

**Entwicklung einer fokalen Dystonie durch periphere  
Nervenschädigung in *Tor1a* +/- Mäusen**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Burak Baris Kusche-Tekin  
aus Dietenheim

Würzburg, 08.08.2017

# Referentenblatt

Referent: Priv.-Doz. Dr. Chi Wang Ip  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Sendtner  
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2018

Der Promovend ist Zahnarzt.

*Sema, Anneanne, Valentina und Manfred*

## **Verwendete Abkürzungen und Begriffe**

°C	Grad Celcius
µl	Mikroliter
µl/g	Mikroliter pro Gramm
AMPT	Alpha-methyl-p-Tyrosin
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CD11b+	Makrophagen und Mikroglia marker
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
D1-D5 -Rezeptor	Dopamin-Rezeptoren D1 bis D5
DA	Dopamin
DAB	Diaminobenzidin
DAT	Dopamintransporter
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
DOPAC	3, 4-Dihydroxyphenylelessigsäure
DRD	L-Dopa-responsive Dystonie
DYT1	Dystonie 1
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F4/80+	Makrophagen und Mikroglia marker
g	Gramm
GABA	γ-Aminobuttersäure
GAG	Glykosaminoglykan
GLUT1	Glucose-Transporter 1
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HVA	Homovanillinsäure
i.p.	intraperitoneal
L2-L4	Rückenmarkssegment lumbal 2 bis 4
LAP1	Lamin-assoziiertes Protein 1
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
m	Meter

## Verwendete Abkürzungen und Begriffe

---

M	Mol
M.	Musculus
MAO-B	Monoaminoxidase-B
max.	maximal
MPZ	Myelinprotein Zero
mg	Milligramm
mg/kg KG	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht
min.	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid
Ncl.	Nucleus
NF	Neurofilament
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PRKRA	Proteinkinase-Interferon induzierbarer doppelsträngiger RNA abhängiger Aktivator
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SEM	Standardfehler
SGCE	Epsilonsarcoglycan
SLC2A1	Solute-Carrier-Protein 2A1
THAP1	Thanatos-Apoptose-assoziiertes Protein 1
<i>Tor1a</i> -Gen	Torsin1a - Gen
vs.	versus
wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	<b>Dystonie</b> .....	1
1.2	<b>Das motorische Nervensystem</b> .....	14
1.2.1	Anatomische Strukturen .....	14
1.2.2	Die zentrale Rolle von Dopamin .....	16
1.3	<b>TorsinA</b> .....	18
1.4	<b>Zielsetzung</b> .....	22
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>23</b>
2.1	<b>Versuchstiere</b> .....	23
2.2	<b>Quetschläsion des N. ischiadicus</b> .....	24
2.3	<b>Injektion von AMPT und L-DOPA</b> .....	24
2.4	<b>Messverfahren bei der Verhaltensanalyse</b> .....	25
2.5	<b>Versuchssequenz</b> .....	29
2.5.1	Methoden der Morphologischen Analysen .....	33
2.6	<b>Auswertungsmuster</b> .....	36
2.6.1	Morphometrie .....	36
2.6.2	Statistische Auswertungen .....	40
<b>3</b>	<b>Befunde</b> .....	<b>41</b>
3.1	<b>Verhaltensanalysen</b> .....	41
3.2	<b>Morphologische Analysen</b> .....	46
3.2.1	Peripheres Nervensystem .....	46
3.2.2	Zentrales Nervensystem .....	53
3.3	<b>L-DOPA/AMPT-Behandlung</b> .....	61
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>68</b>
4.1	<b>Verhaltensanalysen</b> .....	68
4.2	<b>Morphologische Analysen</b> .....	74
4.2.1	Peripheres und zentrales Nervensystem .....	74
4.3	<b>L-DOPA/AMPT-Behandlung</b> .....	82
<b>5</b>	<b>Einschränkungen</b> .....	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>88</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>89</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>94</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>96</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Dystonie**

Der Begriff Dystonie stammt ursprünglich aus dem Griechischen (dys = krankhaft/normabweichend, Tonus = Muskelspannung; Dystonie = Störung des normalen Spannungszustands der Muskeln und Gefäße) und impliziert, dass es sich bei dieser Krankheit - wie die Herleitung des Begriffs schon vermuten lässt - um eine fehlgesteuerte Anspannung von Muskeln handelt (Albanese & Lalli, 2012; Duden, 2014). Erstmals wurde das Syndrom Dystonie 1911 von Hermann Oppenheim als „dystonia musculorum deformans“ beschrieben, da Oppenheim muskuläre Verzerrungen als zentrales Krankheitscharakteristikum ansah (Albanese et al., 2013). Flatau und Sterling, Neurologen aus Polen, beschrieben Patienten mit rotierenden Bewegungen im Kopf- und Rumpfbereich und bezeichneten die Dystonie als progressiven Torsionsspasmus (Flatau & Sterling, 1911). Der Terminus Dystonie beschreibt ein neurologisches Syndrom mit anhaltenden Muskelkontraktionen. Dabei entstehen sich wiederholende Bewegungen und pathologische Haltungen (Fahn, Bressman, & Marsden, 1998). Es kommt zu lang anhaltenden und unwillkürlichen Kontraktionen der Muskulatur, die durch eine exzessive und überlappende Aktivität von Agonist und Antagonist der betroffenen Muskeln verursacht wird (Berardelli et al., 1998; Tanabe, Kim, Alagem, & Dauer, 2009; Wichmann, 2008). Diese unwillkürlichen Muskelanspannungen werden oft durch willentliche Handlungen ausgelöst oder sogar verschlimmert und sind mit einer übermäßigen Muskelaktivität verbunden (Albanese et al., 2013). Dystone Bewegungen können beständig oder unregelmäßig auftreten und sind verdreht, folgen einem bestimmten Muster oder können auch Zittern beinhalten. Oft sind diese Bewegungen stereotyp und repetitiv, sodass daraus typische Fehlstellungen des Körpers resultieren. Diese Stereotypie der dystonen Bewegungen rührt daher, dass oft dieselben Muskelgruppen involviert sind. Generell können aber alle willkürlichen Muskeln von dieser Krankheit betroffen sein (Albanese & Lalli, 2012; Grundmann, 2005). Die Pathophysiologie der Dystonie ist noch unklar. Man geht davon aus, dass eine Störung des zentralen Netzwerkes zwischen Kortex, Cerebellum, Thalamus und Basalganglien bei der Dystonie vorliegt (Goodchild, Grundmann, & Pisani, 2013; Tanabe et al., 2009). Die Klassifikation der Dystonie hat sich im Laufe der Zeit aufgrund des zunehmenden Wissens um diese Erkrankung entwickelt. Die Einteilung der Dystonie kann einmal nach dem klinischen Erscheinungsbild erfolgen. Es wird zwischen fokalen,

multifokalen, segmentalen oder generalisierten Formen unterschieden: Während bei einer fokalen Dystonie lediglich eine eindeutige Körperregion betroffen ist, können bei der multifokalen Form zwei oder mehr nicht benachbarte Körperregionen involviert sein. Ein Beispiel für eine fokale Dystonie ist die fokale Hand-Dystonie: Eine Studie mit professionellen Orchestermusikern zeigt, dass intensives und langanhaltendes Üben an einem Instrument eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Ausbilden einer aufgabenspezifischen, fokalen Hand-Dystonie bewirkt. Bedingt durch exzessives Trainieren der gleichen motorischen Bewegungen, die die Feinmotorik verbessern sollen, treten die Symptome auch in der am meisten beanspruchten Hand auf (Altenmüller & Jabusch, 2010). Bei der segmentalen Dystonie sind zwei oder mehr benachbarte Körperregionen befallen. Bei der generalisierten Form kommt es zu einer Verkrampfung des ganzen Körpers (Albanese et al., 2013; Berardelli et al., 1998). 1984 entwickelten Mitglieder einer Forschungsgemeinschaft für medizinische Erforschung der Dystonie eine damals neue Klassifikation und teilten diese Krankheit in zwei große ätiologische Kategorien ein: Primäre Dystonien und sekundäre Dystonien (Blitzer, Brin, Fahn, & Lovelace, 1988). Primäre und sekundäre Formen des Krankheitsbildes unterscheiden sich je nach Ursache und Symptomatik: Primäre Dystonien beschreiben die Dystonie als alleinige Krankheitsentität, vorwiegend mit einem genetischen Ursprung, die durch Veränderungen der Basalganglien oder durch genetische Mutationen ausgelöst werden. Des Weiteren werden zu den primären Dystonien idiopathische Formen ohne ersichtliche Ursache gefasst. Sekundäre Dystonien beinhalten hingegen dystone Bewegungen, die aufgrund von Läsionen oder Traumata im motorischen System hervorgerufen und zusätzlich häufig von anderen neurologischen Symptomen begleitet werden (Tanabe et al., 2009). Tabelle eins stellt eine ätiologische Klassifizierung der Dystonie Syndrome anhand von vier Untergruppen dar: Primäre Dystonie, Dystonie-plus, sekundäre Dystonie und die hereditäre Dystonie. Dystonien-plus sind Dystonien mit weiteren pathologischen Symptomen, wie die L-Dopa-responsive Dystonie (DYT5), die mit Parkinsonismus assoziiert ist, eine genetische und progressive Form der Dystonie mit tagesbedingten Schwankungen der Symptome. Das bedeutet, Verschlimmerung der Symptome am Abend und Verbesserung dieser morgens nach dem Schlafen (Casper, Kalliolia, & Warner, 2013; Ichinose et al., 1994). Bei der Dystonie mit Myoklonien treten unwillkürliche Muskelzuckungen in Kombination mit einer Dystonie auf (Saunders-Pullman et al., 2002). Sekundäre Dystonien beschreiben Dystonien, die aufgrund von nachweisbaren exogenen, strukturellen oder metabolischen Ursachen entstehen (Berardelli et al., 1998).

Beispiele für solche Ursachen wären Traumata oder Läsionen. Eine Metaanalyse an 240 Patienten mit Läsionen in den Basalganglien zeigte, dass die häufigste Folge einer solchen Schädigung die Entwicklung einer Dystonie war (36% der Patienten). Während Läsionen des Nucleus caudatus dabei nur selten Bewegungsstörungen hervorriefen, waren Läsionen des Nucleus lentiformis (Putamen und Globus pallidus) am häufigsten (49%) mit der Entwicklung einer Dystonie verbunden, vor allem wenn das Putamen involviert war (63%), sodass demnach besonders diese beiden Kerngebiete mit der Entwicklung von Bewegungsstörungen im Zusammenhang zu stehen scheinen (Bhatia & Marsden, 1994). Ferner können sekundäre Dystonien durch Medikamente, Toxine, Gehirntumore oder virale Infektionen erworben werden (Breakefield et al., 2008). Heredodegenerative Dystonien beschreiben komplexere Krankheitsformen, bei denen Dystonien zusätzlich zu neurodegenerativen Krankheiten wie der Wilson- oder Huntington-Krankheit auftreten (Casper et al., 2013).

<b>Primäre Dystonie</b>	<b>Dystonie-Plus</b>	<b>Sekundäre Dystonie</b>	<b>Heredodegenerative Dystonie</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Keine Anzeichen struktureller Anomalie im ZNS</li> <li>Häufigste Form</li> <li>Mit/ohne Tremor</li> <li>Generalisiert: idiopathische Torsionsdystonie</li> <li>Fokal/ Schreibkrampf/ Blepharospasmus (ein- oder beidseitiger Lidkrampf)/ Schiefhals (Torticollis spasmodicus)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kein neuronaler Defekt</li> <li>Kombiniert mit weiteren pathologischen Veränderungen wie Myoklonus oder Parkinson</li> <li>Dystonie mit Myoklonien</li> <li>Dopa-responsive Dystonie</li> <li>Dystonie-Parkinsonismus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Strukturelle Veränderung</li> <li>Exogene Ursache</li> <li>Metabolische Störung (Stoffwechsel)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hirndegeneration (Fahn et al., 1998)</li> </ul>

**Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der am häufigsten verwendeten Klassifikationen für Dystonie** [nach (Berardelli et al., 1998; Casper et al., 2013)].

Diese dargestellte Klassifikation ist immer noch wichtig zu kennen, da sie für viele klinischen Studien eingesetzt wurde.

Die aktuellste Klassifikation der Dystonie ist schließlich 2013 von Albanese et al. erschienen. In einem gemeinsamen Konsensus von Dystonie-Experten kam man zu dem Schluss, dass Dystonien zukünftig nur noch anhand von zwei Achsen, nämlich nach klinischen Gesichtspunkten (Alter bei Krankheitsbeginn, beteiligte Körperregionen, zeitlicher Verlauf und assoziierte Merkmale) und nach der Ätiologie (Pathologisches Nervensystem, hereditär/ erworben/ idiopathisch) klassifiziert werden sollen, um eine einheitliche Terminologie zu ermöglichen. Ferner geben sie eine aktuell gültige Definition des Terminus Dystonie an:

*“Dystonia is a movement disorder characterized by sustained or intermittent muscle contractions causing abnormal, often repetitive, movements, postures, or both. Dystonic movements are typically patterned, twisting, and may be tremulous. Dystonia is often initiated or worsened by voluntary action and associated with overflow muscle activation”* (Albanese et al., 2013)

Achsen	Klassifizierung	Untergruppen
<b>Achse 1:</b>  <b>Klinische Merkmale</b>	<b>Alter</b>	Frühe Kindheit (0 – 2 Jahre)
		Späte Kindheit (3 – 12 Jahre)
		Jugend (13 – 20 Jahre)
		Frühes Erwachsenenalter (21 – 40 Jahre)
		Spätes Erwachsenenalter (40 oder älter)

	<b>Körperliche Merkmale</b>	Fokal (eine isolierte Körperregion)
		Segmental (2 oder mehr zusammenhängende Regionen)
		Multifokal (2 oder mehr nicht zusammenhängende Regionen)
		Hemidystonie (Hälfte des Körpers betroffen)
		Generalisiert (Rumpf plus zwei weitere Regionen)
	<b>Zeitliches Muster</b>	Krankheitsverlauf (statisch vs. progressiv)
		Kurzzeitvariation (z.B. persistierend, handlungsspezifisch, täglich oder paroxysmal)
	<b>Zugehörige Funktionen</b>	Isoliert (mit oder ohne Tremor)
		Kombiniert (mit anderen neurologischen oder systemischen Merkmalen)
<b>Achse 2: Ätiologie</b>	<b>Pathologie des Nervensystems</b>	Degenerativ
		Strukturell (z.B. fokale statische Läsionen)
		Keine degenerative oder strukturelle Pathologie

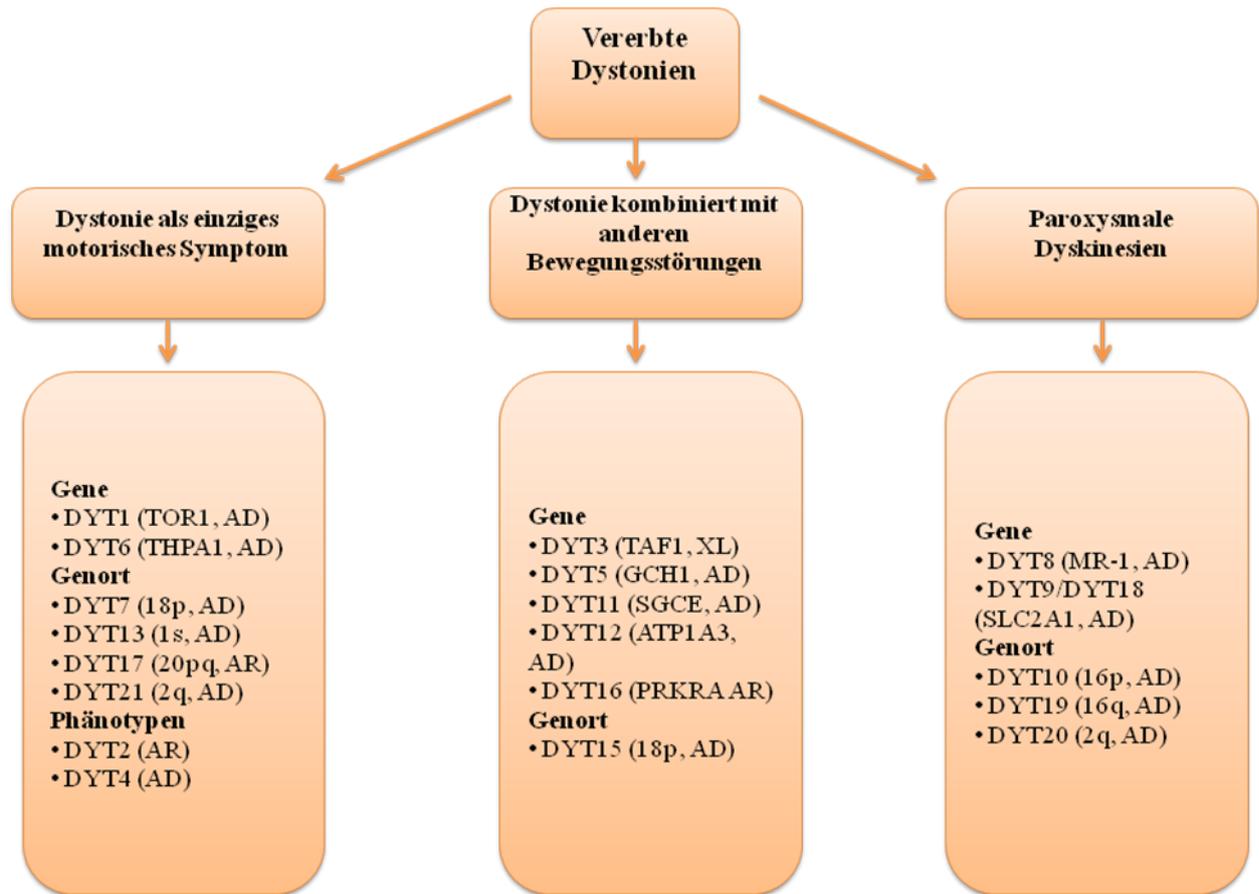
	<b>Erblichkeit</b>	Vererbt (z.B. geschlechtsspezifisch, autosomal, dominant/rezessiv oder mitochondrial)
		Erworben (z.B. Hirnverletzung, Drogen, Toxine, vaskulär oder neoplastisch)
	<b>Idiopathisch</b>	Sporadisch
		Familiär

**Tabelle 2: Die aktuellste Klassifikation der Dystonie** [nach (H.A. Jinnah & Albanese, 2014)].

### *Genetisch determinierte Dystonien*

Auch hinsichtlich der Nomenklatur der genetischen Dystonieformen gibt es eine stetige Entwicklung. Abbildung eins stellt die 2012 beschriebenen erblich bedingten Dystonien dar mit ihren drei Erscheinungsformen. Neben der DYT1 Dystonie (Mutation des *Tor1a*-Gens) gibt es noch zahlreiche weitere monogene Formen von Dystonien, wie zum Beispiel die DYT6 Dystonie, die durch eine Mutation des *THAPI*-Gens hervorgerufen wird. Charakteristisch für diese Form ist eine frühe dystone Verkrampfung der kranialen und cervikalen Anteile der Muskulatur. Außerdem ist in diesem Falle auch die Sprache betroffen, da die Kehlkopfmuskulatur ebenfalls von der Dystonie betroffen ist. Während die Penetranz bei der DYT1 Dystonie nur bei etwa 30% liegt, liegt sie bei der DYT6 Dystonie doppelt so hoch, nämlich bei rund 60%, sodass hier eine größere Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung des Phänotyps besteht. Ferner gibt es noch bei anderen Bewegungsstörungen vorkommende Dystonien wie zum Beispiel der DYT16 Dystonie-Parkinsonismus. Bei dieser autosomal-rezessiven Dystonieform handelt es sich um eine *Missense*-Mutation des *PRKRA*-Gens (Albanese & Lalli, 2012). Der Phänotyp ist definiert durch eine früh einsetzende Progression der Dystonie (in den ersten 2 bis 18 Jahren), sodass rasch die gesamte Muskulatur betroffen ist und es zu einer generalisierten Dystonie kommt (Bressman, 2004). Die DYT11 Dystonie hingegen, als Beispiel für eine Dystonieform mit Myoklonien, ist gekennzeichnet durch

blitzartige unwillkürliche Muskelzuckungen. Das typische Erkrankungsalter ist in der Regel in der ersten und zweiten Dekade. Verursacht wird diese Krankheit durch eine Mutation des *SGCE*-Gens (Raymond, Saunders-Pullman, Aguiar, et al., 2008). Schließlich sind noch die paroxysmalen Dyskinesien zu nennen. Diese heterogene Gruppe von Erkrankungen macht sich vor allem durch vorübergehende, anfallsartige Hyperkinesien des Bewegungsapparats bemerkbar (Bhatia, 2011). Ein Vertreter dieser Dystonieformen ist die DYT18 Dystonie, die durch eine Mutation des *SLC2A1*-Gens ausgelöst wird und unwillkürliche Bewegungen der Muskulatur verursacht. Das genannte Gen ist für die Kodierung des *GLUT1*-Gens zuständig und zugleich der Hauptglucosetransporter im Gehirn (Suls et al., 2008; Weber et al., 2008).



**Abbildung 1: Erbllich bedingte Dystonien und ihre drei Erscheinungsformen.** Das Syndrom Dystonie kann sich als isolierte Dystonie oder als Dystonie kombiniert mit anderen Bewegungsmustern präsentieren. Paroxysmale Dyskinesien stellen eine eigene Kategorie dar. Pathogenetisch veränderte Gene und bekannte Genorte sind oben aufgelistet. AD = autosomal-dominant; AR = autosomal-rezessiv; XL = X-chromosomal rezessiv [nach (Albanese & Lalli, 2012)].

Auch bezüglich der Nomenklatur der genetisch determinierten Dystonien gibt es neue Empfehlungen der *Movement disorder Society* (Marras et al., 2016). Die aktuelle Empfehlung lautet, die genetischen Dystonien nicht mehr mit der Locus Bezeichnung (z.B. DYT1, DYT6 etc.) zu beschreiben, sondern nach dem gefundenen und bestätigten Gendefekt, z.B. DYT-TORIA statt DYT1 (Klein C., 2014).

Neue Bezeichnung und phänotypische Untergruppe	Phänotypische Merkmale	Vererbungsmuster	Symbol
<b>Isolierte Dystonien</b>			
<b>DYT-TOR1A</b>	Frühzeitig generalisierte Dystonie	AD	DYT1
<b>DYT-THAP1</b>	In der Jugend beginnende Dystonie der gemischten Art	AD	DYT6
<b>DYT-GNAL</b>	Im Erwachsenenalter beginnende cranial-cervikale Dystonie	AD	DYT25
<b>Kombinierte Dystonien</b>			
<i>Dystonie plus Parkinsonismus</i>			
<b>DYT-GCH1</b>	Dopa-responsive Dystonie	AD	DYT5a
<b>DYT-TH</b>	Dopa-responsive Dystonie	AR	DYT5b
<b>DYT-ATPIA3</b>	Rapid einsetzender Dystonie-Parkinsonismus	AD	DYT12
<b>DYT-TAF1 *</b>	Dystonie-Parkinsonismus	X-Chromosomal	DYT3
<i>Dystonie plus Myoklonus</i>			
<b>DYT-SGCE</b>	Myoklonus-Dystonie	AD	DYT11
<i>Paroxysmale Dystonie plus andere Dyskinesien</i>			
<b>DYT-PRRT2</b>	Paroxysmale kinesigene Dyskinesie	AD	DYT10
<b>DYT-MR-1</b>	Paroxysmale nicht-kinesigene Dyskinesie	AD	DYT8
<b>DYT-SLC2A1</b>	Paroxysmale leistungsinduzierte Dyskinesie	AD	DYT18
* Aufgrund eines Gründereffektes ist ein Gentest möglich. Die Pathogenität des TAF1-Gens ist nicht unbedingt bestätigt. Ausgewählte Varianten innerhalb des XDP-verknüpften Haplotyps reichen für die Diagnose aus.			

**Tabelle 3: Tabellarische Darstellung der neuen Liste der genetisch bedingten Dystonien [nach (Klein C., 2014)].**

### *DYT1 Dystonie*

Über 20 Arten genetischer Dystonieformen (DYT1 bis 25) werden in der klinischen Literatur berichtet. Die DYT1 Dystonie ist dabei die häufigste genetische Dystonie. Es handelt sich dabei um eine autosomal-dominant vererbte Genmutation (Ozelius et al., 1997). Verursacht wird diese Krankheit durch eine einzelne Mutation auf dem Chromosom 9q34 (Ozelius et al., 1997; N. J. Risch et al., 1990). Die DYT1 Dystonie entsteht dabei durch eine „inframe-Deletion“ im Genabschnitt des *Tor1a*-Gens. Bei diesem Vorgang der Deletion werden drei Basenpaare ausgetauscht (Leseraster bleibt somit erhalten) (Goodchild & Dauer, 2005). Die Folge dieser Zerstörung der Basenpaare bewirkt den Verlust eines der Paare von Glutaminsäureresten (=ΔGAG), nahe am Carboxy-Terminus eines ATP-bindenden Proteins namens TorsinA (Ozelius et al., 1997). Die DYT1 Dystonie geht mit der Störung der Regulation der Basalganglien einher (Niethammer, Carbon, Argyelan, & Eidelberg, 2011). Interessanterweise findet sich die größte Prävalenz von DYT1 Dystonien bei Ashkenazi Juden aufgrund eines einzelnen Gründereffekts, also einer genetischen Mutation, die wahrscheinlich vor 350 Jahren erstmalig auftrat (N. Risch et al., 1995).

Die DYT1 Dystonie beginnt meist schon in der frühen Kindheit, mit einem durchschnittlichen Alter von 12 Jahren. Krankheitsanfänge nach einem Alter von 28 Jahren sind extrem selten (Saunders-Pullman et al., 2002; Wichmann, 2008). Bei Erwachsenen treten die Symptome meist fokal an Extremitäten, Händen oder Hals auf, bei Kindern findet größtenteils eine Generalisierung der Dystonie statt. Die Dystonie fängt zunächst als Aktionsdystonie in einer Extremität an und schreitet dann in eine segmentale bzw. generalisierte Dystonie voran mit schweren körperlichen Beeinträchtigungen (Saunders-Pullman et al., 2002).

Obwohl die DYT1 Dystonie eine vererbte Krankheit aufgrund eines Gendefekts darstellt, bricht diese Krankheit nur bei etwa 30% der Mutationsträger aus (Albanese & Lalli, 2012; Goodchild, Kim, & Dauer, 2005; Tanabe et al., 2009). Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, was das Ausbrechen der Krankheit bei dem Einen bewirkt oder warum ein Anderer das Krankheitsgen sein ganzes Leben lang trägt, aber keine eindeutigen bzw. nur sehr milde Krankheitssymptome zeigt.

### Die „*second-hit*“ Hypothese

Bezogen auf die Dystonie ist der Grundgedanke dieser Hypothese, dass eine genetische Prädisposition erst durch einen „*second-hit*“, d.h. einem äußeren Faktor wie ein peripheres Trauma zum Tragen kommt und eine klinisch relevante Dystonie auslöst. Gerade bei der DYT1 Dystonie, die eine deutlich reduzierte Penetranz von nur 30% aufweist (Albanese & Lalli, 2012; Goodchild et al., 2005; Tanabe et al., 2009), ist das Zusammenwirken mit einem umweltbedingten Faktor im Sinne eines „*second-hits*“ für das Ausbrechen der Krankheit anzunehmen. Ein Vergleich zwischen zwölf menschlichen asymptomatischen DYT1 Krankheitsträgern und zwölf gesunden Kontrollen bei verschiedenen motorischen Computeraufgaben zeigte, dass beide Gruppen zwar eine ähnliche motorische Leistung brachten, die DYT1 Krankheitsträger aber signifikante Defizite im Lernen von Bewegungssequenzen hatten (Ghilardi et al., 2003). Begleitende PET-Aufnahmen zeigten zusätzlich dabei eine erhöhte Aktivität im linken prämotorischen Kortex und im rechten supplementären motorischen Bereich, sodass insgesamt bei den asymptomatischen Krankheitsträgern von Abnormalitäten im motorischen Verhalten und in bestimmten Gehirnfunktionen im Vergleich zu gesunden Kontrollen ausgegangen werden kann. Es scheint, dass die erhöhte neuronale Aktivität zwar eine normale Bewegungskoordination ermöglicht, die aber Defekte im Sequenzlernen nicht zu kompensieren vermag. Eine weitere PET-Studie an DYT1 Krankheitsträgern mit und ohne ersichtlichen Symptomen zeigte ferner abnormale metabolische Aktivitäten in Gehirnbereichen, die für die Bewegungssteuerung wichtig sind (Eidelberg et al., 1998). Bei beiden Gruppen wurden diese im Nucleus lentiformis, Cerebellum und den supplementären motorischen Arealen vorgefunden, jedoch besaßen diejenigen mit einer ausgeprägten Dystonie noch zusätzliche Auffälligkeiten im Mittelhirn und Thalamus. Die Autoren vermuten dahinter eine Interaktion funktionaler Netzwerke im Gehirn, die zum Krankheitsbild beitragen. Weiter wurde bei symptomatischen DYT1 Krankheitsträgern eine signifikant reduzierte axonale Integrität und Kohärenz in der subgyralen weißen Substanz des sensomotorischen Kortex gefunden, was auf eine mikrostrukturelle Störung der efferenten und afferenten Leitungsbahnen der weißen Substanz zum primären sensomotorischen Kortex hindeutet und ebenfalls einen Vulnerabilitätsfaktor für das Ausbilden einer DYT1 Dystonie darstellen könnte (Carbon et al., 2004). Es gibt aber auch Hinweise auf elektrophysiologische Defizite bei der DYT1 Dystonie: Ein Vergleich zwischen symptomatischen und asymptomatischen DYT1 Krankheitsträgern brachte zu Tage,

dass beide Gruppen zwar ähnliche elektrophysiologische kortikale Defizite, die im Zusammenhang mit den Basalganglien stehen, aufwiesen, dass aber nur die symptomatischen DYT1 Krankheitsträger zusätzlich noch spinale elektrophysiologische Auffälligkeiten besaßen. Die Autoren vermuten infolgedessen, dass die genetische Mutation alleine nur ein subklinisches Maß an Abnormalitäten bewirken kann, zusätzlich zur Ausbildung der Krankheit mit vollen Symptomen noch weitere umweltbedingte oder genetische Faktoren hinzutreten müssen (Edwards, Huang, Wood, Rothwell, & Bhatia, 2003). Schlussfolgernd bedeutet das also, dass eine genetische DYT1 Mutation zwar bestimmte abnorme Veränderungen verursachen kann, die aber von den Krankheitsträgern weitgehend kompensiert werden können, das Ausbrechen der DYT1 Dystonie aber vermutlich noch einen oder mehrere andere Faktoren, also einen „*second hit*“ benötigt (Edwards et al., 2003; Koh, Rehfeld, & Ganetzky, 2004).

Weitere Hinweise auf das Zusammenwirken von genetischen und umweltbedingten Faktoren ergeben sich auch aus Tierstudien. DYT1-Drosophila-Mücken entwickeln motorische Abnormalitäten wie Koordinationsverlust, aber nur, wenn sie höheren Temperaturen von 38 Grad Celsius ausgesetzt waren. Auch hier kommen die Autoren zu dem Schluss, dass die genetische Prädisposition die Mücken für einen „*second-hit*“ anfällig macht, der dann den vollständigen Krankheitsausbruch triggert (Koh et al., 2004).

Abbildung zwei stellt das komplexe Zusammenspiel von genetischen und umweltbedingten Einflüssen bei der Pathophysiologie der Dystonie dar (Albanese et al., 2013; Albanese & Lalli, 2012). Gegliedert ist die Abbildung in vier Ebenen: Ätiologische Ebene, Schaltungsebene, funktionale Ebene und phänomenologische Ebene. Die ätiologische Ebene beschreibt das gerade erörterte Wechselspiel von Anlage- und Umweltfaktoren. Genetische Mutationen oder eine Anfälligkeit der Gene unbekannter Ursache stehen in einem wechselseitigen Verhältnis zu einem Umwelteinfluss wie zum Beispiel einem Trauma. Das heißt, die Information einer Interaktion zwischen einem biologischen und einem umweltbedingten Faktor wird weitergeleitet und kann somit zu pathogenen Veränderungen in den Basalganglien, im Kleinhirn, im supplementären motorischen Areal (SMA = „*supplementary motor area*“) und im sensomotorischen Kortex führen. Dies bewirkt verschiedene Dysfunktionen im ZNS (Albanese & Lalli, 2012): Es kommt zu einer eingeschränkten motorischen Hemmung, was sich in krampfartigen Muskelkontraktionen äußert. Zudem zeigen sich sensorische Funktionsstörungen, wie eine abnormale Verarbeitung eingehender räumlicher und zeitlicher Signale. Schließlich ist noch eine abnormale

motorische Plastizität zu nennen, die durch repetitive Aktivität oder exzessive sensorische Stimulation zum Tragen kommt.

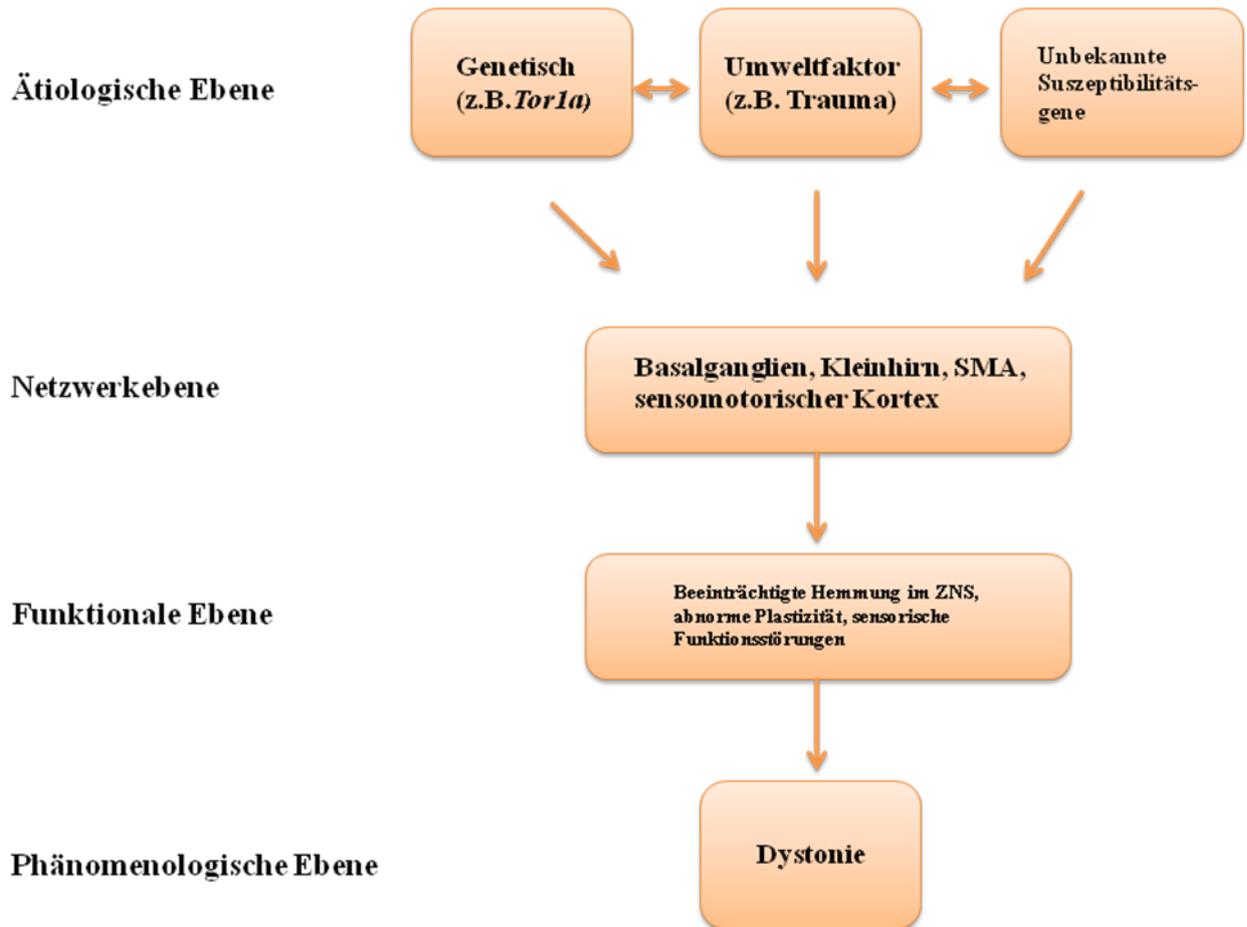


Abbildung 2: Pathogenetische Mechanismen der primären Dystonie [(nach (Albanese & Lalli, 2012)].

