, Lin Q, Chang YN, Chiang YL, Hay CM, Mohajeri H, Davidson BL, Bohn MC (1997): Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy. *Science* 275, 838-841
- Cleeter MW, Cooper JM, Schapira AH (1992): Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: evidence for free radical involvement. *J Neurochem* 58, 786-789
- Cosi C, Marien M (1998): Decreases in mouse brain NAD⁺ and ATP induced by 1-methyl-4-phenyl-1, 2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): prevention by the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, benzamide. *Brain Res* 809, 58-67
- Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R (1969): L-DOPA in parkinson's syndrome. *N Engl J Med* 281, 272
- Cummings JL (1999): Understanding Parkinson disease. *JAMA* 281, 376-378
- Dauer W, Przedborski S (2003): Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39, 889-909
- Dawson TM, Dawson VL (2002): Neuroprotective and neurorestorative strategies for Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 5 Suppl, 1058-1061
- Debyser Z (2003): Biosafety of lentiviral vectors. *Curr Gene Ther* 3, 517-525
- DeLong MR (1990): Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* 13, 281-285

- DeRijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, Fratiglioni L, Lobo A, Martinez-Lage J, Trenkwalder C, et al. (2000): Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 54, S21-23
- Dexter DT, Sian J, Rose S, Hindmarsh JG, Mann VM, Cooper JM, Wells FR, Daniel SE, Lees AJ, Schapira AH, et al. (1994): Indices of oxidative stress and mitochondrial function in individuals with incidental Lewy body disease. *Ann Neurol* 35, 38-44
- Diener HC, Putzki N (2008): Leitlinien für die Diagnostik und Therapie in der Neurologie. 4. überarb. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Dietz GP, Valbuena PC, Dietz B, Meuer K, Mueller P, Weishaupt JH, Bahr M (2006): Application of a blood-brain-barrier-penetrating form of GDNF in a mouse model for Parkinson's disease. *Brain Res* 1082, 61-66
- Donovan DM, Miner LL, Perry MP, Revay RS, Sharpe LG, Przedborski S, Kostic V, Philpot RM, Kirstein CL, Rothman RB, et al. (1999): Cocaine reward and MPTP toxicity: alteration by regional variant dopamine transporter overexpression. *Brain Res Mol Brain Res* 73, 37-49
- Durbec P, Marcos-Gutierrez CV, Kilkenny C, Grigoriou M, Wartiovaara K, Suvanto P, Smith D, Ponder B, Costantini F, Saarma M, et al. (1996): GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature* 381, 789-793
- Eberhardt O, Schulz JB (2003): Apoptotic mechanisms and antiapoptotic therapy in the MPTP model of Parkinson's disease. *Toxicol Lett* 139, 135-151
- Eberhardt O, Coelln RV, Kugler S, Lindenau J, Rathke-Hartlieb S, Gerhardt E, Haid S, Isenmann S, Gravel C, Srinivasan A, et al. (2000): Protection by synergistic effects of adenovirus-mediated X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis and glial cell line-derived neurotrophic factor gene transfer in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 20, 9126-9134

- Elizan TS, Yahr MD, Moros DA, Mendoza MR, Pang S, Bodian CA (1989): Selegiline as an adjunct to conventional levodopa therapy in Parkinson's disease. Experience with this type B monoamine oxidase inhibitor in 200 patients. *Arch Neurol* 46, 1280-1283
- Engelender S, Kaminsky Z, Guo X, Sharp AH, Amaravi RK, Kleiderlein JJ, Margolis RL, Troncoso JC, Lanahan AA, Worley PF, et al. (1999): Synphilin-1 associates with alpha-synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions. *Nat Genet* 22, 110-114
- Fahn S (1999): Parkinson disease, the effect of levodopa, and the ELLDOPA trial. Earlier vs Later L-DOPA. *Arch Neurol* 56, 529-535
- Fahn S, Cohen G (1992): The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol* 32, 804-812
- Fahn S, Sulzer D (2004): Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. *NeuroRx* 1, 139-154
- Fahn S, Oakes D, Shoulson I, Kieburtz K, Rudolph A, Lang A, Olanow CW, Tanner C, Marek K (2004): Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N Engl J Med* 351, 2498-2508
- Fearnley JM, Lees AJ (1991): Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114, 2283-2301
- Forno LS, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW (1993): Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonism and Parkinson's disease. Neuropathologic considerations. *Adv Neurol* 60, 600-608
- Gash DM, Zhang Z, Ovidia A, Cass WA, Yi A, Simmerman L, Russell D, Martin D, Lapchak PA, Collins F, et al. (1996): Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature* 380, 252-255
- Gasser T (2005): Genetics of Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 18, 363-369

