

**Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Jens Volkmann

**Kinematische und histomorphologische Charakterisierung des DYT1 Knock-in
Mausmodells mit Trauma-induzierter Dystonie**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Felix Leonard Steeg

aus

Mainz

Würzburg, Mai 2023

Referent: Prof. Dr. Chi Wang Ip

Koreferent: Prof. Dr. Philip Tovote

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.2023

Der Promovend ist Zahnarzt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Dystonie – Definition und Epidemiologie	1
1.1.1	Klassifikation der Dystonie	2
1.2	DYT-TOR1A Dystonie	5
1.2.1	TorsinA	7
1.3	Pathophysiologische Veränderungen des motorischen Netzwerks bei der DYT-TOR1A Dystonie	9
1.3.1	Neuroanatomische Grundlagen des motorischen Nervensystems	9
1.3.2	Aufbau und Funktion der Basalganglien	9
1.3.3	Das Striatum	11
1.3.4	Die Substantia nigra	13
1.3.5	Dopamin	13
1.4	Dystonie und Umweltfaktoren - die Two-hit Hypothese	15
1.5	DYT-TOR1A Tiermodelle	16
1.6	Die Rolle des Immunsystems bei einer peripheren Verletzung	18
1.6.1	Das Immunsystem und das periphere Nervensystem (PNS)	18
1.6.2	Das Immunsystem und das ZNS	20
1.7	Zielsetzung	21
2	Material und Methoden	23
2.1	Tierversuchsvotum	23
2.2	Versuchstiere	23
2.3	Substanzen und Chemikalien	23
2.3.1	Lösungen	27
2.4	Technische Gerätschaften und Instrumentarium	29
2.5	Versuchsanordnung	32
2.6	Nervenquetschläsion des N. ischiadicus	32
2.7	Elektroneurographie	33
2.8	Verhaltensanalyse	35
2.8.1	Erstellung eines neuronalen Netzwerks mittels DeepLabCut	36
2.8.2	Analysesoftware zur weiterführenden kinematischen Auswertung	43
2.9	Transkardiale Perfusion und Organentnahme	46
2.10	Gewebeverarbeitung	48
2.11	TH ⁺ - und Nissl-Färbung in der SN	49
2.12	Färbung der Immunzellen	52
2.13	Analyse der immunhistochemischen Färbungen	54
2.13.1	Analyse der Immunzellfärbungen	54
2.13.2	Analyse der TH ⁺ /Nissl Färbung	55

2.14	Statistische Auswertung	57
3	Ergebnisse	59
3.1	Auswirkungen der Nervenquetschung auf Bewegungsmuster im TST	59
3.1.1	Das neuronale Netzwerk	59
3.1.2	DYT1KI Tiere entwickeln signifikant mehr Dystonie-ähnliche Bewegungen im TST als wt Tiere.....	59
3.2	Auswirkungen der Nervenquetschung auf die Funktion des N. ischiadicus	60
3.3	Auswirkungen der Nervenquetschung auf die Immunreaktion in PNS und ZNS... ..	63
3.3.1	Keine erhöhte Immunreaktion nach Quetschläsion im Striatum.....	63
3.3.2	Geringe Erhöhungen an Immunzellen im Rückenmark nach Nervenquetschung	65
3.3.3	Erhöhung der Immunzellen im N. ischiadicus nach Quetschläsion.....	69
3.4	Auswirkungen der Nervenquetschung auf dopaminerge Neurone in der SN....	72
3.4.1	Signifikante Reduktion der TH ⁺ -Neurone in den DYT1KI Tieren	72
3.4.2	Signifikante Hypertrophie der TH ⁺ -Zellen bei DYT1KI Tieren	72
3.4.3	Keine Veränderungen der Nissl-Zellen in der SN.....	72
4	Diskussion.....	75
4.1	Überblick über die Hauptergebnisse	75
4.2	Kritische Bewertung der Ergebnisse und Methoden	75
4.2.1	Etablierung eines symptomatischen Mausmodells für die DYT-TOR1A Dystonie.....	75
4.2.2	Auswirkungen der Nervenquetschung auf das Immunsystem im PNS und ZNS	78
4.2.3	Hinweise auf eine Affektion des dopaminergen Stoffwechsels im DYT1KI-Mausmodell	83
5	Zusammenfassung	88
6	Literaturverzeichnis	90

Appendix

I	Abkürzungsverzeichnis
II	Abbildungsverzeichnis
III	Tabellenverzeichnis
IV	Danksagung
V	Lebenslauf
VI	Publikation

1 Einleitung

1.1 Dystonie – Definition und Epidemiologie

Die Dystonien umfassen eine Gruppe von hyperkinetischen Bewegungsstörungen, die sich in anhaltenden oder intermittierenden Muskelkontraktionen äußern und zu abnormen, oft repetitiven Bewegungen und/oder Haltungen führen. Diese beinhalten ein heterogenes klinisches Bild mit Bewegungen, die pathognomonisch gemustert auftreten und unwillkürliche Verkrampfungen, Torsionen (verdrehende Bewegungen) sowie Tremores (Zittern) aufweisen können (Albanese et al., 2013; Breakefield et al., 2008). In einem Konsensusbericht von Albanese et al. im Jahr 2013 wurde die aktuell gültige Definition und Klassifizierung der Dystonien veröffentlicht. Hier wird sie folgendermaßen definiert:

„Dystonia is a movement disorder characterized by sustained or intermittend 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)

Das Auftreten dieser abnormen Bewegungen kommt durch eine simultane Kontraktion agonistischer und antagonistischer Muskelgruppen zustande, wobei jegliche willkürlich gesteuerte Muskulatur betroffen sein kann (Berardelli et al., 1998; Tanabe, Kim, Alagem, & Dauer, 2009). Abhilfe leisten sich Patienten insbesondere in frühen Stadien der Erkrankung mit sensorischen Tricks oder einer „Geste antagonist“, wobei die Berührung eines benachbarten Körperteils symptomlindernd wirkt (Tanabe et al., 2009).

Schätzungen zufolge leiden bei einer Prävalenz von circa 370 pro 1 Million Menschen, über 3 Millionen Menschen weltweit an einer idiopathischen oder genetischen Dystonie. Damit repräsentiert sie die dritthäufigste Bewegungsstörung hinter dem essenziellen Tremor und Morbus Parkinson (Defazio, 2010). Aufgrund der vielfältigen klinischen Manifestationen wird jedoch weit verbreitet angenommen, dass bei einigen Patienten die Dystonie nicht diagnostiziert wird und die Zahl somit eigentlich deutlich höher liegt. Die Studienlage weist auch diesbezüglich ein sehr heterogenes Bild im Hinblick auf exakte Fallzahlen auf, die beispielsweise für die früh-beginnende Dystonie bei 2-50 pro Million und zwischen 30-7320 pro Million Menschen für den spät-beginnenden Typ liegen, was auf Unterschiede in Studiendesign, -population, Fallrekrutierung und Kriterien in der

Diagnostik zurückzuführen ist (Defazio, 2010; H. A. Jinnah & Hess, 2008). Es bleibt daher festzustellen, dass Angaben zur Prävalenz der Dystonien aufgrund von Diskrepanzen in Studien sowie ihrer weit gefassten Definition in der Literatur stark differieren.

1.1.1 Klassifikation der Dystonie

Ebenso wie die Debatte um die Prävalenzen hat sich im Laufe der Zeit auch die Klassifikation der Erkrankung gewandelt. Erste Beschreibungen des Begriffes „Dystonie“ gehen auf das 19. Jahrhundert zurück. Hierbei wurde zunächst eine psychogene Ursache vermutet (Munts & Koehler, 2010). Oppenheim beschrieb 1911 den Begriff „dystonia musculorum deformans“ (Oppenheim, 1911), während Flatau und Sterling im selben Jahr stattdessen den Namen „progressiver Torsionskrampf“ vorschlugen (Flatau & Sterling, 1911). Oppenheims Annahme, „dystonia musculorum deformans“ sei eine rein somatische Krankheit ohne psychische Ursache bekam Unterstützung durch Studien über eine eigene klinische Entität der Erkrankung (Herz, 1944a, 1944b, 1944c), die Heredität (Zeman, Kaelbling, Pasamanick, & Jenkins, 1959) und die limitierten Effekte durch eine Therapie mit Psychopharmaka oder chirurgische Intervention (Cooper, 1969; Eldridge, Riklan, & Cooper, 1969; Fahn & Eldridge, 1976; Munts & Koehler, 2010). Aufgrund der sowohl bis heute nicht vollständig geklärten Pathophysiologie als auch der Überschneidung zwischen klinischen Symptomen und Ätiologien dieser komplexen Krankheit, gab es lange Zeit keine einheitliche klinische Konzeptualisierung (Balint et al., 2018; Standaert, 2011). Ein Gen kann dabei verschiedenen dystonen Phänotypen zugrunde liegen, wohingegen auch ein dystoner Phänotyp durch verschiedene genetische Veränderungen verursacht werden kann (Balint et al., 2018).