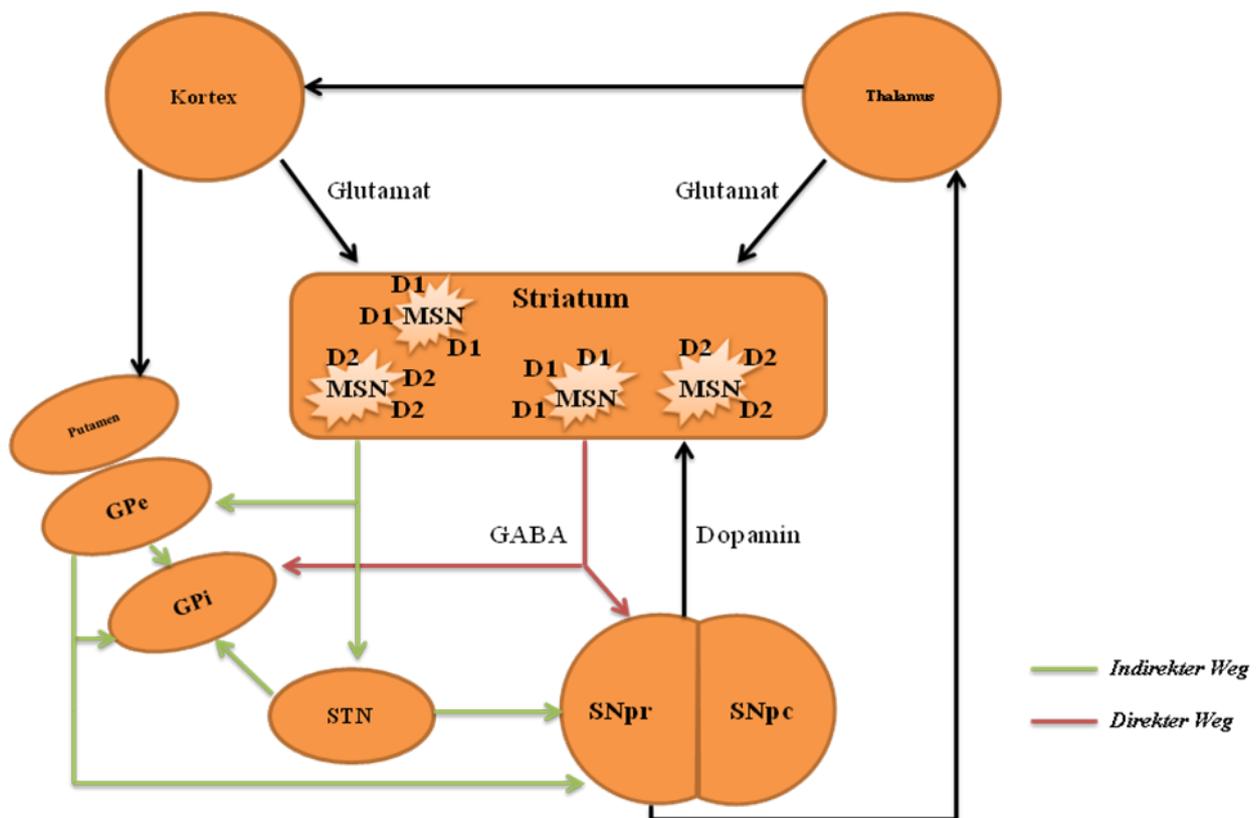
## 1.2 Das motorische Nervensystem

### 1.2.1 Anatomische Strukturen

Das motorische System im ZNS ist für die Aufrechterhaltung und Durchführung komplexer Bewegungsabläufe zuständig. Es sendet wichtige Signale über absteigende Bahnen von motorischen Kortexarealen zu den Motoneuronen im Hirnstamm und dem Rückenmark. Der Motokortex projiziert Informationen über den Tractus corticostriatalis zu den Basalganglien durch den erregenden Transmitter Glutamat. Das Striatum erhält neben den eingehenden erregenden Signalen aus dem Kortex auch eingehende erregende Signale aus dem Thalamus und integriert diese beiden Informationen zusammen. Diese erregenden eingehenden Signale aus dem motorischen Kortex bewirken eine Erregung der hemmenden Neurone des Striatums. Das Striatum besitzt hierbei einen eigenen Mikrokreislauf (Goodchild et al., 2013). Dem Striatum stehen dabei mindestens sechs verschiedene Klassen von Neuronen zur Verfügung. Die meisten davon sind GABAerge „*medium spiny neurons*“ = MSN Neurone, die zu den signalaussendenden Kernen der Basalganglien projizieren. Diese MSN Projektionsneurone werden nochmals in zwei Gruppen unterteilt, je nach ihren Projektionsmustern und Neuropeptid- und Dopaminrezeptor-Expressionsprofilen: a) GABAerge Projektionsneurone, die überwiegend D1-Rezeptoren (D1) besitzen werden durch Dopamin als Neurotransmitter (über den nigro-striatalen Trakt) über den D1-Rezeptor erregt und projizieren auf dem sogenannten *direkten Weg* zum Globus pallidus internus (GPi) und zur Substantia nigra pars reticulata (SNpr). Durch die Erregung dieser Projektionsneurone kommt es zu einer Inhibition des GPi und der SNpr. Sowohl die Inhibition des GPi als auch der SNpr führt zu einer Disinhibition von thalamischen glutamatergen Neuronen, die in den Kortex projizieren. Dieser Weg führt zu einer Bewegungsaktivierung. b) Sowie GABAerge Projektionsneurone, die überwiegend D2-Rezeptoren (D2) aufweisen, werden durch Dopamin über den D2 Rezeptor gehemmt und projizieren über den Globus pallidus externus (GPe) und Nucleus subthalamicus (STN) zur SNpr und GPi (*indirekter Weg*). Diese Projektionsneurone hemmen die ebenfalls GABAergen, inhibitorischen Neurone des GPe. Es kommt dadurch zu einer Disinhibition der erregenden glutamatergen Projektionsneurone des Nucleus subthalamicus (STN), welcher wiederum die hemmenden Neurone des GPi und der SNpr erregt, die in den Thalamus projizieren. Die Aktivierung dieses Weges führt zu einer Bewegungshemmung. Zusätzlich innerviert der GPe direkt den GPi. Im Striatum projizieren auch die nigro-striatalen Fasern mit Dopamin als Neurotransmitter, sodass durch die

Substantia nigra pars compacta über die beiden hemmenden und erregenden Projektionen des *direkten und indirekten Weges* die Innervation des GPi und SNpr und damit die thalamische Aktivierung sehr genau kontrolliert werden.

Insgesamt lassen sich die Basalganglien also als Regelschleife motorischer Bewegungen ansehen, die erwünschte Bewegungen zulassen und unerwünschte unterdrücken können. Abbildung drei zeigt diese Projektions- und Rückkopplungswege nochmals im Detail (Bähr, 2014; Calabresi, Picconi, Tozzi, Ghiglieri, & Di Filippo, 2014; Gerhard Aumüller et al., 2006; Goodchild et al., 2013)



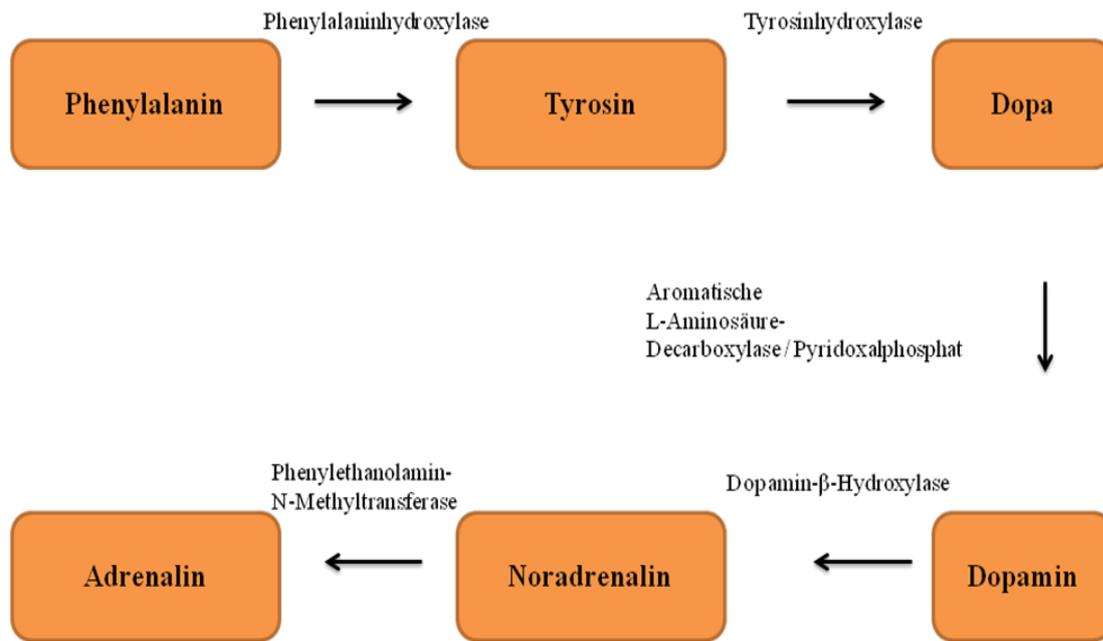
**Abbildung 3: Zentrale Projektions- und Rückkopplungswege im Hinblick auf das Bewegungsverhalten** [nach (Calabresi et al., 2014; Goodchild et al., 2013)].

Das Verständnis dieses vielschichtigen Kreislaufs und seiner Mechanismen verdeutlicht die Komplexität des gesamten Bewegungsablaufs, der einer zentralnervösen Kontrolle unterliegt. So lässt sich nachvollziehen, dass es bei einer Störung in diesem Kreislauf zu pathogenen Auswirkungen auf die Aktivierung oder Hemmung von motorischem Verhalten kommt, was letztlich zum Krankheitsbild der Dystonie führen kann.

## 1.2.2 Die zentrale Rolle von Dopamin

### *Biosynthese*

Dopamin gehört zur Gruppe der Katecholamine, die im sympathischen Nervensystem als postganglionäre Neurotransmitter mit Rezeptoren eine wichtige Rolle spielen. Alle Katecholamine entstehen aus Tyrosin, das durch die Nahrung aufgenommen oder in der Leber aus der Aminosäure Phenylalanin synthetisiert wird. Das Tyrosin wird aktiv durch Transporter in Neurone und chromaffine Zellen transportiert. Wie das folgende Schema (siehe Abbildung 4) zeigt, wird das Ausgangsmolekül Tyrosin durch das Enzym Tyrosin-Hydroxylase zu Dihydroxyphenylalanin (DOPA) metabolisiert. Dieser Schritt findet in postganglionären sympathischen Nerven und in den chromaffinen Zellen der Nebenniere statt. Dabei ist es entscheidend, dass Tetrahydrobiopterin als Reduktionsäquivalent agiert und somit Elektronen überträgt. Nach der Übertragung von Elektronen entsteht als Zwischenprodukt Dihydrobiopterin. Das entstandene Produkt DOPA wird durch die ubiquitäre aromatische L-Aminosäure-Decarboxylase (DOPA-Decarboxylase) zusammen mit Pyridoxalphosphat (PALP) als Cofaktor in Dopamin überführt. Daraufhin beginnt der Transport von Dopamin in die präsynaptischen Sekretgranula chromaffiner Zellen. Im ZNS wird in spezifischen Hirnregionen Dopamin in den präsynaptischen Vesikeln gespeichert und bei Bedarf als Neurotransmitter ausgeschüttet. Dopamin wird dann zu Adrenalin und Noradrenalin umgewandelt (M. Scharl, 2009).



**Abbildung 4: Biosynthese der Katecholamine** [nach ( M. Scharl,2009)].

### *Freisetzung des Dopamins aus den Sekretgranula*

Zunächst kommt es zur präganglionären Acetylcholinfreisetzung. Diese wiederum stimuliert als chemischer Transmitter die nikotinergeren, postganglionären Rezeptoren und bewirkt die Depolarisation der postganglionären Zellen, wobei dann ein  $\text{Ca}^{2+}$  - Einstrom die Freisetzung des Dopamins aus den Vesikeln auslöst. Die nur teilweise oder komplette Verschmelzung der Sekretgranula mit der postsynaptischen Zellmembran führt zur Freisetzung des gesamten Vesikelinhalts, also neben Dopamin werden ebenfalls ATP oder neuroaktive Peptide freigesetzt. Alle Katecholamine, darunter auch Dopamin, vermitteln ihre Wirkung immer über membranständige Rezeptoren auf der Oberfläche von Zielzellen. Diese Rezeptoren gehören zu sogenannten Transmembranproteinen aus der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Es gibt fünf Dopaminrezeptoren Subtypen D1-D5, wobei die Dopaminrezeptoren D2-D5 lediglich nur im ZNS exprimiert werden. Diese Rezeptoren werden in zwei Klassen unterteilt: Die erregenden D1DR-artigen Rezeptoren ('D1': D1DR und D5DR) und die hemmenden D2DR-artigen ('D2': D2DR, D3DR und D4DR) Rezeptoren, die die postsynaptischen Dopaminantworten übermitteln (Goodchild et al., 2013; M. Scharl, 2009).

### 1.3 TorsinA

TorsinA ist ein peripheres Membranprotein, das unterschiedliche Funktionen innerhalb des Zellsystems übernimmt. Die Lokalisation dieses Proteins befindet sich im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER), das eine wichtige Funktion bei der Translation oder der Herstellung von Proteinen besitzt (Goodchild et al., 2005). Beim ER handelt es sich um ein Kanalsystem mit Hohlräumen, umgeben von Membranen. Neben der Produktion der Proteine finden hier ebenfalls die Faltung und die Qualitätskontrolle, die posttranslatorische Modifikation und der Transport von Proteinen statt (Lüllmann-Rauch, 2006a). Das Protein gehört zur AAA+-Proteinfamilie. Es sind Oligomere, die die Proteinzerlegung durch eine ATP-Hydrolyse steigern und so die zelluläre Aktivität kontrollieren. Des Weiteren unterstützt das Protein die Chaperonaktivität, die für eine korrekte Faltung aller umgesetzten Proteine zuständig ist. TorsinA ist vermutlich auch bei der Vesikelfreisetzung und bei Stressantworten beteiligt (Richter & Richter, 2014).

Die genaue Rolle von TorsinA in Bezug zu DYT1 Dystonien ist bisher unklar, es gibt aber diverse Vermutungen, wie dieser Einfluss aussehen könnte. Das Protein TorsinA spielt eine entscheidende Rolle für die Ausbildung des ZNS, des Rückenmarks, des Hippocampus und des präfrontalen Kortex. Jegliche Veränderungen bzw. Mutationen dieses Proteins können somit Störungen der Bewegungsabläufe hervorrufen (Goodchild et al., 2005; Misbahuddin et al., 2005). Dass TorsinA bei der zentralnervösen Entwicklung eine wichtige Funktion einnimmt, und Mutationen dieses Proteins sich dann dementsprechend entwicklungsabhängig auswirken, lässt sich mit Hinweisen aus den bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnissen belegen: Einerseits deutet der frühe Krankheitsbeginn vieler Dystonien (Wichmann, 2008) - im Besonderen der DYT1 Dystonie - auf das Vorliegen einer entwicklungsbedingten Krankheit hin, es findet sich aber auch beispielsweise Evidenz aus einer Studie an genetisch mutierten *Tor1a* Mäusen, dass sowohl homozygote knock-in *Tor1a* (= *Tor1a*  $\Delta$ gag/ $\Delta$ gag) und *Tor1a*-Null (= *Tor1a* -/-) Mäuse innerhalb von 48 Stunden nach ihrer Geburt versterben, was die Autoren auf einen Funktionsverlust von TorsinA zurückführen (Goodchild et al., 2005). Ferner berichten Dang et al. 2005, dass genetisch mutierte DYT1  $\Delta$ GAG knock-in Mäuse, die ein Modell der genetischen Mutation von DYT1-Dystonie Patienten darstellen, mit drei Monaten noch keine motorischen Abnormalitäten aufweisen, sondern, dass diese erst ab etwa sechs Monaten zu beobachten sind, was wiederum auf einen altersbedingten

Entwicklungsfaktor bei der Entstehung der DYT1 Dystonie schließen lässt (Dang et al., 2005).

TorsinA und LAMP1-Polypeptide gehen Verbindungen ein. Bei einer genetischen Mutation von *Tor1a* wird diese Interaktionsfähigkeit höher und kann dabei zu einer Relokalisation von zellulären Proteinen beitragen, was sich im Hinblick auf die Pathogenese der DYT1 Dystonie als möglicher Einflussfaktor darstellt (Goodchild & Dauer, 2005). Ein Interaktionspartner für TorsinA stellt das Protein Snapin dar. Beide Proteine spielen eine Rolle bei der Exozytose, wobei eine DYT1 Mutation einen Funktionsverlust bewirken kann. Dies bedingt letztlich auch die Aufnahme von Dopamin, sodass die DYT1 Mutation im TorsinA kodierenden *Tor1a* Gen also auch beim synaptischen Vesikelrecycling pathogen mitwirken könnte. Die Mutation im *Tor1a* Gen führt ferner zu Fehllokalisationen des veränderten TorsinA Proteins und pathologischen Aggregaten und Einschlüssen wie zum Beispiel in synaptischen Membranen und in der Kernhülle, einer Struktur, die dem ursprünglichen Lokalisationsort ER benachbart ist (Gonzalez-Alegre & Paulson, 2004; Koh et al., 2004). Dies könnte sich dann pathogen auf die Signalübertragungswege zwischen Synapsen und Nuclei auswirken, die für die normale synaptische Entwicklung und Funktion benötigt werden (Koh et al., 2004).

TorsinA wird im gesamten ZNS wie zum Beispiel im Striatum, Hippocampus, Cerebellum und in der Substantia nigra exprimiert (Rostasy et al., 2003; Wichmann, 2008). Die mRNA für TorsinA wird aber vor allem in hohem Ausmaß in den dopaminergen Neuronen der Substantia nigra exprimiert (Balcioglu et al., 2007). Auch genetische Studien legen die Hypothese nahe, dass mutiertes *Tor1a* vor allem die striatale Dopaminsignalübertragung beeinflusst (Dang, Yokoi, Pence, & Li, 2006; Koh et al., 2004; Song, Fan, Exeter, Hess, & Jinnah, 2012; Zhao, DeCuyper, & LeDoux, 2008).

### *Striatale Dysfunktion mit Bezug zum Dopamin*

Ergebnisse aus Tierstudien weisen darauf hin, dass bei der DYT1 Dystonie die dopaminerge Signalgebung oder -verarbeitung beeinträchtigt sei (Bao, Patel, Walker, Shashidharan, & Rice, 2010; Dang et al., 2006; Patel, Roskrow, Davis, & Heckmatt, 1995; Zhao et al., 2008). Diese Annahme wird durch verschiedene Befunde aus dem Humanbereich unterstützt. Typischerweise finden sich keine Hinweise auf neurodegenerative oder grobe strukturelle Veränderungen im Gehirn von DYT1 Patienten, im Gegensatz zu anderen Krankheiten, die ebenfalls zu den Bewegungsstörungen zählen und zusätzlich zu ihren Krankheitsanzeichen

Symptome der Dystonie entwickeln wie zum Beispiel Chorea Huntington oder M. Parkinson (Casper et al., 2013). Berardelli et al. 1998 kommen daher zu dem Schluss, dass primäre Dystonien eine Krankheitsgruppe darstellen, die durch Funktionsstörungen in den Basalganglien hervorgerufen werden (Berardelli et al., 1998). Diese Funktionsstörungen lassen sich anhand der in den anatomischen Strukturen beschriebenen Pfade (siehe auch Kapitel 1.2.1., Abbildung 3) nachvollziehen. Informationen zu den Krankheitsursachen und pathogenen Mechanismen innerhalb des Striatums bei Dystonien aus Studien an menschlichen Gehirnen sind aufgrund der geringen Anzahl von eindeutig belegten Dystonie-Gehirnen nur selten vorhanden (Augood et al., 2004; Furukawa, Hornykiewicz, Fahn, & Kish, 2000). Hinweise aus dem Humanbereich liefert jedoch eine Studie von S. J. Augood et al., 2004, die vier menschliche Gehirne (davon drei mit einer DYT1 Dystonie und eines mit M. Parkinson, aber mit DYT1 Dystonie in der familiären Geschichte, behandelt mit Levodopa und Carbidopa) *postmortem* nach Anhaltspunkten auf die striatale Dopamintransmission untersuchte. Hierbei wurden einerseits Marker der striatalen Dopaminübertragung gemessen, das heißt es wurde der striatale Gewebeinhalt von Dopamin und seinen Metaboliten 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC) und Homovanillinsäure (HVA) ermittelt. Andererseits wurde noch mittels quantitativer Autoradiographie nach möglichen Unterschieden in der Dichte oder Bindungsfähigkeit von Dopaminrezeptoren im Striatum gesucht. Dies geschah unter Verwendung von Liganden für Dopamin und seinen vesikulären Transportern (präsynaptisch) und für die Dopamin-Rezeptoren D1 und D2 (postsynaptisch). Vergleiche mit gesunden Kontrollgehirnen zeigten eine 23%ige Reduktion des striatalen Dopamingehaltes und ein 48%iger Anstieg des DOPAC-Gehaltes in den drei DYT1 Dystonie-Gehirnen. Diese Unterschiede erreichten zwar alleine keine statistische Signifikanz, aber das Verhältnis zwischen DOPAC und Dopamin zeigte einen signifikanten Anstieg von 71%. Diese Ergebnisse weisen auf einen erhöhten Dopaminumsatz im dystonen Striatum hin. Hinsichtlich der autoradiographischen Messungen konnte ein 29%iger Rückgang in der Dopamin D1-Bindung und ein 40%iger Rückgang in der Dopamin D2-Bindung gefunden werden. Dieser Unterschied ist aber ebenfalls als Trend zu sehen und erlangte keine statistische Signifikanz. Das M. Parkinson-Gehirn brachte konträre Ergebnisse zutage: Es konnte eine mehr als 85%ige signifikante Reduktion des striatalen Dopamins sowie seiner Metaboliten festgestellt werden. Zusätzlich fehlten vesikuläre Aufnahmestellen von Dopamin sowie die postsynaptische D1- und D2-Rezeptorbindung fast komplett. Der erhöhte Dopaminumsatz in den drei dystonen Gehirnen kann durch mehrere Faktoren begünstigt sein: In Frage kommen

eine erhöhte Dopaminfreisetzung, eine verringerte Vesikelbildung mit Dopamininhalt oder eine erhöhte Aktivität von Monoaminoxidase-B (MAO-B), was aber eine eindeutige Klärung des höheren Umsatzes aus dieser Studie nicht ermöglicht. Insgesamt ergeben sich also aus dieser Studie Hinweise auf eine striatale Dysfunktion mit Imbalancen in der Dopaminübertragung und einem erhöhten Dopaminumsatz im dystonen Striatum (Augood et al., 2002). Die Fallstudie von Furukawa et al. 2000 an einem zehnjährigen Jungen jedoch liefert gegensätzliche Ergebnisse: Das Gehirn des Jungen, der zu seinem Todeszeitpunkt eine generalisierte primäre Torsionsdystonie aufwies, die mit einem Alter von vier Jahren mit motorischen Störungen der Beine begann, wurde mit acht gesunden Kontrollgehirnen verglichen (Furukawa et al., 2000). Es zeigten sich keine zellulären Unterschiede des nigrostriatalen Dopaminsystems, auch der striatale Dopamin- und HVA-Gehalt im Putamen und Nucleus caudatus waren vergleichbar. Lediglich ein subklinischer Rückgang von 50-54% des Dopamingehaltes in den rostralen Anteilen des Putamens und des Ncl. caudatus wurde ermittelt. Als mögliche Ursachen für eine fehlerhafte Signaltransmission bei der DYT1 Dystonie werden ein erhöhter Dopaminumsatz (Verhältnis DA/DOPAC oder Verhältnis DA/HVA) (Augood et al., 2002; Zhao et al., 2008), eine Reduktion des striatalen Dopamingehaltes (Bao et al., 2010; Dang et al., 2006; Shashidharan et al., 2005; Song et al., 2013) oder eine Verringerung der Rezeptorbindung in der bisherigen Forschung diskutiert (Augood et al., 2002).

### *Mausmodelle der DYT1 Dystonie*

Da grundlagenorientierte Studien der DYT1 Dystonie im Humanbereich rar und nur *postmortem* durchführbar sind, werden für fundamentale Studien Tierexperimente durchgeführt und dabei besonders auf Mausmodelle zurückgegriffen (Augood et al., 2002; Furukawa et al., 2000). Da es sich bei der DYT1 Dystonie um eine hereditäre Krankheit handelt, bietet es sich an, mit genetisch mutierten Versuchstieren zu arbeiten, die die menschliche Mutation des *Tor1a*-Gens möglichst gut imitieren sollen.

Verschiedene Mausmodelle der DYT1 Dystonie wurden dabei erzeugt, z.B. knock-down Mäuse, bei denen Gene gezielt ausgeschaltet werden (Goodchild et al., 2005) oder knock-in Mäuse, die das mutierte TorsinA kodierende Gen eingesetzt bekommen. Bislang gibt es keine Maus- oder Rattenmodelle einer DYT1 Dystonie, die eine klare Dystonie aufweisen. Es

existiert lediglich ein neurodegeneratives DYT1 Mausmodell, was nicht der humanen Situation entspricht (Liang, Tanabe, Jou, Chi, & Dauer, 2014).

#### 1.4 **Zielsetzung**

Die Pathophysiologie der DYT1 Dystonie ist bislang in der Forschung nicht eindeutig geklärt. Des Weiteren existiert kein Mausmodell der DYT1 Dystonie, die eindeutige klinisch definierte dystone Bewegungen hat, ohne dass eine Neurodegeneration vorliegt. Daher adressieren wir in dieser Arbeit die Frage, ob sich eine Dystonie bei DYT1 relevanter genetischer Prädisposition durch peripheren Stress („*second hit*“) manifestiert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Heterozygote *Tor1a* +/- (50% *Tor1a* Expression), die naiv keinen dystonen Phänotyp haben, und *Tor1a* +/+ (wt) Mäuse (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) wurden im Alter von vier Monaten untersucht (Goodchild et al., 2005). Die Mäuse des Mischstammes C57BL/6J und 129 wurden in unserer Tieranlage unter nahezu pathogenfreien Bedingungen gehalten.

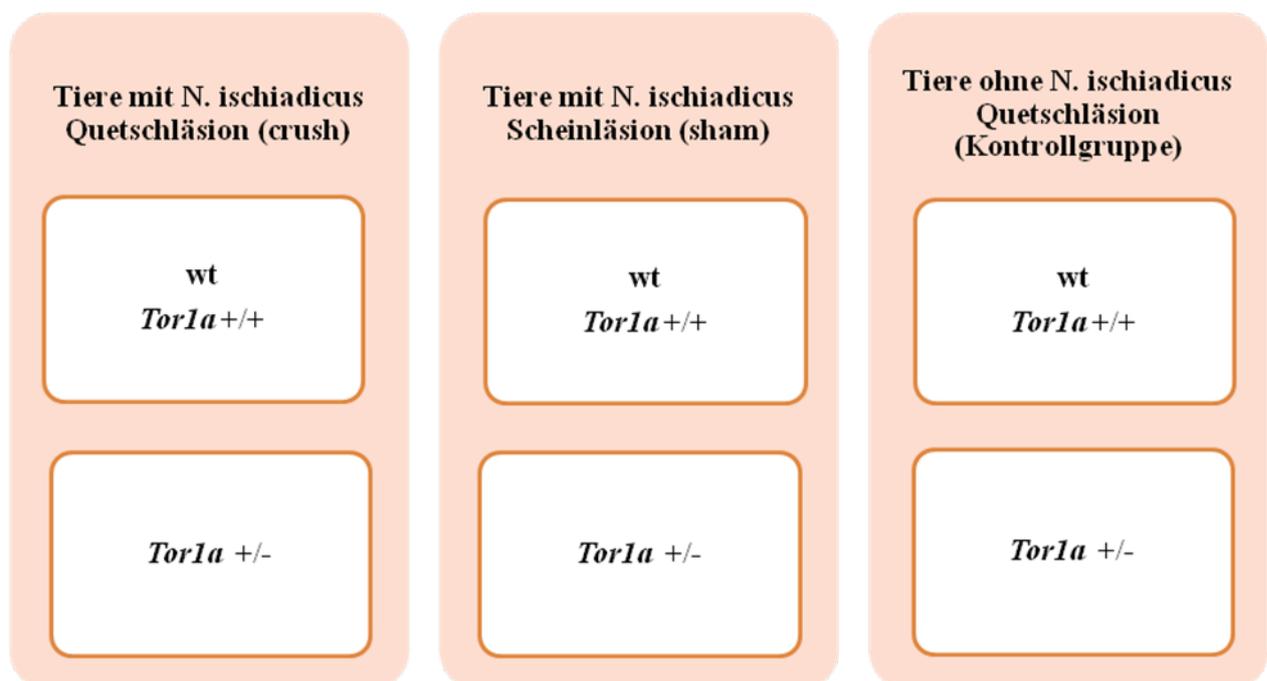


Abbildung 5: Gruppenverteilung der Versuchstiere.

Insgesamt wurden 124 Tiere für die Versuche eingesetzt. Alle Versuche wurden mit adulten Tieren beiderlei Geschlechts durchgeführt. Die Tierversuche wurden von der Regierung Unterfranken genehmigt. Alle Tiere wurden entsprechend den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes artgerecht gehalten. Während des Beobachtungszeitraums von acht Wochen kam es zu keinen großen Gewichtsunterschieden bei der täglichen Gewichtskontrolle (20 bis 25 g).

Die Tiere wurden in sechs Gruppen eingeteilt: Zwei Gruppen mit N. ischiadicus Quetschläsion (crush; wt und *Tor1a* +/-), zwei Gruppen mit N. ischiadicus Scheinläsion

(sham; wt und *Tor1a +/-*) und zwei unoperierte Kontrollgruppen (wt und *Tor1a +/-*). Bei den scheinoperierten Gruppen wurde lediglich das Areal samt der Muskulatur am N. ischiadicus unter Narkose eröffnet und wieder verschlossen, ohne dass der Nerv verletzt wurde.

## 2.2 Quetschläsion des N. ischiadicus

Vor der Operation wurde die Maus mit zehn  $\mu\text{l/g}$  Körpergewicht mit einer zusammengesetzten Narkoselösung intraperitoneal (= i.p.) betäubt (Narkoselösung: Ketanest 2,5 % (2 ml), 0,25 ml/g 2 % (0,25 ml) und NaCl 0,9 % (4 ml) ergeben Injektionslösung von 6,25; Injektion 0,01 ml/g Körpergewicht, 25 g Maus maximale Menge 0,25 ml).

Danach wurde die Region oberhalb des rechten Beins rasiert. Die Maus wurde daraufhin auf einer vorgewärmten Platte (37°C) in Bauchlage fixiert und ein fünf mm langer Schnitt im Bereich des dorsalen hinteren Hüftgelenks des rechten Beins gesetzt. Vorsichtig wurde der Nervus ischiadicus im nächsten Schritt freipräpariert. Im Anschluss daran fand die Quetschläsion des N. ischiadicus mit einer feinen, nicht bezahnten Klemme statt (Hemostat, Firma FST). Die Dauer der Quetschung betrug 30 Sekunden. Am Ende der Operation wurde die operierte Stelle mit einem Faden verschlossen und die Wunde auf Nachblutungen kontrolliert. Die Maus bekam anschließend noch eine Schmerzmedikation mit einem nichtsteroidalen Antirheumatikum (Rimadyl). Innerhalb von wenigen Minuten nach der Operation konnte die Maus sich wieder bewegen und sowohl Nahrung als auch Flüssigkeit zu sich nehmen.

## 2.3 Injektion von AMPT und L-DOPA

In diesem Versuch wurden 22 Tiere (9 *Tor1a +/+* und 13 *Tor1a +/-* Mäuse) in einem Zeitraum von acht Wochen mit einem Dopamin-depletierenden Präparat AMPT (Alpha-Methyl-p-Tyrosin) mit jeweils drei i.p. Gaben mit einer Dosis von je 100 mg/kg KG (1. Gabe 24 h, 2. Gabe 20 h, 3. Gabe 4 h vor Versuchsbeginn) behandelt. 24 Tiere (10 *Tor1a +/+* und 14 *Tor1a +/-* Mäuse) wurden ebenfalls in einem Zeitraum von acht Wochen mit einem Dopamin steigerndem Präparat inklusive einem Decarboxylasehemmer (L-Dopa/ Benserazid-Kombination) mit 30 mg/kg/KG/d L-Dopa sowie 12 mg/kg/KG/d Benserazid einmal pro Tag behandelt. Die Kombination L-Dopa und Benserazid ist beim Menschen ein etabliertes

Präparat zur Therapie von M. Parkinson sowie Dopa-responsiven Dystonien. L-Dopa wird zu Dopamin verstoffwechselt. Damit aber L-Dopa nicht schon in der Peripherie sondern erst im Gehirn zu Dopamin umgewandelt wird, gibt man bei Menschen einen Decarboxylasehemmer hinzu, um Nebenwirkungen zu verringern (Szczena et al., 2014).

Dieses Verfahren wurde analog zum Vorgehen von Ankenmann et al. 2007, Szczena et al. 2014 und van Enkhuizen et al. 2014, durchgeführt (Ankenman & Salvatore, 2007; Szczena et al., 2014; van Enkhuizen, Geyer, Halberstadt, Zhuang, & Young, 2014).

## 2.4 Messverfahren bei der Verhaltensanalyse

Zur Ermittlung von Bewegungsstörungen bei Mäusen sind mehrere unterschiedliche Methoden geeignet. Eine der bewährtesten Vorgehensweisen stellt hierbei die Ganganalyse zur Erforschung eines veränderten Gangbilds dar. Die computerunterstützte Ganganalyse mittels Catwalk™ XT ist dabei ein hochmodernes Verfahren, das insbesondere nach einer N. ischiadicus Quetschläsion bei Ratten schon intensiv untersucht wurde (Bozkurt et al., 2008). Auch anderen Verfahren kommt eine hohe Bedeutung bei der Analyse von Bewegungsstörungen zu. Dazu gehört zum Beispiel der *Rotarod Performance Test*, der Defizite in der Koordination und des Gleichgewichts der Tiere misst (Dang et al., 2006; Sharma et al., 2005; Zhao et al., 2008). Zudem ist die Untersuchung mit dem *Tail-suspension-Test* etabliert, um Bewegungsstörungen bei Nagern zu untersuchen.

### *Catwalk™ XT 10.0*

Beim Catwalk™ XT 10.0 der Firma Noldus Information Technology GmbH (siehe Abbildung 6) handelt es sich um ein neues video-basiertes Analysesystem zur Beurteilung der motorischen Defizite bei Mäusen oder Ratten. Der Versuchsraum war unbeleuchtet, es kam aber eine Infrarotlampe zum Einsatz. Die Entfernung der Kamera zum Laufsteg wurde bei allen Durchläufen standardisiert auf 31,5cm gehalten. Die zu analysierende Fläche auf dem Laufsteg betrug 20cm x 10cm. Diese technischen Voraussetzungen wurden vor jedem Versuchstag kalibriert, um einheitliche Versuchsbedingungen zu schaffen.

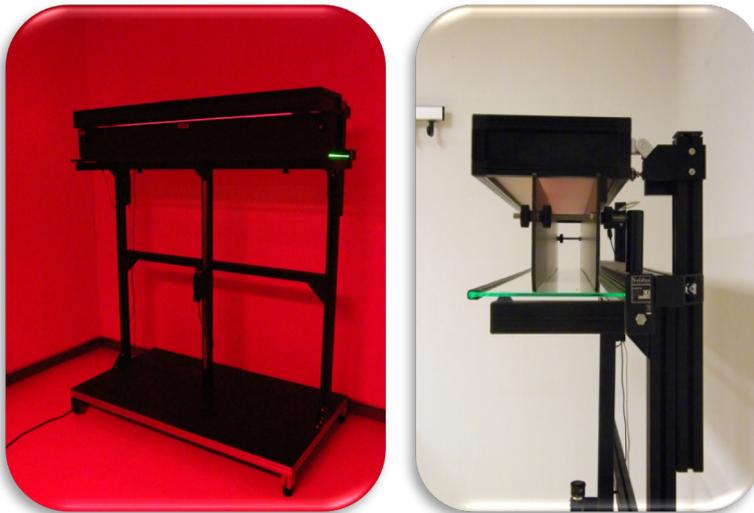


Abbildung 6: Rechts Geräteaufbau frontal und links Geräteaufbau lateral [aus (Noldus, 2012)].