- Gelb DJ, Oliver E, Gilman S (1999): Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol* 56, 33-39
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Jr., Sibley DR (1990): D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250, 1429-1432
- Gerlach M, Youdim MB, Riederer P (1996): Pharmacology of selegiline. *Neurology* 47, S137-145
- German DC, Nelson EL, Liang CL, Speciale SG, Sinton CM, Sonsalla PK (1996): The neurotoxin MPTP causes degeneration of specific nucleus A8, A9 and A10 dopaminergic neurons in the mouse. *Neurodegeneration* 5, 299-312
- Gibb WR, Lees AJ (1988): The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51, 745-752
- Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, Brooks DJ, Svendsen CN, Heywood P (2003): Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med* 9, 589-595
- Guillin O, Diaz J, Carroll P, Griffon N, Schwartz JC, Sokoloff P (2001): BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioural sensitization. *Nature* 411, 86-89
- Hartmann A, Hunot S, Michel PP, Muriel MP, Vyas S, Faucheux BA, Mouatt-Prigent A, Turmel H, Srinivasan A, Ruberg M, et al. (2000): Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2875-2880
- Hefti F, Melamed E, Wurtman RJ (1980): Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization. *Brain Res* 195, 123-137
- Heikkila RE, Sonsalla PK (1992): The MPTP-treated mouse as a model of parkinsonism: how good is it? *Neurochem Int* 20 Suppl, 299S-303S

- Heikkila RE, Nicklas WJ, Vyas I, Duvoisin RC (1985): Dopaminergic toxicity of rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion after their stereotaxic administration to rats: implication for the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. *Neurosci Lett* 62, 389-394
- Heinonen EH, Rinne UK (1989): Selegiline in the treatment of Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand Suppl* 126, 103-111
- Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA, Davies AM, Lemeulle C, Armanini M, Simmons L, Moffet B, Vandlen RA, Simpson LC, et al. (1994): GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science* 266, 1062-1064
- Hou JG, Lin LF, Mytilineou C (1996): Glial cell line-derived neurotrophic factor exerts neurotrophic effects on dopaminergic neurons in vitro and promotes their survival and regrowth after damage by 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J Neurochem* 66, 74-82
- Hovland DN, Jr., Boyd RB, Butt MT, Engelhardt JA, Moxness MS, Ma MH, Emery MG, Ernst NB, Reed RP, Zeller JR, et al. (2007): Six-month continuous intraputamenal infusion toxicity study of recombinant methionyl human glial cell line-derived neurotrophic factor (r-metHuGDNF) in rhesus monkeys. *Toxicol Pathol* 35, 1013-1029
- Hughes AJ, Ben-Shlomo Y, Daniel SE, Lees AJ (2001): What features improve the accuracy of clinical diagnosis in Parkinson's disease: a clinicopathologic study. 1992. *Neurology* 57, S34-38
- Jackson-Lewis V, Jakowec M, Burke RE, Przedborski S (1995): Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegeneration* 4, 257-269
- Jain S, Golden JP, Wozniak D, Pehek E, Johnson EM, Jr., Milbrandt J (2006): RET is dispensable for maintenance of midbrain dopaminergic neurons in adult mice. *J Neurosci* 26, 11230-11238