Wurde die Dystonie zuvor anhand dreier Achsen - Ätiologie, Alter bei Symptombeginn und betroffene Körperregionen - klassifiziert (Fahn, 2011), schlägt das Gremium um Albanese et al. eine Klassifizierung anhand zweier Achsen vor (Tabelle 1):

Tabelle 1 **Aktuell gültige Klassifizierung der Dystonie [nach (Albanese et al., 2013)]**

Achse 1: klinische Eigenschaften						
<u>Alter zu Beginn der Symptome</u>	<i>Säuglingsalter</i>		<i>Kindheit</i>	<i>Jugendalter</i>	<i>Frühes Erwachsenenalter</i>	<i>Spätes Erwachsenenalter</i>
	bis 2. Lebensjahr		3-12 Jahre	13-20 Jahre	21-40 Jahre	> 40 Jahre
<u>Beteiligte Körperregionen</u>	<i>fokal</i>		<i>segmental</i>	<i>multifokal</i>	<i>generalisiert</i>	<i>Hemidystonie</i>
	nur <i>eine</i> Körperregion betroffen		<i>zwei oder mehr benachbarte</i> Körperregionen betroffen	<i>zwei oder mehr nicht benachbarte</i> Körperregionen betroffen	<i>Rumpf und zusätzlich zwei oder mehr</i> Körperregionen betroffen; mit oder ohne Beteiligung der Beine	mehrere Körperregionen betroffen, <i>beschränkt auf eine Körperseite</i>
<u>Zeitlicher Verlauf</u>	<i>Krankheitsverlauf</i>		<i>Variabilität des Auftretens der Symptome</i>			
	statisch	progressiv	persistierend	aktionsspezifisch	tägliche Schwankungen	paroxysmal
<u>Koexistenz mit weiteren Bewegungsstörungen</u>	<i>isoliert</i>		Dystonie als alleiniges Merkmal (Ausnahme: Tremor)			
	<i>kombiniert</i>		Dystonie in Kombination mit weiteren neurologisch-motorischen Manifestationen (z.B. Myoklonus, Parkinsonismus)			
Achse 2: Ätiologie						
<u>Pathologien des Nervensystems</u>	<i>Degeneration</i>		Progressive strukturelle Abnormitäten (z.B. Verlust an Neuronen)			
	<i>Statische Läsionen</i>		Nicht-progressive neurologische Entwicklungsanomalien oder erworbene Läsionen			
	kein Nachweis für Degenerationen oder strukturelle Läsionen					
<u>Heredität</u>	<i>hereditär</i>	<i>autosomal-dominant</i>	<i>autosomal-rezessiv</i>	<i>X-chromosomal-rezessiv</i>	<i>mitochondrial</i>	
		z.B. DYT-TOR1A, DYT-THAP1, DYT-SGCE	z.B. Morbus Wilson	z.B. Lesch-Nyhan-Syndrom	z.B. Leigh-Syndrom	
	<i>erworben</i>	spezifischer, bekannter Auslöser	z.B. perinatale Verletzungen, Infektionen, Medikamente, toxische Substanzen, vaskulärer Insult, Neoplasien, Trauma, psychisch bedingt			
	<i>idiopathisch</i>	sporadisch				
		familiär				

Die erste Achse beschreibt die klinischen Eigenschaften, die anhand von vier weiteren Unterpunkten charakterisiert werden. Diese sind das Alter bei Auftreten der Dystonie, die betroffenen Körperregionen, der zeitliche Verlauf und die mögliche Koexistenz von weiteren Bewegungsstörungen oder anderen neurologischen Manifestationen. Sie nehmen wichtigen Einfluss auf Diagnostik, Prognose und Therapie der auftretenden Symptomatik. Beginnt eine Dystonie beispielsweise bereits in der Kindheit, ist eine Ausbreitung fokaler Symptome zu einem generalisierten Erscheinen wahrscheinlich (Albanese et al., 2013; Reichel et al., 2018). Weiterhin wird folgende Unterscheidung hinsichtlich des Ausmaßes betroffener Körperteile getroffen: Bei fokalen Manifestationen begrenzt sich die Bewegungsstörung auf einen Teil des Körpers. Sie können zum Beispiel bei bestimmten, insbesondere repetitiven Muskelbeanspruchungen auftreten und die Feinmotorik beeinflussen, die für Aufgaben wie beispielsweise Schreiben (Schreibkrampf), Sprechen (spasmodische Dysphonie) oder Spielen eines Musikinstruments (Musikerdystonie) beschrieben wurden (Torres-Russotto & Perlmutter, 2008). Kommt es zu einem Übergreifen auf benachbarte Körperregionen, wie bei der kranialen Dystonie (bestehend aus Blepharospasmus und oromandibulärer Dystonie), spricht man von einem segmentalen Befall. Dahingegen sind bei der multifokalen Dystonie zwei oder mehr nicht unmittelbar zusammenhängende Körperteile betroffen. Belaufen sie sich auf den Rumpf und mindestens zwei weitere Regionen, mit oder ohne Beteiligung der Beine, ist von der generalisierten Form die Rede (Albanese et al., 2013). Die häufigste klinische Manifestation der Dystonie stellt bei Erwachsenen die zervikale Dystonie dar, wohingegen bei Kindern die generalisierte und vererbte DYT-TOR1A Dystonie als die häufigste Form gilt (Batla, 2018). Darüber hinaus wird zwischen dem Auftreten von Dystonie als alleiniges Krankheitsmerkmal sowie dem Auftreten in Kombination mit anderen Symptomkomplexen, wie beispielsweise einem Parkinson-Syndrom unterschieden (Tolosa & Compta, 2006).

Achse II nimmt Bezug auf die Ätiologie der Erkrankung, mit einer Untergliederung in „Pathologien des Nervensystems“ und „Heredität“. Die abnorme neuronale Aktivität, die zu dystonen Bewegungsmustern führt, gilt auf zellulärer Ebene als noch nicht vollständig geklärt (Balint et al., 2018). Zur Ergründung der vielfältigen Ursachen der Dystonien existieren unterschiedliche Methoden. Es wurden erwiesenermaßen anatomisch-strukturelle Veränderungen in sensomotorischem Kortex, Cerebellum und insbesondere in den Basalganglien, hier vor allem im Putamen, in Studien mittels bildgebender Verfahren beobachtet (Neychev, Gross, Lehericy, Hess, & Jinnah, 2011; Zoons, Booij, Nederveen, Dijk, & Tijssen, 2011). Humane Autopsie-Studien erweisen aufgrund einer

sehr begrenzten Anzahl kaum Evidenz, die neuropathologische Veränderungen in direkte Verbindung mit einer gemeinsamen Pathogenität der Erkrankung bringen (Standaert, 2011). Dies ist darauf zurückzuführen, dass das Auftreten von Dystonien selten diagnostiziert wird, post mortem Untersuchungen an Gehirnen zum Teil besondere Methoden zur Verarbeitung des Gewebes erfordern, die nicht auf humanes Gewebe angewandt werden können und, dass bei den genetischen und idiopathischen Dystonien möglicherweise gar keine offensichtliche Degeneration oder makrostrukturelle Veränderungen auftreten. Vielmehr könnten auch mikrostrukturelle Veränderungen von Morphologie, Komplexität oder Konnektivität von Somata oder Neuriten ursächlich sein (Song et al., 2013). Zusammenfassend unterscheiden Albanese et al. die pathologischen molekularen, mikro- und makroskopischen Vorgänge in degenerative Prozesse, statische Läsionen oder Auftreten ohne nachweisbare Degenerationen oder strukturelle Läsionen.

Als weiterer wichtiger Punkt wird unter Achse II unterschieden, ob die Dystonie vererbt, erworben oder idiopathisch ist (Albanese et al., 2013). Unter den hereditären Dystonieformen existieren autosomal-dominante Formen wie die DYT-TOR1A Dystonie sowie autosomal-rezessive, X-chromosomal-rezessive und mitochondriale Formen.