Die Tiere wurden zunächst auf einem 1,5m langen Laufsteg des Catwalk™ XT 10.0 präoperativ trainiert und das Gangverhalten aufgezeichnet. Dafür wurden die Mäuse auf der linken Seite des Laufstegs platziert, sodass sie an das andere Ende der Laufbahn laufen konnten. Dort wurde darüberhinaus eine Futterquelle aufgestellt, die als Motivationshilfe diente. Nach der Läsion des N. ischiadicus fanden postoperativ acht Messungen, jeweils im Abstand von einer Woche statt, bei denen dasselbe Vorgehen in der Untersuchung des Ganges wie im präoperativen Training Anwendung fand. Insgesamt wurden drei Durchläufe pro Messzeitpunkt mit jedem Versuchstier durchgeführt. Beim Gang der Versuchstiere über den Catwalk™ XT 10.0 wurden die Pfotenabdrücke durch eine Kamera erfasst und in Echtzeit auf den Computer übertragen. Das vollständig automatisierte System ist daraufhin bei der computergestützten Analyse in der Lage sowohl dynamische als auch statische Gangparameter anzuzeigen (Bozkurt et al., 2008).

Mit Hilfe des Catwalk™ XT 10.0 wurden Schrittfolgenmuster während des Laufens untersucht („*step sequence*“) und das Gangverhalten der Versuchstiere anhand des vom Programm (Programmversion 10.0.408) ermittelten Schrittfolge-Regularitäts-Index (RI) beurteilt. Dieser Index beschreibt allgemein die Regularität der Koordination zwischen den Gliedmaßen untereinander während des Ganges. Gemessen wird dieser Schrittfolge-Regularitäts-Index anhand der Anzahl der normalen Schrittfolgenmuster („*number of normal step sequence patterns*“ = NSSP), die mit vier (= Anzahl der Pfoten) multipliziert und durch die Anzahl der Pfotenabdrücke mal 100% multipliziert, dividiert werden (Deumens, Jaken, Marcus, & Joosten, 2007):

$$RI = (\text{NSSPx4}) / \text{Anzahl der Pfotenabdrücke} \times 100\%$$

### *Rotarod Analyse*

Ein weiterer motorischer Test, der auch die Koordinationsfähigkeit ermittelt, ist die Rotarod Analyse. Diese wird mit Hilfe einer rotierenden Walze (Rotarod-System™, TSE Systems Bad Homburg Deutschland) festgestellt. Es handelt sich hierbei um einen Zylinder, der sich um die eigene Achse dreht (siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7: Rotarod-System™ Versuchsaufbau frontal.**

Während des Versuchs wird anhand von Sensoren, die im Rotarod integriert sind, die Zeit gemessen, bis die Mäuse von der rotierenden Walze herabfallen. Die sich drehende Walze im Rotarod-System™ besitzt anfangs eine Geschwindigkeit von 5 rpm (Umdrehung pro Minute). Diese Geschwindigkeit steigt während des fünfminütigen Versuchs an (Start 5 rpm bis zur 1. min., 12 rpm = ab 1. min., 20 rpm = ab 2. min., 28 rpm = ab 3. min., 36 rpm = ab 4. min., 50 rpm = 5. min). Die maximale Testdauer pro Maus betrug jeweils 300 Sekunden pro Runde am Rotarod. Die Zeit, bis eine Maus von der Walze fällt, wurde gemessen. Die Mäuse wurden zunächst vor der Nervenläsion des N. ischiadicus präoperativ trainiert und getestet. Nach der Läsion fanden wöchentlich Messungen statt. Die ermittelten Werte wurden im Anschluss auf Microsoft Excel übertragen. Für jede Gruppe wurde der Mittelwert berechnet, um damit nachfolgend statistische Auswertungen durchzuführen.

*Tail-suspension-Test (TST)*

Die klinische Diagnostik im „Tail-suspension-Test“ zur Beurteilung der dystonen Bewegungen des betroffenen rechten Hinterbeines wurde anhand verblindeter Videoaufnahmen (JVC Everio Hard Disk Camcorder) durchgeführt. Die Mäuse wurden für eine Minute vorsichtig am Schwanz festgehalten und hochgehoben. Diese klinische Diagnostik wurde präoperativ sowie acht Wochen lang postoperativ, jeweils im wöchentlichen Abstand, durchgeführt.

Die Skalierung erfolgte nach Schweregrad der fokalen Dystonie (siehe Tabelle 4) am rechten Hinterbein. Es wurde darauf geachtet, dass die Analyse aller Videos verblindet durchgeführt wurde. Falls die Mäuse keine Auffälligkeiten bezüglich der fokalen Dystonie der rechten Hinterpfote zeigten, wurde der Wert null eingetragen. Trat jedoch vereinzelt eine leichte fokale Dystonie des rechten Beins auf, wurde Grad eins registriert. Diese entsprach einem einmaligen, kurzen dystonen Anziehen des betroffenen Beines mit einer Dauer unter einer Sekunde. Grad zwei entsprach einer leichten fokalen Dystonie, bei der wiederholtes, kurzes, dystones Anziehen des betroffenen Beines für eine Dauer von jeweils < 1 Sekunde auftrat. Grad drei wurde vergeben, wenn wiederholtes Anziehen des betroffenen Beines auftrat mit einer Dauer  $\geq 1$  und < 2 Sekunden. Grad vier glich einer fokalen Dystonie höheren Grades mit Anziehen des rechten Beines für eine Dauer  $\geq 2$  Sekunden.

Zur statistischen Analyse wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test herangezogen.

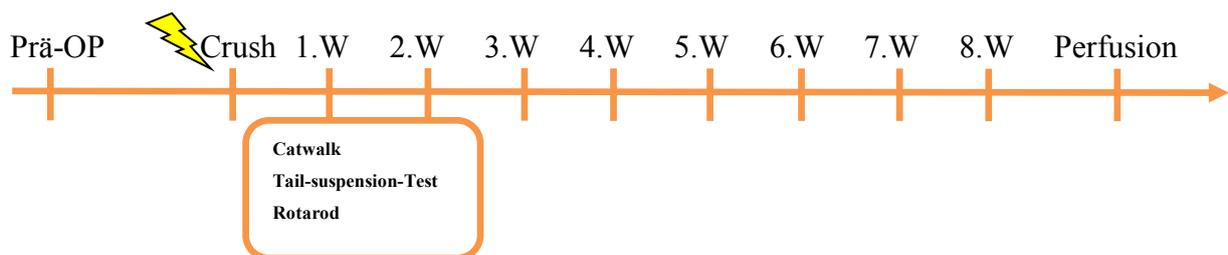
<b>Scoring</b>	<b>Dystoniegrad</b>
<b>0</b>	Keine fokale Dystonie
<b>1</b>	Fokale Dystonie (einmalig, kurz) < 1 Sekunde
<b>2</b>	Fokale Dystonie (mehrfach, kurz) <1 Sekunde
<b>3</b>	Fokale Dystonie (mehrfach) $\geq 1$ und < 2 Sekunden
<b>4</b>	Fokale Dystonie höheren Grades $\geq 2$ Sekunden

**Tabelle 4: Bewertungsskala zur klinischen Beurteilung des Dystoniegrads.**

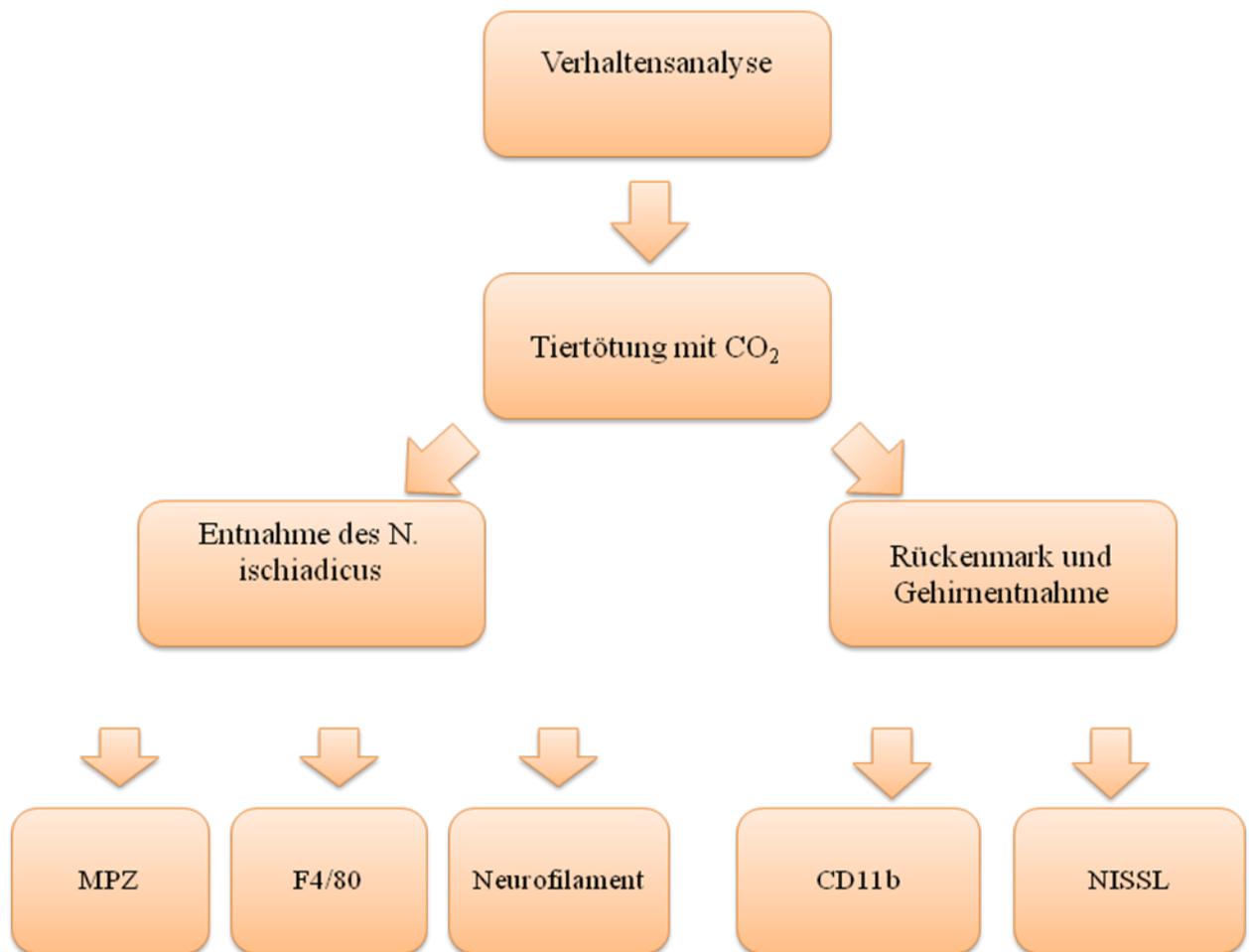
## 2.5 Versuchssequenz

Das Experiment bestand aus drei Teilen.

Im ersten Teil des Experiments wurde zunächst eine präoperative Verhaltensanalyse mit genetisch mutierten *Tor1a* +/- Mäusen und *Tor1a* +/+ Kontrollen durchgeführt: Messverfahren hierfür waren Catwalk, Rotarod und der „Tail-suspension-Test“. Anschließend fand eine Quetschläsion des rechten N. ischiadicus statt. Daraufhin begann die postoperative Verhaltensanalyse mit den gleichen Messinstrumenten über einen Zeitraum von acht Wochen. Gemessen wurde jeweils in einem einwöchigen Abstand (siehe Versuchssequenz unten). Im zweiten Teil wurden histologische Analysen vorgenommen (siehe Abbildung 8). Ob Dopamin die Ausprägung der Dystonie beeinflusst, wurde im dritten Teil der Doktorarbeit mit einem Kontrollexperiment (siehe Abbildung 9) überprüft. Hierfür wurde das gleiche Mausmodell verwendet. Prä- und postoperativ erfolgte dieselbe Verhaltensanalyse, mit Fokus auf Catwalk und Tail-suspension-Test analog zum ersten Teil des Experiments. Zusätzlich fand postoperativ die Verabreichung zweier Medikamente statt. Hierfür gab es vier Mäusegruppen, wobei jeweils einer mutierten *Tor1a* +/- und *Tor1a* +/+ (wt) Mäusegruppe entweder ein Dopamin-depletierendes Präparat (AMPT) oder ein Dopamin-steigerndes Präparat (L-Dopa/Benserazid) verabreicht wurde. Untersucht wurde damit, ob sich die fokale Dystonie der Tiere nach der Quetschläsion des N. ischiadicus verbessert bzw. verschlechtert.

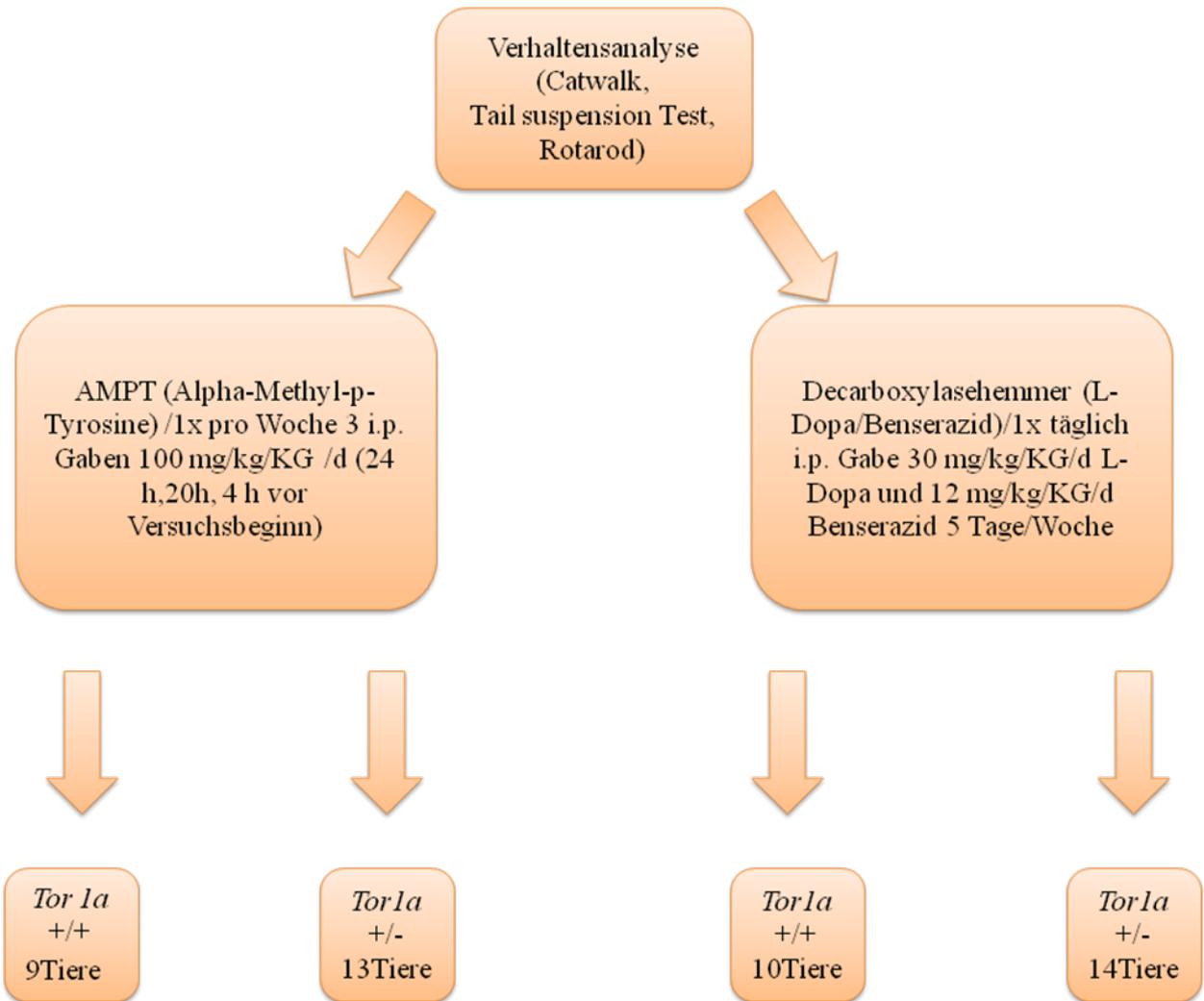


*Histologische Analyse*



**Abbildung 8: Schematische Darstellung des Versuchaufbaus Teil 2.** Nach der gemeinsamen Operation aller Versuchstiere wurde das gewonnene Gewebe unterschiedlich bearbeitet. Im Kyrotom wurden die Schnitte mit einer Dicke von 10 µm auf die Objektträger übertragen und im Tiefkühlschrank bei -20 °C aufbewahrt. Links sieht man die Färbemethoden für die Analyse des N. ischiadicus und rechts die Färbeverfahren für das Gehirn und das Rückenmark.

*Verhaltensanalyse*



**Abbildung 9: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus Teil 3.** Das letzte Experiment mit 46 Tieren dient als Beweis dafür, dass Dopamin tatsächlich für die Ausprägung der Dystonie verantwortlich ist. In diesem Versuch wurden 22 Tiere (9 *Tor1a* +/+ und 13 *Tor1a* +/- Mäuse) in einem Zeitraum von acht Wochen mit einem Dopamin-depletierenden Präparat AMPT (Alpha-Methyl-p-Tyrosine) mit 3 i.p. Gaben in einer Dosis je 100 mg/kg (1. Gabe 24 h, 2. Gabe 20 h, 3. Gabe 4 h vor Versuchsbeginn) und 24 Tiere (10 *Tor1a* +/+ und 14 *Tor1a* +/- Mäuse), ebenfalls ein Zeitraum von acht Wochen, mit einem Dopamin steigerndem Präparat inklusive einem Decarboxylasehemmer (L-Dopa/Benserazid-Kombinatio) mit 30 mg/kg/d L-Dopa sowie 12 mg/kg/d Benserazid einmal pro Tag je 5 Tage/Woche getestet. Im Laufe der Versuche sind zwei Mäuse aus der AMPT-Gruppe, *Tor1a* +/+ und *Tor1a* +/- Tiere, aufgrund einer Wundheilungsstörung aus dem Experiment genommen worden und konnten nicht in die Auswertung der Ergebnisse aufgenommen werden.

### *Gewebe Gewinnung und Aufbereitung*

Nach den achtwöchigen Verhaltensanalysen der Versuchstiere wurden die Mäuse in einem Behälter mit CO<sub>2</sub>-Zufuhr bis zum Tod aufbewahrt. Daraufhin erfolgte eine Fixation der Tiere auf einer Platte an den Füßen. Der Brustkorb wurde eröffnet. Es folgte eine transkardiale Perfusion mit einer Spritze bestehend aus phosphatgepuffter Salzlösung (PBS=100 ml 0,1 M PB (pH 7,35); 900 ml destilliertem Wasser, 9g NaCl + 0,3 ml Heparin). Dabei wurde die Kanüle in die linke Herzkammer injiziert, während gleichzeitig der rechte Vorhof mit einer chirurgischen feinen Schere aufgeschnitten wurde. So sollte erreicht werden, dass das gesamte Blut der Maus abfließt. Das Gehirn wurde anschließend freipräpariert. Das Cerebrum wurde vom Cerebellum mit einem Skalpell getrennt. Beide Bestandteile des Gehirns wurden in ein dafür vorgesehenes Medium (Tissue-Tek) in einen Behälter gegeben. Dieser wurde anschließend in Stickstoff-gekühltem Methylbutan gefroren. Danach fand analog dazu identisch die Präparation des Rückenmarks statt. Dabei wurde seitlich die Knochenstruktur der Wirbelsäule mit einer Pinzette gesprengt und vorsichtig das Rückenmark mit einer Länge von ungefähr einem Zentimeter lumbal entnommen. Zu guter Letzt wurde die Loge des rechten N. ischiadicus freipräpariert und der N. ischiadicus in der Tiefe dargestellt. Anschließend wurde mit Hilfe einer kleinen Schere und einer feinen Pinzette der N. ischiadicus rechts proximal und distal der Läsionsstelle (Länge circa 1-2 cm) durchgeschnitten. Das Gewebe wurde in das Tissue-Tek-Medium eingebettet und eingefroren. Bis zur Bearbeitung der Kryoschnitte wurden die Präparate vom Rückenmark und dem N. ischiadicus in Eppendorf-Gefäßen im Kühlschrank bei -20°C gelagert. Die in Tissue-Tek-Medium eingebetteten Gewebestücke, N. ischiadicus rechts und links, sowie Cerebrum, wurden jeweils mittels eines Kryotoms bei -25°C in zehn µm dicke Schnitte geschnitten. Diese Gewebeschnitte wurden auf mehrere Objektträger transferiert und dem Gewebe entsprechend beschriftet.



vom Kühlschrank entnommen wurden, eine Umrandung mit Pap-Pen. So wurde verhindert, dass die zugeführte Lösung mit dem dazugehörigen Antikörper seitlich entweicht. Da die Makrophagenfärbung (F4/80) und die Neurofilamentfärbung nicht mit Paraformaldehyd (PFA-Inhalt: 4% Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,35)-fixiertem Gewebe funktionieren, wurde die Fixierung mit PFA in diesem Fall ausgelassen. Vor Beginn war es erforderlich die Präparate dreimal 5 Minuten mit 1%iger phosphatgepufferter Salzlösung zu waschen. Daraufhin wurden für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur mit einer serumhaltigen Lösung (Inhalt: 1 ml 10% BSA mit 100 µl Goat Serum und 30 µl Triton auf 9 ml PBS) die unspezifischen Bindungen blockiert. Nach dieser Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die Objektträger mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert, wobei pro Färbevorgang eine Negativkontrolle zur Beurteilung des Hintergrundes und der Probe der erfolgreichen Färbung verwendet wurde. Diese wurde nicht mit dem Primärantikörper inkubiert, sondern lediglich mit der Verdünnungslösung. Die Lösung mit der dazu gehörigen spezifischen Verdünnung des Primärantikörpers für die jeweilige Färbungsmethode wird in Tabelle 5 aufgeführt. Die Präparate wurden am nächsten Tag wieder dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend folgte eine einstündige Inkubation der Gewebepreparate mit dem Sekundärantikörper (siehe Tabelle 5). Nach der Inkubation wurden die Schnitte erneut dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen. Eine halbe Stunde vor dem Gebrauch des ABC-Kits (Dako, Hamburg, Germany) wurde die Lösung angemischt und vorbereitet. Das Grundprinzip der ABC-Färbung besteht darin, über eine Avidinbrücke ein biotinyliertes Enzym irreversibel an den Sekundärantikörper zu binden (Avidin/ Biotin-Kit 1:100; 99 µl BSA+1µl Lösung A+ 1µl Lösung B). Dieses Enzym wandelt dann einen löslichen Farbstoff in ein farbiges und unlösliches Produkt um, was sich mikroskopisch ermitteln lässt. Nach 30 minütiger Inkubationszeit wurde anschließend wieder dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen. Als Farbsubstrat kam in allen durchgeführten Färbeverfahren des *N. ischiadicus* 3,30 - Diaminobenzidin (DAB) in Form von Tabletten zur Anwendung. Die DAB-Tablette wurde in zehn ml destilliertes Wasser zehn Minuten lang gerührt und kurz vor Gebrauch mit 7,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktiviert und mit einer Spritze mit Filteraufsatz auf die Gewebeschnitte gegeben. Nach wenigen Minuten wurden dann die Objektträger in destilliertem Wasser zweimal 5 Minuten gewaschen und mit Aquatex eingedeckt.

*Rückenmark und Gehirn*

Sowohl für die Färbung des Großhirns als auch für die Färbung des Rückenmarks wurden zwei Färbemethoden realisiert. Für die Darstellung von Makrophagen und Mikroglia wurde immunhistochemisch der CD11b Antikörper (Serotec, Oxford, UK) eingesetzt. Die Analyse der Nervenzellen fand durch Nissl-Färbung statt. Die Ermittlung der Makrophagen (CD11b+) wurde wie oben beschrieben gehandhabt. Der einzige Unterschied bestand darin, dass unterschiedliche Primär/- und Sekundär-Antikörper zum Einsatz kamen (siehe Tabelle 5).

Für die Durchführung der Nissl-Färbung wurden die Objektträger zuvor ebenfalls mit Pap-Pen umrandet und dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurde mit einer Pipette das gefilterte Kresylviolett (0,1% Kresylviolett) für 10 Minuten auf die Gewebeschnitte appliziert. Darauffolgend wurden die Schnitte aufs Neue dreimal 5 Minuten mit der phosphatgebundenen Salzlösung gewaschen. Im Anschluss an den Waschvorgang wurde mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol ab 70%) gearbeitet. Dadurch erfolgte die Entwässerung des Gewebes. Im weiteren Verlauf wurde das Gewebe zusätzlich mit dem Lösungsmittel Xylol zweimal 5 Minuten inkubiert und am Ende mit Vitro-Clud (Inhaltsstoff: Xylol), einem klaren dickflüssigen Lösungsmittel mit guter Haftkraft, eingedeckt (siehe Tabelle 6).

	<b>MPZ</b>	<b>NF</b>	<b>F4/80+</b>	<b>CD11b+</b>
<b>Primär-AK</b>	Chicken anti mouse MPZ	Rat anti mouse NF	Rat anti mouse F4/80	Rat anti mouse CD11b
<b>Verdünnung (1% BSA/PBS)</b>	1:1000	1:150	1:300	1:100
<b>Sekundär-AK</b>	Goat anti chicken biot.	Goat anti rat biot.	Rabbit anti rat biot.	Rabbit anti rat biot.
<b>Verdünnung (1% BSA/PBS)</b>	1:100	1:100	1:100	1:100

**Tabelle 5: Verwendete Antikörper der immunhistochemischen Färbemethoden und Dosierung der Antikörper.**

	<b>Ethanol (70%)</b>	<b>Ethanol (80%)</b>	<b>Ethanol (90%)</b>	<b>Ethanol (100%)</b>	<b>Xylol</b>
<b>Zeit (in Minuten)</b>	1-2	1	1-2	1	2 x 5

**Tabelle 6: Aufsteigende Alkoholreihe bei der Nissl – Färbung und Auflistung der verschiedenen Lösungsmittel.**

## 2.6 Auswertungsmuster

### 2.6.1 Morphometrie

#### *MetaVue Research Imaging Software*

Mit Hilfe eines Axioplan 2 mit CCD Kamera (Olympus BH2, Olympus, Hamburg, Germany) wurde die optische Dichte („*optical density*“, OD) ermittelt. Diese wurde mit dem Programm **MetaVue Research Imaging Software** (Programmversion 6.3r2 Visitron Systems, Munich, Germany) bestimmt. Zusätzlich fand das Programm SPOT Software (SPOT Imaging Solutions, Michigan, USA) für die Aufnahme von Live-Bildern Anwendung. Um die Belichtung konstant zu halten, wurde immer mit den unten aufgeführten Werten für eine standardisierte Auswertung gearbeitet (siehe Tabelle 7).

	<b>Rot</b>	<b>Grün</b>	<b>Blau</b>
<b>Belichtungsparameter</b>	1,000	1,962	6,628

**Tabelle 7: Standardisierte Belichtungswerte Axiophot.**

Zur Ermittlung der Anzahl der Zellen für die Bestimmung der immunhistochemischen Parameter wurde ein Mikroskop von Zeiss verwendet (siehe Abbildung 11). Für die Zellzählung wurde ein Okular mit Zählgitter (definierte Fläche 0,0256 mm<sup>2</sup>) eingesetzt. (siehe Abbildung 11).



**Abbildung 11: Zeiss Mikroskop (links) und das Zählkular (rechts).** Dieses Mikroskop wurde für die Zellzählung herangezogen. Rechts sieht man das Okular mit integriertem Zählgitter 25/ 2x2 DM Zeiss (Durchmesser 25 mm) zusammen mit dem Handzähler.

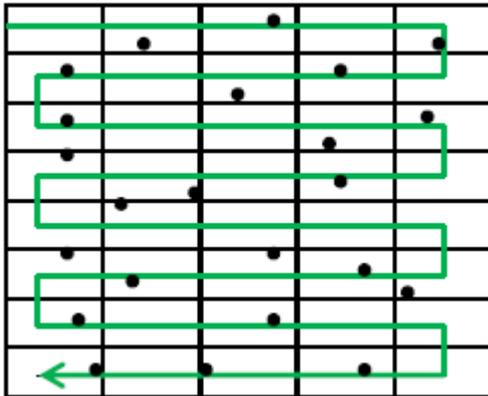
#### *Immunhistochemische Färbungen des N. ischiadicus – MPZ, NF und F4/80*

Immunhistochemische Färbungen des N. ischiadicus rechts wurden mit dem Myelinmarker Myelinprotein Zero (MPZ) und dem axonalen Marker Neurofilament (NF) durchgeführt. Pro Tier wurden fünf Bilder aufgenommen, die wiederum auf der Festplatte des Computers abgespeichert wurden. Für diese fünf gespeicherten Bilder erfolgte eine Qualitätskontrolle. Dabei wurden die drei am besten erhaltenen Bilder für die weitere Auswertung ermittelt. Die Bilder, die für die Auswertung ausgewählt wurden, hatten alle keine Fehler, die bei der Durchführung der Färbemethoden vereinzelt entstehen können. Anschließend fand die Auswertung statt. Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) der Färbungen wurde mit dem Programm MetaVue (Programmversion 6.3r2) durchgeführt.

#### *Immunhistochemische Färbungen des Striatums, des Kortex und des Rückenmarks – Nissl und CD11b*

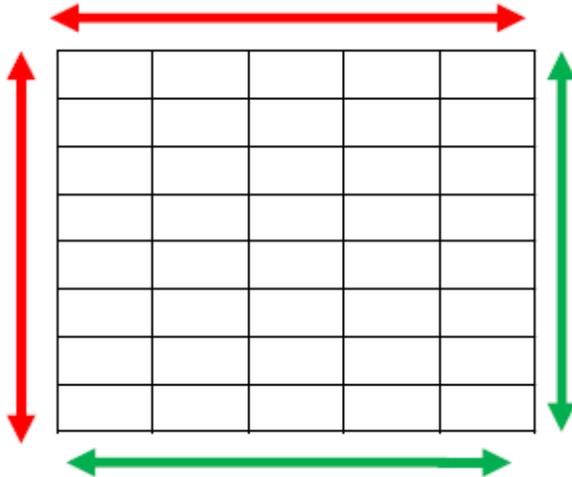
Zur Darstellung von Neuronen wurde die Nissl- Färbung verwendet (Lüllmann-Rauch, 2006c). Um die beiden Genotypen zu vergleichen, wurden neben dem Rückenmark (lumbal L2-L4), auch das Striatum und der zerebrale sensible Kortex näher untersucht. Methodisch

wurde die Auswertung mittels Zellzählung mit einem Zählkular mit Zählgitter realisiert (siehe Abbildung 11).



**Abbildung 12: Die mäanderförmige Zähltechnik.**

Bei der Zähltechnik wurden alle Quadrate ausgezählt, daraufhin in eine Excel-Tabelle übertragen, um anschließend den Mittelwert zu errechnen. Beim Auszählen der Zellen wurde immer darauf geachtet, dass die Grenzlinien nicht überschritten wurden. Um jegliche Fehler zu vermeiden, wurde eine mäanderförmige Zähltechnik (siehe Abbildung 12) angewandt. Dabei wurde von oben links angefangen und schrittweise von Kasten Nr. eins auf Nr. zwei gezählt. Dies hatte den Vorteil, dass Zellen weder doppelt gezählt noch vergessen wurden. Um die Auswertung zu optimieren, wurde ein Handzähler verwendet. Das Gewebe wurde mit einer 600-fachen Vergrößerung (10x Okular mal 60x Objektiv = 600) dargestellt. Am Anfang wurden die Grenzlinien festgelegt. Dies diente dazu, eine systematische Auswertung zu gewährleisten. Nach dieser Zählweise wurden nur die Zellen an zwei vorher festgelegten Grenzlinien mitgezählt. Diese zwei Grenzlinien sind in Abbildung 13 (grüner Pfeil) abgebildet. Die roten Pfeile zeigen die anderen Grenzlinien an. Zellen, die sich dort befanden oder diese Grenzlinien überschritten, wurden nicht mitgezählt. (siehe Abbildung 13, roter Pfeil).



**Abbildung 13: Grenzlinienfestlegung.** Zellen an der Grenzlinie (grüner Pfeil) wurden mitgezählt, die Zellen an der Grenzlinie mit rotem Pfeil wurden nicht mitgezählt.

Das Rückenmark der Versuchstiere wurde im lumbalen Bereich (L2-L4) entnommen. Anschließend erfolgte die Auswertung. Dabei wurde bei der Auswertung des Rückenmarks die graue Substanz (*Substantia grisea*), die eine Schmetterlingsform aufweist, berücksichtigt: Sie ist der informationsverarbeitende Anteil des ZNS aus neuronalen Zellkörpern mit Synapsen und Gliazellen. In diesem Bereich des Rückenmarks kommen neben den großen multipolaren  $\alpha$ -Motoneuronen auch die kleinen  $\gamma$ -Motoneurone vor. Auch die weiße Substanz (*Substantia alba*) wurde ausgewertet. Diese Region ist im Vergleich zur *Substantia grisea* der informationsleitende Anteil (Leitung von Aktionspotentialen) des ZNS und besteht hauptsächlich aus markhaltigen Nervenfasern. Zwar fehlt in der *Substantia alba* weitgehend die synaptische Verarbeitung der neuronalen Information, dennoch traten vereinzelt Zellen auf, die mit aufgezeichnet wurden (Aumüller, 8. November 2006).

Die Zählkammer befand sich im vorderen breiteren Flügelteil, dem Vorderhorn (*Cornu ventrale*). Bei dem Zählvorgang wurden die rechte Hälfte sowie die linke Hälfte des Vorderhorns erfasst. Die Einteilung der Typen von Nervenzellen der grauen Substanz des Rückenmarks kann in Tabelle 8 nachgelesen werden.

Wurzellzellen	Interneurone	Strangzellen
<b><math>\alpha</math>- Motoneurone</b>	Schaltzellen	im Hinterhorn
<b><math>\gamma</math>- Motoneurone</b>	Kommisurenzellen	
	Assoziationszellen	

**Tabelle 8:** Neurontypen der grauen Substanz des Rückenmarkes [nach (Lüllmann-Rauch, 2006b)].

Sowohl die großen Zellen ( $\alpha$ - Motoneurone) als auch die kleinen Zellen ( $\gamma$ - Motoneurone) der grauen Substanz wurden als Ganzes zusammengeführt. Nach dem Zählvorgang wurde die Anzahl der Zellen auf eine SI-Einheit der Fläche von 1 mm<sup>2</sup> umgerechnet.