- Janetzky B, Hauck S, Youdim MB, Riederer P, Jellinger K, Pantucek F, Zochling R, Boissl KW, Reichmann H (1994): Unaltered aconitase activity, but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 169, 126-128
- Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH (1985): Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 2173-2177
- Javoy-Agid F, Agid Y (1980): Is the mesocortical dopaminergic system involved in Parkinson disease? *Neurology* 30, 1326-1330
- Jenner P, Olanow CW (2006): The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease. *Neurology* 66, S24-36
- Joel D, Weiner I (1997): The connections of the primate subthalamic nucleus: indirect pathways and the open-interconnected scheme of basal ganglia-thalamocortical circuitry. *Brain Res Brain Res Rev* 23, 62-78
- Johnson RG, Jr. (1988): Accumulation of biological amines into chromaffin granules: a model for hormone and neurotransmitter transport. *Physiol Rev* 68, 232-307
- Kaplan DR, Miller FD (2000): Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10, 381-391
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995): Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 18, 527-535
- Kebabian JW, Calne DB (1979): Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277, 93-96
- Kirik D, Georgievska B, Bjorklund A (2004): Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson disease. *Nat Neurosci* 7, 105-110

- Kordower JH, Palfi S, Chen EY, Ma SY, Sendera T, Cochran EJ, Mufson EJ, Penn R, Goetz CG, Comella CD (1999): Clinicopathological findings following intraventricular glial-derived neurotrophic factor treatment in a patient with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 46, 419-424
- Kordower JH, Emborg ME, Bloch J, Ma SY, Chu Y, Leventhal L, McBride J, Chen EY, Palfi S, Roitberg BZ, et al. (2000): Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science* 290, 767-773
- Kornhuber J, Weller M (1997): Psychogenicity and N-methyl-D-aspartate receptor antagonism: implications for neuroprotective pharmacotherapy. *Biol Psychiatry* 41, 135-144
- Kowall NW, Hantraye P, Brouillet E, Beal MF, McKee AC, Ferrante RJ (2000): MPTP induces alpha-synuclein aggregation in the substantia nigra of baboons. *Neuroreport* 11, 211-213
- Kowsky S, Poppelmeyer C, Kramer ER, Falkenburger BH, Kruse A, Klein R, Schulz JB (2007): RET signaling does not modulate MPTP toxicity but is required for regeneration of dopaminergic axon terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20049-20054
- Kramer ER, Knott L, Su F, Dessaud E, Krull CE, Helmbacher F, Klein R (2006): Cooperation between GDNF/Ret and ephrinA/EphA4 signals for motor-axon pathway selection in the limb. *Neuron* 50, 35-47
- Kramer ER, Aron L, Ramakers GM, Seitz S, Zhuang X, Beyer K, Smidt MP, Klein R (2007): Absence of Ret signaling in mice causes progressive and late degeneration of the nigrostriatal system. *PLoS Biol* 5, e39
- Kriegstein K (2004): Factors promoting survival of mesencephalic dopaminergic neurons. *Cell Tissue Res* 318, 73-80
- Lang AE, Lozano AM (1998): Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med* 339, 1130-1143

- Lang AE, Gill S, Patel NK, Lozano A, Nutt JG, Penn R, Brooks DJ, Hotton G, Moro E, Heywood P, et al. (2006): Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Ann Neurol* 59, 459-466
- Langston JW, Ballard P (1984): Parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): implications for treatment and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Can J Neurol Sci* 11, 160-165
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I (1983): Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219, 979-980
- Langston JW, Forno LS, Tetrud J, Reeves AG, Kaplan JA, Karluk D (1999): Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol* 46, 598-605
- Larkin M (1999): Parkinson's disease research moves on briskly. *Lancet* 353, 566
- Le Gal La Salle G, Robert JJ, Berrard S, Ridoux V, Stratford-Perricaudet LD, Perricaudet M, Mallet J (1993): An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain. *Science* 259, 988-990
- Ledda F, Paratcha G, Sandoval-Guzman T, Ibanez CF (2007): GDNF and GFRalpha1 promote formation of neuronal synapses by ligand-induced cell adhesion. *Nat Neurosci* 10, 293-300
- Levi-Montalcini R (1987): The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237, 1154-1162.
- Levivier M, Przedborski S, Bencsics C, Kang UJ (1995): Intrastratial implantation of fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 15, 7810-7820

- Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F (1993): GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260, 1130-1132
- Lindholm P, Voutilainen MH, Lauren J, Peranen J, Leppanen VM, Andressoo JO, Lindahl M, Janhunen S, Kalkkinen N, Timmusk T, et al. (2007): Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. *Nature* 448, 73-77
- Maher NE, Currie LJ, Lazzarini AM, Wilk JB, Taylor CA, Saint-Hilaire MH, Feldman RG, Golbe LI, Wooten GF, Myers RH (2002): Segregation analysis of Parkinson disease revealing evidence for a major causative gene. *Am J Med Genet* 109, 191-197
- Marini AM, Lipsky RH, Schwartz JP, Kopin IJ (1992): Accumulation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in cultured cerebellar astrocytes. *J Neurochem* 58, 1250-1258
- Markey SP, Johannessen JN, Chiueh CC, Burns RS, Herkenham MA (1984): Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature* 311, 464-467
- Marks WJ, Jr., Ostrem JL, Verhagen L, Starr PA, Larson PS, Bakay RA, Taylor R, Cahn-Weiner DA, Stoessl AJ, Olanow CW, et al. (2008): Safety and tolerability of intraputaminial delivery of CERE-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. *Lancet Neurol* 7, 400-408
- Marks WJ, Jr., Bartus RT, Siffert J, Davis CS, Lozano A, Boulis N, Vitek J, Stacy M, Turner D, Verhagen L, et al. (2010): Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol* 9, 1164-1172
- Mayer RA, Kindt MV, Heikkila RE (1986): Prevention of the nigrostriatal toxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by inhibitors of 3,4-dihydroxyphenylethylamine transport. *J Neurochem* 47, 1073-1079

- Mayeux R, Denaro J, Hemenegildo N, Marder K, Tang MX, Cote LJ, Stern Y (1992): A population-based investigation of Parkinson's disease with and without dementia. Relationship to age and gender. *Arch Neurol* 49, 492-497
- Merello M, Lees AJ, Webster R, Bovingdon M, Gordin A (1994): Effect of entacapone, a peripherally acting catechol-O-methyltransferase inhibitor, on the motor response to acute treatment with levodopa in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 57, 186-189
- Myllyla VV, Kultalahti ER, Haapaniemi H, Leinonen M (2001): Twelve-month safety of entacapone in patients with Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 8, 53-60
- Nagel F, Falkenburger BH, Tonges L, Kowsky S, Poppelmeyer C, Schulz JB, Bahr M, Dietz GP (2008): Tat-Hsp70 protects dopaminergic neurons in midbrain cultures and in the substantia nigra in models of Parkinson's disease. *J Neurochem* 105, 853-864
- Nicklas WJ, Youngster SK, Kindt MV, Heikkila RE (1987): MPTP, MPP+ and mitochondrial function. *Life Sci* 40, 721-729
- Numan S, Seroogy KB (1999): Expression of trkB and trkC mRNAs by adult midbrain dopamine neurons: a double-label in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 403, 295-308
- Nutt JG, Burchiel KJ, Comella CL, Jankovic J, Lang AE, Laws ER, Jr., Lozano AM, Penn RD, Simpson RK, Jr., Stacy M, et al. (2003): Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. *Neurology* 60, 69-73
- O'Callaghan JP, Miller DB, Reinhard JF, Jr. (1990): Characterization of the origins of astrocyte response to injury using the dopaminergic neurotoxicant, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Brain Res* 521, 73-80
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Rodriguez M, Lanciego JL, Artieda J, Gonzalo N, Olanow CW (2000): Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 23, S8-19