1.2 DYT-TOR1A Dystonie

Im Rahmen dieser Arbeit wird die DYT-TOR1A Dystonie eingehend behandelt. Wurden die Dystonien früher anhand ihrer Genloci zur Spezifizierung chromosomaler Regionen bezeichnet (z.B. „DYT1“ bis „DYT15“), empfiehlt die „International Parkinson and Movement Disorder Society Task Force“ in Ihrer Übersichtsarbeit von 2016 die Einbeziehung der Gene, bei denen Mutationen für die Entwicklung von Bewegungsstörungen mitentscheidend sind, sofern eine eindeutige genetische Variation für den jeweiligen Phänotypen nachgewiesen ist (Marras et al., 2016). Dabei wird der Name des Gens an die symbolische Abkürzung der Krankheit anstelle der vorherigen Nummerierung angehängt („DYT-TOR1A“ statt „DYT1“). In dieser Arbeit wird die in einigen der zitierten Studien auch als „DYT1“ oder „primäre Dystonie“ bezeichnete Form der Dystonie aufgrund dessen synonym „DYT-TOR1A Dystonie“ genannt. Sie stellt die häufigste Form hereditärer Dystonien dar und wird autosomal dominant vererbt (Bressman et al., 1989; L. J. Ozelius et al., 1997; N. J. Risch et al., 1990). Es ist bekannt, dass in der aschkenasisch-jüdischen Bevölkerungsgruppe (Juden mit europäischer Herkunft) die DYT-TOR1A Dystonie mit einer Prävalenz von bis zu 1 : 10 000 rund fünfmal häufiger auftritt als bei Juden afrikanischer oder asiatischer Herkunft (Zilber,

Korczy, Kahana, Fried, & Alter, 1984). Dies ist darauf zurückzuführen, dass vor rund 350 Jahren eine Gründermutation in dieser Population stattfand, die sich bis heute durchsetzt (N. Risch et al., 1995). Ozelius et al. und Kramer et al. zeigten auf, dass sowohl bei der aschkenasischen als auch bei nicht-aschkenasischen und nicht-jüdischen Bevölkerungsgruppen, die der DYT-TOR1A Dystonie zugrundeliegende Mutation auf Chromosom 9 in Region q34 lokalisiert ist (Kramer et al., 1990; Kramer et al., 1994; L. Ozelius et al., 1989). In der kodierenden Sequenz des TOR1A-Gens führt eine 3-bp Deletion eines GAG-Codons zum Verlust von zwei Glutaminsäureresten in der Nähe des Carboxy-Terminus im Genprodukt, dem Protein TorsinA, auf welches im folgenden Abschnitt genauer eingegangen wird (L. J. Ozelius et al., 1997). Die Penetranz ist auf 30-40% reduziert, darüber hinaus können das klinische Erscheinungsbild hinsichtlich der Symptomausprägung sowie das Erkrankungsalter variieren (Bressman et al., 1989; Kramer et al., 1994; Pauls & Korczyn, 1990). Dennoch wird bei einem Großteil der Genträger ein charakteristischer Phänotyp beschrieben. Dieser zeigt einen Beginn mit Verkrampfungen in einem Arm oder Bein. Häufig folgt daraufhin ein Ausbreiten der Dystonie innerhalb von durchschnittlich fünf Jahren auf andere Extremitäten, gelegentlich auf zervikale und selten auf kraniale Anteile (Bressman et al., 2000; L. J. Ozelius et al., 1997). Eine Studie von Lange et al. mit 694 TOR1A-Mutationsträgern gibt mit 68,1% der untersuchten Patienten einen Symptombeginn zumeist im Kindesalter, mit einem medianen Erkrankungsalter von 9 Jahren an. Ein Beginn im Jugendalter wurde bei 11,7% dieser Patienten festgestellt, bei Patienten mit einem Lebensalter von über 30 Jahren wurde die Erstmanifestation auf lediglich 5,2% beziffert (Lange et al., 2021). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass Patienten in jüngerem Alter eher zu einer Erstmanifestation in den unteren Extremitäten mit einer schnelleren Ausbreitung und Tendenz zur Generalisierung neigen. Dahingegen trat bei Patienten mit einem späteren Erkrankungsbeginn, der sich vornehmlich in den oberen Extremitäten manifestierte, eine Ausbreitung oder Generalisierung der Symptome wenn überhaupt erst mehrere Jahre später auf (Greene, Kang, & Fahn, 1995). Als Therapieoptionen für DYT-TOR1A Patienten gelten die Injektion von Botulinumtoxin in beteiligte Muskelgruppen sowie die tiefe Hirnstimulation und die Gabe von Anticholinergika. Erstere Therapieoption ist bei einer generalisierten Ausbreitung der Erkrankung meist nur unzureichend. Dahingegen kann die tiefe Hirnstimulation eine signifikante Verbesserung der Symptome bewirken, während bei einer Therapie mit anticholinergischer Medikation zur Reduktion der dystonen Symptome unerwünschte

Nebenwirkungen wie Mundtrockenheit oder Gedächtnisprobleme beobachtet wurden (Kim & Jeon, 2021; Rodrigues et al., 2021).

1.2.1 TorsinA

TorsinA ist ein Protein, bestehend aus einer Sequenz von 332 Aminosäuren. Es gehört zu der Superfamilie der AAA+ Adenosintriophosphatasen („ATPases associated with a variety of cellular activities“), welche vielfältigen Aufgaben im Körper nachkommen. Dazu gehören intrazelluläre Vorgänge wie Vesikelfusion, Zytoskelettdynamik, Proteinfaltung („Chaperon“-Funktion) und -abbau sowie die Biogenese von Zellorganellen (Granata & Warner, 2010). In immunhistochemischen Untersuchungen zum Vorkommen von TorsinA im Zentralnervensystem (ZNS) konnte das Protein in allen Bereichen des Gehirns in neuronalen Zellkörpern und im Neuropil nachgewiesen werden. Unter anderem wurde in den Basalganglien, dort im Striatum sowie im Globus pallidus eine schwache bis moderate Immunreaktion auf eine TorsinA-Antikörperfärbung beobachtet (Konakova, Huynh, Yong, & Pulst, 2001). In besonderem Ausmaß konnte TorsinA zudem in den dopaminergen Neuronen der Substantia nigra pars compacta (SNc) sowie im Cerebellum und im Hippocampus in human- und veterinärpathologischen Studien nachgewiesen werden (Augood et al., 1998; Shashidharan, Kramer, Walker, Olanow, & Brin, 2000). Auf zellulärer Ebene steht das Protein in Interaktion mit integralen Membranproteinen. Primär ist es im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert, jedoch vermuten Callan et al. eine dynamische Wechselwirkung mit der ER-Membran, wie es von anderen AAA+ ATPasen in deren Aufgabe, Konformationsänderungen membranständiger Substrate zu katalysieren, bekannt ist (Callan, Bunning, Jones, High, & Swanton, 2007). In Anbetracht der Tatsache, dass bei der DYT-TOR1A Dystonie ein dysfunktionales TorsinA vorhanden ist und Patienten nicht auf eine L-Dopa-Therapie ansprechen, wird vermutet, dass die Krankheit durch einen Defekt vielmehr in der Dopamin-Ausschüttung als in dessen Synthese hervorgerufen wird (L. J. Ozelius et al., 1997). Somit kommt dem TorsinA möglicherweise eine entscheidende Rolle im Transport oder der Fusion von Vesikeln mit Membranen und damit auch der Dopamin-Ausschüttung zu (Neuwald, Aravind, Spouge, & Koonin, 1999). Goodchild et al. konnten TorsinA auch im Lumen der Kernhülle nachweisen, wo es eine Bindung mit dem Protein LAP1 („lamina-associated polypeptide 1“), eingeht. Dieser Effekt wurde überdies verstärkt in mutiertem TorsinA mit der beschriebenen Glutaminsäuredeletion beobachtet. In derselben Studie wurde ein weiteres Transmembranprotein als Bindungspartner zu TorsinA dargelegt, „luminal domain like LAP1“ (LULL1), welches wiederum im ER lokalisiert ist. Es wird vermutet, dass sowohl

LAP1 als auch LULL1 aufgrund ihrer Ähnlichkeit in strukturellen Eigenschaften und Größe selbst als Substrate der Chaperon-Funktion von TorsinA unterliegen und beide an ihrem jeweiligen Wirkort (Kernhülle beziehungsweise ER) ähnliche Aufgaben übernehmen. Änderungen ihrer Aktivität könnten auch zum Pathomechanismus der DYT-TOR1A Dystonie beitragen (Goodchild & Dauer, 2005). Darüber hinaus wird TorsinA in Verbindung mit Snapin („SNARE-associated Protein“) gebracht, ein Protein, das über seine Wechselwirkungen mit dem SNARE-Komplex für die Reifung synaptischer Vesikel verantwortlich ist und ausschließlich auf Membranen synaptischer Vesikel exprimiert wird (Ilardi, Mochida, & Sheng, 1999). Auch dabei wurde beobachtet, dass sich ein Funktionsverlust durch mutiertes TorsinA negativ auf die regulierte Exozytose auswirkt (Granata, Watson, Collinson, Schiavo, & Warner, 2008). Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass TorsinA-Bindungspartner vorwiegend integrale Bestandteile von Membranen zellulärer Kompartimente (LAP1 in der Kernhülle; LULL1 im ER) beziehungsweise synaptischer Vesikel (Snapin) sind, die grundlegenden Mechanismen des TorsinA auf biochemischer Ebene jedoch weiterhin zu untersuchen bleiben (Callan et al., 2007). Den Effekt der Δ GAG-Mutation auf das TorsinA Protein zeigten Goodchild et al. überdies hinaus anhand von fünf transgenen Mauslinien: Während heterozygote $Tor1a^{+/-}$ und $Tor1a^{+/\Delta GAG}$ Tiere (je ein vollständig funktionsfähiges Allel plus ein Knockout- beziehungsweise Δ GAG-Knockin-Allel) keine phänotypischen Unterschiede zur Kontrollgruppe zeigten, starben homozygote $Tor1a^{-/-}$ und Δ GAG Knock-in- ($Tor1a^{\Delta GAG/\Delta GAG}$) Tiere sowie die heterozygote $Tor1a^{\Delta GAG/-}$ -Linie innerhalb von 48 Stunden nach der Geburt (Goodchild, Kim, & Dauer, 2005). Dies unterstützt die Hypothese, dass es sich bei der Δ GAG-Mutation um eine Funktionsverlustmutation handelt. Trotz der im letzten Jahrzehnt erreichten Fortschritte im Verständnis der molekularen Mechanismen bleibt es weiterhin eine Aufgabe, die pathophysiologischen Vorgänge von der Entstehung der Mutation und dem damit verbundenen dysfunktionalen TorsinA bis zum Auftreten dystoner Symptome zu verstehen. Dabei sind auch dem TorsinA vorgeschaltete, bislang ungeklärte Regulationsmechanismen und deren Einfluss auf (patho-)physiologische Parameter von wichtiger Bedeutung (Gonzalez-Alegre, 2019).