### 2.6.2 Statistische Auswertungen

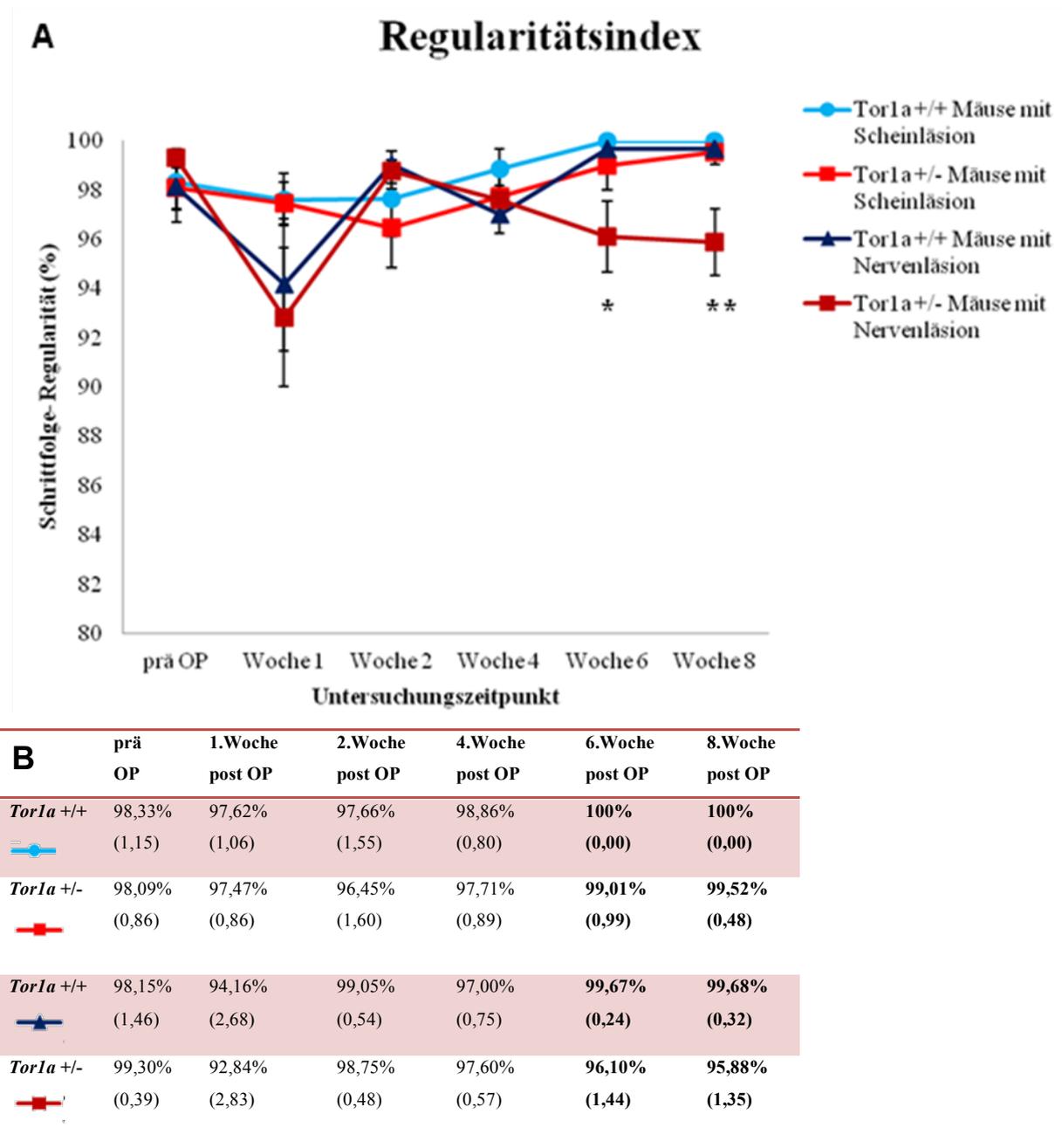
Zur statistischen Analyse von ermittelten Daten wurde die Verteilung der Werte mittels Quantile-Quantile-Plots untersucht. Keiner der Plots zeigte eine normale Verteilung, daher wurden nicht-parametrische Verfahren als statistische Tests verwendet. Zuerst wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet, um mehrere Gruppen (Genotyp, behandelte Tiere mit oder ohne Quetschläsion) miteinander zu vergleichen. Um zwei Gruppen für jeden Zeitpunkt zu vergleichen, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Da jedoch mehrere Zeitpunkte untersucht wurden (Prä-OP, Woche 1, Woche 2, Woche 4, Woche 6, Woche 8), war eine Korrektur der Fehlerrate erforderlich, um ein Signifikanzniveau von 0,05 zu erhalten. Zu diesem Zweck wurden die Ergebnisse der Mann-Whitney-U-Tests für die verschiedenen Zeitpunkte durch die Bonferroni-Holm-Methode korrigiert. Um die Veränderung der nicht konstanten Werte über die verschiedenen Zeitpunkte in die statistischen Analysen umzusetzen, wurde die Differenz zu den präoperativen Werten berechnet. In den Abbildungen sind Mittelwerte und  $\pm$  SEM-Intervalle als Fehlerbalken dargestellt. Statistisch signifikante Ergebnisse, die unkorrigierten \* und die korrigierten § sind in den Abbildungen 14, 17 und 26 dargestellt. Zusätzlich wurde Cohens d als Effektgrößenmaß für die Interpretation der Größe des Effekts in Abbildung 17 berechnet. Um Cohens d-Daten zu interpretieren, zeigen Werte kleiner als 0,5 einen kleinen Effekt, Werte zwischen 0,5 und 0,8 stellen einen mittleren Effekt dar und Werte über 0,8 implizieren einen großen Effekt (Cohen, 1988). Die statistische Analyse erfolgte mit der Software R Version 3.2.2. Zur Bestimmung der Signifikanz wurden die Signifikanzwerte \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  und \*  $p < 0,001$  festgelegt.

### **3 Befunde**

#### **3.1 Verhaltensanalysen**

##### *Catwalk™ XT 10.0*

Analysiert wurden abnormale Veränderungen des Schrittfolgemusters, die sich in der Höhe des Schrittfolgeregularitäts-Index widerspiegeln. Dieser Index lag bei *Tor1a* *+/+* Tieren mit einer Quetschläsion des N. ischiadicus vor der Operation bei  $98,15 \pm 1,46\%$  und bei *Tor1a* *+/-* Tieren bei  $99,30 \pm 0,39\%$ . Eine Woche nach der Quetschläsion betrug der prozentuale Anteil der Schrittfolgeregularität bei *Tor1a* *+/+* Mäusen  $94,16 \pm 2,68\%$  und bei *Tor1a* *+/-* Mäusen  $92,84 \pm 2,83\%$ . Bis zum Ende des achtwöchigen Beobachtungszeitraums kam es bei den *Tor1a* *+/+* Mäusen zu einer Erholung ( $99,68 \pm 0,32\%$ ), während die Mutanten diese Erholung nicht aufweisen konnten ( $95,88 \pm 1,35\%$ ) (\*\*  $p < 0,01$ ). Die Kontrollexperimente mit scheinoperierten Mäusen zeigten keine Abnormalitäten in der Schrittfolge nach der Operation. Abbildung 14 stellt diese Ergebnisse nochmals graphisch dar.

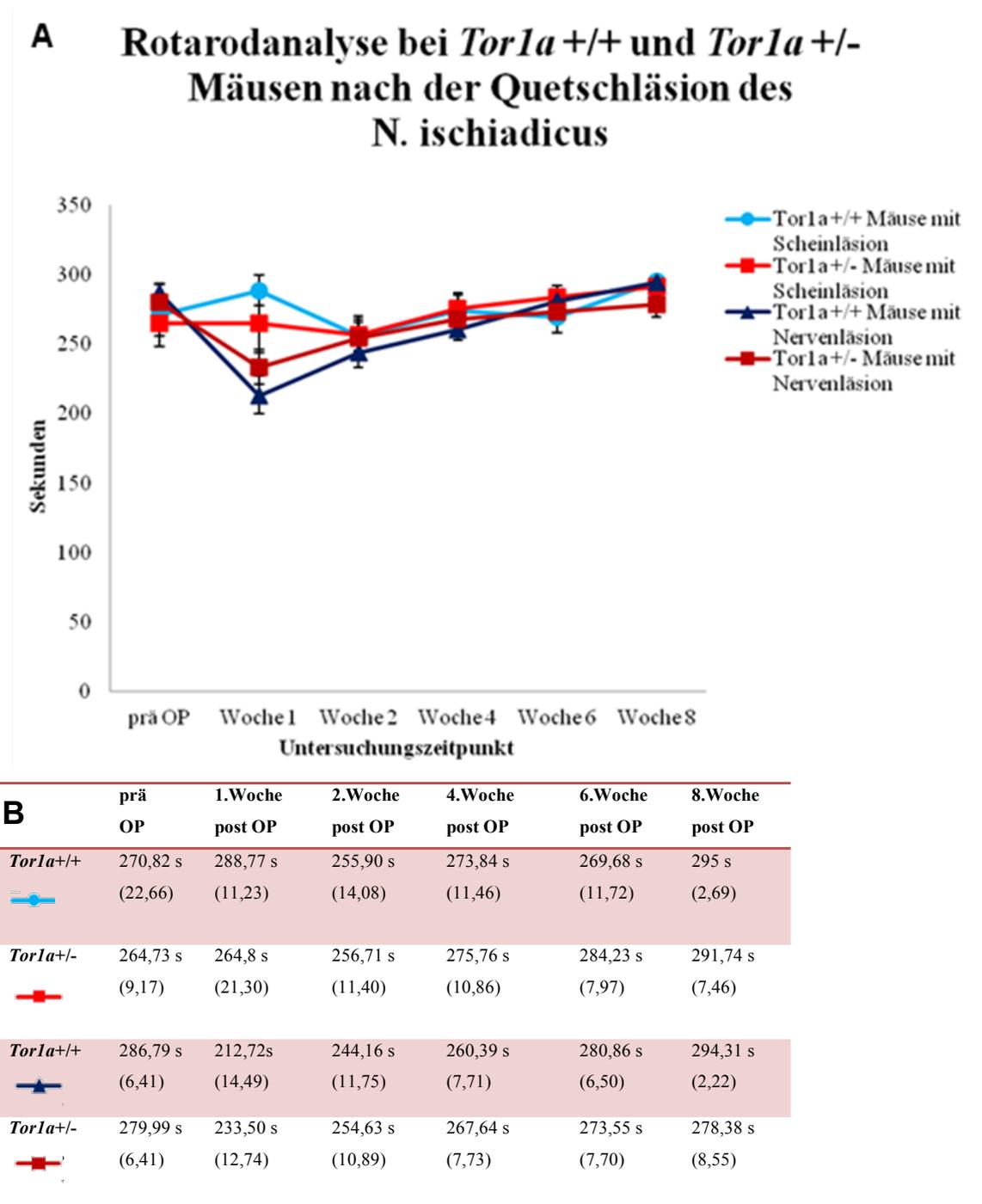


**Abbildung 14: Catwalk – Schrittfolgeregularitätsindex, Tiere mit einer Scheinläsion (sham) versus Tiere mit einer Quetschläsion (crush) präoperativ bis 8. Woche postoperativ (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , Mann-Whitney Test, Abbildung A, Mittelwerte und Standardfehler in Klammern sind in Abbildung B aufgeführt).**

### Rotarod

Ermittelt wurde die Motorik und Koordinationsfähigkeit der Mäuse, gemessen anhand der Zeit, bis diese von der rotierenden Walze herabfielen. Vor der Operation konnten sich alle Versuchstiere etwa 264 bis 286 Sekunden lang auf der Walze halten. Nach der Quetschläsion

(crush) kam es bei beiden Genotypen (*Tor1a* +/+ und *Tor1a* +/-) zu einer nicht signifikanten Reduktion der Verweildauer auf der Rotarodwalze (212 bis 233 Sekunden). Im Verlauf stieg aber die Zeit auf der Walze bei den Tieren mit der Quetschläsion (crush) wieder auf das Ausgangsniveau an. Bei den scheinoperierten Mäusen ließen sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Veränderungen in der Verweildauer auf der Walze finden (siehe Abbildung 15).

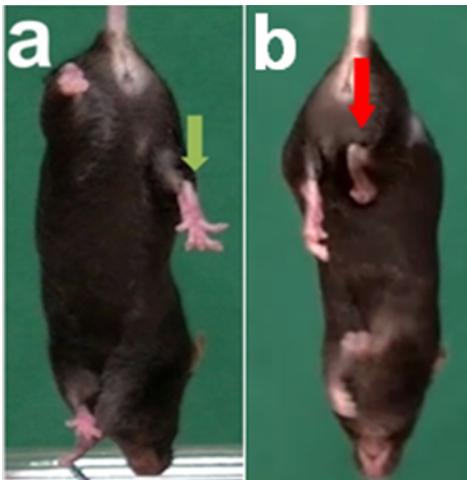


**Abbildung 15: Rotarod-Experiment scheinoperierte Mäuse (sham) versus Mäuse mit einer Quetschläsion bis 8. Woche postoperativ.** Zu keinem Messzeitpunkt unterschieden sich die Mäuse signifikant in ihrer

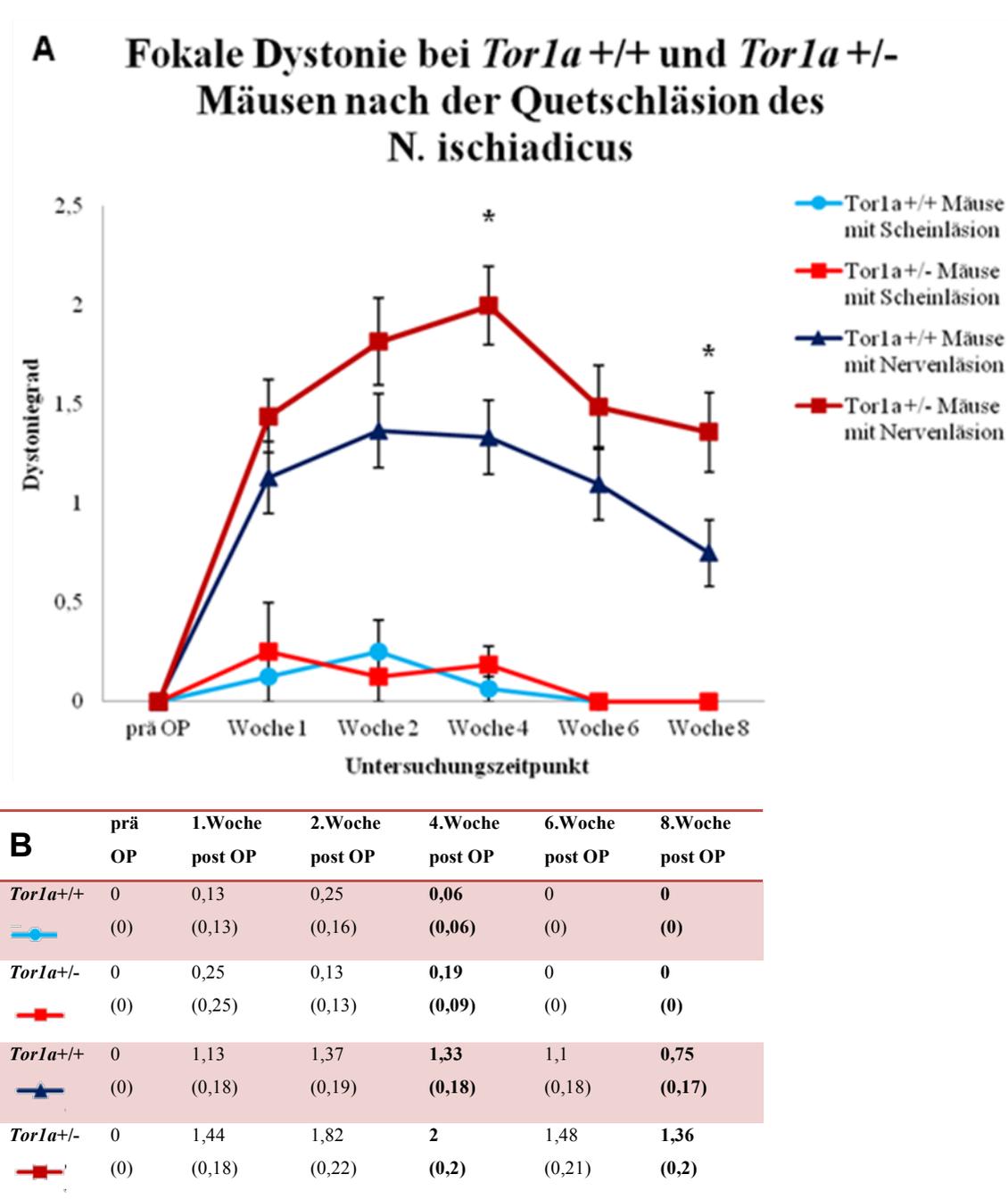
motorischen Koordinationsleistung beim Rotarod-Test ( $p > 0,05$ , Abbildung A). Abbildung B zeigt die Mittelwerte und die Standardfehler (in Klammern) zwischen den Kontrolltieren wt *Tor1a*  $+/+$  und den Tieren mit der Quetschläsion *Tor1a*  $+/-$ .

### *Dystoniegraduierung anhand des Tail-suspension-Tests*

Hierbei zeigten sowohl *Tor1a*  $+/+$  Mäuse als auch *Tor1a*  $+/-$  Mäuse zwei Tage nach der Operation eine passagere Parese des betroffenen rechten Hinterbeins (Abbildung 16 A, grüner Pfeil), wodurch dieses vom Körper ausgestreckt wurde. Nach zwei Wochen kam es in beiden Genotypen zu einer fokalen Dystonie mit „Verkrampfung“ des operierten Beins (Abbildung 16 B, roter Pfeil). Diese fokale Dystonie war bei den *Tor1a*  $+/-$  Mäusen im Verlauf der postoperativen Beobachtungszeit von 8 Wochen durchgehend höher als bei den *Tor1a*  $+/+$  Mäusen, wobei ein statistisch signifikanter Unterschied nur in der vierten und achten Woche nach der Operation zu verzeichnen war (Abbildung 17, \*  $p < 0,05$ ). Hinsichtlich der scheinoperierten Mäuse zeigten weder Wildtyp-Mäuse noch Mutanten Hinweise auf dystone Bewegungen.



**Abbildung 16: Zustand der Maus zwei Tage nach der Quetschläsion des rechten N. ischiadicus (links) und die fokale Dystonie zwei Wochen nach der Quetschläsion des N. ischiadicus (rechts).**



**Abbildung 17: Tail-suspension-Test: Fokale Dystonie - Vergleich zwischen *Tor1a*  $+/+$  und *Tor1a*  $+/-$  Mäusen (Einheit: Dystoniegrad).** Die fokale Dystonie entwickelte sich ab der vierten Woche nach der Operation bei den *Tor1a*  $+/-$  Mäusen mit einer Quetschläsion signifikant stärker als bei den *Tor1a*  $+/+$  Mäusen mit Quetschläsion. Weder scheinoperierte *Tor1a*  $+/+$  Mäuse noch scheinoperierte Mutanten zeigten Hinweise auf dystone Bewegungen. (\*  $p < 0,05$ , Mann-Whitney Test mit Vergleich zwischen *Tor1a*  $+/-$  und *Tor1a*  $+/+$  Mäusen mit Quetschläsion, Abbildung A). Abbildung B stellt die Mittelwerte und Standardfehler (in Klammern) der scheinoperierten *Tor1a*  $+/+$  und *Tor1a*  $+/-$  Mäuse versus der *Tor1a*  $+/-$  und *Tor1a*  $+/+$  Tiere mit der Quetschläsion präoperativ bis zur achten Woche postoperativ dar.

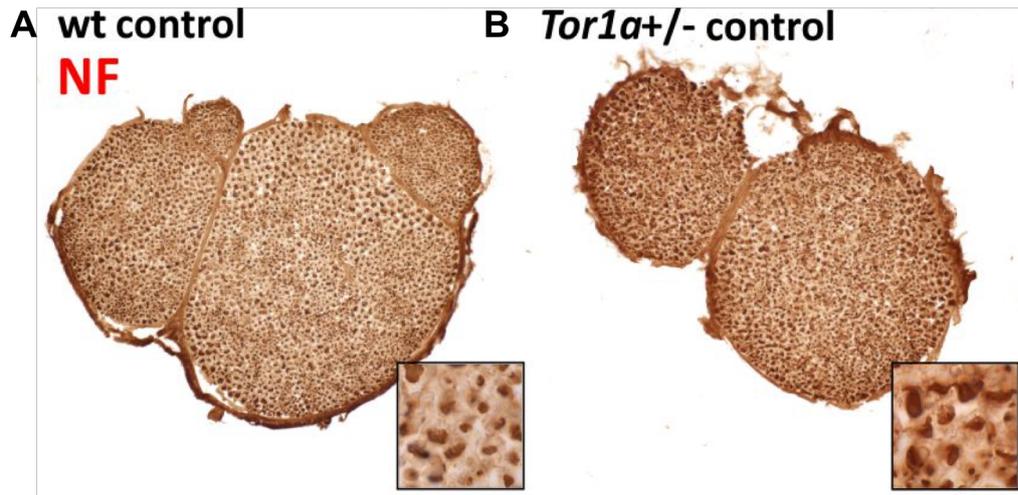
## 3.2 Morphologische Analysen

### 3.2.1 Peripheres Nervensystem

Es wurden immunhistochemische Färbungen vorgenommen, um mögliche Unterschiede in der Regenerationsfähigkeit zwischen den Versuchsgruppen nach der N. ischiadicus Quetschläsion zu überprüfen.

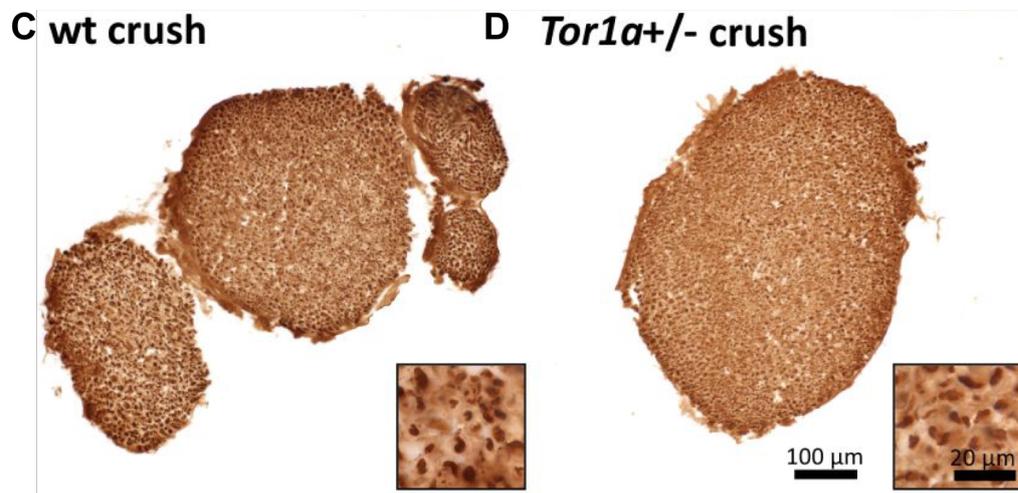
#### *Axonaler Marker Neurofilament (NF)*

Bezüglich der Neurofilamentfärbung zeigten naive *Tor1a* *+/+* Mäuse (Abbildung A, hellblauer Balken,  $0,25 \pm 0,03OD$ ) keine signifikanten Unterschiede verglichen mit *Tor1a* *+/-* Mäusen (Abbildung B, oranger Balken,  $0,31 \pm 0,03OD$ ). Auch die *Tor1a* *+/+* Tiere mit der Quetschläsion (Abbildung C, dunkelblauer Balken,  $0,31 \pm 0,02OD$ ) unterschieden sich diesbezüglich nicht signifikant von den *Tor1a* *+/-* Tieren mit der Quetschläsion (Abbildung D, roter Balken,  $0,40 \pm 0,02OD$ ). Auch zwischen den Tieren mit Quetschläsion (*Tor1a* *+/+*  $0,31 \pm 0,02OD$ ; *Tor1a* *+/-*  $0,40 \pm 0,02OD$ ) und den Kontrolltieren (*Tor1a* *+/+*  $0,25 \pm 0,03OD$ ; *Tor1a* *+/-*  $0,31 \pm 0,03OD$ ) gab es keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ).



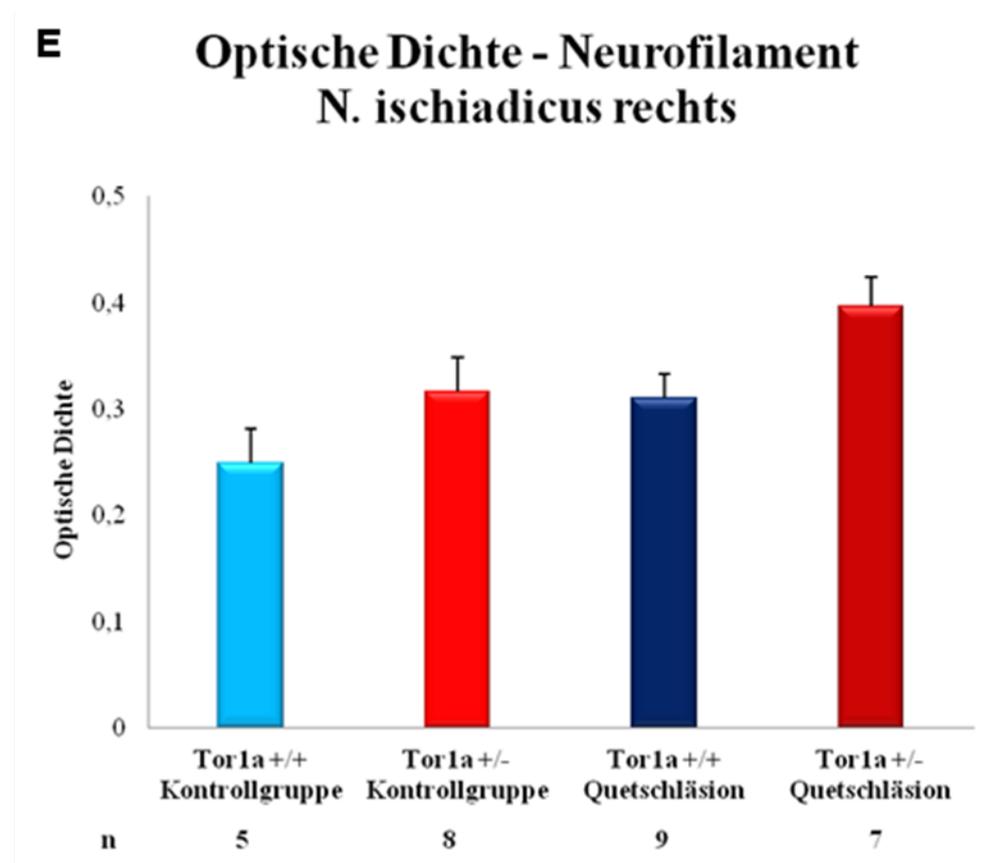
*Tor1a* <sup>+/+</sup> Kontrollgruppe

*Tor1a* <sup>+/-</sup> Kontrollgruppe



*Tor1a* <sup>+/+</sup> mit Nervenläsion

*Tor1a* <sup>+/-</sup> mit Nervenläsion



**F** Optische Dichte Neurofilament

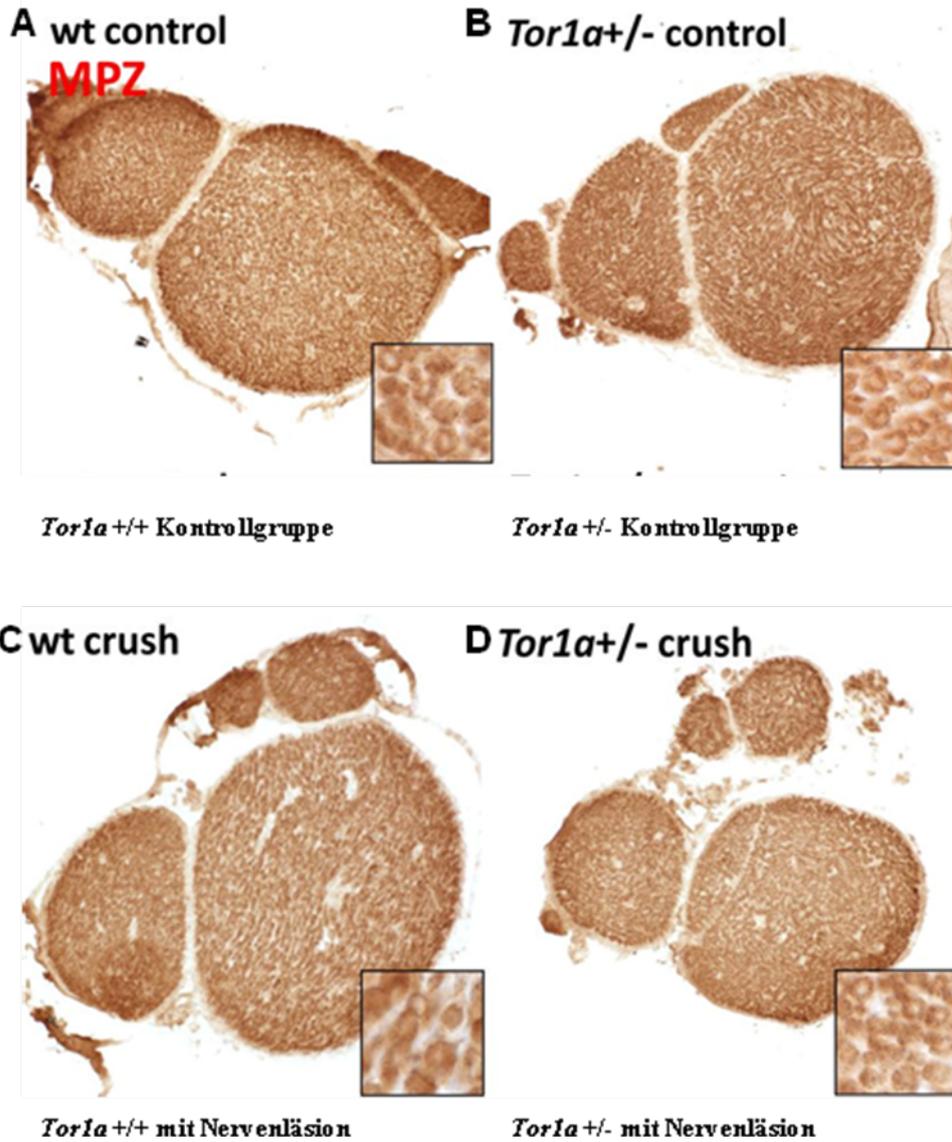
Tor1a <sup>+/+</sup> Kontrollgruppe	0,25 (0,03)
Tor1a <sup>+/-</sup> Kontrollgruppe	0,31 (0,03)
Tor1a <sup>+/+</sup> Quetschläsion	0,31 (0,02)
Tor1a <sup>+/-</sup> Quetschläsion	0,40 (0,02)

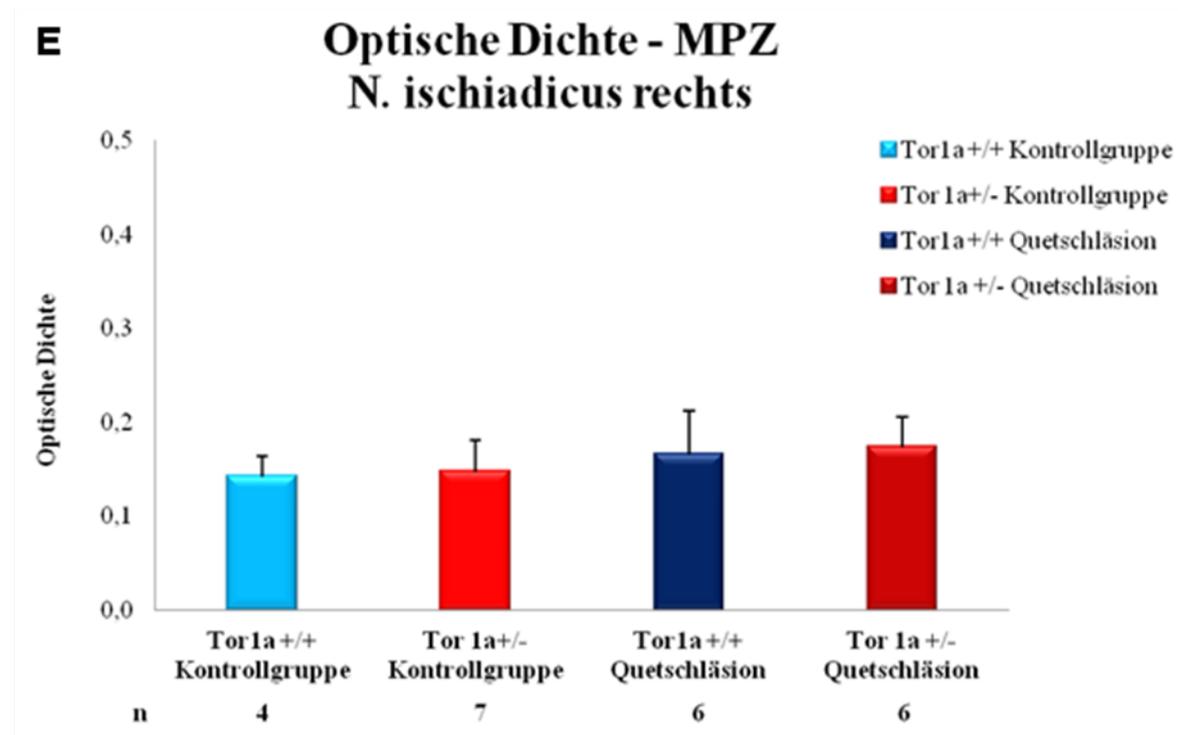
**Abbildung 18: Optische Dichte der Neurofilamentfärbemethode des N. ischiadicus rechts.** Immunhistochemische Färbungen des N. ischiadicus auf dem axonalen Marker Neurofilament zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zwischen *Tor1a* <sup>+/+</sup> und *Tor1a* <sup>+/-</sup> Tieren (alle *p*-Werte >0,05, Abbildung bis E). Abbildung F verdeutlicht die Mittelwerte und die Standardfehler (in Klammern).

*Myelinmarker Myelinprotein Zero (MPZ)*

Hinsichtlich der Myelinfärbung zeigten naive *Tor1a* <sup>+/+</sup> Kontrolltiere (Abbildung A, hellblauer Balken, 0,14±0,02OD) keine signifikanten Unterschiede verglichen mit *Tor1a* <sup>+/-</sup> Mäusen (Abbildung B, oranger Balken, 0,15±0,03OD). Auch die *Tor1a* <sup>+/+</sup> Tiere mit der Quetschläsion (Abbildung C, dunkelblauer Balken, 0,16±0,05OD) unterschieden sich

diesbezüglich nicht signifikant von den *Tor1a* +/- Tieren mit der Quetschläsion (Abbildung D, roter Balken,  $0,17\pm 0,03\text{OD}$ ). Auch zwischen den Tieren mit Quetschläsion (*Tor1a* ++  $0,16\pm 0,05\text{OD}$ ; *Tor1a* +/-  $0,17\pm 0,03\text{OD}$ ) und den Kontrolltieren (*Tor1a* ++  $0,14\pm 0,02\text{OD}$ ; *Tor1a* +/-  $0,15\pm 0,03\text{OD}$ ) gab es keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ).