- Oertel WH, Wolters E, Sampaio C, Gimenez-Roldan S, Bergamasco B, Dujardin M, Grosset DG, Arnold G, Leenders KL, Hundemer HP, et al. (2006): Pergolide versus levodopa monotherapy in early Parkinson's disease patients: The PELMOPET study. *Mov Disord* 21, 343-353
- Olanow CW (2007): The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease--2007. *Mov Disord* 22 Suppl 17, S335-342
- Oo TF, Kholodilov N, Burke RE (2003): Regulation of natural cell death in dopaminergic neurons of the substantia nigra by striatal glial cell line-derived neurotrophic factor in vivo. *J Neurosci* 23, 5141-5148
- Ourednik J, Ourednik V, Lynch WP, Schachner M, Snyder EY (2002): Neural stem cells display an inherent mechanism for rescuing dysfunctional neurons. *Nat Biotechnol* 20, 1103-1110
- Palfi S, Leventhal L, Chu Y, Ma SY, Emborg M, Bakay R, Deglon N, Hantraye P, Aebischer P, Kordower JH (2002): Lentivirally delivered glial cell line-derived neurotrophic factor increases the number of striatal dopaminergic neurons in primate models of nigrostriatal degeneration. *J Neurosci* 22, 4942-4954
- Paratcha G, Ledda F, Ibanez CF (2003): The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell* 113, 867-879
- Pardridge WM (2002): Neurotrophins, neuroprotection and the blood-brain barrier. *Curr Opin Investig Drugs* 3, 1753-1757
- Paxinos G, Franklin KBJ (2004): *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. Second Edition*; Elsevier Science, San Diego, USA
- Pennathur S, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Heinecke JW (1999): Mass spectrometric quantification of 3-nitrotyrosine, ortho-tyrosine, and o,o'-dityrosine in brain tissue of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine-treated mice, a model of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Biol Chem* 274, 34621-34628

- Peterziel H, Unsicker K, Kriegstein K (2002): TGFbeta induces GDNF responsiveness in neurons by recruitment of GFRalpha1 to the plasma membrane. *J Cell Biol* 159, 157-167
- Petrova P, Raibekas A, Pevsner J, Vigo N, Anafi M, Moore MK, Peaire AE, Shridhar V, Smith DI, Kelly J, et al. (2003): MANF: a new mesencephalic, astrocyte-derived neurotrophic factor with selectivity for dopaminergic neurons. *J Mol Neurosci* 20, 173-188
- Poteryaev D, Titievsky A, Sun YF, Thomas-Crusells J, Lindahl M, Billaud M, Arumae U, Saarma M (1999): GDNF triggers a novel ret-independent Src kinase family-coupled signaling via a GPI-linked GDNF receptor alpha1. *FEBS Lett* 463, 63-66
- Przedborski S, Jackson-Lewis V (1998): Mechanisms of MPTP toxicity. *Mov Disord* 13 Suppl 1, 35-38
- Przedborski S, Vila M (2003): The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991, 189-198
- Przedborski S, Jackson-Lewis V, Djaldetti R, Liberatore G, Vila M, Vukosavic S, Almer G (2000): The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism. *Restor Neurol Neurosci* 16, 135-142
- Przedborski S, Jackson-Lewis V, Naini AB, Jakowec M, Petzinger G, Miller R, Akram M (2001): The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. *J Neurochem* 76, 1265-1274
- Ramsay RR, Krueger MJ, Youngster SK, Gluck MR, Casida JE, Singer TP (1991): Interaction of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) and its analogs with the rotenone/piericidin binding site of NADH dehydrogenase. *J Neurochem* 56, 1184-1190