1.3 Pathophysiologische Veränderungen des motorischen Netzwerks bei der DYT-TOR1A Dystonie

1.3.1 Neuroanatomische Grundlagen des motorischen Nervensystems

Bewegungen des Körpers, seien sie willkürlicher oder unwillkürlicher Natur, kommen durch die räumliche und zeitliche Koordination von Muskelkontraktionen und -relaxationen zustande (Kato, Vogt, & Kanosue, 2019). Dieses komplexe Zusammenspiel erfordert eine ausführliche Planung, Feinabstimmung, Kontrolle und gegebenenfalls Korrektur, die durch Strukturen des ZNS erreicht werden. Im Allgemeinen sind motorische Areale einer Hemisphäre für die Innervation der kontralateralen Muskulatur zuständig (Emos & Agarwal, 2021). Willkürliche motorische Aktionen werden in der Großhirnrinde (Motorkortex) initiiert. Daraufhin folgt eine Optimierung der Signale durch mehrere kortikale und subkortikale Bereiche, die das Kleinhirn und die Basalganglien einschließen. Nach dem anschließenden Durchlaufen des Hirnstamms und des Rückenmarks erreicht ein auf diesem Wege entstandenes Signal schlussendlich motorische Einheiten, an denen Muskelkontraktionen und damit Bewegungsabläufe stattfinden (Groenewegen, 2003). Aufgrund dessen ist es nicht verwunderlich, dass die Ursachen einiger Bewegungsstörungen auf eine angeborene oder erworbene Dysfunktion innerhalb dieser zentralnervösen Regulation zurückzuführen sind. Zu diesen gehören einerseits hypokinetische Bewegungsstörungen wie Morbus Parkinson als auch andererseits solche hyperkinetischer Art wie Chorea Huntington, Tourette-Syndrom oder Dystonien. All diese Erkrankungen haben gemeinsam, dass insbesondere das gut untersuchte Netzwerk der Basalganglien eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielt (Gittis & Kreitzer, 2012).

1.3.2 Aufbau und Funktion der Basalganglien

Die Basalganglien umfassen eine Gruppe von subkortikalen Kerngebieten, die anatomisch eine Verbindung zwischen Telencephalon, Diencephalon und Mesencephalon darstellen (Albin, Young, & Penney, 1989). Sie bestehen im engeren Sinne aus dem Globus pallidus (GP) und dem Striatum, welches sich wiederum aus Nucleus caudatus und Putamen zusammensetzt. Als funktionell mit den Basalganglien assoziierte Kerne gelten der Nucleus subthalamicus (STN) im Diencephalon, die Substantia nigra (SN) im Mesencephalon und der Nucleus pedunculo-pontinus im Pons (Lanciego, Luquin, & Obeso, 2012). Grob gliedern lässt sich das weitmaschige Netzwerk auch anhand der Aufgabenbereiche. Vereinfacht dargestellt existieren Nuclei, die Eingangssignale verarbeiten, solche, die Ausgangssignale emittieren und intrinsische,

die für die interne Umschaltung verantwortlich sind (Fazl & Fleisher, 2018). Zu Ersteren zählt allen voran das Striatum, welches seine Afferenzen aus Kortex, Thalamus und SN bezieht, während Globus pallidus internus (GPi) und die Substantia nigra pars reticulata (SNr) für ausgehende Signale an ventrale Nuclei des Thalamus verantwortlich sind. Über den Thalamus werden striatale Efferenzen dann wiederum mit dem Kortex rückgekoppelt. Den Bereichen zwischen Ein- und Ausgangsinformation zwischengeschaltet sind der Globus pallidus externus (GPe), der STN und die SNc (Abbildung 1). Als Hauptaufgabe dieses Regelkreises gilt die Steuerung der Willkürmotorik (Lanciego et al., 2012). Daneben dienen die Basalganglien der Integration und Koordination bislang erfahrener Situationen und Aktionen sowie deren Verarbeitung (motorisches Lernen) (Graybiel, Aosaki, Flaherty, & Kimura, 1994; Packard & Knowlton, 2002). Auch in der Verhaltensentwicklung und der Entstehung von Emotionen sind sie von wichtiger Bedeutung (Pierce & Péron, 2020; Yin & Knowlton, 2006).

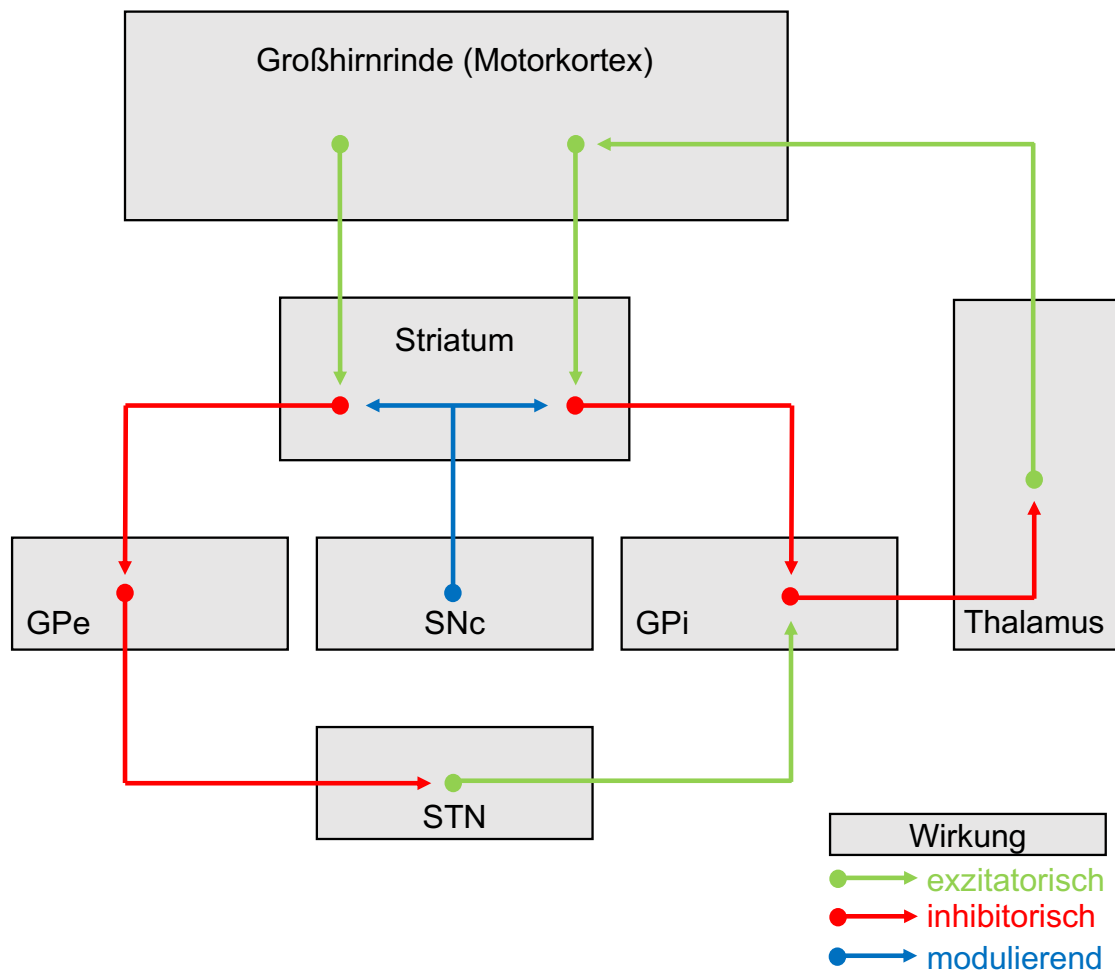


Abbildung 1

Regelkreis zur Steuerung der Willkürmotorik im ZNS

Abbildung 1 zeigt exzitatorische, inhibitorische und modulierende Wirkmechanismen für die Entstehung willkürlicher Bewegungen in den Basalganglien.