**F** Optische Dichte MPZ

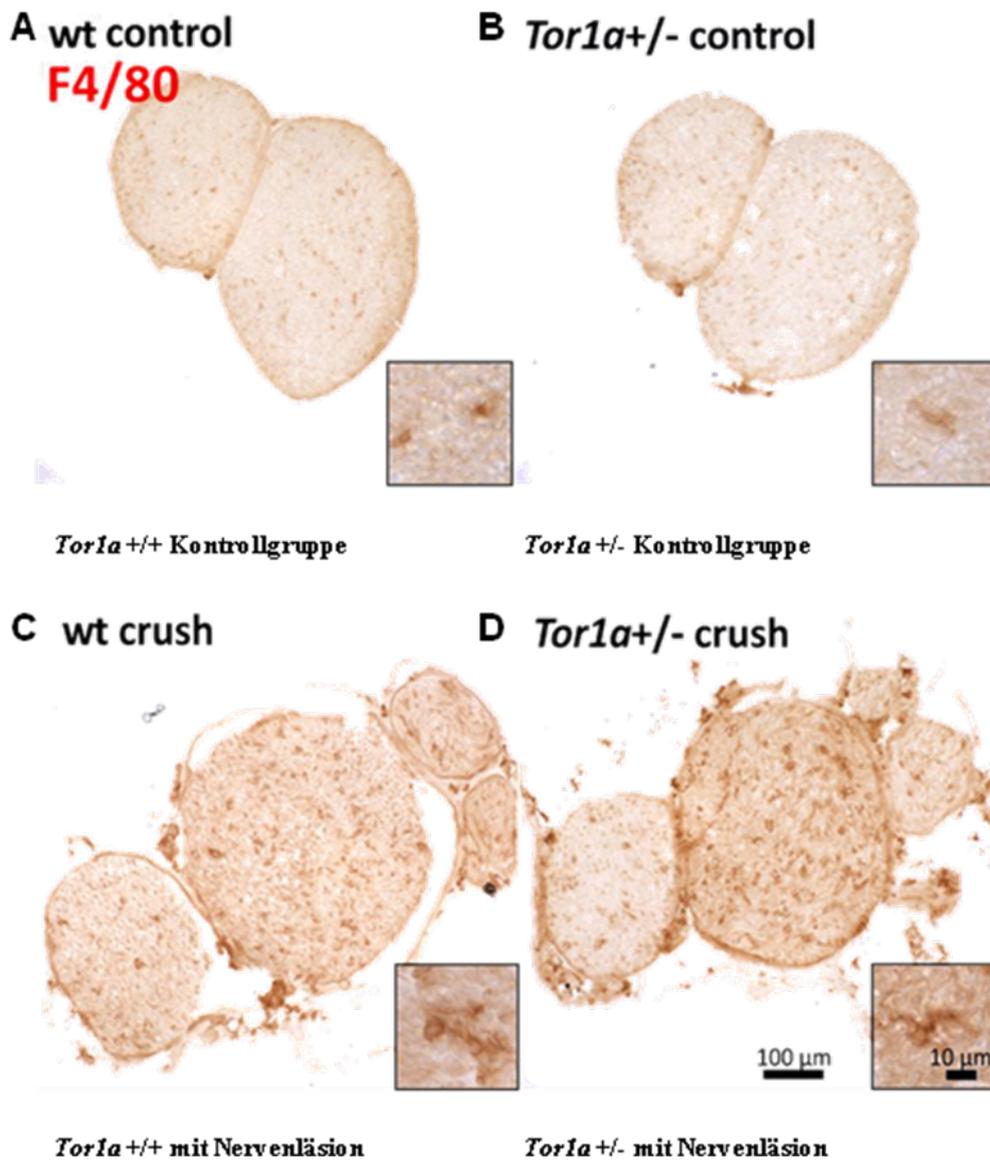
<i>Tor1a</i> +/+ Kontrollgruppe	0,14 (0,02)
<i>Tor1a</i> +/- Kontrollgruppe	0,15 (0,03)
<i>Tor1a</i> +/+ Quetschläsion	0,16 (0,05)
<i>Tor1a</i> +/- Quetschläsion	0,17 (0,03)

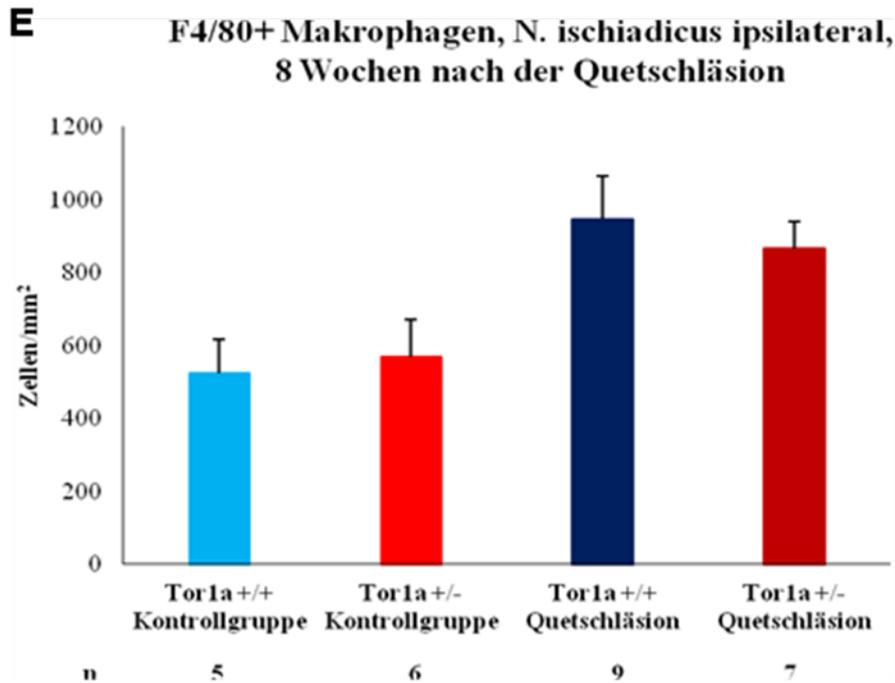
**Abbildung 19: Optische Dichte der MPZ – Färbemethode des N. Ischiadicus rechts.** Immunhistochemische Färbungen des N. ischiadicus rechts auf dem Myelinmarker Myelinprotein Zero zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zwischen *Tor1a* +/+ und *Tor1a* +/- Tieren (alle *p*-Werte >0,05, Abbildung A bis E). Die Mittelwerte und die Standardfehler (in Klammern) sind in Abbildung F zusammengefasst.

*F4/80*+ - Makrophagenfärbung

Was die *F4/80*+ - Makrophagenfärbung angeht, zeigten naive *Tor1a* +/+ Mäuse (Abbildung A, hellblauer Balken, 523,96±93,80 Zellen/mm<sup>2</sup>) keine signifikanten Unterschiede verglichen mit *Tor1a* +/- Mäusen (Abbildung B, oranger Balken, 567,63±101,91 Zellen/mm<sup>2</sup>). Auch die *Tor1a* +/+ Tiere mit der Quetschläsion (Abbildung C, dunkelblauer Balken, 946,34±118,21 Zellen/mm<sup>2</sup>) unterschieden sich diesbezüglich nicht

signifikant von den *Tor1a* +/- Tieren (Abbildung D, roter Balken,  $865,92 \pm 74,52$  Zellen/mm<sup>2</sup>). Jedoch lässt sich ein deutlicher Anstieg in der Anzahl der Zellen zwischen den Tieren mit der Quetschläsion (*Tor1a* ++  $946,34 \pm 118,21$  Zellen/mm<sup>2</sup>; *Tor1a* +/-  $865,92 \pm 74,52$  Zellen/mm<sup>2</sup>) und den naiven Mäusen (*Tor1a* ++  $523,96 \pm 93,80$  Zellen/mm<sup>2</sup>; *Tor1a* +/-  $567,63 \pm 101,91$  Zellen/mm<sup>2</sup>) feststellen.





**F** F4/80+ ipsilateral

Tor1a+/+ Kontrollgruppe	523,96 Zellen/mm <sup>2</sup> (93,80)
Tor1a+/- Kontrollgruppe	567,63 Zellen/mm <sup>2</sup> (101,91)
Tor1a+/+ Quetschläsion	946,34 Zellen/mm <sup>2</sup> (118,21)
Tor1a+/- Quetschläsion	865,92 Zellen/mm <sup>2</sup> (74,52)

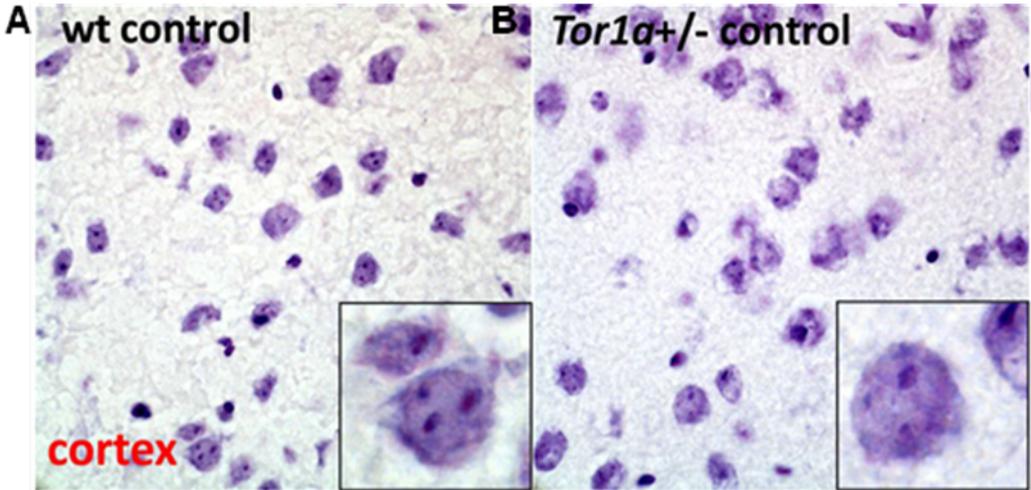
**Abbildung 20: F4/80+ Makrophagenfärbung N. ischiadicus ipsilateral 8 Wochen nach der Quetschläsion.**

Die Anzahl an F4/80+ Makrophagen ipsilateral zur Nervenläsion unterschied sich im Vergleich der Kontrollgruppen zueinander sowie der beiden Gruppen mit Nervenläsion zueinander nicht signifikant (alle  $p$ -Werte  $>0,05$ , Abbildung A bis E). Die Mittelwerte und die Standardfehler (in Klammern) sind in Abbildung F zusammengefasst.

### 3.2.2 Zentrales Nervensystem

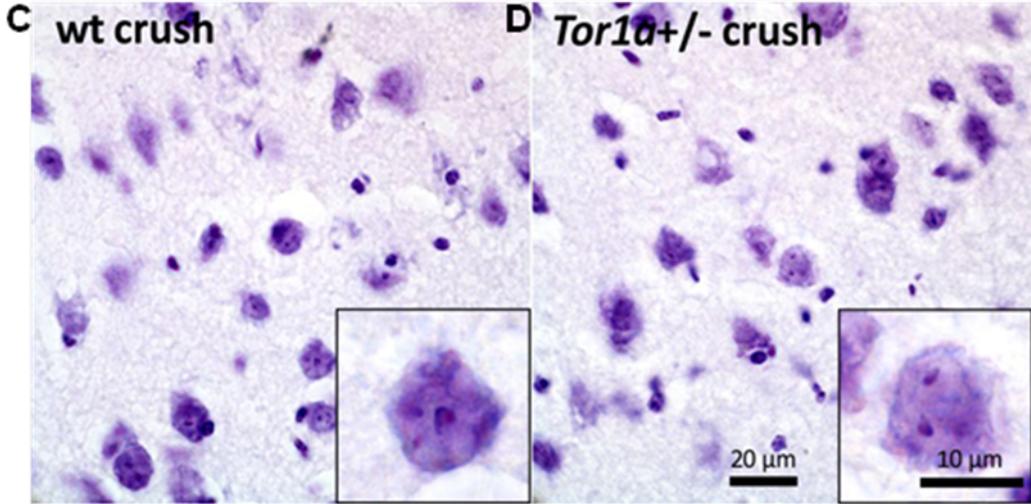
#### *Nissl Färbung im Kortex*

Die Anzahl der Nissl+ Neurone im sensiblen Kortex unterschied sich nicht zwischen naiven *Tor1a* *+/+* Mäusen (Abbildung A, hellblauer Balken, ipsilateral 1289,6±99,23 und kontralateral 1328±90,37 Zellen/mm<sup>2</sup>) und den *Tor1a* *+/-* Mäusen (Abbildung B, oranger Balken, ipsilateral 1318,67±50,10 und kontralateral 1320±39,52 Zellen/mm<sup>2</sup>). Auch die *Tor1a* *+/+* Tiere mit der Quetschläsion (Abbildung C, dunkelblauer Balken, ipsilateral 1458,67±84,71 und kontralateral 1456±100,77 Zellen/mm<sup>2</sup>) unterschieden sich diesbezüglich nicht signifikant von den *Tor1a* *+/-* Tieren (Abbildung D, roter Balken, ipsilateral 1379,56±80,73 und kontralateral 1389,33±49,21 Zellen/mm<sup>2</sup>). Zwischen den Tieren mit der Quetschläsion (*Tor1a* *+/+* ipsilateral 1458,67±84,71 und kontralateral 1456±100,77 Zellen/mm<sup>2</sup>; *Tor1a* *+/-* ipsilateral 1379,56±80,73 und kontralateral 1389,33±49,21 Zellen/mm<sup>2</sup>) und den Kontrolltieren (*Tor1a* *+/+* ipsilateral 1289,6±99,23 und kontralateral 1328±90,37 Zellen/mm<sup>2</sup>; *Tor1a* *+/-* ipsilateral 1318,67±50,10 und kontralateral 1320±39,52 Zellen/mm<sup>2</sup>) gab es ebenso keine signifikanten Unterschiede (alle *p*-Werte >0,05).



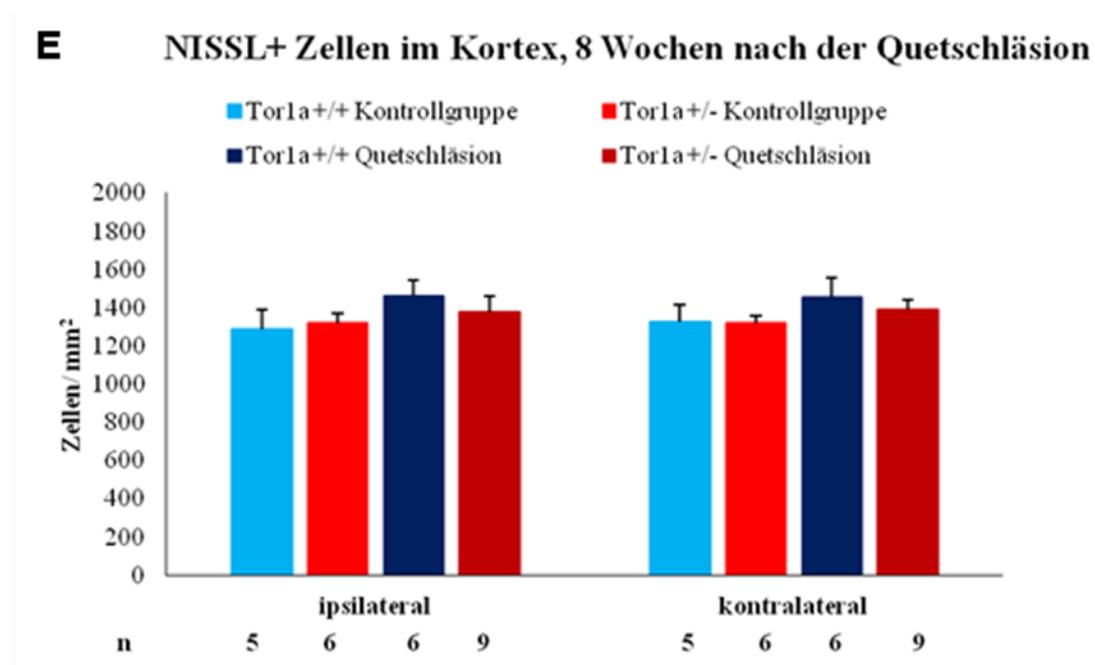
*Tor1a*<sup>+/+</sup> Kontrollgruppe

*Tor1a*<sup>+/-</sup> Kontrollgruppe



*Tor1a*<sup>+/+</sup> mit Nervenläsion

*Tor1a*<sup>+/-</sup> mit Nervenläsion



**F**

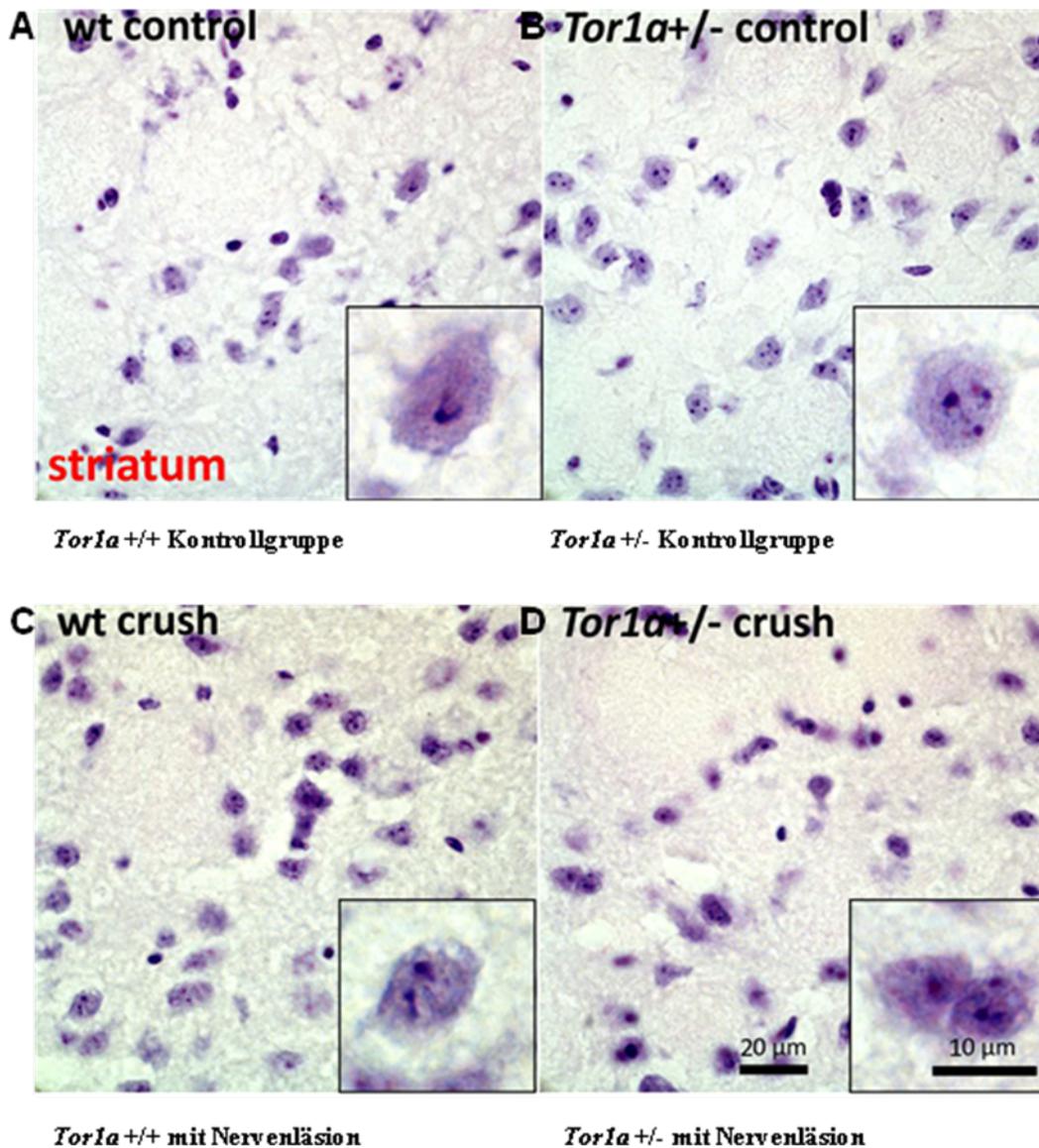
Nissl+ Kortex	ipsilateral	kontralateral
<i>Tor1a</i> +/+ Kontrollgruppe	1289,6 Zellen/mm <sup>2</sup> (99,23)	1328 Zellen/mm <sup>2</sup> (90,37)
<i>Tor1a</i> +/- Kontrollgruppe	1318,67 Zellen/mm <sup>2</sup> (50,10)	1320 Zellen/mm <sup>2</sup> (39,52)
<i>Tor1a</i> +/+ Quetschläsion	1458,67 Zellen/mm <sup>2</sup> (84,71)	1456 Zellen/mm <sup>2</sup> (100,77)
<i>Tor1a</i> +/- Quetschläsion	1379,56 Zellen/mm <sup>2</sup> (80,73)	1389,33 Zellen/mm <sup>2</sup> (49,21)

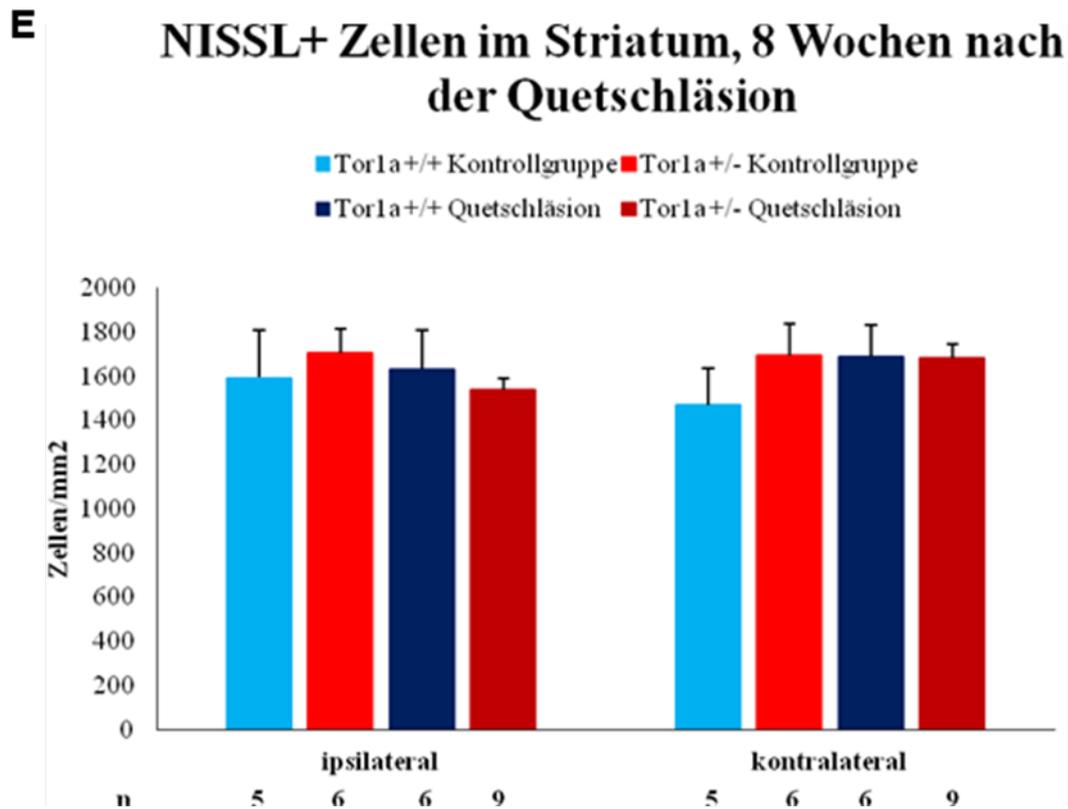
**Abbildung 21: Nissl+ Zellen in sensorischen Kortex 8 Wochen nach der Quetschläsion.** Die Anzahl der Nissl+ Neurone im Kortex (ipsilateral und kontralateral) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (alle  $p$ -Werte  $>0,05$ , Abbildung A bis E). Die Mittelwerte und die Standardfehler (in Klammern) sind in Abbildung F zusammengefasst.

### Nissl Färbung im Striatum

Hinsichtlich der Anzahl Nissl+ Neurone im Striatum konnten zwischen naiven *Tor1a* +/+ Mäusen (Abbildung A, hellblauer Balken, ipsilateral  $1593,6 \pm 217,66$  und kontralateral  $1468,8 \pm 164,68$  Zellen/mm<sup>2</sup>) und den *Tor1a* +/- Mäusen (Abbildung B, oranger Balken, ipsilateral  $1704 \pm 113,36$  und kontralateral  $1693,33 \pm 145,61$  Zellen/mm<sup>2</sup>) keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Auch die *Tor1a* +/+ Tiere mit der Quetschläsion (Abbildung C, dunkelblauer Balken, ipsilateral  $1629,33 \pm 178,32$  und kontralateral  $1689,33 \pm 144,83$  Zellen/mm<sup>2</sup>) unterschieden sich diesbezüglich nicht signifikant von den *Tor1a* +/- Tieren (Abbildung D, roter Balken, ipsilateral  $1541,04 \pm 47,28$  und kontralateral  $1682,67 \pm 64,72$

Zellen/mm<sup>2</sup>). Zwischen den Tieren mit Quetschläsion (*Tor1a* *+/+* ipsilateral 1629,33±178,32 und kontralateral 1689,33±144,83 Zellen/mm; *Tor1a* *+/-* ipsilateral 1541,04±47,28 und kontralateral 1682,67±64,72 Zellen/mm<sup>2</sup>) und den Kontrolltieren (*Tor1a* *+/+* ipsilateral 1593,6±217,66 und kontralateral 1468,8±164,68 Zellen/mm<sup>2</sup>; *Tor1a* *+/-* ipsilateral 1704±113,36 und kontralateral 1693,33±145,61 Zellen/mm<sup>2</sup>) gab es ebenso keine signifikanten Unterschiede (alle *p*-Werte >0,05).





**F**

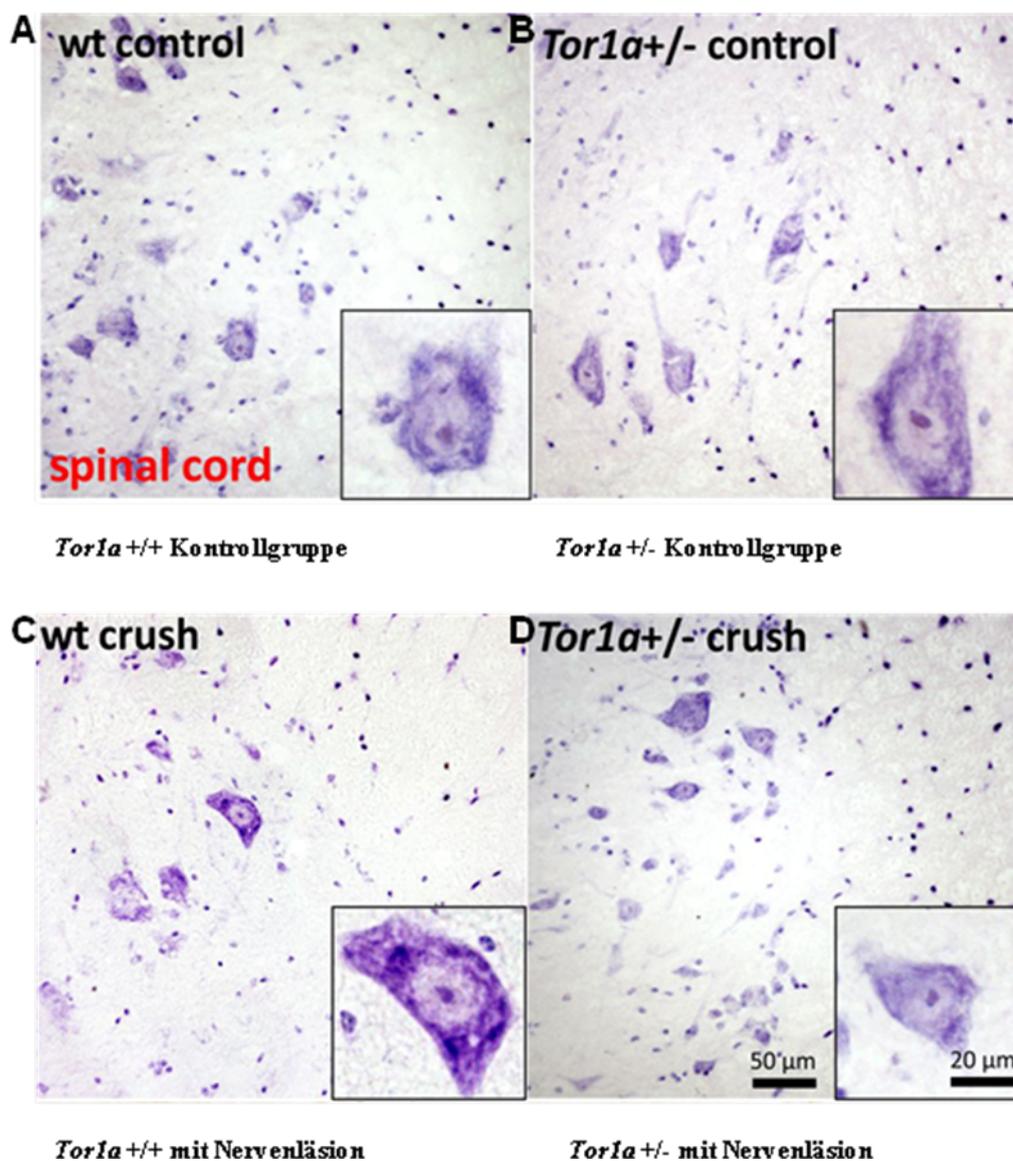
Nissl+ Striatum	ipsilateral	kontralateral
<i>Tor1a</i> +/+ Kontrollgruppe	1593,6 Zellen/mm <sup>2</sup> (217,66)	1468,8 Zellen/mm <sup>2</sup> (164,68)
<i>Tor1a</i> +/- Kontrollgruppe	1704 Zellen/mm <sup>2</sup> (113,36)	1693,33 Zellen/mm <sup>2</sup> (145,61)
<i>Tor1a</i> +/+ Quetschläsion	1629,33 Zellen/mm <sup>2</sup> (178,32)	1689,33 Zellen/mm <sup>2</sup> (144,83)
<i>Tor1a</i> +/- Quetschläsion	1541,04 Zellen/mm <sup>2</sup> (47,28)	1682,67 Zellen/mm <sup>2</sup> (64,72)

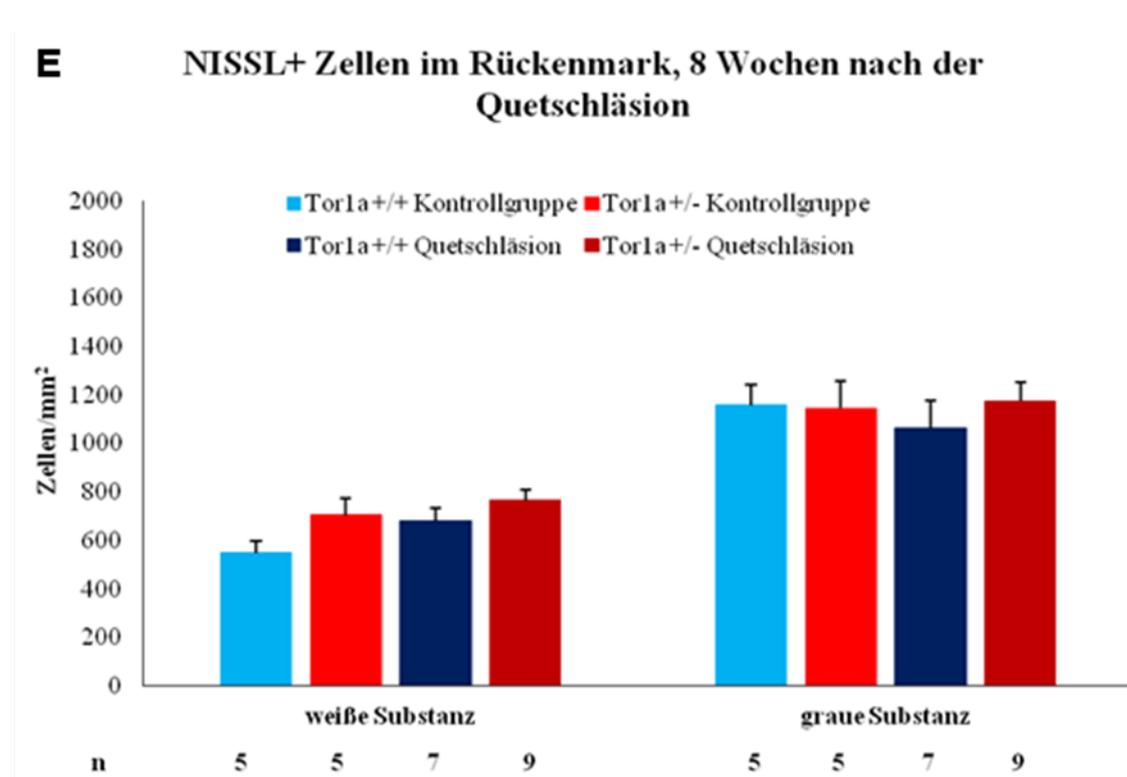
**Abbildung 22: Nissl+ Zellen im Striatum 8 Wochen nach der Quetschläsion.** Die Anzahl der Nissl+ Neurone im Striatum (ipsilateral und kontralateral) wies keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der beiden Genotypen auf, unabhängig ob mit oder ohne eine Quetschläsion (alle  $p$ -Werte  $>0,05$ , Abbildung A bis E). Die Mittelwerte und die Standardfehler (in Klammern) sind in Abbildung F zusammengefasst.

#### *Nissl Färbung im Rückenmark*

Die Anzahl der Nissl+ Neurone im Rückenmark unterschied sich nicht zwischen naiven *Tor1a* +/+ Mäusen (Abbildung A, hellblauer Balken, weiße Substanz  $547,2 \pm 52,68$  und graue Substanz  $1158,4 \pm 83,38$  Zellen/mm<sup>2</sup>) und den *Tor1a* +/- Mäusen (Abbildung B, oranger Balken, weiße Substanz  $704 \pm 71,55$  und graue Substanz  $1144 \pm 112,85$  Zellen/mm<sup>2</sup>). Auch die *Tor1a* +/+ Tiere mit der Quetschläsion (Abbildung C, dunkelblauer Balken, weiße Substanz

680±54,29 und graue Substanz 1062,86±114,84 Zellen/mm<sup>2</sup>) unterschieden sich diesbezüglich nicht signifikant von den *Tor1a* +/- Tieren (Abbildung D, roter Balken, weiße Substanz 764,44±44,44 und graue Substanz 1176±78,02 Zellen/mm<sup>2</sup>). Zwischen den Tieren mit Quetschläsion (*Tor1a* ++ weiße Substanz 680±54,29 und graue Substanz 1062,86±114,84 Zellen/mm<sup>2</sup>; *Tor1a* +/- weiße Substanz 764,44±44,44 und graue Substanz 1176±78,02 Zellen/mm<sup>2</sup>) und den Kontrolltieren (*Tor1a* ++ weiße Substanz 547,2±52,68 und graue Substanz 1158,4±83,38 Zellen/mm<sup>2</sup>; *Tor1a* +/- weiße Substanz 704±71,55 und graue Substanz 1144±112,85 Zellen/mm<sup>2</sup>) gab es ebenso keine signifikanten Unterschiede (alle *p*-Werte >0,05).





**F**

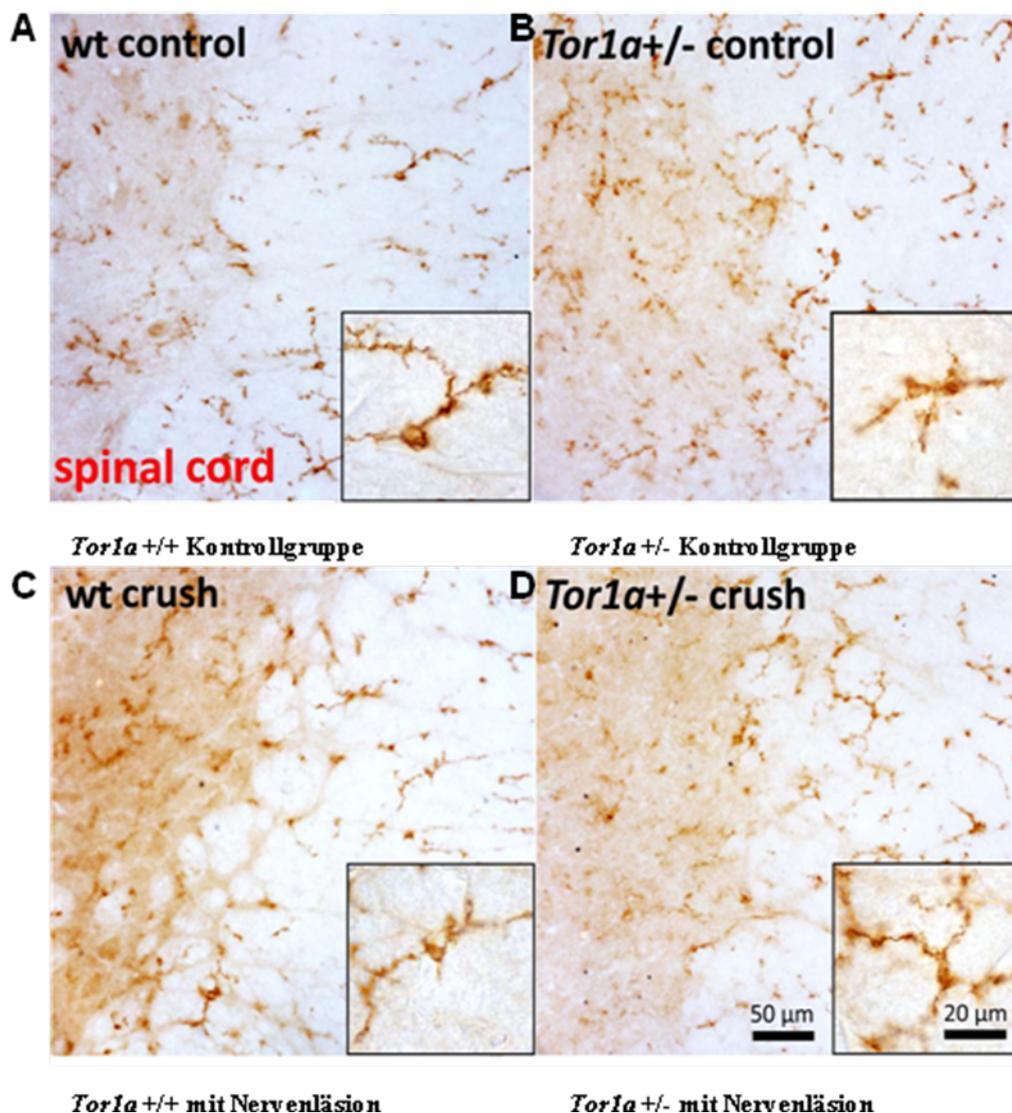
Nissl+ Rückenmark	weiße Substanz	graue Substanz
<i>Tor1a</i> +/+ Kontrollgruppe	547,2 Zellen/mm <sup>2</sup> (52,68)	1158,4 Zellen/mm <sup>2</sup> (83,38)
<i>Tor1a</i> +/- Kontrollgruppe	704 Zellen/mm <sup>2</sup> (71,55)	1144 Zellen/mm <sup>2</sup> (112,85)
<i>Tor1a</i> +/+ Quetschläsion	680 Zellen/mm <sup>2</sup> (54,29)	1062,86 Zellen/mm <sup>2</sup> (114,84)
<i>Tor1a</i> +/- Quetschläsion	764,44 Zellen/mm <sup>2</sup> (44,44)	1176 Zellen/mm <sup>2</sup> (78,02)

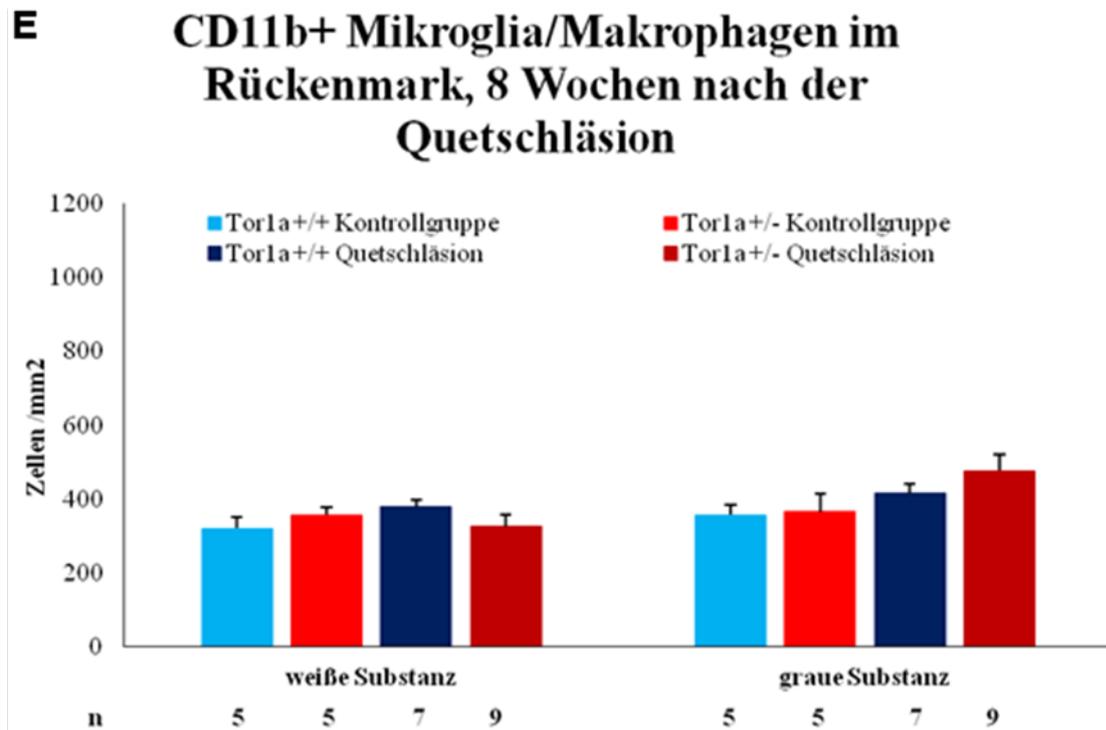
**Abbildung 23: Nissl+ Zellen im Rückenmark ipsilateral 8 Wochen nach der Quetschläsion.** Die Anzahl der Nissl+ Neurone im Rückenmark (weiße Substanz und graue Substanz) wies ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der beiden Genotypen auf, unabhängig ob mit oder ohne eine Quetschläsion (alle  $p$ -Werte  $>0,05$ , Abbildung A bis E). Die Mittelwerte und die Standardfehler (in Klammern) sind in Abbildung F zusammengefasst.