- Ransom BR, Kunis DM, Irwin I, Langston JW (1987): Astrocytes convert the parkinsonism inducing neurotoxin, MPTP, to its active metabolite, MPP+. *Neurosci Lett* 75, 323-328
- Rascol O, Goetz C, Koller W, Poewe W, Sampaio C (2002): Treatment interventions for Parkinson's disease: an evidence based assessment. *Lancet* 359, 1589-1598
- Rascol O, Payoux P, Ory F, Ferreira JJ, Brefel-Courbon C, Montastruc JL (2003): Limitations of current Parkinson's disease therapy. *Ann Neurol* 53 Suppl 3, S3-12; discussion S12-15
- Riddle EL, Fleckenstein AE, Hanson GR (2005): Role of monoamine transporters in mediating psychostimulant effects. *AAPS J* 7, E847-851
- Rinne JO, Laihinen A, Rinne UK, Nagren K, Bergman J, Ruotsalainen U (1993): PET study on striatal dopamine D2 receptor changes during the progression of early Parkinson's disease. *Mov Disord* 8, 134-138
- Rinne JO, Laihinen A, Nagren K, Bergman J, Solin O, Haaparanta M, Ruotsalainen U, Rinne UK (1990): PET demonstrates different behaviour of striatal dopamine D-1 and D-2 receptors in early Parkinson's disease. *J Neurosci Res* 27, 494-499
- Rossetti ZL, Sotgiu A, Sharp DE, Hadjiconstantinou M, Neff NH (1988): 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and free radicals in vitro. *Biochem Pharmacol* 37, 4573-4574
- Ruottinen HM, Rinne UK (1996): Entacapone prolongs levodopa response in a one month double blind study in parkinsonian patients with levodopa related fluctuations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 60, 36-40
- Russ H, Staust K, Martel F, Gliese M, Schomig E (1996): The extraneuronal transporter for monoamine transmitters exists in cells derived from human central nervous system glia. *Eur J Neurosci* 8, 1256-1264

- Salach JI, Singer TP, Castagnoli N, Jr., Trevor A (1984): Oxidation of the neurotoxic amine 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) by monoamine oxidases A and B and suicide inactivation of the enzymes by MPTP. *Biochem Biophys Res Commun* 125, 831-835
- Saporito MS, Thomas BA, Scott RW (2000): MPTP activates c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) and its upstream regulatory kinase MKK4 in nigrostriatal neurons in vivo. *J Neurochem* 75, 1200-1208
- Saporito MS, Brown EM, Miller MS, Carswell S (1999): CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of c-jun N-terminal kinase activation, attenuates the 1-methyl-4-phenyl tetrahydropyridine-mediated loss of nigrostriatal dopaminergic neurons In vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 288, 421-427
- Sariola H, Saarma M (2003): Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci* 116, 3855-3862
- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD (1990): Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 54, 823-827
- Schiel SJ (2004): Untersuchung eines möglichen Neuroprotektiven Effektes der Kainsäure- und Chinolinsäureläsion des Nucleus subthalamicus auf dopaminerge Neurone der Substantia nigra im 6-Hydroxydopamin- und im 3-Nitropropionsäure-Parkinson-Tiermodell der Ratte. *Med. Diss. Marburg*
- Schober A, Peterziel H, von Bartheld CS, Simon H, Krieglstein K, Unsicker K (2007): GDNF applied to the MPTP-lesioned nigrostriatal system requires TGF-beta for its neuroprotective action. *Neurobiol Dis* 25, 378-391
- Schrag A, Ben-Shlomo Y, Quinn N (2002): How valid is the clinical diagnosis of Parkinson's disease in the community? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 73, 529-534
- Schulz JB (2006): Anti-apoptotic gene therapy in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 467-476