Darstellung modifiziert nach (Lanciego et al., 2012), © Cold Spring Harbor Laboratory Press
 GPe = Globus pallidus externus; GPi = Globus pallidus internus; SNc = Substantia nigra, pars compacta; STN = Nucleus subthalamicus

1.3.3 Das Striatum

Das Striatum fungiert im Regelkreis der Steuerung der Motorik im ZNS wie ein Filter, indem es einerseits stark exzitatorische, glutamaterge Signale aus Kortex und Thalamus empfängt und diese im Sinne einer Signalabschwächung in inhibitorische, γ -Aminobuttersäure (GABA)erge Signale umwandelt. Andererseits können hier auch Bewegungen durch Bindung von Dopamin an striatale Neurone im Sinne einer Signalverstärkung initiiert werden, welches aus axonalen Endigungen dopaminergener Neurone der SNc stammt (vgl. Kapitel 1.3.4 und Abbildung 1). Mit etwa 90% aller striataler Neurone stellen dabei die mittelgroßen Projektionsneurone des Striatums (= „medium spiny neurons“ = MSN) die Hauptumschaltstellen auf efferente

Basalganglienkerne dar (Fazl & Fleisher, 2018). Diese lassen sich je nach Projektion und Rezeptorbesetzung in zwei Klassen einteilen: Die auf direktem Weg zu SNr und GPi projizierenden MSN exprimieren vornehmlich D1-Dopaminrezeptoren (D1DR). Durch sie werden gerichtete Bewegungen angeregt. Die auf indirektem Weg an den GPe projizierenden MSN besitzen D2-Dopamin- (D2DR) und Adenosin 2-Rezeptoren (A2AR) (Abbildung 2). Ihre Aufgabe ist die Unterdrückung des Bewegungsantriebs. Darüber hinaus existieren im Striatum Interneurone, die durch ihre modulierende Funktion Einfluss auf Ausgangssignale der MSN nehmen. Es gibt vier Arten GABAerger Interneurone, unterscheiden lassen diese sich anhand verschiedener Proteine, die bei den jeweiligen Typen nachgewiesen werden können. So existieren Parvalbumin- (PV), Calreticulin- (CR), Stickoxid-Synthase- (nNOS) und Tyrosinhydroxylase positiv (TH⁺) exprimierende Interneurone. Als weitere relevante Interneurone gelten Dopaminsensitive, cholinerge Riesenneurone, die durch ihre rhythmische Acetylcholin-Ausschüttung Einfluss auf den striatalen Dopamin-Spiegel nehmen (Capetian, Pauly, Azmitia, & Klein, 2014; Goodchild, Grundmann, & Pisani, 2013; Surmeier & Graybiel, 2012; Tritsch & Sabatini, 2012).

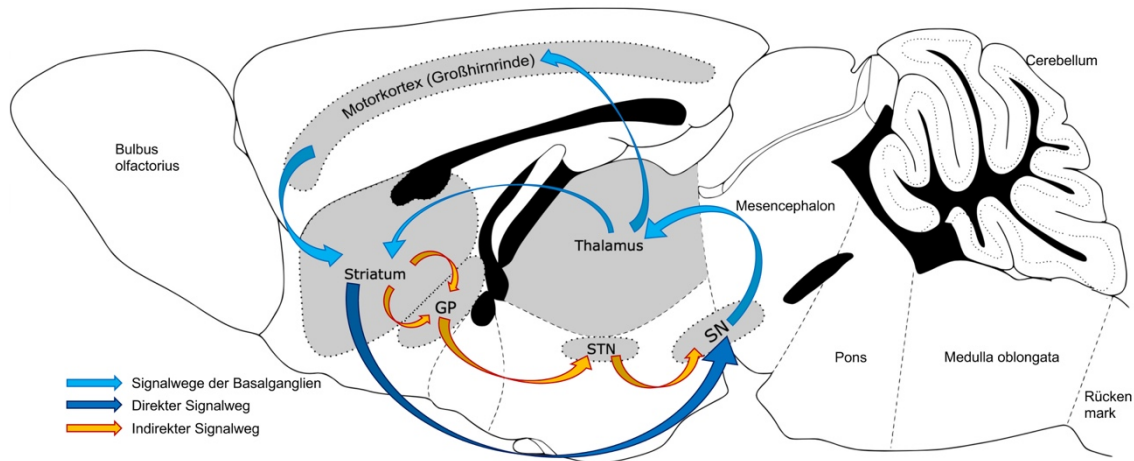


Abbildung 2

Direkte und indirekte Signalwege der Basalganglien

Signalwege der Basalganglien verlaufen ausgehend vom Striatum zur Substantia nigra auf zwei Wegen: Zum einen auf direktem Weg (dunkelblau), zum anderen indirekt über Globus pallidus und Nucleus subthalamicus (gelb), hier am Beispiel eines Mausehirns.

Darstellung modifiziert nach (Paxinos & Franklin, 2001)

GP = Globus pallidus; SN = Substantia nigra; STN = Nucleus subthalamicus

1.3.4 Die Substantia nigra

Der Großteil der dopaminergen Innervation des Striatums geht von der SNc und der Area tegmentalis ventralis aus. Die SNc wird anhand ihrer anatomischen Gegebenheiten in eine dorsale, eine ventrale und eine Hauptgruppe eingeteilt. Während die dorsalen dopaminergen Neurone in Verbindung mit Kleinhirn und der Area tegmentalis ventralis stehen, erstrecken sich die Dendriten des ventralen Anteils in die SNr. Neben der Exprimierung einer hohen Dichte an D2DR wurde ein hoher Anteil an messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) des Dopamintransporters (DAT) in den ventralen dopaminergen Neuronen nachgewiesen (Haber, 2014; Haber, Ryoo, Cox, & Lu, 1995). Darüber hinaus besteht eine enge Verflechtung oben genannter Neurone mit dem Striatum. Diese konnten Matsuda et al. (2009) anhand eines Rattenmodells eindrucksvoll nachweisen: Ein einzelnes dopaminerges Neuron projiziert zu circa 75 000 striatalen MSN und ein MSN wird von circa 94-195 dopaminergen Neuronen innerviert (Matsuda et al., 2009). Bewegungsstörungen lassen sich dahingehend im Allgemeinen insbesondere auf pathophysiologische Vorgänge innerhalb dieses nigrostriatalen Systems ziehen: Während bei Morbus Parkinson eine Bradykinesie insbesondere durch den Untergang der dopaminergen Neurone in der SN hervorgerufen wird, entwickelt sich bei Chorea Huntington eine Degeneration und Dysfunktion der indirekt projizierenden striatalen MSN (Cepeda et al., 2013; Lavoie & Parent, 1991; Tong et al., 2014). Eine solch klare Evidenz für eine neurochemische, anatomisch-morphologische, qualitative oder quantitative Affektion in der SN existiert bislang für die idiopathischen oder genetischen Formen der Dystonie nicht (Goodchild et al., 2013).

1.3.5 Dopamin

Dopamin ist ein biogenes Amin, das der Gruppe der Katecholamine angehört. Die Bildung des Neurotransmitters findet im Zytoplasma dopaminerger Neurone im ZNS statt. Auch im Nebennierenmark und in postganglionären sympathischen Neuronen findet diese Synthese statt. Dort wird es zudem zu den weiteren Katecholaminen Adrenalin oder Noradrenalin verstoffwechselt. Das Ausgangssubstrat für die Dopaminsynthese ist die Aminosäure Tyrosin (Deutzmann, 2021). Bei dieser wird der Phenylring durch die Monooxygenase Tyrosinhydroxylase (TH) hydroxyliert. Als Zwischenprodukt entsteht dadurch 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA). Im anschließenden Schritt katalysiert ein weiteres Enzym, die Dopadecarboxylase, mithilfe des Cofaktors Pyridoxalphosphat schließlich die Reaktion zu Dopamin (Abbildung 3). Seine Wirkung entfaltet der Neurotransmitter über die in den Kapiteln des nigrostriatalen System bereits genannten,