### *CD11b*+ Mikroglia/Makrophagen

Auch bezüglich der Anzahl der Mikroglia und Makrophagen (*CD11b*+ Färbemethode) im Rückenmark unterschieden sich naive *Tor1a* +/+ Mäuse (Abbildung A, hellblauer Balken, weiße Substanz  $320 \pm 31,09$  und graue Substanz  $356,8 \pm 28,8$  Zellen/mm<sup>2</sup>) und *Tor1a* +/- Mäusen (Abbildung B, oranger Balken, weiße Substanz  $356,8 \pm 20,33$  und graue Substanz  $366,4 \pm 46,95$  Zellen/mm<sup>2</sup>) nicht signifikant voneinander. Auch die *Tor1a* +/+ Tiere mit der Quetschläsion (Abbildung C, dunkelblauer Balken, weiße Substanz  $378,29 \pm 18,20$  und graue

Substanz  $416 \pm 25,48$  Zellen/mm<sup>2</sup>) unterschieden sich diesbezüglich nicht signifikant von den *Tor1a* +/- Tieren (Abbildung D, roter Balken, weiße Substanz  $325,33 \pm 31,58$  und graue Substanz  $477,33 \pm 43,49$  Zellen/mm<sup>2</sup>). Zwischen den Tieren mit Quetschläsion (*Tor1a* +/- weiße Substanz  $378,29 \pm 18,20$  und graue Substanz  $416 \pm 25,48$  Zellen/mm<sup>2</sup>; *Tor1a* +/- weiße Substanz  $325,33 \pm 31,58$  und graue Substanz  $477,33 \pm 43,49$  Zellen/mm<sup>2</sup>) und den Kontrolltieren (*Tor1a* +/- weiße Substanz  $320 \pm 31,09$  und graue Substanz  $356,8 \pm 28,8$  Zellen/mm<sup>2</sup>; *Tor1a* +/- weiße Substanz  $356,8 \pm 20,33$  und graue Substanz  $366,4 \pm 46,95$  Zellen/mm<sup>2</sup>) gab es ebenso keine signifikanten Unterschiede (alle *p*-Werte >0,05).





**F**

CD11b+ Rückenmark	weiße Substanz	graue Substanz
<i>Tor1a</i> <sup>+/+</sup> Kontrollgruppe	320 Zellen/mm <sup>2</sup> (31,09)	356,8 Zellen/mm <sup>2</sup> (28,8)
<i>Tor1a</i> <sup>+/-</sup> Kontrollgruppe	356,8 Zellen/mm <sup>2</sup> (20,33)	366,4 Zellen/mm <sup>2</sup> (46,95)
<i>Tor1a</i> <sup>+/+</sup> Quetschläsion	378,29 Zellen/mm <sup>2</sup> (18,20)	416 Zellen/mm <sup>2</sup> (25,48)
<i>Tor1a</i> <sup>+/-</sup> Quetschläsion	325,33 Zellen/mm <sup>2</sup> (31,58)	477,33 Zellen/mm <sup>2</sup> (43,49)

**Abbildung 24: CD11b+ Mikroglia/Makrophagen im Rückenmark ipsilateral 8 Wochen nach der Quetschläsion.** Die Anzahl an CD11b+ Mikroglia/Makrophagen ipsilateral (weiße Substanz und graue Substanz) war zwischen *Tor1a*<sup>+/-</sup> und wt Mäusen nicht signifikant verschieden, unabhängig ob mit oder ohne eine Quetschläsion (alle *p*-Werte >0,05, Abbildung A bis E). Die Mittelwerte und die Standardfehler (in Klammern) sind in Abbildung F zusammengefasst.

### 3.3 L-DOPA/AMPT-Behandlung

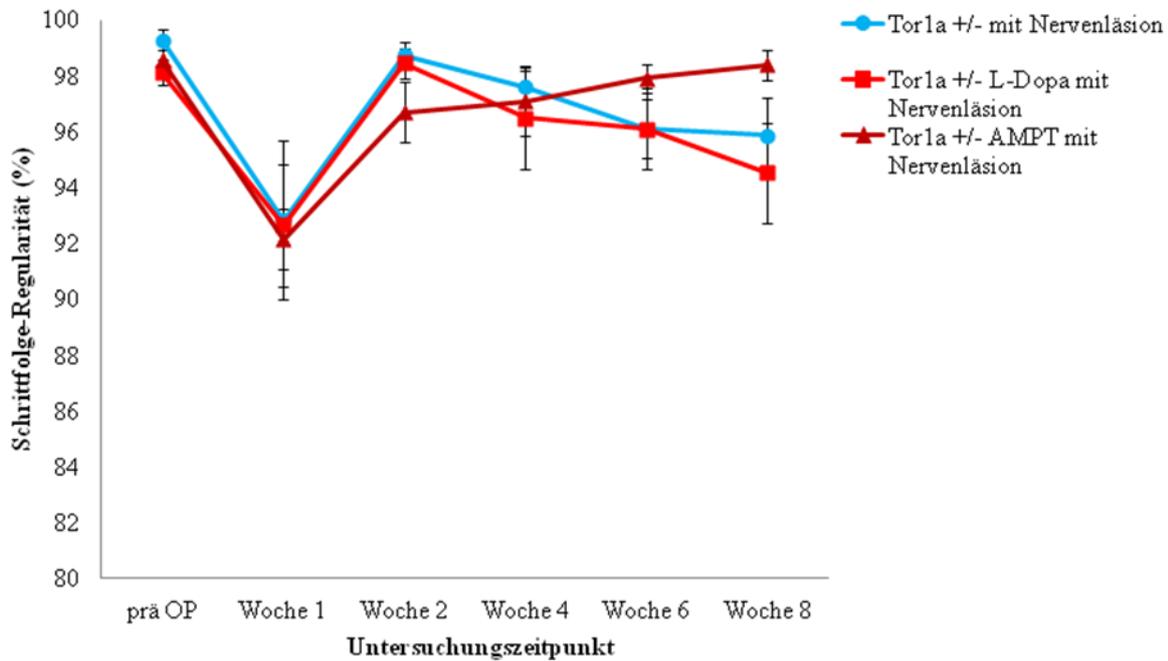
Abschließend wurden noch verschiedene Behandlungsexperimente durchgeführt, um zu klären, ob die gefundenen Unterschiede zwischen *Tor1a*<sup>+/-</sup> und *Tor1a*<sup>+/+</sup> Mäusen dopaminerg verursacht sind. Hierfür wurden sowohl genetisch mutierte *Tor1a*<sup>+/-</sup> Mäuse als auch wt Mäuse nach der Quetschläsion entweder mit einem Kombinationspräparat aus L-Dopa und Benserazid oder mit AMPT acht Wochen lang behandelt.

*Catwalk*

Bei den *Tor1a* +/- Mäusen zeigte sich bezüglich des Gangverhaltens ein signifikanter Effekt der Medikation: Bei allen Versuchstieren kam es nach der Operation zwar zu einer ähnlichen Abnahme der Schrittfolgeregularität von etwa 99% auf 92-93% (Präoperativ: *Tor1a* +/- 99,30±0,39%, *Tor1a* +/- L-Dopa 98,11±0,46%, *Tor1a* +/- AMPT 98,57±0,61%; erste Woche postoperativ: *Tor1a* +/- 92,84±2,83%, *Tor1a* +/- L-Dopa 92,65±2,20%, *Tor1a* +/- AMPT 92,15±1,08%). Es ließ sich aber nur bei den *Tor1a* +/- AMPT Mäusen auf die Läsion hin eine progrediente Zunahme der Schrittfolgeregularität auf das Ausgangsniveau (Präoperativ: 98,57±0,61%; achte Woche postoperativ: 98,39±0,53%) feststellen. Die *Tor1a* +/- L-Dopa Mäuse hingegen wiesen auf die Läsion hin eine konstante Abnahme der Schrittfolgeregularität auf (Präoperativ: 98,11±0,46%, achte Woche postoperativ: 94,53±1,79%) und konnten sich nicht auf ihr Ausgangsniveau erholen.

Die Gegenüberstellung von *Tor1a* +/- AMPT Mäusen und *Tor1a* +/- L-Dopa Mäusen mit den *Tor1a* +/- Mäusen ohne Behandlung aus dem ersten Teil der Doktorarbeit liefert folgendes Ergebnis: Während es bei den *Tor1a* +/- AMPT Mäusen nach der Quetschläsion zu einer nahezu kompletten Wiederherstellung der Schrittfolgeregularität auf 98,39±0,53% kam, wiesen *Tor1a* +/- L-Dopa-Mäuse (Präoperativ 98,11±0,46%, achte Woche postoperativ: 94,53±1,79%) und unbehandelte *Tor1a* +/- Mäuse (Präoperativ 99,30±0,39%, achte Woche postoperativ: 95,88±1,35%) mit Nervenläsion hingegen eine Abnahme der Schrittfolgeregularität auf (siehe Abbildung 25).

### A Regularitätsindex *Tor1a* +/- AMPT vs. *Tor1a* +/- und *Tor1a* +/- L-Dopa mit Nervenläsion



**B**

	prä OP	1.Woche post OP	2.Woche post OP	4.Woche post OP	6.Woche post OP	8.Woche post OP
<i>Tor1a</i> +/-	99,30%	92,84%	98,75%	97,59%	96,10%	95,88%
	(0,39)	(2,83)	(0,48)	(0,57)	(1,44)	(1,35)
<i>Tor1a</i> +/- L-Dopa	98,11%	92,65%	98,47%	96,50%	96,11%	94,53%
	(0,46)	(2,20)	(0,54)	(1,86)	(1,07)	(1,79)
<i>Tor1a</i> +/- AMPT	98,57%	92,15%	96,7%	97,1%	97,91%	98,39%
	(0,61)	(1,08)	(1,06)	(1,23)	(0,49)	(0,53)

**Abbildung 25: L-Dopa und AMPT behandelte *Tor1a* +/- Tiere versus naive *Tor1a* +/- Mäuse nach der Nervenläsion über einen Beobachtungszeitraum von 8 Wochen** (Vergleich der naiven *Tor1a* +/- Mäuse mit jeweils der L-Dopa oder der AMPT behandelten Gruppe, Abbildung A). Die Abbildung B stellt eine Zusammenfassung der Mittelwerte und Standardfehler (in Klammern) dar.

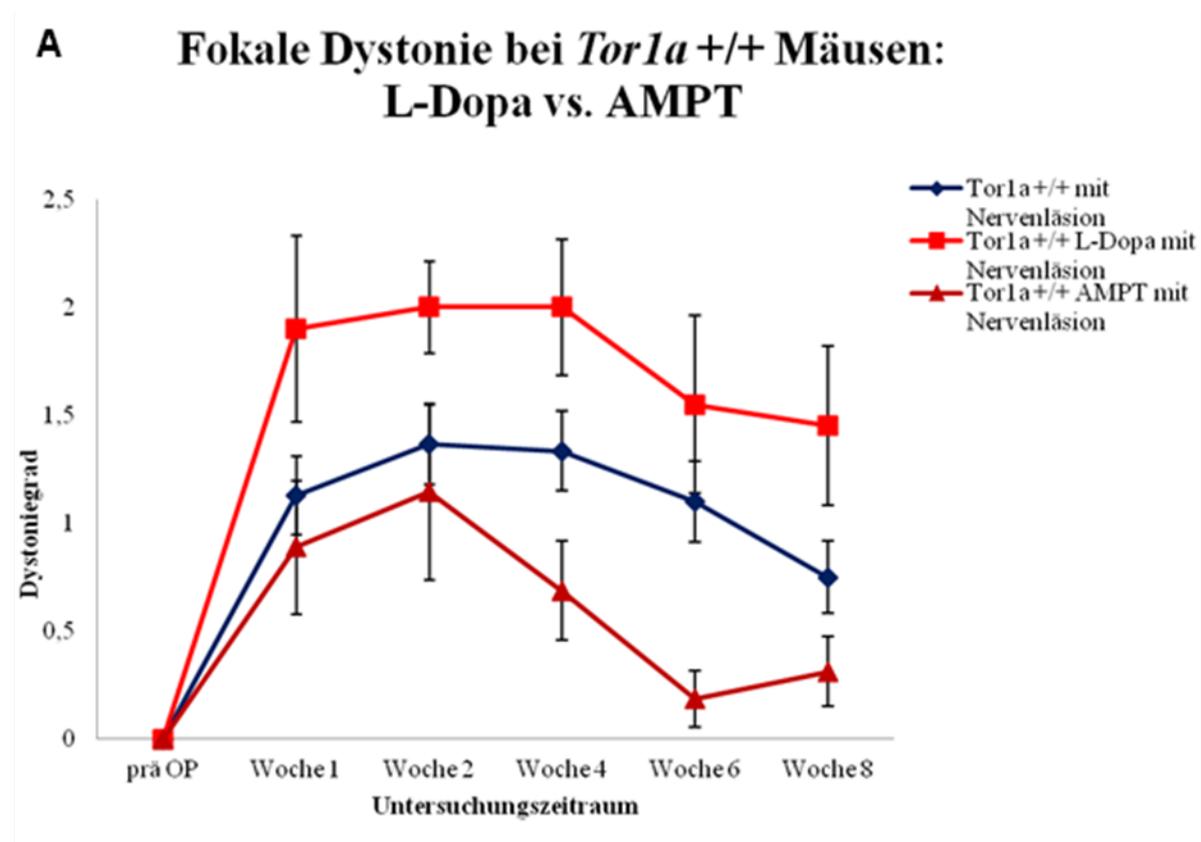


<b>B</b>	<b>prä OP</b>	<b>1.Woche post OP</b>	<b>2.Woche post OP</b>	<b>4.Woche post OP</b>	<b>6.Woche post OP</b>	<b>8.Woche post OP</b>
<i>Tor1a</i> <sup>+/-</sup>	0	1,44	1,82	2	1,48	1,36
	(0)	(0,18)	(0,22)	(0,20)	(0,21)	(0,20)
<i>Tor1a</i> <sup>+/-</sup>	0	1,79	2,3	2,08	2,42	2,36
L-Dopa	(0)	(0,37)	(0,45)	(0,28)	(0,29)	(0,29)
						
<i>Tor1a</i> <sup>+/-</sup>	0	1,15	1	1,08	0,38	0,38
AMPT	(0)	(0,30)	(0,28)	(0,19)	(0,16)	(0,17)
						

**Abbildung 26: Tail-suspension-Test L-Dopa und AMPT behandelte *Tor1a*<sup>+/-</sup> Tiere versus *Tor1a*<sup>+/-</sup> naive nach der Nervenläsion über einen Beobachtungszeitraum von 8 Wochen (Einheit: Dystoniegrad) (\*  $p < 0,05$ , Mann-Whitney Test im Vergleich der naiven *Tor1a*<sup>+/-</sup> Mäuse mit jeweils der L-Dopa oder der AMPT behandelten Gruppe, Abbildung A). Abbildung B stellt eine Zusammenfassung der Mittelwerte und Standardfehler (in Klammern) dar.**

Der Einzelvergleich der beiden wt Medikamentengruppen *Tor1a* *+/+* L-Dopa und *Tor1a* *+/+* AMPT mit den wt crush Mäusen *Tor1a* *+/+* aus dem ersten Teil dieser Doktorarbeit (=wt crush naive) zeigte, dass die *Tor1a* *+/+* Mäuse, die AMPT erhielten, eine Reduktion der fokalen Dystonie im Vergleich zu den naiven Mäusen aufwiesen. Die *Tor1a* *+/+* L-Dopa Mäuse hingegen zeigten eine Steigerung der fokalen Dystonie im Vergleich zu den naiven Mäusen. Während die wt crush naiven Mäuse einen Dystoniegrad von  $>1$  aufwiesen (vierte Woche postoperativ:  $1,33 \pm 0,18$ ), lag die fokale Dystonie bei *Tor1a* *+/+* Tieren mit AMPT Behandlung bei einem Dystoniegrad von  $<1$  (vierte Woche postoperativ:  $0,69 \pm 0,23$ , siehe Abbildung 26).

Zudem zeigte der Vergleich der beiden wt Medikamentengruppen *Tor1a* *+/+* L-Dopa und *Tor1a* *+/+* AMPT im zeitlichen Verlauf folgende Ergebnisse: Die fokale Dystonie war ab der zweiten Woche nach der Quetschläsion bei den *Tor1a* *+/+* Mäusen mit L-Dopa Behandlung höher ausgeprägt als bei den *Tor1a* *+/+* Mäusen mit AMPT Behandlung, sodass die *Tor1a* *+/+* Mäuse mit L-Dopa Behandlung einen Dystoniegrad von 2 (zweite Woche postoperativ:  $2 \pm 0,21$ ) und die *Tor1a* *+/+* Mäuse mit AMPT Behandlung einen Dystoniegrad von 1 (zweite Woche postoperativ:  $1,14 \pm 0,40$ ) besaßen. Ab der vierten Woche nach der Quetschläsion blieb die fokale Dystonie bei den *Tor1a* *+/+* Mäusen mit L-Dopa Behandlung konstant (vierte Woche postoperativ:  $2 \pm 0,32$ ), während die *Tor1a* *+/+* Mäuse mit AMPT Behandlung einen deutlichen Rückgang der fokalen Dystonie zeigten (vierte Woche postoperativ:  $0,69 \pm 0,23$ , siehe Abbildung 27).



**B**

	prä OP	1.Woche post OP	2.Woche post OP	4.Woche post OP	6.Woche post OP	8.Woche post OP
<i>Tor1a</i> +/+	0	1,13	1,36	1,33	1,1	0,75
	(0)	(0,18)	(0,19)	(0,18)	(0,18)	(0,17)
<i>Tor1a</i> +/- L-Dopa	0	1,9	2	2	1,55	1,45
	(0)	(0,43)	(0,21)	(0,32)	(0,41)	(0,37)
<i>Tor1a</i> +/- AMPT	0	0,88	1,14	0,69	0,19	0,31
	(0)	(0,31)	(0,40)	(0,23)	(0,13)	(0,16)

**Abbildung 27: Tail-suspension-Test L-Dopa und AMPT behandelte *Tor1a* +/+ Tiere versus naive *Tor1a* +/+ nach der Nervenläsion über einen Beobachtungszeitraum von 8 Wochen (Einheit: Dystoniegrad, **Abbildung A**). **Abbildung B** stellt eine Zusammenfassung der Mittelwerte und Standardfehler (in Klammern) dar.**

## 4 Diskussion

### 4.1 Verhaltensanalysen

#### *Catwalk™ XT 10.0*

Catwalk™ XT 10.0 Analysen ermittelten, dass *Tor1a* *+/+* und *Tor1a* *+/-* Mäuse eine Woche nach dem N. ischiadicus Trauma eine Veränderung ihres Schrittfolgemusters, das heißt eine Reduktion des Schrittfolge-Regularitäts-Index, entwickelten. Dies zeigte sich in einer abnormalen Schrittfolge beim Laufen. Während sich die *Tor1a* *+/+* Mäuse bis zum Ende des achtwöchigen Beobachtungszeitraumes wieder erholten, kam es hingegen bei den *Tor1a* *+/-* Mäusen mit einer Quetschläsion zu einer progredienten Abnahme des Schrittfolge-Regularitäts-Index. Bei den Mäusen aus den beiden scheinoperierten Gruppen konnten keine Abnormalitäten in der Schrittfolge zu irgendeinem Messzeitpunkt nach der Operation festgestellt werden.

Ein Blick in die bisherige Forschung zeigt, dass die Untersuchung der Kombination aus peripherer Nervenläsion und DYT1 Mutation im Hinblick auf die Auswirkung auf Bewegungsverhalten bisher einzigartig ist. Bisherige Studien verfolgten jeweils nur einen der beiden genannten Aspekte.

Hinsichtlich der Folgen von Läsionen auf das motorische System wurde einerseits zentralnervös geforscht: Eine Studie von Neumann et al. 2009 ermittelte mit einem Mausmodell Auswirkungen eines Schädelhirntraumas auf Bewegungsverhalten durch Catwalk-Analysen. Drei Tage nach dem Schädelhirntrauma kam es bei diesen Mäusen (TBI = „traumatic brain injury“) im Vergleich zu scheinoperierten Mäusen, die lediglich eine Kraniotomie ohne Gehirnläsion erhielten, zu verschiedenen motorischen Störungen. TBI-Mäuse besaßen zum Beispiel eine signifikant geringere Intensität des Pfotenabdrucks: Die untersuchten linken Vorderpfoten der traumatisierten Mäuse hatten eine Intensität von knappen 100 willkürlichen Einheiten („arbitrary-units“), während die scheinoperierten Kontrolltiere 120 willkürliche Einheiten aufwiesen ( $p < 0,05$ ). Zudem war die maximale Kontaktfläche bei den TBI-Mäusen schwächer ausgeprägt: Die linke Vorderpfote der traumatisierten Mäuse hatte eine Fläche von circa 0,13 mm<sup>2</sup> im Vergleich zu scheinoperierten Mäusen, die eine Fläche von etwa 0,16 mm<sup>2</sup> besaßen ( $p < 0,0001$ ) (Neumann et al., 2009). Es findet sich aber andererseits in mehreren Arbeiten auch Evidenz für Veränderungen des

Gangbildes nach einer peripheren Nervenläsion: Deumens et al. 2007 konnten anhand von statischen und dynamischen Parametern durch Catwalk Analysen Defizite bezüglich der Gangweise bei Ratten nach einer Quetschläsion des N. ischiadicus feststellen. Dabei war beispielsweise die Intensität der betroffenen Pfote der Ratten bereits ab dem ersten Tag nach der Operation etwa um 50-60 % im Vergleich zu Werten vor der Operation reduziert (Deumens et al., 2007). Eine Studie von Bozkurt et al. 2008 untersuchte ebenfalls die Auswirkungen einer peripheren Nervenverletzung, nämlich der N. ischiadicus Quetschläsion auf den Gang bei Ratten mittels Catwalk XT (Bozkurt et al., 2008). Anfänglich zeigten sich motorische Auffälligkeiten, was die Intensität der rechten Hinterpfote betraf: Wie bei Deumens et al. 2007 konnte auch hier drei Wochen nach der Quetschläsion eine bis zu 60%ige Reduktion der Intensität der rechten Hinterpfote ermittelt werden. Zudem kam es drei Wochen postoperativ zu Koordinationsstörungen zwischen der betroffenen rechten Hinterpfote und den anderen Pfoten: Ein untersuchter Parameter war beispielsweise die sogenannte „Couplings“, die einen zeitlichen Zusammenhang zwischen dem Aufsetzen von zwei Pfoten innerhalb eines Schrittzklus beschreibt. Dieser Wert wird benutzt, um die Koordination zwischen zwei Pfoten beim Gehen zu messen. „Couplings Diagonal RH->LF“ beschreibt somit die Koordination zwischen der rechten Hinterpfote und der linken Vorderpfote, die in der Arbeit von Deumens et al. 2007 nach der Nervenquetschläsion um etwa 25% reduziert war. Ab der vierten Woche erholten sich diese beiden Gangparameter zu 100% auf das präoperative Ausgangsniveau.

Zudem gibt es aber auch Studien an genetisch mutierten DYT1 Mäusen, die keine periphere oder zentralnervöse Läsion erfahren hatten, die aber dennoch Defizite in der Motorik aufwiesen. Zum Beispiel hatten transgene Mäuse mit einer Version des menschlich mutierten *Tor1a* (hMT1= „human mutant torsinA“) eine größere Hinterfußweite (= Abstand zwischen beiden Hinterpfoten) im Vergleich zu den wt Kontrolltieren (hWT= „human wild-type torsinA“ und wt= „wild type“) bei einer Fußabdruckanalyse (Zhao et al., 2008). Auch wird von Schrittabnormalitäten und -überlappungen bei DYT1  $\Delta$ GAG Mäusen berichtet (Dang et al., 2006). In einem anderen DYT1 Mausmodell hatten transgene Mäuse mit einer Überexpression an mutiertem menschlichen *Tor1a* (hMT1 und hMT2) im Vergleich zu nicht-transgenen Mäusen eine kürzere Schrittlänge, wohingegen die Mäuse mit menschlichem wt *Tor1a* (hWT) eine größere Schrittlänge als nicht-transgene Mäuse aufwiesen (Sharma et al., 2005). Interessanterweise berichten Grundmann et al. 2007 aus ihrer Studie an transgenen Mäusen mit menschlich mutiertem Gen, bei der die jeweiligen Mäuselinien aber entweder

menschliches wt *Tor1a* (hWT) oder menschlich mutiertes *Tor1a* (hΔGAG) überexprimierten, dass nur diejenigen Mäuse mit einer Überexpression an hWT eine signifikant geringere durchschnittliche Schrittlänge (Vorder- und Hinterbeine) aufwiesen, wohingegen Kontrolltiere und Mäuse mit einer Überexpression an hΔGAG diese Gangauffälligkeiten nicht besaßen (Grundmann et al., 2007).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl Läsionen -peripher oder zentral- als auch Mutationen im *Tor1a*-Gen verschiedene motorische Abnormalitäten im Nagersystem hervorrufen können. Das Zusammenspiel von peripherer Läsion und genetischer Mutation bei den Experimenten in dieser Doktorarbeit ist der bisher einzige Versuch diese beiden Einflussgrößen zusammenzubringen und ihre Interaktion zu untersuchen und lässt so weitere interessante Schlüsse bezüglich dieser beiden pathogenen Faktoren auf Bewegungsverhalten zu. Es scheint, dass in unserem Modell weder die Läsion noch die genetische Prädisposition (*Tor1a +/-*) alleine die kontinuierliche Abnahme der Schrittfolgerregularität bewirken kann. Dafür sprechen sowohl die Erholungsfähigkeit der wt Mäuse nach der Quetschläsion, aber auch, dass genetisch mutierte scheinoperierte Mäuse keine motorischen Defizite aufwiesen. Folglich ist das Zusammenwirken beider Aspekte für eine abnormale Schrittfolgerregularität erforderlich.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse aus den Catwalk-Analysen also für das mögliche Vorliegen des „*second-hit*“-Modells bezüglich der Pathogenese bei der DYT1 Dystonie.

### *Rotarod*

Die Auswertungen der Ergebnisse aus den Rotarod-Tests ergaben zu keinem Messzeitpunkt signifikante Unterschiede, sodass sich weder Versuchstiere aus der scheinoperierten Gruppe und Versuchstiere aus der Quetschläsions-Gruppe oder genetisch mutierte Mäuse und wt Mäuse bedeutsam beim Rotarod-Experiment unterschieden. Lediglich eine nicht signifikante Reduktion der Verweildauer auf der Walze konnte bei den Mäusen mit der Quetschläsion (beide Genotypen) eine Woche nach der Operation festgestellt werden, die aber im Verlauf der Untersuchung wieder auf das Ausgangsniveau anstieg. Es scheint also, dass weder eine pathogenetische Prädisposition, noch der „*second-hit*“ durch die Quetschläsion oder eine Interaktion aus diesen beiden Faktoren einen Einfluss auf die motorische Leistung der Mäuse ausüben, die im Rotarod-Test nachgewiesen werden kann, so dass davon auszugehen ist, dass dieser Test nicht sensitiv genug ist, um in diesem Modell motorische Defizite zu erkennen.

Dies steht im Einklang mit Ergebnissen aus anderen Studien an transgenen Mäusen: Sowohl DYT1 knock-down Mäuse, die ein verringertes Niveau an normalem TorsinA hatten, und DYT1  $\Delta$ GAG knock-in Mäuse besaßen keine Unterschiede im Rotarod-Test im Vergleich zu wt Mäusen. Die Zeit, bis die Mäuse herunterfielen (Latenzzeit/Minuten), betrug sowohl bei DYT1 knock-down Mäusen, als auch bei wt Mäusen circa 150 Sekunden und bei DYT1  $\Delta$ GAG knock-in Mäusen und wt Mäusen circa 200 Sekunden (Dang et al., 2005; Dang et al., 2006).

Konträr dazu stehen Resultate aus anderen Mäusestudien, die Auffälligkeiten im Rotarod-Test hervorbrachten: So zeigte sich bei diesen transgenen Mäusen mit einer Überexpression an menschlich mutiertem *Tor1a* (hMT), dass diese zwar keine offensichtlichen dystonen Symptome aufwiesen, aber ein schlechteres motorisches Lernen im Rotarod Test als die hWT Mäuse zeigten: Die Latenzzeit bis zum Fallen von der Walze bewegte sich bei hMT Mäusen über alle fünf Versuchsdurchgänge kontinuierlich zwischen 80 und 100 Sekunden, während die hWT Mäuse sukzessiv eine Verbesserung von 80 auf 150 Sekunden aufwiesen. Zusätzlich besaßen die hWT Mäuse sogar einen Trend zu besseren Resultaten im Rotarod-Test als die Kontrolltiere ohne eine genetische Mutation: Die Kontrolltiere verbesserten sich ebenfalls, aber in einem geringeren Ausmaß, sodass Sie sich von 80 auf lediglich 120 Sekunden steigern konnten (Sharma et al., 2005). Ähnliche Resultate erzielten Grundmann et al. 2007 mit ihrer Studie an Mäusen, die entweder menschlich mutiertes *Tor1a* oder wt *Tor1a* überexprimierten: Hier schnitten die Mäuse mit der Überexpression an menschlich mutiertem TorsinA ebenfalls am schlechtesten ab (h $\Delta$ GAG TorsinA circa 60 Sekunden und hWT und Kontrolltiere etwa 110 Sekunden Latenzzeit) und zeigten die langsamste Lernrate (Grundmann et al., 2007).

#### *Dystoniegraduierung anhand des Tail-suspension-Test*

Die klinische Diagnostik mittels Tail-suspension-Test zeigte bezüglich der Entwicklung einer fokalen Dystonie des betroffenen rechten Hinterbeins nach peripherer N. ischiadicus Quetschläsion, dass alle Mäuse einen Tag nach der Quetschläsion eine passagere Parese des betroffenen rechten Hinterbeines aufwiesen, die sich nach einer Woche in eine fokale Dystonie mit „Verkrampfung“ des operierten Beines weiterentwickelte. Diese fokale Dystonie war zum Zeitpunkt der vierten und achten Woche nach der Operation bei den *Tor1a* +/- Mäusen mit Quetschläsion signifikant stärker ausgeprägt als bei den wt Kontrolltieren mit Quetschläsion. In der restlichen Untersuchungszeit gab es diesbezüglich keine signifikanten

Unterschiede, aber einen Trend zum höheren Dystoniegrad bei den *Tor1a* +/- Mäusen mit Quetschläsion. Was die scheinoperierten Mäuse angeht, zeigten weder Wildtypen noch Mutanten Hinweise auf dystone Verkrampfungen, nachdem Sie sich von der Läsion erholt hatten.

Die genetische Prädisposition bei den *Tor1a* +/- Mäusen allein führt also nicht zur Dystonie, sondern stellt lediglich ein höheres Risiko dafür dar, wenn ein weiterer pathogener Einflussfaktor hinzutritt. Diese Ergebnisse stehen somit im Einklang mit den Ergebnissen aus den Catwalk-Experimenten und untermauern nochmals die Bedeutsamkeit der Interaktion aus Anlage- und Umwelteinflüssen für das Auslösen einer DYT1 Dystonie.

Vorwiegend analoge Ergebnisse zu naiven DYT1 Nagermodellen lassen sich aus den Studien an verschiedenen transgenen Mäusen finden: Zhao et al. 2008 berichten zum Beispiel, dass sich weder Tiere mit humanem TorsinA (hWT= „*human wild-type TorsinA*“) oder Mäuse mit menschlich mutiertem TorsinA (hMT1= „*human mutant TorsinA*“) noch die wt Mäuse ohne genetische Mutation (wt= *wild type* „*wt littermates*“) im Tail-suspension-Test unterschieden. Das heißt, es konnten keine Differenzen beim Selbstklammern der Vorder- und Hinterpfoten („*forepaw and hindpaw clasping*“) beobachtet werden (Zhao et al., 2008). Auch Dang et al. 2005 konnten bei ihren Studien an DYT1  $\Delta$ GAG- und wt Mäusen keine Unterschiede bezüglich des Klammerns an den Hinterbeinen („*hindlimb clasping*“) finden (Dang et al., 2005). Shashidaran et al. 2005 generierten vier verschiedene transgene Mäuselinien mit einer Überexpression von menschlich mutiertem *Tor1a* ( $\Delta$ E-torsinA). Jeweils etwa 40% dieser Mäuse entwickelten Verhaltensauffälligkeiten und selbstklammernde Beinbewegungen („*hindlimb clasping*“) (Shashidharan et al., 2005).

Eine mögliche Erklärung für dieses konträre Ergebnis könnte die Verwendung des menschlich mutierten Gens, die Überexpression oder die Kombination dieser beiden Faktoren darstellen.

Keine dieser Studien zeigten im Tail-suspension-Test eine eindeutige klinische Dystonie bei den verschiedenen DYT1 Mausmodellen. Diese Schlussfolgerung passt zu den Ergebnissen, die im Zuge dieser Doktorarbeit gewonnen wurden: Wie bei den gerade angeführten Studien beschrieben, vermag eine genetische Veränderung des *Tor1a* Gens bei Mäusen alleine noch keine Dystonie auszulösen, sondern erst das Hinzutreten einer peripheren Läsion im Sinne eines „*second-hits*“ bewirkt den Krankheitsausbruch in unserem Modell, der sich dann auch mittels klinischer Diagnostik beobachten lässt.