- Schulz JB, Falkenburger BH (2004): Neuronal pathology in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res* 318, 135-147
- Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J (2000): Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* 267, 4904-4911
- Schulz JB, Klockgether T, Petersen D, Jauch M, Muller-Schauenburg W, Spieker S, Voigt K, Dichgans J (1994): Multiple system atrophy: natural history, MRI morphology, and dopamine receptor imaging with ¹²³I-BZM-SPECT. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 57, 1047-1056
- Schulz JB, Skalej M, Wedekind D, Luft AR, Abele M, Voigt K, Dichgans J, Klockgether T (1999): Magnetic resonance imaging-based volumetry differentiates idiopathic Parkinson's syndrome from multiple system atrophy and progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol* 45, 65-74
- Schwarz J, Tatsch K, Arnold G, Ott M, Trenkwalder C, Kirsch CM, Oertel WH (1993): ¹²³I-iodobenzamide-SPECT in 83 patients with de novo parkinsonism. *Neurology* 43, S17-20
- Scotcher KP, Irwin I, DeLanney LE, Langston JW, Di Monte D (1990): Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion on ATP levels of mouse brain synaptosomes. *J Neurochem* 54, 1295-1301
- Seroogy KB, Lundgren KH, Tran TM, Guthrie KM, Isackson PJ, Gall CM (1994): Dopaminergic neurons in rat ventral midbrain express brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs. *J Comp Neurol* 342, 321-334
- Sherer TB, Fiske BK, Svendsen CN, Lang AE, Langston JW (2006): Crossroads in GDNF therapy for Parkinson's disease. *Mov Disord* 21, 136-141
- Sian J, Gerlach M, Youdim MB, Riederer P (1999): Parkinson's disease: a major hypokinetic basal ganglia disorder. *J Neural Transm* 106, 443-476

- Singer TP, Salach JI, Castagnoli N, Jr., Trevor A (1986): Interactions of the neurotoxic amine 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine with monoamine oxidases. *Biochem J* 235, 785-789
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, et al. (2003): alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302, 841
- Slack RS, Miller FD (1996): Viral vectors for modulating gene expression in neurons. *Curr Opin Neurobiol* 6, 576-583
- Slevin JT, Gerhardt GA, Smith CD, Gash DM, Kryscio R, Young B (2005): Improvement of bilateral motor functions in patients with Parkinson disease through the unilateral intraputaminial infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosurg* 102, 216-222
- Smith AD, Bolam JP (1990): The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends Neurosci* 13, 259-265
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997): Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388, 839-840
- Sugama S, Yang L, Cho BP, DeGiorgio LA, Lorenzl S, Albers DS, Beal MF, Volpe BT, Joh TH (2003): Age-related microglial activation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurodegeneration in C57BL/6 mice. *Brain Res* 964, 288-294
- Sundstrom E, Luthman J, Goldstein M, Jonsson G (1988): Time course of MPTP-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine system in C57 BL/6 mice. *Brain Res Bull* 21, 257-263
- Sveinbjornsdottir S, Hicks AA, Jonsson T, Petursson H, Gugmundsson G, Frigge ML, Kong A, Gulcher JR, Stefansson K (2000): Familial aggregation of Parkinson's disease in Iceland. *N Engl J Med* 343, 1765-1770

- Tatarewicz SM, Wei X, Gupta S, Masterman D, Swanson SJ, Moxness MS (2007): Development of a maturing T-cell-mediated immune response in patients with idiopathic Parkinson's disease receiving r-metHuGDNF via continuous intraputaminaal infusion. *J Clin Immunol* 27, 620-627
- Tatton NA, Kish SJ (1997): In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining. *Neuroscience* 77, 1037-1048
- Tatton NA, Maclean-Fraser A, Tatton WG, Perl DP, Olanow CW (1998): A fluorescent double-labeling method to detect and confirm apoptotic nuclei in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 44, S142-148
- Thanvi BR, Lo TC (2004): Long term motor complications of levodopa: clinical features, mechanisms, and management strategies. *Postgrad Med J* 80, 452-458
- Thomas B, Beal MF (2007): Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 16 Spec No. 2, R183-194
- Tomac A, Lindqvist E, Lin LF, Ogren SO, Young D, Hoffer BJ, Olson L (1995): Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature* 373, 335-339
- Trimmer PA, Smith TS, Jung AB, Bennett JP, Jr. (1996): Dopamine neurons from transgenic mice with a knockout of the p53 gene resist MPTP neurotoxicity. *Neurodegeneration* 5, 233-239
- Trupp M, Belluardo N, Funakoshi H, Ibanez CF (1997): Complementary and overlapping expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), c-ret proto-oncogene, and GDNF receptor-alpha indicates multiple mechanisms of trophic actions in the adult rat CNS. *J Neurosci* 17, 3554-3567
- Trupp M, Scott R, Whittemore SR, Ibanez CF (1999): Ret-dependent and -independent mechanisms of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling in neuronal cells. *J Biol Chem* 274, 20885-20894