bislang fünf bekannten Dopaminrezeptoren (D1-5DR). Über diese kann Dopamin sowohl exzitatorische (D1DR und D5DR) als auch inhibitorische Signalkaskaden (D2DR bis D4DR) in Gang setzen (Rassow, 2016). Im Zusammenhang mit der Entstehung und Therapie der Dystonie spielt auch das Dopamin eine bislang unvollständig nachvollziehbare Rolle: Hierzu ist die „Dopamin-responsive Dystonie“ (DRD) zu erwähnen, bei der Patienten ausgezeichnet und nachhaltig auf die Gabe des Dopamin-Vorläufermoleküls Levodopa (L-DOPA) ansprechen (Wijemanne & Jankovic, 2015). Zudem kann Dystonie als Begleiterscheinung von Morbus Parkinson auftreten, bei dem das dopaminerge System durch Neurodegenerationen betroffen ist (Tolosa & Compta, 2006; Wickremaratchi et al., 2011). Bisher gibt es jedoch keine klare Evidenz, dass Dopaminrezeptoragonisten ein effektives Therapeutikum von Dystonien darstellen können. Wurden sie aufgrund unerwünschter Nebenwirkungen Jahrzehnte zuvor als untauglich zur Therapie von Dystonien erklärt, zeigten Fan et al. in einer Studie von 2018 eine effektive Behandlung mit dem unselektiven D1- und D2-Rezeptoragonisten Apomorphin in zwei Drittel der untersuchten Patienten. Es lässt sich also im Hinblick auf mögliche Therapieformen der Dystonie feststellen, dass ein genaueres Verständnis der einzelnen Formen und deren Zusammenhang mit dopaminergen Wegen im ZNS von herausragender Bedeutung ist (Fan, Donsante, Jinnah, & Hess, 2018). Auch im expliziten Zusammenhang mit der DYT-TOR1A Dystonie belegen Studien eine Beteiligung des dopaminergen Stoffwechsels. Diese konnte sowohl in humanem post mortem Gewebe (Augood et al., 2002; Rostasy et al., 2003) als auch anhand einiger Nagermodele gezeigt werden (Balcioglu et al., 2007; Ip et al., 2016; Knorr et al., 2021; Song, Fan, Exeter, Hess, & Jinnah, 2012).

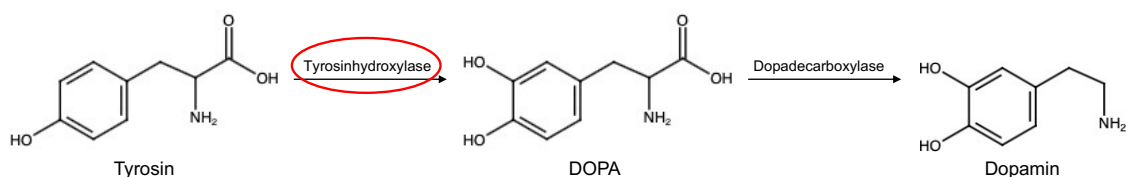


Abbildung 3

Dopaminsynthese

Die Abbildung stellt die Strukturformeln der Synthese des Dopamins, ausgehend von der Aminosäure Tyrosin dar. Die weiteren Schritte der Katecholaminsynthese zu Noradrenalin und Adrenalin, wie sie im Nebennierenmark und in postganglionären, sympathischen Neuronen stattfindet, sind der Übersichtlichkeit halber nicht abgebildet. Die Tyrosinhydroxylase wird für ihre Bedeutung für die angewandten Färbemethoden hervorgehoben. Abbildung erstellt mithilfe der chemischen Struktursuche und -Zeichentool von fishersci.de.
DOPA = 3,4-Dihydroxyphenylalanin

1.4 Dystonie und Umweltfaktoren - die Two-hit Hypothese

Wie bereits erwähnt, liegt bei der DYT-TOR1A Dystonie trotz eines autosomal-dominanten Erbganges eine reduzierte Penetranz von 30-40% vor, auch bei anderen vererbten Dystonieformen wie der DYT-THAP1 Dystonie ist die Penetranz reduziert (Bressman et al., 1989; Kramer et al., 1994; Pauls & Korczyn, 1990). Dies lässt vermuten, dass die Genmutation alleinig nicht ausreichend ist, um zur Entwicklung dystoner Symptome zu führen. Im Rahmen einer sogenannten Two-hit Hypothese wird angenommen, dass erst das Aufeinandertreffen einer Genmutation (erster Treffer) und eines bestimmten Umweltfaktors (zweiter Treffer) zu einer Entwicklung einer Dystonie führt (Rauschenberger et al., 2021). Dabei werden verschiedene Umweltfaktoren diskutiert, zum Beispiel zentrale oder periphere Traumata, Infektionen und Überbeanspruchung im Sinne repetitiver, stereotyper Bewegungen. Während Übereinstimmung darüber herrscht, dass repetitive, stereotype Bewegungen zu einer aufgabenspezifischen, fokalen Dystonie führen können (Musikerdystonie, Schreibkrampf), gibt es auch Hinweise dafür, dass ein peripheres Trauma ein Auslöser für die Bewegungsstörung sein kann (H. Kumar & Jog, 2011). So traten beispielsweise in einer Studie von Jankovic et al. bei 28 Patienten, die ein Trauma eines peripheren Körperteils erlitten hatten, dystone Bewegungsmuster auf (Jankovic & Van der Linden, 1988). Diese konnten zeitlich, innerhalb eines Jahres, und in Bezug auf die Verteilung betroffener Körperteile eindeutig mit der Verletzung in Verbindung gebracht werden. Auch Sheehy et al. berichteten 1980 von 414 Patienten mit Torticollis spasmodicus als fokale Manifestation der Dystonie, denen ein zervikales Trauma oder Schmerzen in 9% der Fälle vorausgegangen waren (Sheehy & Marsden, 1980). Spezifisch für die DYT-TOR1A Dystonie ist der Einfluss von Umweltfaktoren bisher nicht eindeutig definiert und nur wenige patientenbezogene Studien konnten bisher klaren Anhalt für einen extragenetischen Beitrag geben. So gibt es Evidenz für einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten dystoner Symptome bei DYT-TOR1A Patienten mit Virusinfektionen in der Kindheit sowie vereinzelte Fallstudien, bei denen eine Knöchelverletzung oder ein Tierbiss als Auslöser gewertet wurden (Edwards, Wood, & Bhatia, 2003; Gioltzoglou, Milonas, & Lees, 2006; Rauschenberger et al., 2021; Saunders-Pullman, Shriberg, Shanker, & Bressman, 2004). Martino et al. führten darüber hinaus eine retrospektive, auf einem Fragebogen basierte Studie durch, die extragenetische Faktoren in Bezug zur Penetranz bei DYT-TOR1A Patienten untersuchte (Martino et al., 2013). Hierbei wurde ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der dystonen Symptome mit perinatalen Komplikationen vermutet. Den Autoren zufolge bedingen bei einem solchen

Studiendesign jedoch anamnestische Erinnerungsverzerrungen eine hohe Fehleranfälligkeit. Darüber hinaus bedarf es aufgrund der relativen Seltenheit der Erkrankung weiterhin Studien mit höheren Fallzahlen. Zur Abhilfe dieser Problematik sowie zur weiteren Ergreifung der Two-hit Hypothese können DYT-TOR1A Tiermodelle ein geeignetes Instrument darstellen.

1.5 DYT-TOR1A Tiermodelle

Tiermodelle spielen in der neurologischen Forschung eine wichtige Rolle. Erste Ansätze tierexperimenteller Arbeiten gehen auf das antike Griechenland zurück, im Laufe des 18. und 19. Jahrhunderts gewannen sie zunehmend an Bedeutung. Anhand von Tiermodellen können aufgestellte Hypothesen überprüft werden, da es durch post mortem Untersuchungen von humanem Gewebe größtenteils nicht möglich ist, komplexe biochemische, biomedizinische oder (patho-)physiologische Vorgänge auf zellulärer Ebene nachzuvollziehen (Andersen & Winter, 2019). Da Tiermodelle der Dystonie nur in den seltensten Fällen alle beim Menschen relevanten Aspekte der Erkrankung einschließen, werden sie in ätiologische und symptomatische Modelle unterteilt. Ätiologische Tiermodelle haben den Nachteil, meist nicht die klinische Symptomatik aufzuweisen, sind aber nützlich, um über einen bekannten Auslöser wie die Genetik oder ein auslösendes Ereignis Rückschlüsse auf pathophysiologische Vorgänge der Dystonie zu ziehen. Dahingegen stimmen bei den symptomatischen Modellen die Ursachen der Erkrankung meist nicht mit denen beim Menschen überein. Allerdings können bei diesen zugrundeliegende Vorgänge über das klinische Bild nachvollzogen werden (B. K. Wilson & Hess, 2013). Bei den ätiologischen Nagermodellen wird sich zumeist die bekannte Mutation der DYT-TOR1A Dystonie zunutze gemacht (H. Jinnah et al., 2008). Folgende Problematik stellt sich dabei jedoch dar: Trotz der zur humanen DYT-TOR1A Mutation analogen genetischen Variation entwickeln die meisten Modelle entweder keinen dystonen Phänotypen oder etwa einen solchen, der nicht eindeutig die humane Symptomatik widerspiegelt (Dang et al., 2005; Goodchild et al., 2005; Grundmann et al., 2012; Grundmann et al., 2007; Sharma et al., 2005; Shashidharan et al., 2005). Die für die Dystonie existierenden, symptomatischen Nagermodelle entstanden spontan in Brutkolonien, durch pharmakologische Interventionen oder gezielt durch genetische Veränderungen (H. Jinnah et al., 2008). Das erste symptomatische Nagermodell für eine vererbte, paroxysmale, generalisierte Dystonie war dabei das *dt^{sz}* Hamstermodell, bei dem es zu verdrehenden, krampfartigen Anfällen („sz“ = „seizure“ = „Krampfanfall“) der Gliedmaßen und des Rumpfes, entweder

spontan oder durch Stress getriggert, kommt (Richter & Löscher, 1998). Nachteilig ist bei dem *dt^{SZ}* Hamstermodell, dass die zugrundeliegende Mutation bisher nicht bekannt ist.