### *Weitere motorische Testungen*

Es ließen sich zwar keine Unterschiede im Rotarod in den oben angeführten Studien finden, jedoch berichten die Autoren von verschiedenen Auffälligkeiten in der Aktivität der Mäuse: Ein interessantes Ergebnis diesbezüglich liefern Grundmann et al. 2007 mit ihrer Studie an Mäusen, die entweder menschlich mutiertes *Tor1a* oder wt *Tor1a* überexprimierten: Die Versuchstiere überquerten bei diesem Testverfahren sowohl eckige (Dicke 28, 12 und 5 mm) als auch runde (Dicke 28, 17 und 11 mm) Stangen. Bei dem Versuchsdurchgang über die mittlere eckige Stange von 12 mm Dicke („*beamwalking medium square beam*“) benötigten die Mäuse mit der Überexpression an menschlich mutiertem TorsinA (hΔ GAG TorsinA, circa 6 Sekunden Laufzeit) signifikant weniger Zeit beim „*Beam-walking-Test*“ im Vergleich zu Kontrolltieren (hWT TorsinA, circa 10 Sekunden Laufzeit,  $p < 0,009$ ) (Grundmann et al., 2007). Zusätzlich berichten Dang et al. 2006 in ihrer Studie an DYT1 ΔGAG- und wt Mäusen von einem häufigeren Ausrutschen der männlichen DYT1 ΔGAG Mäuse im Vergleich zu wt Mäusen beim Beam-walking Sliptest, der Feinmotorik und Gleichgewicht untersucht. Männliche DYT1 ΔGAG Mäuse zeigten beim Überqueren der Stange eine bis zu 218%ige Häufigkeit auszurutschen („*Beam-walking Slips*“) als die wt Tiere. Die Autoren sehen hier die Ursachen aufgrund von Störungen oder Veränderungen im Dopaminhaushalt. Ebenso folgern sie, dass eher feinmotorische (gemessen mit dem Gehen über einen Balken= „*Beam-walking-Test*“) als grobmotorische Defizite (gemessen mit dem Rotarod-Test) bei DYT1 Mäusen vorherrschen. Dazu passend berichten Zhao et al. 2008, dass transgene DYT1 ΔGAG Mäuse mit menschlich mutiertem TorsinA zwar auf einem Balken langsamer liefen und häufiger ausrutschten als wt Mäuse, es aber keine Unterschiede zwischen diesen bezüglich der Rotarod-Ergebnisse gab. Analoge Ergebnisse berichten auch Song et al. 2012 aus ihrer Studie an DYT1 knock-in Mäusen (Song et al., 2012; Zhao et al., 2008). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die genetisch mutierten Mäuse gewisse motorische Defizite aufweisen, die sich quantitativ in einer gesteigerten Aktivität zu Lasten der Qualität der Bewegungen ausdrücken.

Insgesamt zeigen sich also widersprüchliche Ergebnisse im Vergleich unterschiedlicher DYT1 Modelle, wobei aber die Anzahl der Studien, die keine Unterschiede im Rotarod-Test bei DYT1 Mäusen auffanden, in der Mehrzahl ist. Natürlich ist die Vergleichbarkeit der verschiedenen Studien eingeschränkt, zum Beispiel aufgrund der unterschiedlichen

genetischen Umsetzung des DYT1 Modells, des unterschiedlichen Alters der Versuchstiere oder der verschiedenen Untersuchungszeiträume. Nichtsdestotrotz ließen sich Gemeinsamkeiten bezüglich des Auffindens von häufigerem Ausrutschen, gemessen mittels der Aufgabe, bei der die Mäuse über einen Balken gingen, ermitteln. Dies legt die Vermutung nahe, dass feinmotorische Schädigungen im Vergleich zu grobmotorischen Defiziten, die sich im Rotarod-Test zeigen müssten, bei der DYT1 Dystonie als ein wichtiges Symptom anzusehen sind und daher weiter untersucht werden müssen. Hierfür empfiehlt sich den Rotarod-Test durch feinmotorische Aufgaben, wie den „*Beam-walking-Test*“ auszutauschen. Auch Zhao et al. 2008 verweisen auf die Fähigkeit dieses Tests Krankheiten der Basalganglien zu untersuchen. Dies könnte die Theorie der striatalen Dysfunktion bei der DYT1 Dystonie zusätzlich untersuchen (Zhao et al., 2008).

## 4.2 Morphologische Analysen

### 4.2.1 Peripheres und zentrales Nervensystem

Immunhistochemische Färbungen des N. ischiadicus auf den Myelinmarker Myelinprotein Zero (MPZ) und den axonalen Marker Neurofilament vor der Nervenläsion und 8 Wochen nach der Nervenläsion brachten keine signifikanten Unterschiede in der optischen Dichte im Vergleich zwischen wt und *Tor1a* +/- Tieren hervor. Zudem konnte eine vergleichbare Anzahl an F4/80+ Zellen bei genetisch mutierten *Tor1a* +/- und wt Mäusen gefunden werden. Auch im zentralen Nervensystem konnten weder im Kortex, Striatum noch im Rückenmark signifikante Unterschiede in der Anzahl der Nissl+ Zellen ermittelt werden. Die Anzahl der CD11b+ Mikroglia/Makrophagen im Rückenmark brachte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zutage.

Dies belegt, dass die verstärkte fokale Dystonie in *Tor1a* +/- Mäusen nicht durch ein unterschiedliches Ausmaß an Nervenschädigung bzw. verminderte Nervenregeneration nach der N. ischiadicus Quetschläsion oder durch morphologische Veränderungen der *Tor1a* +/- Mäuse im Bereich des N. ischiadicus, Rückenmark, Striatum oder Kortex zu begründen ist.

Ergebnisse diesbezüglich aus den anderen zuvor diskutierten Studien lassen sich aufgrund der Neuartigkeit des gewählten Studiendesigns dieser Doktorarbeit nicht anführen. Es lassen sich aber verschiedene Ergebnisse aus Studien finden, die immunhistochemische Veränderungen auf eine Nervenquetschläsion untersucht haben:

Betrachtet man immunhistochemische Untersuchungen und Transsektionsdaten nach einer Nervenquetschläsion, so findet man Evidenz für eine Vermehrung von Immunzellen und Makrophagen auf die Läsion hin. Stoll und Mueller 1999 berichten zum Beispiel von einer zunehmenden Anzahl an hämatogenen Makrophagen etwa zwei Wochen nach einer peripheren Nervenquetschläsion. Auf diesen axonalen Schaden hin kam es zudem zu einer Waller'schen Degeneration der Nervenfasern. Hierbei zeigte sich eine Regeneration der peripheren Nervenfasern vom proximalen Drittel aus. Elektronenphysiologische Untersuchungen mittels Elektroden ergaben, dass nach der Quetschläsion eine Dehnung der Nervenfasern um ca. 3-4 mm/ Tag stattfand, während diese bei kompletter Duchtrennung des Nervens lediglich bei ca. 2,5 mm/ Tag lag (Stoll & Muller, 1999). Zudem gibt es weitere Studien über die Zunahme der Immunzellen. Beispielsweise zeigen Perry et al. 1987 in ihrer Studie die Auswirkungen einer Nervenläsion: Sowohl bei Mäusen als auch bei Ratten wurde eine Quetschläsion des N. ischiadicus durchgeführt mit anschließender Euthanasie der Tiere. Danach wandten die Autoren die immunhistochemische Färbemethode F4/80+ an und analysierten die Ergebnisse anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Nerven. Bei den Mäusen mit einer Quetschläsion lagerten sich die Zellen bevorzugt im distalen und degenerierenden Abschnitt des N. ischiadicus ein (Perry, Brown, & Gordon, 1987). Des Weiteren zeigt eine Studie von Wohl et al. 2010 ähnliche Resultate: Die Autoren führten bei erwachsenen Mäusen eine intraorbitale Quetschläsion des N. opticus für zehn Sekunden durch. Die immunhistochemische Analyse der retinalen Gewebeschnitte wurde nach fünf, sieben und zehn Tagen postoperativ durchgeführt. Dabei wurde ein signifikanter Unterschied bei der Zellzählung der F4/80+ Makrophagen in der Retina beobachtet. Schon ab dem fünften Tag stieg die Anzahl der Zellen auf circa 30/ mm<sup>2</sup> an, wobei die unbehandelten naiven Kontrolltiere lediglich circa 8 Zellen/ mm<sup>2</sup> aufwiesen ( $p < 0,05$ ). Zusätzlich führten die Autoren die Immunfluoreszenzuntersuchung der F4/80+ Makrophagen sowohl bei naiven Tieren als auch bei Tieren mit einer Quetschläsion durch: Schon ab dem fünften Tag sah man elektronenmikroskopisch eine Überexpression der F4/80+ Antikörper mit einer hohen Intensität, während die Intensität der Antikörper bei den Kontrolltieren deutlich geringer ausfiel (Wohl, Schmeer, Witte, & Isenmann, 2010). Vergleicht man weitere Studien miteinander, so finden sich ebenso Anzeichen für eine Überexpression an Makrophagen in peripheren Nerven, die vor allem während der Waller'schen Degeneration ihren Höhepunkt hat: Das Myelinprotein Zero (MPZ, P0) mit einem prozentualen Anteil von über 50% als Hauptkomponente des peripheren Myelins und einem Molekulargewicht von 28-30 kd und

das myelinbasierte Protein MBP spielen im Myelinisierungsprozess eine wichtige Rolle. Die beiden Proteine werden von Schwannzellen exprimiert (Lemke & Axel, 1985; Lemke, Lamar, & Patterson, 1988; Martini & Schachner, 1997).

LeBlanc et al. 1990 bestimmten in ihrer Studie nach der Transsektion des N. ischiadicus bei Ratten die Steady-State-Ebenen der myelinspezifischen mRNA und das Vorhandensein von Proteinen wie P0, MBP, P2 und MAG. Sie fanden heraus, dass nach der Quetschläsion eine Reexpression von Myelinen wie MPB und P0 stattfindet, die schon nach dem vierten Tag deutlich zunimmt (LeBlanc & Poduslo, 1990). Auch andere Studien bestätigen diese Aussage: Rakesh Nagarajan et al. untersuchten 2002 die Myelinisierung peripherer Nerven durch Schwanzzellproliferation. Bei zehn C57BL/6 Mäusen (Alter 8 Wochen, männlich) wurde eine Nervenläsion des N. ischiadicus für 30 Sekunden (Untersuchungszeitraum 0, 1, 4, 7, 10, 14 und 28 Tage postoperativ) und eine Nerven-Transsektion (Untersuchungszeitraum 0, 14 und 28 Tage postoperativ) durchgeführt und anschließend die Entwicklung des Nerven nach der Operation bei *Egr2<sup>lo/lo</sup>*-Mäusen und deren „*wt littermates*“ untersucht. Sie analysierten die Gesamtsumme der gewonnenen RNA (aus der RNA wurden biotinylierte cRNA Proben hergestellt) aus zwei Gruppen (14 Tage und 56 Tage postoperativ) von jeweils zehn Tieren. Dabei wurden die Proliferation, die Zytokinantwort und die Makrophageninfiltrationsprozesse ausgewertet. Die Forscher kamen zu folgendem Ergebnis: Aus insgesamt 12654 Proben wurden 98 cRNA-Proben ausgewählt, die für die Myelinisierung zuständigen Proteine wie MPZ, PMP22, MAG oder MBP enthielten. Nach der Nervenläsion stieg die Expression der Proteine ab dem 5. Tag postoperativ stetig an und erlangte am 25. Tag ihr Ausgangsniveau. Die Entwicklung des peripheren Nerven stieg bei *Egr2<sup>lo/lo</sup>*-Mäusen im Vergleich zu „*wt littermates*“ proportional um 51% an, während bei der Nerven-Transsektion kein Anstieg der Myelinproteine beobachtet wurde (Nagarajan, Le, Mahoney, Araki, & Milbrandt, 2002).

Venezie et al. 1995 erforschten in ihrer Studie die Rekrutierung von Makrophagen nach einer Nervenläsion. Sie verwendeten in den Färbemethoden des N. ischiadicus bei Ratten einen Standard-Makrophagenmarker, Anti-CD68 Antikörper (ED1) und ein polyklonales Antiserum spezifisch für Lysozyme (LYS). Lysozyme dienten bei dieser Studie als Marker für Makrophagen, die eine aktive Phagozytose durchführten. Anhand von Northern-Blotanalysen konnten sie eine vermehrte Produktion der mRNA von Lysozymen finden, was auf eine erhöhte Aktivität der phagozytierenden Makrophagen hindeutet (Venezie, Toews, & Morell, 1995).

Was die morphologischen Untersuchungen der bisherigen DYT1 Forschungen betrifft, so lassen sich keine degenerativen, morphologischen zentralen Veränderungen in DYT1 Nagern (Goodchild et al., 2005) und Menschen (Augood et al., 2002) feststellen, sodass bei der DYT1 Dystonie von keiner neurodegenerativen Krankheit gesprochen werden kann (Goodchild et al., 2013; Tanabe et al., 2009). Augood et al. 2002 fanden bei quantitativen Autoradiographieuntersuchungen an menschlichen DYT1 Gehirnen keine Unterschiede in der Dichte der Dopamintransporter oder der vesikulären Monoamintransporter-2-Bindung. Ferner berichten Goodchild et al. 2005 von einer normalen ZNS-Struktur bei ihren untersuchten *Tor1a* homozygot-mutierten Mäusen (*Tor1a*  $-/-$  und *Tor1a*  $\Delta gag/\Delta gag$ ): Die Gewebsschnitte der Gehirne, die mittels Hämatoxylin-Eosinfärbung angefertigt wurden, zeigten normal ausgebildete Gehirne mit regulären neokortikalen Schichten und Rückenmarksentwicklung. Zusätzlich wurden anhand derselben Färbemethode verschiedene Gewebsschnitte dieser Mäuse mit den „wt littermates“ verglichen. Dabei wurde bei allen Tieren ein normaler Gehalt an Synapsin ermittelt, was auf eine vergleichbare synaptische Entwicklung im Rückenmark sowohl bei wt Tieren als auch bei mutierten Mäusen schließen lässt. Zusätzliche immunhistochemische Färbungen, die die bei der DYT1 Dystonie angenommene dopaminerge Dysfunktion untersuchen sollten, konnten keine Auffälligkeiten in der dopaminergen Projektion zum Striatum bei allen Mäusen auffinden, was zusätzlich für einen normalen TorsinA Entwicklungskreislauf bei den mutierten Mäusen schließen lässt. Einzige Ausnahmen hierbei bilden verschiedene Abnormalitäten in der Ultrastruktur der Kernhülle im ZNS: Das Lumen der Kernhülle enthielt eine große Anzahl von Vesikeln sowohl bei *Tor1a*  $-/-$  als auch bei *Tor1a*  $\Delta gag/\Delta gag$  Mäusen. Diese Membranabnormalitäten konnten bei den heterozygoten Mäusen nur bei den *Tor1a*  $\Delta gag/-$  Mäusen gefunden werden aber nicht bei den *Tor1a*  $+/-$  oder *Tor1a*  $\Delta gag/+$  Mäusen, was den Schluss nahe legt, dass den Mäusen mit dem verminderten TorsinA (*Tor1* $+/-$  und *Tor1a*  $\Delta gag/+$ ) noch genug von diesem Protein zur Verfügung steht und es somit bei diesen zu keinem Funktionsverlust des Proteins kommt. Im Gegensatz dazu können die Mäuse ohne TorsinA (*Tor1a* $-/-$ , *Tor1a*  $\Delta gag/-$  und *Tor1a*  $\Delta gag/\Delta gag$ ) diese Funktion nicht mehr aufrechterhalten. Dies belegt, dass für die Entstehung der DYT1 Dystonie weniger strukturelle, sondern eher funktionale Einflussfaktoren („*loss of function mechanism*“) angenommen werden.

Evidenz für pathologische Veränderungen im ER lässt sich auch im Humanbereich finden: Ergebnisse aus Immunofluoreszenzuntersuchungen bei Fibroblasten von DYT1 Patienten zeigten eine abnormale Anhäufung von mutiertem TorsinA in der Kernhülle. Das TorsinA

zentrierte sich lediglich bei den DYT1 Patienten um den Nucleus, aber nicht bei den Kontrollzellen (Goodchild & Dauer, 2004). Zusätzlich zeigten sich in verschiedenen Tierstudien morphologische Veränderungen im Hirnstamm: Shashidaran et al. 2005 fanden bei ihren Versuchstieren mit einer Überexpression an menschlich mutiertem TorsinA beispielsweise perinukleare Aggregate von TorsinA vorwiegend in cholinergen Neuronen im pedunculopontinen Nucleus (PPN) und in Gehirnstammregionen, das bedeutet, in ähnlichen Gebieten, wie sie bei menschlichen DYT1 Patienten auftraten (Shashidharan et al., 2005). Auch Dang et al. 2006 konnten bei ihren männlichen DYT1  $\Delta$ GAG Mäusen erhöhte Proteinaggregate in pontinen Nuclei auffinden (Dang et al., 2006). Nichtsdestotrotz muss abschließend noch angemerkt werden, dass auch entgegengesetzte Ergebnisse in diesem Bereich aufzufinden sind: Zhao et al. 2008 hat z.B. im Vergleich zu den anderen Studien bei ihren DYT1  $\Delta$ GAG Mäusen keine abnormalen Zelleinschlüsse auffinden können (Zhao et al., 2008).

Derartige morphologische Veränderungen wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht näher untersucht. Zusammenfassend spricht dies aber dafür, dass pathogene Aggregate von TorsinA eine mögliche Rolle bei der Entwicklung der DYT1 Dystonie spielen, sodass zukünftige Studien diese Einschlüsse unbedingt weiter erforschen sollten. Interessant wäre auch eine weiterführende Studie angelehnt an diese Doktorarbeit, die zusätzlich untersuchen könnte, ob das Zusammenwirken der genetischen Mutation und des „*second-hits*“ ebenfalls zu perinuklearen Proteinaggregaten führt oder ob es hier zu anderen immunhistochemischen Ergebnissen im Sinne der beschriebenen Läsionsstudien kommt.

### *DYT1-Krankheitsmodelle*

Dang et al. 2006 berichten von drei Modellen, die für die DYT1 Mutation verantwortlich sein könnten: Erstens wird ein „*loss of function genetic mechanism*“ erwähnt, den die Autoren durch ihre bereits erwähnten Ergebnisse mit knock-down Mäusen als gültiges Krankheitsmodell ansehen. Auch die Ergebnisse dieser Doktorarbeit unterstützen die These eines mutationsbedingten Funktionsverlusts. Dem zweiten diskutierten Modell eines mutationsbedingten Funktionsgewinns, also einem „*toxic-gain of function*“, stehen diese Ergebnisse konträr gegenüber, sodass auch Goodchild et al. 2005 diesen Mechanismus als ungültig einstufen. Die Evidenz für die Theorie des Funktionsverlusts schließt aber nicht die Möglichkeit eines dritten Modells, dem sogenannten „*dominant negative mechanism*“, aus:

Mutiertes TorsinA reduziert den totalen TorsinA Spiegel (Goodchild et al., 2005), dabei ist aber unklar, ob das mutierte Protein selbst instabil ist (= Funktionsverlust) oder ob es mit dem normalen TorsinA interagiert und dieses destabilisiert (= dominant negativer Mechanismus). Breakefield et al. 2001 nehmen an, dass das mutierte Protein selbst instabil ist. Koh et al. 2004 gehen von einem dominanten Phänotyp aus und halten einen dominant negativen Mechanismus oder einen Funktionsgewinn für möglich.

Keiner der diskutierten Modelle ist demnach eindeutig belegt.

### *Striatale Dysfunktion*

Im Zuge dieses Projektes wurden noch weitere, bisher nicht angeführte Ergebnisse erzielt, die nicht Bestandteil dieser Doktorarbeit waren (Ip et al., 2016). Dabei wurden Veränderungen des dopaminergen Stoffwechsels gefunden, die aber im Rahmen dieser Dissertation anhand von zwei Experimenten nachgeprüft wurden. Analysen der mRNA (RT-PCR) im kontralateralen Mittelhirn und striatale Proteinuntersuchung mittels „Western-Blot“ ergaben eine signifikante Reduktion des präsynaptischen Dopamin Transporters (DAT) in den unoperierten *Tor1a* +/- Mäusen verglichen mit wt Kontrollen. Acht Wochen nach der N. ischiadicus Schädigung konnte eine signifikante Reduktion der DAT mRNA und des DAT Proteingehaltes in wt Mäusen nachgewiesen werden, während es zu einem Anstieg dieser Parameter bei *Tor1a* +/- Mäusen kam. Die DAT Veränderungen in wt Mäusen nach dem Trauma konnten nur auf der kontralateralen, aber nicht auf der ipsilateralen Hemisphäre beobachtet werden.

Untersuchungen des synaptischen Dopamingehaltes (DA) und des Dopaminabbauproduktes Homovanillinsäure (HVA) mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ergaben einen reduzierten Basisgehalt dieser Neurotransmitter in naiven *Tor1a* +/- Mäusen im Vergleich zu naiven wt Tieren. Nach der N. ischiadicus Läsion kam es zu einer Reduktion von DA und HVA in wt nicht aber in *Tor1a* +/- Mäusen. Hier konnte wiederum ein leichter Anstieg von DA und HVA verzeichnet werden. Die Analyse der striatalen postsynaptischen Dopamin D1 und D2 Rezeptor Proteinexpression ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen im unoperierten Zustand. Nach dem Nervenstrauma konnte auf der kontralateralen Seite sowohl in wt als auch in *Tor1a* +/- Mäusen eine signifikante Reduktion der D1 und D2 Rezeptoren gesehen werden.

Zusätzlich wurde der funktionelle Dopaminstoffwechsel mittels striataler DAT Autoradiographie untersucht. Dabei wurde FP-CIT als Ligand eingesetzt. Die Veränderung der DAT Ligandenbindung nach dem Nervenstrauma in Relation zum Basiswert (unbehandelte wt oder *Tor1a* +/- Kontrollen) zeigte eine signifikante Reduktion der DAT Bindung bei *Tor1a* +/- Mäusen acht Wochen nach der Nervenläsion, während es zu keiner Veränderung bei den wt Mäusen kam.

Der erhöhte Dopaminumsatz präsynaptisch bedeutet, dass DA schneller verstoffwechselt wird. Ebenso wird DA extrazellulär schneller aufgenommen, was die Reduktion der DAT Bindung bei gleichzeitigem Anstieg des DAT Gehaltes präsynaptisch vermuten lässt. Hinzu kommt noch die geringere postsynaptische DA-Rezeptorbindung, was ebenso ein gesteigertes DA-Angebot bewirkt. Diese Ergebnisse lassen also auf einen hyperdopaminergen Mechanismus bei *Tor1a* +/-Mäusen als Reaktion auf das periphere Trauma („*second-hit*“) hin schließen.

Resultate dazu aus bisherigen Studien, die aber nur die Auswirkungen einer genetischen Mutation untersuchten, sind unterschiedlich: Zhao et al. 2008 berichten beispielsweise bei ihren transgenen DYT1  $\Delta$ GAG Mäusen zwar von keinen Unterschieden im striatalen Dopamingehalt im Vergleich zu wt Mäusen, aber Mutanten wiesen ebenso wie bei dieser Doktorarbeit gefundenen Ergebnissen einen höheren HVA, DOPA und DA Umsatz auf (Zhao et al., 2008). Song et al. 2012 fanden zwar einen kleinen Abfall an DA im Mittelhirn, jedoch auch einen kleinen Anstieg an HVA im Striatum bei ihren mutierten knock-in Mäusen (Song et al., 2012). Keine diesbezüglichen Auffälligkeiten fanden sich bei Balcioglu et al. 2007, die bei ihren Mäusen mit menschlich mutiertem *Tor1a* keine Unterschiede zu wt Mäusen bezüglich des striatalen DA-Gehaltes und seiner Metaboliten feststellen konnten (Balcioglu et al., 2007). Auch wurden keine Differenzen zwischen diesen bei der Dichte der präsynaptischen Dopamintransporter aufgefunden. Zusätzlich gibt es aber auch Studien, die konträre Ergebnisse aufweisen. Shashidaran et al. 2005 zeigten bei ihrer Studie mit genetisch mutierten Mäusen mit Proteinüberexpression, dass bei denjenigen transgenen Mäusen, die motorische Auffälligkeiten besaßen, das striatale DA sogar sinkt, wohingegen bei den transgenen Mäusen ohne klinische Auffälligkeiten das striatale DA ansteigt. Die Autoren vermuten, dass dies bei den Mäusen, die als eine Art Krankheitsträger anzusehen sind, eine kompensatorische Antwort darstellt, die letztlich normales Bewegungsverhalten bewirkt (Shashidaran et al., 2005). Dang et al. 2006 stellten ebenso eine Reduktion der HVA bei den Mutanten im Vergleich zu den Wildtypen fest. Interessant ist hierbei, dass dieser Unterschied

nur bei den männlichen Versuchstieren auftrat. Die Autoren berichten sogar von einem generellen Geschlechtsunterschied, dass weibliche Mutanten geringere verhaltensbedingte, neurochemische oder zelluläre Veränderungen aufwiesen als männliche Mutanten. Diese Annahme empfiehlt sich, in weiteren Studien zu überprüfen. Dang et al. 2006 berichten schließlich, dass ihre knock-down Mäuse, die ein verringertes Level an normalem TorsinA hatten, ebenso signifikant weniger DOPAC als wt Mäuse und einen Trend zu reduziertem striatalen DA-Gehalt und HVA besaßen (Dang et al., 2006). Dass ein reduzierter TorsinA Gehalt ähnliche Effekte hat wie das Vorhandensein von mutiertem TorsinA, erwähnen auch Goodchild et al. 2005, denn sie nehmen an, dass mutiertes TorsinA gleichzusetzen ist mit der Abwesenheit dieses Proteins. Auch diese Fragestellung könnte die zukünftige Forschung näher adressieren.

Was die Übertragung auf menschliche DYT1 Patienten betrifft, so kann die Studie von Berman et al. 2013 zum Schreibkrampf angeführt werden: Mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) wurde bei diesen Patienten mit einer fokalen Dystonie eine reduzierte D2 und D3 Rezeptorbindung in Ruhe gezeigt, bei einer Schreibaufgabe hingegen eine reduzierte DA Ausschüttung ins Striatum (Berman, Hallett, Herscovitch, & Simonyan, 2013). Ebenso liefern *postmortem* Studien Evidenzen: Die Fallstudie von Furukawa et al. 2000 bringt als Ergebnis, dass bei einem untersuchten Jungen mit DYT1 der subregionale striatale Dopamingehalt im Normalbereich lag, lediglich in rostralen Anteilen des Putamens und des Nucleus caudatus war dieser leicht verringert (Furukawa et al., 2000). Die Autoren vermuten jedoch, dass dieser Rückgang von zu geringem Ausmaß sei motorische Abnormalitäten zu verursachen und folgern, dass die DYT1 Dystonie keinen Schaden auf das nigrostriatale Dopaminsystem bewirkt und DYT1 Patienten daher vermutlich nicht auf eine L-Dopa Therapie ansprechen oder parkinsonartige Symptome entwickeln. Inwieweit diese Aussage über nur ein Gehirn, und das eines Kindes, das eventuell noch nicht alle Entwicklungsprozesse dieser Krankheit durchlaufen hat, mit den Aussagen über Erwachsenenengehirne verglichen werden kann, bleibt unklar. Augood et al. 2004 hingegen ermittelten analog zu den Ergebnissen der Experimente dieser Doktorarbeit einen erhöhten Dopaminumsatz (Verhältnis DOPAC/DA) bei den untersuchten DYT1 Gehirnen. Sie fanden ferner keine Unterschiede in der Dichte der Dopamintransporter, aber einen zu den Ergebnissen dieser Dissertation passenden Trend zu einer verringerten D1 und D2 Rezeptorbindung (Augood et al., 2004).

Insgesamt sind aber diese beiden Hinweise aus dem Humanbereich also widersprüchlich, sodass Ergebnisse aus der Tierforschung ein klareres Licht bezüglich einer striatalen Dysfunktion bei der DYT1 Dystonie werfen sollen. Um diese These zu überprüfen, wurden zwei ergänzende Experimente durchgeführt, bei denen genetisch mutierten *Tor1a* +/- Mäusen nach einer N. ischiadicus Quetschläsion entweder AMPT (*Tor1a* +/- AMPT Mäuse) oder L-Dopa (*Tor1a* +/- L-Dopa Mäuse) über einen Zeitraum von acht Wochen injiziert und die Auswirkung auf das Bewegungsverhalten der Tiere untersucht wurde.

### 4.3 L-DOPA/AMPT-Behandlung

#### *Catwalk*

Hinsichtlich der Schrittfolgeregularität zeigte sich bei genetisch mutierten Mäusen eine deutliche Auswirkung der Medikation: *Tor1a* +/- AMPT Mäuse wiesen nach der Läsion eine progrediente Zunahme der Schrittfolgeregularität auf das Ausgangsniveau auf, *Tor1a* +/- L-Dopa Mäuse hingegen entwickelten auf die Läsion hin eine kontinuierliche Abnahme der Schrittfolgeregularität auf und konnten sich nicht auf ihr Ausgangsniveau erholen. Das bedeutet also, dass die Interaktion aus genetischer Mutation und Läsion, die zu einer Dystonie führt, durch die Gabe von AMPT wieder aufgehoben werden kann und die fokale Dystonie reversibel ist.

#### *Dystoniegraduierung anhand des Tail-suspension-Test*

Bezüglich der Ergebnisse beim Tail-suspension-Test zeigten sich ähnliche Resultate: *Tor1a* +/- Mäuse wiesen nach der Quetschläsion auf die Verabreichung von AMPT hin eine Reduktion der fokalen Dystonie auf, wohingegen die Behandlung mit L-Dopa bei Mutanten zu einer Verschlechterung der Dystonie führte. Dieser Unterschied ließ sich ab der vierten Woche nach der Quetschläsion beobachten. Diese Ergebnisse sind analog zu den Catwalk-Analysen zu interpretieren und untermauern den positiven Effekt von AMPT auf die durch den „second hit“ ausgelöste DYT1 Dystonie von genetisch mutierten Mäusen. Durch den im Gegensatz dazu stehenden möglichen negativen Effekt einer L-Dopa Behandlung wird ebenso die These der hyperdopaminergen Störung bei der DYT1 Dystonie bestärkt. Durch ein

zusätzliches Überangebot an Dopamin durch das Präparat zu dem ohnehin schon bei der DYT1 Dystonie angenommenen übermäßigen Dopamingehalt scheinen sich die Dystoniesymptome sogar verschlimmern zu können.

### *Pseudodystonie*

Um den kausalen Zusammenhang zwischen dem vorhandenen Ungleichgewicht in den Basalganglien und der fokalen Dystonie im zuvor verletzten Nerv zu überprüfen, wurden zwei Experimente mit etablierten pharmakologischen Behandlungen durchgeführt. Durch die Behandlung von *Tor1a* +/- Mäusen mit L-Dopa oder dem DA-Syntheseblocker AMPT konnte die striatale DA-Konzentrationen in zwei entgegengesetzte Richtungen gesteuert und somit entweder eine Verschlimmerung oder eine Reduktion der dystonen Bewegungen ausgelöst werden im Vergleich zu den Tieren, die keine Behandlung erhielten. Interessanterweise reagierten die wt Mäuse mit einer dystonieähnlichen Bewegung des betroffenen rechten Hinterbeines nicht signifikant auf eine L-Dopa Behandlung und nur geringfügig auf eine AMPT-Verabreichung. Dies zeigt somit, dass die dystonieähnlichen Bewegungen in wt Mäusen eine zu vernachlässigende zentrale Beteiligung der Basalganglien aufweisen im Gegensatz zu der zentral modifizierbaren Dystonie bei den *Tor1a* +/- Mäusen. Dies bestätigt, dass die motorischen Symptome der wt Mäuse als eine Art „Pseudodystonie“ zu bewerten sind ähnlich wie bei Menschen nach einer Deafferentierung und nicht als eine genuine Dystonie zu betrachten sind.

Vergleichsstudien lassen sich auch bei dieser Thematik schwer finden. Eine Studie von Song et al. 2012 jedoch konnte sowohl bei DYT1 knock-in Mäusen als auch bei Wildtypen auf Amphetamin (Dopaminsteigerung) eine erhöhte Aktivität und auf Haloperidol (Dopaminverminderung) eine Bewegungsverringering feststellen, sodass sich hier Mutanten und wt Mäuse nicht unterschieden (Song et al., 2012). Dennoch besaßen die knock-in Mäuse sowohl eine grundlegend verringerte Dopaminausschüttung als auch eine reduzierte amphetaminbedingte Dopaminsteigerung. Dazu passend fanden auch Balcioglu et al. 2007 bei ihren transgenen Mäusen mit menschlich mutiertem *Tor1a* eine verringerte amphetaminbedingte striatale Dopaminausschüttung, sodass es neuronal einen Unterschied in der Dopaminausschüttung zwischen mutierten und wt Mäusen zu geben scheint, der sich nicht offensichtlich zwischen den Mäusen in ihrem motorischen Verhalten bemerkbar machen

muss. Es muss hierbei aber bedacht werden, dass die Autoren nur den naiven Zustand von Mutanten und Wildtypen ohne einen dystonen Phänotyp untersucht haben, wohingegen in dieser Dissertation Vergleiche mit dystonem Phänotyp durchgeführt wurden, was zudem zum Auffinden unterschiedlicher Ergebnisse beigetragen haben kann.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse aus diesen beiden letzten Experimenten dafür, dass Dopamin ein wichtiger Metabolit bei der DYT1 Dystonie ist, sodass dopaminsenkende Mittel translational im Humanbereich zum richtigen Zeitpunkt eingesetzt ein potentiell Therapeutikum darstellen. Nur durch die Kenntnis und Überprüfung solcher Grundlagen ist die Entwicklung effektiver Behandlungsmethoden möglich. Leider ist dies gerade bei Dystonien sehr schwierig, da diese Krankheit eine sehr heterogene Gruppe mit ungeklärten Ursachen darstellt, was die Entwicklung von Therapieoptionen zusätzlich erschwert. Ferner sind Studien mit einem Behandlungsimpetus selten, sodass auch hier in Anbetracht der hohen Anzahl an Dystonie-Patienten dringender Forschungsbedarf besteht. Ankenmann und Salvatore et al. 2007 konnten bereits bei Patienten mit tardiver Dystonie und Dyskinesie mit einer niedrigen Dosierung von AMPT Erfolge erzielen. Dieses Ergebnis hat also in Betracht auf menschliche DYT1 Patienten unbedingte Behandlungsimplicationen und sollte daher auch für diese Patientengruppe in der zukünftigen Forschung weiter adressiert werden. Einen Überblick über bisherige Behandlungsmöglichkeiten bieten Jinnah und Hess et al. 2008 und Richter et al. 2014: Am breitesten und effektivsten beispielsweise ist das Spritzen von Botox in betroffene Muskeln bei fokalen und segmentalen Dystonien. L-Dopa wird bei DRD eingesetzt, da es nur bei dieser Dystonie wirksam ist (Jinnah & Hess, 2008; Richter & Richter, 2014). Es wird ferner versucht, die Dopamintransmission zu unterdrücken, zum Beispiel mit Tetrabenazin bei spät einsetzenden, tardiven Dystonien. Allerdings birgt dies auch viele Nebenwirkungen wie Parkinson Symptome. Auch anticholinerge Medikamente kommen zum Einsatz. Diese haben allerdings auch Nebenwirkungen, da oft hohe Dosen benötigt werden und eine kognitive Störung, Verstopfung oder Mundtrockenheit damit einhergehen. Dies stellt natürlich ein unbefriedigendes Ergebnis dar, dennoch liefert auch die Studie von Bao et al. 2010 an transgenen Mäusen Hinweise auf eine mögliche cholinerge Dysfunktion zusätzlich zu der dopaminergen bei Dystonien (Bao et al., 2010). Da cholinerge Interneurone im Striatum vorhanden sind, verwundert dies nicht (Goodchild et al., 2013; Jinnah & Hess, 2008). Somit sollte also künftige Forschung das Wechselspiel von Dopamin und Acetylcholin im Hinblick auf die Pathophysiologie von Dystonie näher untersuchen.

## 5            **Einschränkungen**

Nicht bei allen Tieren konnten Untersuchungen durchgeführt werden, da bei der Verhaltensanalyse zwei Tiere von den Experimenten ausgeschlossen werden mussten. Gründe dafür waren eine Wundheilungsstörung sowie der Tod eines Tieres aus unklaren Gründen.