- Trupp M, Ryden M, Jornvall H, Funakoshi H, Timmusk T, Arenas E, Ibanez CF (1995): Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. *J Cell Biol* 130, 137-148
- Trupp M, Arenas E, Fainzilber M, Nilsson AS, Sieber BA, Grigoriou M, Kilkenny C, Salazar-Grueso E, Pachnis V, Arumae U (1996): Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene. *Nature* 381, 785-789
- Twelves D, Perkins KS, Counsell C (2003): Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. *Mov Disord* 18, 19-31
- Varastet M, Riche D, Maziere M, Hantraye P (1994): Chronic MPTP treatment reproduces in baboons the differential vulnerability of mesencephalic dopaminergic neurons observed in Parkinson's disease. *Neuroscience* 63, 47-56
- Varrone A, Marek KL, Jennings D, Innis RB, Seibyl JP (2001): [(123)I]beta-CIT SPECT imaging demonstrates reduced density of striatal dopamine transporters in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Mov Disord* 16, 1023-1032
- Vila M, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Djaldetti R, Liberatore G, Offen D, Korsmeyer SJ, Przedborski S (2001): Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2837-2842
- Volkman J (2004): Deep brain stimulation for the treatment of Parkinson's disease. *J Clin Neurophysiol* 21, 6-17
- Warner TT, Schapira AH (2003): Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53 Suppl 3, S16-23; discussion S23-15
- West MJ (1993): New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol Aging* 14, 275-285

- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ (1991): Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 231, 482-497
- Wichmann T, DeLong MR (1993): Pathophysiology of parkinsonian motor abnormalities. *Adv Neurol* 60, 53-61
- Wichmann T, Bergman H, DeLong MR (1994): The primate subthalamic nucleus. III. Changes in motor behavior and neuronal activity in the internal pallidum induced by subthalamic inactivation in the MPTP model of parkinsonism. *J Neurophysiol* 72, 521-530
- Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y (1996): Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2696-2701
- Yu T, Scully S, Yu Y, Fox GM, Jing S, Zhou R (1998): Expression of GDNF family receptor components during development: implications in the mechanisms of interaction. *J Neurosci* 18, 4684-4696
- Zhou FM, Wilson CJ, Dani JA (2002): Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *J Neurobiol* 53, 590-605
- Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan M, Uitti RJ, Calne DB, et al. (2004): Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 44, 601-607

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Jörg B. Schulz für die Bereitstellung meines Dissertationsthemas und die Unterstützung im Erlernen und Anwenden von eigenständigem wissenschaftlichen Arbeiten.

Ebenfalls bedanke ich mich herzlich bei Dr. med. Björn Falkenburger für die exzellente Betreuung während der gesamten Dissertation. Das unermüdliche Engagement und die Unterstützung auf allen Ebenen machten diese Arbeit erst möglich.

Ich möchte mich bei Dr. Edgar R. Kramer (Max-Planck Institut für Neurobiologie, Martinsried, Deutschland) für die Bereitstellung der Versuchstiere und für die gute und freundliche Zusammenarbeit bei der Erstellung der veröffentlichten Arbeit bedanken.

Es gilt ein großer Dank den Mitarbeitern des Instituts für Neurodegeneration und Neurorestaurationsforschung, insbesondere Cathy Ludwig, Dr. rer. nat. Ellen Gerhardt, Christiane Fahlbusch, Annette Bennemann, Dr.med. Arno Reich für das angenehme Arbeitsklima und die Unterstützung während der wissenschaftlichen Laborarbeit.

Als letztes gebührt ein großer Dank Charlotte Pöppelmeyer für die gute Zusammenarbeit während des Projektes und der gemeinsamen Veröffentlichung.