Mit dem Bestreben, ätiologische und symptomatische Nagemodelle zu kombinieren, führte die Arbeitsgruppe um Prof. Chi Wang Ip bei mehreren genetisch veränderten Nagern für die DYT-TOR1A Dystonie (*Tor1a^{+/-}* Knockout-Mäuse, Δ ETorA-Ratten, *h* Δ GAG3-Mäuse), welche im naiven Zustand asymptomatisch sind, im Sinne der Two-hit Hypothese eine standardisierte Nervenquetschläsion durch (Ip et al., 2016; Knorr et al., 2021; Rauschenberger et al., 2019). Dies führte über einen Beobachtungszeitraum von jeweils 12 Wochen zu einem Dystonie-ähnlichen Phänotypen in den genetisch veränderten Tieren. In naivem Zustand zeigten diese Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe keine phänotypischen Unterschiede. Erst durch die Nervenquetschläsion, die ein peripheres Trauma imitiert, zeigten sich bei den genetisch veränderten Tieren im Schwanzsuspensionstest („Tail Suspension Test“, TST) Dystonie-ähnliche Symptome im Sinne repetitiver Verkrampfungen der Hinterpfoten und Adduktion der Hinterbeine. Dieser Phänotyp weist eine hohe Übereinstimmung mit der aktuellen Konsensdefinition nach Albanese auf (Albanese et al., 2013).

Neben den oben genannten Nagern existiert das in dieser Arbeit verwendete DYT1 Knock-in (DYT1KI) Mausmodell. Dieses Mausmodell ist translational besonders wertvoll, da dessen In-frame Δ E Deletion vergleichbar mit der beim Menschen stattfindenden 3-Basenpaaren-Deletion im TOR1A Gen ist (Goodchild et al., 2005). Song et al. konnten zwar eine signifikante Leistungsreduktion der DYT1KI Mäuse verglichen mit der Wildtyp- (wt) Kontrollgruppe im „Beam-walking Test“, welcher die Feinmotorik und Koordination der Versuchstiere testet und somit als sensitiv für Änderungen des dopaminergen Systems gilt, feststellen (Carter et al., 1999; Dluzen et al., 2001; Dluzen, Liu, Chen, & DiCarlo, 1995; Song et al., 2012). Dennoch konnten keine offensichtlichen Zeichen einer Dystonie, wie die oben beschriebenen Verkrampfungen oder eine Beeinträchtigung im Erlernen motorischer Fähigkeiten im „Rotarod“ Verhaltenstest aufgezeigt werden. Auffällig waren jedoch auf neurochemischer Ebene nigrostriatale, dopaminerge Veränderungen. So konnte gezeigt werden, dass extrazelluläres Dopamin sowohl im Ausgangslevel als auch nach Amphetaminstimulation im Striatum verringert war und dopaminerge Neurone in der SN in ihrer Anzahl um 6,9% reduziert und die Somata gleichzeitig um 15,8% vergrößert im Vergleich zu wt-Kontrolltieren in Erscheinung traten (Song et al., 2012). Darüber hinaus fanden Song et al. neben mikrostrukturellen Veränderungen des Striatums von Cholin-Acetyltransferase-positiv

(ChAT⁺), PV⁺ Zellen (jeweils Volumenzunahme) sowie von nNOS⁺ Interneuronen (Volumenabnahme) in den mutanten Mäusen auch eine Umverteilung an ChAT⁺-Neuronen in dorsolateralere Regionen des Striatums. Morphologisch wiesen die Dendriten der striatalen MSN der DYT1KI Tiere eine geringere Dichte, dünnere Durchmesser und eine verringerte Anzahl an Dornfortsätzen im Vergleich zu wt-Tieren auf (Song et al., 2013). Auch gibt es Evidenz, dass DYT1KI Mäuse ein vergrößertes zerebelläres Volumen im Vergleich zur Kontrollgruppe besitzen (Song, Bernhard, Hess, & Jinnah, 2014). Purkinje-Zellen stellten sich zudem im Kleinhirn vermehrt heterotop, mit geringerer Anzahl, dünneren und mit weniger Dornfortsätzen besetzten Dendriten, dar. Inwiefern ein peripheres Trauma, wie es bei oben genannten Tiermodellen angewandt wurde, einen Einfluss auf den Phänotypen und histomorphologische Parameter des DYT1KI Mausmodells hat, soll Gegenstand der gegenwärtigen Untersuchungen sein.

1.6 Die Rolle des Immunsystems bei einer peripheren Verletzung

1.6.1 Das Immunsystem und das periphere Nervensystem (PNS)

Bei einer Verletzung von Nervengewebe wird im Allgemeinen nach dem Ausmaß der Schädigung in der Klassifizierung nach Seddon in Neurapraxie, Axonotmesis und Neurotmesis unterschieden (Abbildung 4) (Seddon, 1943). Eine Neurapraxie beschreibt einen vorübergehenden Verlust der Impulsüberleitung ohne Degeneration mit vollständiger Genesung nach bis zu zwölf Wochen. Dahingegen werden bei einer Axonotmesis Nervenfasern in einem solchen Ausmaß geschädigt, dass deren Kontinuität unterbrochen wird. Jedoch sind durch ihre intakt gebliebenen epi- und perineuralen Hüllen ideale Leitstrukturen für eine geführte Aussprossung der regenerativen Nervenfasern mit einer Geschwindigkeit von circa 1 mm pro Tag vorhanden. Die ungünstigste Prognose zu einer vollständigen Regeneration tritt bei kompletter Kontinuitätsunterbrechung eines Nervs inklusive aller essenzieller Begleitstrukturen (Neurotmesis) auf (Radić, Radić, & Duraković, 2018; Seddon, 1943). Im Gegensatz zum ZNS ist im PNS eine Regeneration von Nervengewebe nach Verletzung möglich, jedoch oft nicht in vollständiger Weise und teilweise verbunden mit neuropathischem Schmerz. Ein wichtiger Faktor dabei ist unter anderem das Zusammenspiel zwischen Nerven- und Immunsystem (Benowitz & Popovich, 2011). Durch eine periphere Nervenverletzung wird eine weitläufige Kaskade in Gang gesetzt, die zum Ziel hat, wachstumshemmende Bestandteile wie Überreste von Myelin, das eine

Ummantelung und Isolierung der Nerven darstellt, aus der betroffenen Umgebung zu entfernen und optimale Bedingungen für das Nachwachsen axonaler Bestandteile zu schaffen. Bezeichnet wird dieser Prozess, der typischerweise vom distalen Ende der Läsion ausgeht, als Waller'sche Degeneration (Gaudet, Popovich, & Ramer, 2011). Zunächst kommt es innerhalb von Stunden bis Tagen zu einem Einwandern angeborener Immunzellen wie neutrophilen Granulozyten, Monozyten und dendritischen Zellen. Diese sind in der Lage, über proinflammatorische Zytokine weitere Zellen der erworbenen Immunabwehr, allen voran B- und T-Lymphozyten, zu rekrutieren. Die noch unreifen monozytären Zellen differenzieren sich nach Eintritt ins Gewebe zu Makrophagen, um weitere Aufgaben (Chemotaxis, Revaskularisierung, Umbau des Gewebes) einzuleiten. Die Rolle der angelockten Lymphozyten in der nervalen Regeneration ist bislang nicht vollständig geklärt (Benowitz & Popovich, 2011). Serpe et al. konnten jedoch anhand von transgenen, immuninkompetenten Mäusen mit einem Defizit an funktionellen B- und T-Lymphozyten eine um drei bis fünf Tage verzögerte Regeneration der Gesichtsmotorik (Lidschlussreflex) nach einer Quetschläsion des Nervus (N.) facialis im Vergleich zu immunkompetenten wt-Mäusen feststellen (Serpe, Tetzlaff, Coers, Sanders, & Jones, 2002). Auch nach einer Depletion von Makrophagen konnte eine stark beeinträchtigte axonale Regeneration und damit einhergehende Bewegungsbeeinträchtigung nach einer Quetschung des N. ischiadicus bei einem Mausmodell festgestellt werden (Barrette et al., 2008). Die Autoren konnten dabei aufzeigen, dass der ausbleibende Umbau des Milieus durch die Makrophagen als Voraussetzung für eine optimale Regeneration entscheidend für die kompromittierte Wiederherstellung der Nerven war. Die Funktion der Makrophagen wurde dabei mit der Entfernung von Überresten von Myelin, der Produktion von Neurotrophinen, die beim Wachstum von Axonen in ZNS und PNS beteiligt sind und der Einsprossung und Aufrechterhaltung von Blutgefäßen beschrieben. Ferner werden Makrophagen nach dem Status ihrer Aktivierung in M1 und M2 Makrophagen unterteilt. M1 Makrophagen infiltrieren die Stelle der Läsion nur in den ersten zwei bis drei Tagen mit einer Abnahme bis Tag sieben nach der Verletzung. Mit ihrer proinflammatorischen Wirkung sind sie während dieses Zeitraums für die Aktivierung von weiteren Immunzellen verantwortlich. M2 Makrophagen konnten hingegen in erhöhter Konzentration ab Tag drei nach Nervenverletzung festgestellt werden. Ihre Aufgabe entsprach dann der Remodellierung des infiltrierten Gewebes (P. Chen, Piao, & Bonaldo, 2015; Ehmedah et al., 2019; Nadeau et al., 2011). Die durch ein peripheres Trauma ausgelöste Immunreaktion beinhaltet zusammenfassend eine komplexe Interaktion multipler Zelltypen, welche