Ein weiteres Problem trat bei den Catwalk™ XT 10.0 Analysen auf. Einige der Versuchstiere wollten nicht laufen. Als Motivation konnte zwar am Ende des Gangs Futter die Mäuse zum Laufen bringen, aber dies funktionierte nicht bei jedem Versuchstier. Daraus resultierten uneinheitliche Gruppengrößen. Bei einigen Mäusen konnte zwar keine Ganganalyse vorgenommen werden, dafür aber konnte der Dystoniegrad im „Tail suspension Test“ ermittelt werden.

Eine vollständige Einheitlichkeit der Versuchsabläufe konnte trotz aller Bemühungen nicht in jedem Fall gewährleistet werden: Es wurden bei der Durchführung der Ganganalyse Tiere, die z.B. während der Aufnahme von der im Catwalk integrierten Kamera stehenblieben, von der Auswertung ausgeschlossen.

Ferner gab es Einschränkungen in der Auswertung der immunhistochemischen Präparate. Pro Objektträger wurden drei Schnitte zur Analyse ausgesucht. Obwohl die Färbemethoden sehr gut etabliert sind, ist das Endprodukt des gefärbten Präparates nicht vollständig beeinflussbar. So wurden neben Schmutz auch kleine Schnittstellen sowie abgetrennte Ränder bei einigen Präparaten entdeckt und von der Auswertung ausgeschlossen.

## 6 Zusammenfassung

Hintergrund dieser Doktorarbeit ist die ungeklärte Pathophysiologie der idiopathischen Dystonie. Die DYT1 Dystonie ist die häufigste hereditäre Dystonie und weist eine Mutation im *Tor1a*-Gen auf, welches das Protein TorsinA kodiert. Diese DYT1 Dystonie besitzt interessanterweise lediglich eine Penetranz von 30%. Ein gutes Nagermodell mit einem klinisch dystonen Phänotyp existiert bislang nicht. Diese Dissertation adressiert die Frage, ob sich eine Dystonie bei DYT1 relevanter genetischer Prädisposition durch peripheren Stress („*second-hit*“) manifestiert.

Bei *Tor1a +/-* Mäusen (50% TorsinA Expression, *Tor1a +/-*), die im naiven Zustand keinen dystonen Phänotyp haben, sowie bei Wildtyp (wt) Kontrolltieren im Alter von vier Monaten wurde eine rechtsseitige reversible N. ischiadicus Quetschläsion durchgeführt. Die Tiere wurden daraufhin in einem Beobachtungszeitraum von acht Wochen nach dem Trauma verhaltensanalytisch und morphologisch untersucht.

Folgende Ergebnisse wurden hierbei erzielt: Im „*Tail-suspension-Test*“ zeigte sich bereits ein Tag nach der Quetschläsion des N. ischiadicus eine passagere Parese des betroffenen rechten Hinterbeins bei wt und *Tor1a +/-* Mäusen. Die fokale Dystonie entwickelte sich ab der vierten Woche bei *Tor1a +/-* Mäusen stärker als bei den wt Kontrolltieren. Durch das computergestützte Ganganalysesystem (Catwalk™ XT 10.0) konnte bei wt und *Tor1a +/-* Tieren eine Woche nach der Quetschläsion eine Veränderung der Schrittfolgemuster mit einer Reduktion des Schrittfolge-Regularitäts-Index festgestellt werden. Die abnormale Schrittfolge beim Laufen führte bei *Tor1a +/-* Mäusen zu einer progredienten Abnahme des Schrittfolge-Regularitäts-Index, während sich wt Mäuse nach fünf Wochen aber wieder erholten. Bei der Überprüfung der Koordinationsfähigkeit beider Genotypen durch den Rotarod Test konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Immunhistochemische Färbungen des N. ischiadicus auf den Myelinmarker Myelinprotein Zero MPZ, den axonalen Marker Neurofilament und Makrophagen Marker F4/80+ vor der Nervenläsion und acht Wochen nach der Nervenläsion zeigten ebenso keine signifikanten Unterschiede zwischen wt und *Tor1a +/-* Tieren. Die Anzahl Nissl+ Neurone im lumbalen Rückenmark (L2-4), Striatum und zerebralen Kortex und zudem die Anzahl CD11b positiver Mikroglia im lumbalen Rückenmark (L2-4) wiesen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der beiden Genotypen nach Nervenläsion auf.

Abschließend wurden noch verschiedene Behandlungsexperimente durchgeführt, um zu klären, ob die gefundenen Unterschiede zwischen *Tor1a* +/- und *Tor1a* +/+ Mäusen dopaminerg verursacht sind. Hierfür wurden sowohl genetisch mutierte *Tor1a* +/- Mäuse als auch wt Mäuse nach der Quetschläsion entweder mit einem Kombinationspräparat aus L-Dopa und Benserazid oder mit AMPT acht Wochen lang behandelt.

Folgende Ergebnisse wurden hierbei ermittelt: Die Schrittfolgeregularität beim Catwalk™ XT 10.0 zeigte bei genetisch mutierten Mäusen eine deutliche Auswirkung der Medikation. *Tor1a* +/- AMPT Mäuse wiesen nach der Läsion eine progrediente Zunahme der Schrittfolgeregularität auf das Ausgangsniveau auf, *Tor1a* +/- L-Dopa Mäuse hingegen entwickelten auf die Läsion hin eine kontinuierliche Abnahme der Schrittfolgeregularität und konnten sich nicht auf ihr Ausgangsniveau erholen. Die Ergebnisse beim „Tail-suspension-Test“ zeigten ähnliche Resultate: *Tor1a* +/- Mäuse wiesen nach der Quetschläsion auf die Verabreichung von AMPT hin eine Reduktion der fokalen Dystonie auf, wohingegen die Behandlung mit L-Dopa bei Mutanten zu einer Verschlechterung der Dystonie führte.

Schlussfolgernd zeigt die vorliegende Dissertation, dass ein peripheres Trauma bei genetisch prädispositionierten Mäusen im Sinne eines „second-hits“ zur klinischen Ausprägung einer DYT1 Dystonie führt. Die verstärkte fokale Dystonie in *Tor1a* +/- Mäusen ist nicht durch ein unterschiedliches Ausmaß an Nervenschädigung nach N. ischiadicus Quetschläsion oder durch morphologische Veränderungen der *Tor1a* +/- Mäuse im Bereich des N. ischiadicus, Rückenmarks, Striatums oder des Kortex zu begründen.

## 7 Abstract

### **Focal dystonia manifests in *Tor1a*<sup>+/-</sup> mice via a striatal dopaminergic dysregulation triggered by peripheral nerve injury**

Chi Wang Ip, Ioannis U. Isaias, Burak B. Kusche - Tekin, Dennis Klein, Janos Groh, Aet O'Leary, Susanne Knorr, Takahiro Higuchi, James B. Koprach, Jonathan M. Brotchie, Klaus V. Toyka, Andreas Reif, Jens Volkmann

#### **Abstract**

Isolated generalized dystonia is a central motor network disorder characterized by twisted movements or postures. The most frequent genetic cause is a GAG deletion in the *Tor1a* (*DYT1*) gene encoding torsinA with a reduced penetrance of 30-40 % suggesting additional genetic or environmental modifiers. Development of dystonia-like movements after a standardized peripheral nerve crush lesion in wild type (wt) and *Tor1a*<sup>+/-</sup> mice, that express 50 % torsinA only, was assessed by scoring of hindlimb movements during tail suspension, by rotarod testing and by computer-assisted gait analysis. Western blot analysis was performed for dopamine transporter (DAT), D1 and D2 receptors from striatal and quantitative RT-PCR analysis for DAT from midbrain dissections. Autoradiography was used to assess the functional DAT binding in striatum. Striatal dopamine and its metabolites were analyzed by high performance liquid chromatography. After nerve crush injury, we found abnormal posturing in the lesioned hindlimb of both mutant and wt mice indicating the profound influence of the nerve lesion (15x vs. 12x relative to control) resembling human peripheral pseudodystonia. In mutant mice the phenotypic abnormalities were increased by about 40 % ( $p < 0.05$ ). This was accompanied by complex alterations of striatal dopamine homeostasis. Pharmacological blockade of dopamine synthesis reduced severity of dystonia-like movements, whereas treatment with L-Dopa aggravated these but only in mutant mice suggesting a *DYT1* related central component relevant to the development of abnormal involuntary movements. Our findings suggest that upon peripheral nerve injury reduced torsinA concentration and environmental stressors may act in concert in causing the central motor network dysfunction of *DYT1* dystonia.

## 8 Literaturverzeichnis

- Albanese, A., Bhatia, K., Bressman, S. B., DeLong, M. R., Fahn, S., Fung, V. S., Teller, J. K. (2013). Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update. [Review]. *Mov Disord*, 28(7), 863-873.
- Albanese, A., & Lalli, S. (2012). Update on dystonia. [Review]. *Curr Opin Neurol*, 25(4), 483-490.
- Altenmüller, E., & Jabusch, H. C. (2010). Focal dystonia in musicians: phenomenology, pathophysiology, triggering factors, and treatment. [Review]. *Med Probl Perform Art*, 25(1), 3-9.
- Ankenman, R., & Salvatore, M. F. (2007). Low dose alpha-methyl-para-tyrosine (AMPT) in the treatment of dystonia and dyskinesia. [Case Reports]. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 19(1), 65-69.
- Augood, S. J., Hollingsworth, Z., Albers, D. S., Yang, L., Leung, J., Breakefield, X. O., & Standaert, D. G. (2004). Dopamine transmission in DYT1 dystonia. [Comparative Study]. *Adv Neurol*, 94, 53-60.
- Augood, S. J., Hollingsworth, Z., Albers, D. S., Yang, L., Leung, J. C., Müller, B., Standaert, D. G. (2002). Dopamine transmission in DYT1 dystonia: a biochemical and autoradiographical study. *Neurology*, 59(3), 445-448.
- Aumüller, G. (8. November 2006). *Anatomie (Duale Reihe)*. Kapitel 3 Nervensystem Grundlagen - 3.1 Funktion und Gliederung -. Seite 172 bis 178: MLP Thieme Verlag. ISBN 3-13-136041-0.
- Bähr, M. e. a., 2014. (2014). Neurologisch-topische Diagnostik Anatomie - Funktion – Klinik, Kapitel 3.2 Zentrale Anteile des motorischen Systems und klinische Syndrome bei deren Läsion. Seite 72 bis 80. Thieme Verlag.
- Balcioglu, A., Kim, M. O., Sharma, N., Cha, J. H., Breakefield, X. O., & Standaert, D. G. (2007). Dopamine release is impaired in a mouse model of DYT1 dystonia. *J Neurochem*, 102(3), 783-788.
- Bao, L., Patel, J. C., Walker, R. H., Shashidharan, P., & Rice, M. E. (2010). Dysregulation of striatal dopamine release in a mouse model of dystonia. *J Neurochem*, 114(6), 1781-1791.
- Berardelli, A., Rothwell, J. C., Hallett, M., Thompson, P. D., Manfredi, M., & Marsden, C. D. (1998). The pathophysiology of primary dystonia. [Review]. *Brain*, 121 ( Pt 7), 1195-1212.
- Berman, B. D., Hallett, M., Herscovitch, P., & Simonyan, K. (2013). Striatal dopaminergic dysfunction at rest and during task performance in writer's cramp. *Brain*, 136(Pt 12), 3645-3658.
- Bhatia, K. P. (2011). Paroxysmal dyskinesias. [Historical Article Review]. *Mov Disord*, 26(6), 1157-1165.
- Bhatia, K. P., & Marsden, C. D. (1994). The behavioural and motor consequences of focal lesions of the basal ganglia in man. *Brain*, 117 ( Pt 4), 859-876.
- Blitzer, A., Brin, M. F., Fahn, S., & Lovelace, R. E. (1988). Clinical and laboratory characteristics of focal laryngeal dystonia: study of 110 cases. *Laryngoscope*, 98(6 Pt 1), 636-640.
- Bozkurt, A., Deumens, R., Scheffel, J., O'Dey, D. M., Weis, J., Joosten, E. A., Pallua, N. (2008). CatWalk gait analysis in assessment of functional recovery after sciatic nerve injury. *J Neurosci Methods*, 173(1), 91-98.

- Breakefield, X. O., Blood, A. J., Li, Y., Hallett, M., Hanson, P. I., & Standaert, D. G. (2008). The pathophysiological basis of dystonias. [Review]. *Nat Rev Neurosci*, 9(3), 222-234.
- Bressman, S. B. (2004). Dystonia genotypes, phenotypes, and classification. [Review]. *Adv Neurol*, 94, 101-107.
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V., & Di Filippo, M. (2014). Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. [Review]. *Nat Neurosci*, 17(8), 1022-1030.
- Carbon, M., Kingsley, P. B., Su, S., Smith, G. S., Spetsieris, P., Bressman, S., & Eidelberg, D. (2004). Microstructural white matter changes in carriers of the DYT1 gene mutation. [Comparative Study]. *Ann Neurol*, 56(2), 283-286.
- Casper, C., Kalliolia, E., & Warner, T. T. (2013). Recent advances in the molecular pathogenesis of dystonia-plus syndromes and hereditodegenerative dystonias. *Curr Neuropharmacol*, 11(1), 30-40.
- Cohen, J. (1988). *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. 2. Auflage. Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale 1988.
- Dang, M. T., Yokoi, F., McNaught, K. S., Jengelley, T. A., Jackson, T., Li, J., & Li, Y. (2005). Generation and characterization of Dyt1 DeltaGAG knock-in mouse as a model for early-onset dystonia. [Comparative Study]. *Exp Neurol*, 196(2), 452-463.
- Dang, M. T., Yokoi, F., Pence, M. A., & Li, Y. (2006). Motor deficits and hyperactivity in Dyt1 knockdown mice. *Neurosci Res*, 56(4), 470-474.
- Deumens, R., Jaken, R. J., Marcus, M. A., & Joosten, E. A. (2007). The CatWalk gait analysis in assessment of both dynamic and static gait changes after adult rat sciatic nerve resection. *J Neurosci Methods*, 164(1), 120-130.
- Duden. (2014). *Die deutsche Rechtschreibung*, Kapitel 26 - völlig neu bearb. u. erw. Aufl.: Berlin - Dudenverlag.
- Edwards, M. J., Huang, Y. Z., Wood, N. W., Rothwell, J. C., & Bhatia, K. P. (2003). Different patterns of electrophysiological deficits in manifesting and non-manifesting carriers of the DYT1 gene mutation. *Brain*, 126(Pt 9), 2074-2080.
- Eidelberg, D., Moeller, J. R., Antonini, A., Kazumata, K., Nakamura, T., Dhawan, V., Fahn, S. (1998). Functional brain networks in DYT1 dystonia. *Ann Neurol*, 44(3), 303-312.
- Fahn, S., Bressman, S. B., & Marsden, C. D. (1998). Classification of dystonia. [Review]. *Adv Neurol*, 78, 1-10.
- Flatau E, S. W. (1911). Progressiver Torsionspasm bei Kindern. *°Z ges Neurol Psychiat°*, 7:586–612.
- Furukawa, Y., Hornykiewicz, O., Fahn, S., & Kish, S. J. (2000). Striatal dopamine in early-onset primary torsion dystonia with the DYT1 mutation. [Case Reports]. *Neurology*, 54(5), 1193-1195.
- Gerhard Aumüller et al. (2006). *Anatomie (Duale Reihe)* - Kapitel N ZNS - Basalganglien - basale Kerne des Großhirnes (Nuclei basales). Seite 1150 bis 1153: MLP Thieme Verlag. ISBN 3-13-136041-0.
- Ghilardi, M. F., Carbon, M., Silvestri, G., Dhawan, V., Tagliati, M., Bressman, S., Eidelberg, D. (2003). Impaired sequence learning in carriers of the DYT1 dystonia mutation. *Ann Neurol*, 54(1), 102-109.
- Gonzalez-Alegre, P., & Paulson, H. L. (2004). Aberrant cellular behavior of mutant torsinA implicates nuclear envelope dysfunction in DYT1 dystonia. *J Neurosci*, 24(11), 2593-2601.
- Goodchild, R. E., & Dauer, W. T. (2004). Mislocalization to the nuclear envelope: an effect of the dystonia-causing torsinA mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(3), 847-852.

- Goodchild, R. E., & Dauer, W. T. (2005). The AAA+ protein torsinA interacts with a conserved domain present in LAP1 and a novel ER protein. [Comparative Study]. *J Cell Biol*, 168(6), 855-862.
- Goodchild, R. E., Grundmann, K., & Pisani, A. (2013). New genetic insights highlight 'old' ideas on motor dysfunction in dystonia. [Review]. *Trends Neurosci*, 36(12), 717-725.
- Goodchild, R. E., Kim, C. E., & Dauer, W. T. (2005). Loss of the dystonia-associated protein torsinA selectively disrupts the neuronal nuclear envelope. *Neuron*, 48(6), 923-932.
- Grundmann, K. (2005). Primary torsion dystonia. [Historical Article]. *Arch Neurol*, 62(4), 682-685.
- Grundmann, K., Reischmann, B., Vanhoutte, G., Hubener, J., Teismann, P., Hauser, T. K., Riess, O. (2007). Overexpression of human wildtype torsinA and human DeltaGAG torsinA in a transgenic mouse model causes phenotypic abnormalities. *Neurobiol Dis*, 27(2), 190-206.
- H.A. Jinnah, & Albanese, A. (2014). The New Classification System for the Dystonias: Why Was It Needed and How Was It Developed? *Movement Disorders Clinical Practice*, 1, 280–284.
- Ichinose, H., Ohye, T., Takahashi, E., Seki, N., Hori, T., Segawa, M. et al. (1994). Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. [Comparative Study]. *Nat Genet*, 8(3), 236-242.
- Ip, C. W., Isaias, I. U., Kusche-Tekin, B. B., Klein, D., Groh, J., O'Leary, A., Volkmann, J. (2016). Tor1a<sup>+/-</sup> mice develop dystonia-like movements via a striatal dopaminergic dysregulation triggered by peripheral nerve injury. *Acta Neuropathol Commun*, 4(1), 108.
- Jinnah, H. A., & Hess, E. J. (2008). Experimental therapeutics for dystonia. [Review]. *Neurotherapeutics*, 5(2), 198-209.
- Klein C. (2014). Genetics in dystonia. *Parkinsonism Relat Disord.*, 20 Suppl 1, 137-142.
- Koh, Y. H., Rehfeld, K., & Ganetzky, B. (2004). A Drosophila model of early onset torsion dystonia suggests impairment in TGF-beta signaling. *Hum Mol Genet*, 13(18), 2019-2030.
- LeBlanc, A. C., & Poduslo, J. F. (1990). Axonal modulation of myelin gene expression in the peripheral nerve. *J Neurosci Res*, 26(3), 317-326.
- Lemke, G., & Axel, R. (1985). Isolation and sequence of a cDNA encoding the major structural protein of peripheral myelin. *Cell*, 40(3), 501-508.
- Lemke, G., Lamar, E., & Patterson, J. (1988). Isolation and analysis of the gene encoding peripheral myelin protein zero. *Neuron*, 1(1), 73-83.
- Liang, C.-C., Tanabe, L. M., Jou, S., Chi, F., & Dauer, W. T. (2014). TorsinA hypofunction causes abnormal twisting movements and sensorimotor circuit neurodegeneration. *J Clin Invest.*, 124(7), 3080–3092.
- Lüllmann-Rauch, R. (2006a). *Taschenlehrbuch Histologie*. Kapitel 5 “Zellorganellen und Zytosol”: 5.1 Endoplasmatisches Retikulum -5.1.1. Ribosomen-. Seite 41 bis 47. Thieme Verlag. 3. Auflage. ISBN 978-3-13-129243-8
- Lüllmann-Rauch, R. (2006b). *Taschenlehrbuch Histologie*. Kapitel 9 “Nervengewebe ”: 9.1 Grundlagen -9.1.1. Übersicht über das Neuron-. Seite 166 bis 172. Thieme Verlag. 3. Auflage. ISBN 978-3-13-129243-8
- Lüllmann-Rauch, R. (2006c). *Taschenlehrbuch Histologie*. Kapitel 9 “Nervengewebe”:9.1 Grundlagen -9.1.1. Übersicht über das Neuron-. Untertitel "Methodische Besonderheiten der Neurohistologie". Seite 172. Thieme Verlag. 3. Auflage. ISBN 978-3-13-129243-8
- M. Schartl, M. G., A. von Eckardstein. (2009). *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen* - Kapitel 24 Hormone (Vol. 1.): 24.2 Biogene Amine. 24.2.1.

- Catecholamine -Biosynthese der Catecholamine-. Seite 695 bis 697. Elsevier Verlag. ISBN 978-3-437-43690-1.
- Marras, Lang A, van de Warrenburg BP, Sue CM, Tabrizi SJ, Bertram L, C, K. (2016). Nomenclature of Genetic Movement Disorders: Recommendations of the International Parkinson and Movement Disorder Society Task Force. *Movement Disorders, Vol. 31, No. 4*, 436-457.
- Martini, R., & Schachner, M. (1997). Molecular bases of myelin formation as revealed by investigations on mice deficient in glial cell surface molecules. *Glia, 19(4)*, 298-310.
- Misbahuddin, A., Placzek, M. R., Taanman, J. W., Gschmeissner, S., Schiavo, G., Cooper, J. M., & Warner, T. T. (2005). Mutant torsinA, which causes early-onset primary torsion dystonia, is redistributed to membranous structures enriched in vesicular monoamine transporter in cultured human SH-SY5Y cells. *Mov Disord, 20(4)*, 432-440.
- Nagarajan, R., Le, N., Mahoney, H., Araki, T., & Milbrandt, J. (2002). Deciphering peripheral nerve myelination by using Schwann cell expression profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A, 99(13)*, 8998-9003.
- Neumann, M., Wang, Y., Kim, S., Hong, S. M., Jeng, L., Bilgen, M., & Liu, J. (2009). Assessing gait impairment following experimental traumatic brain injury in mice. *J Neurosci Methods, 176(1)*, 34-44.
- Niethammer, M., Carbon, M., Argyelan, M., & Eidelberg, D. (2011). Hereditary dystonia as a neurodevelopmental circuit disorder: Evidence from neuroimaging. [Review]. *Neurobiol Dis, 42(2)*, 202-209.
- Noldus. (2012). *Reference Manual - CatWalk XT Version 10.0 Copyright © 2012 Noldus Information Technology b.v., Documentation: Douwe Achterkamp, Ruud de Keijzer, Patrick Zimmerman. May 2012 - Noldus Information Technology b.v., International headquarters, Wageningen, The Netherlands.*
- Ozelius, L. J., Hewett, J. W., Page, C. E., Bressman, S. B., Kramer, P. L., Shalish, C., Breakefield, X. O. (1997). The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein. *Nat Genet, 17(1)*, 40-48.
- Patel, K., Roskrow, T., Davis, J. S., & Heckmatt, J. Z. (1995). Dopa responsive dystonia. [Case Reports]. *Arch Dis Child, 73(3)*, 256-257.
- Paxinos&Franklin's. (2001). *"The Mouse Brain", in Stereotaxic Coordinates, second edition.* George Paxinos - The Prince of Wales Medical Research Institute, Barker St, Randwick NSW 2031 Australia and School of Psychology The University of New South Wales Sydney 2052, Australia und Keith B. J. Franklin Department of Psychology, McGill University, Montreal, Quebec - Canada H3A 1B1.
- Perry, V. H., Brown, M. C., & Gordon, S. (1987). The macrophage response to central and peripheral nerve injury. A possible role for macrophages in regeneration. [Comparative Study]. *J Exp Med, 165(4)*, 1218-1223.
- Raymond, D., Saunders-Pullman, R., de Carvalho Aguiar, P., Schule, B., Kock, N., Friedman, J., Bressman, S. (2008). Phenotypic spectrum and sex effects in eleven myoclonus-dystonia families with epsilon-sarcoglycan mutations. *Mov Disord, 23(4)*, 588-592.
- Richter, F., & Richter, A. (2014). Genetic animal models of dystonia: common features and diversities. [Review]. *Prog Neurobiol, 121*, 91-113.
- Risch, N., de Leon, D., Ozelius, L., Kramer, P., Almasy, L., Singer, B., Bressman, S. (1995). Genetic analysis of idiopathic torsion dystonia in Ashkenazi Jews and their recent descent from a small founder population. [Historical Article]. *Nat Genet, 9(2)*, 152-159.
- Risch, N. J., Bressman, S. B., deLeon, D., Brin, M. F., Burke, R. E., Greene, P. E., Fahn, S. (1990). Segregation analysis of idiopathic torsion dystonia in Ashkenazi Jews suggests autosomal dominant inheritance. *Am J Hum Genet, 46(3)*, 533-538.

- Rostasy, K., Augood, S. J., Hewett, J. W., Leung, J. C., Sasaki, H., Ozelius, L. J., Hedreen, J. C. (2003). TorsinA protein and neuropathology in early onset generalized dystonia with GAG deletion. *Neurobiol Dis*, *12*(1), 11-24.
- Saunders-Pullman, R., Shriberg, J., Heiman, G., Raymond, D., Wendt, K., Kramer, P., Bressman, S. B. (2002). Myoclonus dystonia: possible association with obsessive-compulsive disorder and alcohol dependence. *Neurology*, *58*(2), 242-245.
- Sharma, N., Baxter, M. G., Petravicz, J., Bragg, D. C., Schienda, A., Standaert, D. G., & Breakefield, X. O. (2005). Impaired motor learning in mice expressing torsinA with the DYT1 dystonia mutation. *J Neurosci*, *25*(22), 5351-5355.
- Shashidharan, P., Sandu, D., Potla, U., Armata, I. A., Walker, R. H., McNaught, K. S., Olanow, C. W. (2005). Transgenic mouse model of early-onset DYT1 dystonia. *Hum Mol Genet*, *14*(1), 125-133.
- Song, C. H., Bernhard, D., Bolarinwa, C., Hess, E. J., Smith, Y., & Jinnah, H. A. (2013). Subtle microstructural changes of the striatum in a DYT1 knock-in mouse model of dystonia. *Neurobiol Dis*, *54*, 362-371.
- Song, C. H., Fan, X., Exeter, C. J., Hess, E. J., & Jinnah, H. A. (2012). Functional analysis of dopaminergic systems in a DYT1 knock-in mouse model of dystonia. *Neurobiol Dis*, *48*(1), 66-78.
- Stoll, G., & Muller, H. W. (1999). Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. [Review]. *Brain Pathol*, *9*(2), 313-325.
- Suls, A., Dedeken, P., Goffin, K., Van Esch, H., Dupont, P., Cassiman, D., Van Paesschen, W. (2008). Paroxysmal exercise-induced dyskinesia and epilepsy is due to mutations in SLC2A1, encoding the glucose transporter GLUT1. *Brain*, *131*(Pt 7), 1831-1844.
- Szczesna, K., de la Caridad, O., Petazzi, P., Soler, M., Roa, L., Saez, M. A., Esteller, M. (2014). Improvement of the Rett syndrome phenotype in a MeCP2 mouse model upon treatment with levodopa and a dopa-decarboxylase inhibitor. *Neuropsychopharmacology*, *39*(12), 2846-2856.
- Tanabe, L. M., Kim, C. E., Alagem, N., & Dauer, W. T. (2009). Primary dystonia: molecules and mechanisms. [Review]. *Nat Rev Neurol*, *5*(11), 598-609.
- van Enkhuizen, J., Geyer, M. A., Halberstadt, A. L., Zhuang, X., & Young, J. W. (2014). Dopamine depletion attenuates some behavioral abnormalities in a hyperdopaminergic mouse model of bipolar disorder. *J Affect Disord*, *155*, 247-254.
- Venezie, R. D., Toews, A. D., & Morell, P. (1995). Macrophage recruitment in different models of nerve injury: lysozyme as a marker for active phagocytosis. *J Neurosci Res*, *40*(1), 99-107.
- Weber, Y. G., Storch, A., Wuttke, T. V., Brockmann, K., Kempfle, J., Maljevic, S., Lerche, H. (2008). GLUT1 mutations are a cause of paroxysmal exertion-induced dyskinesias and induce hemolytic anemia by a cation leak. [Case Reports]. *J Clin Invest*, *118*(6), 2157-2168.
- Wichmann, T. (2008). Commentary: Dopaminergic dysfunction in DYT1 dystonia. [Review]. *Exp Neurol*, *212*(2), 242-246.
- Wohl, S. G., Schmeer, C. W., Witte, O. W., & Isenmann, S. (2010). Proliferative response of microglia and macrophages in the adult mouse eye after optic nerve lesion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *51*(5), 2686-2696.
- Zhao, Y., DeCuypere, M., & LeDoux, M. S. (2008). Abnormal motor function and dopamine neurotransmission in DYT1 DeltaGAG transgenic mice. *Exp Neurol*, *210*(2), 719-730.

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich nun bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben. Ohne die Unterstützung vieler Personen im Beruf und im privaten Umfeld wäre die Anfertigung dieser Doktorarbeit nicht möglich gewesen.

Hier ist zuerst Herr Prof. Dr. Jens Volkmann, Direktor der Neurologischen Klinik und Poliklinik, zu nennen, der mir diese überaus interessante Doktorarbeit ermöglicht hat. Ein besonders großer Dank gebührt zudem meinem Betreuer, Herrn Dr. Chi Wang Ip (Privatdozent), der mir eine immense Hilfe bei der Umsetzung dieser Doktorarbeit war. Er hat mich über mehrere Jahre intensiver Arbeit sehr gut betreut und hatte als mein persönlicher Mentor immer ein offenes Ohr für mich. Dr. Ip stand mir über mehrere Jahre mit Rat und Tat zur Seite. Zudem konnte er mir sein Wissen in professioneller Art und Weise weitergeben, indem er mir die einzelnen Arbeitsschritte immer wieder geduldig und detailliert erklärte. Ohne seine zuverlässige und kompetente Unterstützung wäre diese umfangreiche Dissertation praktisch und theoretisch nicht in dieser Form realisierbar gewesen.

Zudem möchte ich mich auch bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rudolf Martini, Leiter der Arbeitsgruppe Entwicklungsneurobiologie, bedanken. Ich konnte während der experimentellen praktischen Arbeiten (Etablierung der Färbemethoden, Mikroskopie) alle Räumlichkeit bedingungslos benutzen und wurde immer tatkräftig von allen Mitarbeitern unterstützt. Vor allem für die Hilfe bei der Etablierung der Färbemethoden und beim Umgang mit Kryostat bedanke ich mich ganz herzlich bei Fr. Silke Loserth (technische Mitarbeiterin). Durch Ihre langjährige Erfahrung konnte sie mich in der Hinsicht sehr gut unterstützen. Nicht zu vergessen ist in diesem Kontext die überaus unterstützende und professionelle Mithilfe und Mitarbeit von Dr. rer. nat. Janos Groh, Dipl.-Biol. Dennis Klein und Heinrich Blazyca. Sie haben sich immer wieder und flexibel Zeit genommen und waren somit eine sehr große Hilfe bei diesem Projekt. Für Ihre Hilfe möchte ich mich nochmals bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe der Experimentellen Entwicklungsneurobiologie bedanken.

Ein besonders großer Dank kommt zudem einer sehr wichtigen Person in meinem Leben zu, meiner Frau Valentina Kusche, die mich während meines Studiums mental immer unterstützt hat. Ohne diesen entscheidenden Rückhalt wäre das Zahnmedizinstudium mit gleichzeitiger Doktorarbeit nicht zu schaffen gewesen.

Ebenso gebührt ein großer Dank Frau Ursula und Andrea Kusche, die diese Doktorarbeit Korrektur gelesen haben.

Abschließend möchte ich mich auch bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium und diese Doktorarbeit finanziell ermöglicht haben.

## 10 Lebenslauf



### Curriculum Vitae

**Burak Baris Kusche-Tekin**

Färberstrasse 2

89165 Dietenheim

Privat: 07347-9586442

Mobil: 0049-160-5230448

E-Mail: buraktekin87@web.de

### Personalien

Geburtsdatum: 08.12.1987

Geburtsort: Kelkit (Türkei)

Familienstand: Verheiratet

Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Beruflicher Werdegang

01.04.2016 Beschäftigung als Vorbereitungsassistent in Türkheim –  
Gemeinschaftspraxis Dr. Sigle und Wengert

01.04.2015 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Universitätsklinikum Ulm –  
Abteilung der Zahnärztlichen Prothetik. Kursbetreuung  
Technische Propädeutik und Phantomkursus 1

01.10.2012 –

01.04.2016 Zahnmedizinischer Doktorand in der Neurologischen Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Würzburg

### **Universitärer Werdegang**

04.06.2014 Zahnmedizinisches Staatsexamen (Note: 2,0)  
01.10.2012 Beginn der Dissertation (Neurologische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Würzburg)  
11.10.2011 Zahnärztliche Vorprüfung  
18.03.2010 Naturwissenschaftliche Vorprüfung  
01.04.2009 Beginn des Studiums der Zahnmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

### **Schulischer Werdegang**

14.06.2008 Abitur (Note: 2,0)  
01.01.2007 2. Runde der 39. Internationalen Chemie-Olympiade 2007  
01.10.2006 1. Runde der 39. Internationalen Chemie-Olympiade 2007  
02.08.1999 –  
14.06.2008 Konrad-Adenauer-Gymnasium, Meckenheim  
27.06.1997 –  
29.01.1999 Katholische Grundschule, Meckenheim  
01.12.1994 –  
15.12.1996 Grundschule, Kelkit/Türkei

### **Promotion**

Beginn der Dissertation: 01.10.2012  
Thema der Dissertation: Entwicklung einer fokalen Dystonie durch periphere Nervenschädigung in Tor1a +/- Mäusen (Universitätsklinikum Würzburg, Neurologische Klinik und Poliklinik, Direktor Prof. Dr. J. Volkman, Betreuer PD Dr. med. Chi Wang Ip)  
Veröffentlichung: Am 03.10.2016 in Acta Neuropathologica Communications

## Fortbildungen

- 08.07.2017 **DVT Digitale Volumentomographie** – Teil 1, München
- 13.05.2017 **The Inman Aligner Certification Course** - Kempten
- 12.11.2016 **Biostrukturanalyse** – Schlüssel zum Kunden 2, Ettlingen
- 29.10.2016 **Biostrukturanalyse** – Schlüssel zum Kunden 1, Ettlingen
- 08.10.2016 **Biostrukturanalyse** – Triogram, Ettlingen
- 07.10.2016 **Biostrukturanalyse** – Structogram, Ettlingen
- 23.09.2016 –
- 24.09.2016 **Intensiv – Workshop:** „White Aesthetics and Funktion under your control“ Dr. T. Schwenk und Dr. M. Striegel – Nürnberg
- 02.02.2016 **Hands-On Kurs – Uniklinikum Ulm:** Abformung mit Triple-Tray-Löffeln mittels Impregnum DuoSoft für nicht endständige Einzelzahnkronen und einspannigen Brücken im Seitenzahnbereich
- 18.11.2015 **Digitaler Workflow** in der oralen Implantologie – Dentsply Implants Fortbildungen
- 13.06.2015 Workshop: Wurzelidentische REPLICATE Implantate – eine Option dank moderner Technik
- 13.06.2015 Workshop: Kommunikative Strategien bei somatoform- und schmerzgestörten Patienten
- 12.06.2015 Veneers von A-Z – Vom Patientenwunsch zum „perfect smile“
- 11.06.2015 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Prothetische Zahnmedizin und Biomaterialien e.V. (DGPro)

## Nebentätigkeiten während des Studiums

**Famulatur in Donauwörth, Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie**  
08/2010  
Praktikum in der Kieferchirurgie: Durchführung von Implantationen (Assistenz), Wurzelspitzenresektion (Assistenz)

Schienung des Unterkiefers nach Fraktur (Assistenz)

**Famulatur bei Dr. Ackermann (Rennertshofen) 08/2010**  
(1Woche)

Praktikum beim Zahnarzt: Praktische Erfahrungen im Umgang mit Patienten, Hygieneinstruktionen

**Famulatur (4 Wochen) Universitätsklinikum MKG-Chirurgie 2013**

### **Zusatzqualifikationen**

#### **EDV-Kenntnisse**

Fundierte Kenntnisse in Microsoft Word 2007 und 2013

Fundierte Kenntnisse in Microsoft Excel 2007

Grundkenntnisse in Microsoft Powerpoint 2007 und 2013

#### **Fremdsprachen**

1. Muttersprache: Türkisch

2. Muttersprache: Deutsch

Großes Latinum

Grundkenntnisse in Englisch und Französisch

#### **Mitgliedschaften**

Mitglied der DGZMK seit 06/2015

**Datum:** 08.08.2017