auch noch Monate nach der Verletzung nachgewiesen werden können (Gaudet et al., 2011).

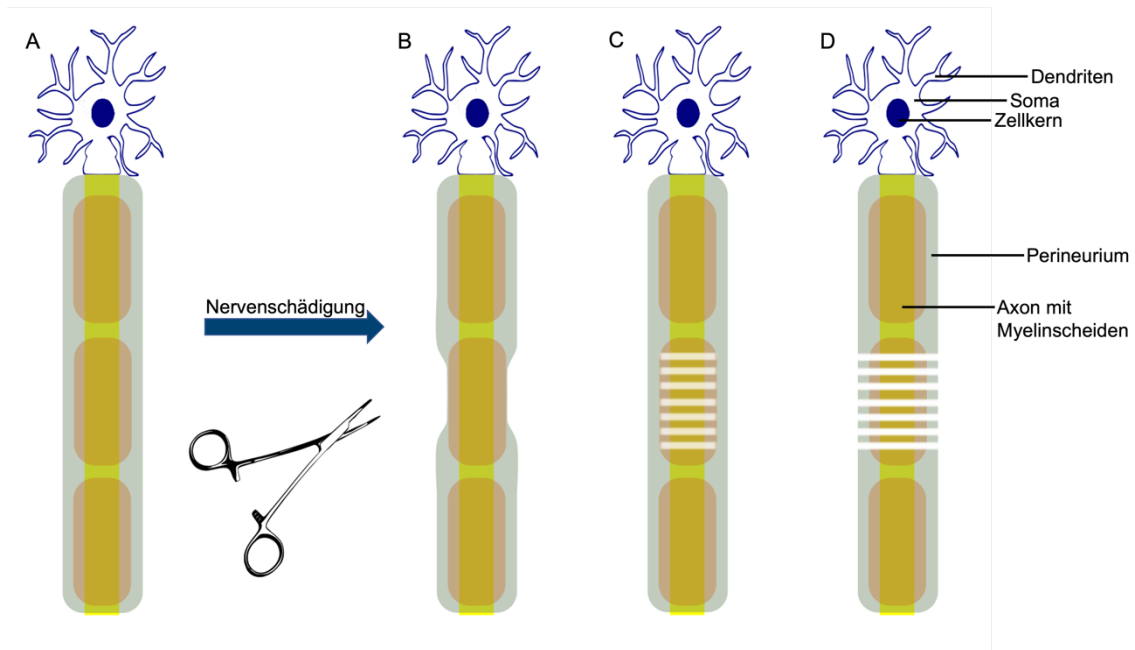


Abbildung 4 Seddon-Klassifizierung

Bei einer Nervenschädigung (hier symbolisch die iatrogene Nervenschädigung mit einer Arterienklemme) wird nach Seddon im Vergleich zum unversehrten Zustand (A) in Neurapraxie (B), Axonotmesis (C) und Neurotmesis (D) unterschieden. Eigene Darstellung, erstellt mithilfe der Software „Inkscape“.

1.6.2 Das Immunsystem und das ZNS

Auch im ZNS zeigen sich Veränderungen als sensorische Reaktion auf eine periphere Nervenverletzung. Um für den menschlichen Organismus eine protektive Wirkung zu erzielen, werden Nozizeptoren auf eine Gewebeverletzung hin sensibilisiert. Andersherum kann Schmerz aber auch eine maladaptive Funktion des Nervensystems darstellen. Die zentralnervöse Untersuchung von Nervenverletzungen ist daher eingehender Bestandteil in der Forschung neuropathischen Schmerzes (Scholz & Woolf, 2002; Tsuda, Inoue, & Salter, 2005). Hierbei zeigen die Ergebnisse zur Rolle von Lymphozyten im ZNS als Reaktion auf ein peripheres Trauma keine eindeutige Evidenz: Gattlen et al. konnten keine erhöhte Anzahl an Lymphozyten im Rückenmark feststellen, während die Ergebnisse von Costigan et al. und Hu et al. davon abweichen (Costigan et al., 2009; Gattlen et al., 2016; Hu, Bembrick, Keay, & McLachlan, 2007). Dahingegen besteht weitgehender Konsens, dass eine Änderung der Anzahl und Aktivität von Mikroglia im ipsilateralen Rückenmark als Reaktion auf ein peripheres Trauma stattfindet und somit eine zentrale Rolle in der Übermittlung von Schmerz zukommt (Beggs &

Salter, 2007; Watkins, Milligan, & Maier, 2001). Anders als Makrophagen existieren Mikroglia ausschließlich im ZNS. Im „ruhenden“ Zustand stellen sie sich als Zellen mit kleinem Soma und dünnen Fortsätzen dar. Charakteristisch werden diese Zellen jedoch auf einen Stimulus wie eine Ischämie, ein Trauma oder eine Infektion in einen aktivierten Zustand überführt, um eine adäquate Reaktion auf diesen einzuleiten. Dabei kommt es nicht nur zu einer Transformation der Morphologie, sondern auch der Genexpression und der Anzahl der Zellen. Unter anderem werden analog zur Funktion der Makrophagen im PNS, durch Mikroglia im ZNS potenziell gewebetoxische Rückstände beseitigt, die Expression von Immunmodulatoren in Gang gesetzt oder durch Sekretion von Wachstumsfaktoren eine Geweberegeneration eingeleitet (Kreutzberg, 1996; Tsuda et al., 2005). Einen weiteren Einfluss übernehmen Mikroglia in der Modifizierung der synaptischen Signalübertragung und der neuronalen Plastizität. Diese „Formung“ im ZNS ist von immenser Bedeutung bei Prozessen in der Entwicklung wie Gedächtnisbildung und Lernen, aber auch bei einer Reorganisation somatosensorischer und motorischer Bereiche des Gehirns (Wu, Dissing-Olesen, MacVicar, & Stevens, 2015). Diese tritt auf, wenn es zu einer Störung zwischen afferenten und efferenten Signalen wie bei einem peripheren Trauma kommt und hält über den Zeitraum an, in dem die Signalübertragung beeinträchtigt ist (C. Li, Liu, Pi, & Zhang, 2021).

Abschließend werden proinflammatorischen Zellen nicht nur eine Rolle bei peripheren Traumata zugeschrieben. Es konnte auch nachgewiesen werden, dass sie einen Faktor bei neurodegenerativen Prozessen im ZNS darstellen (Stephenson, Nutma, van der Valk, & Amor, 2018). Eine Beteiligung im Kontext der Dystonien wurde zu unserem Kenntnisstand bislang noch nicht untersucht.

1.7 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Induktion eines Dystonie-ähnlichen Phänotypen im DYT1KI Mausmodell, welches die Δ GAG-Mutation der DYT-TOR1A Dystonie im endogenen TOR1A-Gen beinhaltet und im naiven Zustand asymptomatisch ist (Goodchild et al., 2005). Damit soll ein symptomatisches NagermodeLL von hohem translationalen Wert für weiterführende pathophysiologische Untersuchungen etabliert werden. Die Bewegungen werden dann aufgezeichnet und, unter Verwendung der Software „DeepLabCut“, mittels neuronalem Netzwerk analysiert (Nath et al., 2019). Dies soll eine automatisierte, objektive Charakterisierung Dystonie-ähnlicher Bewegungen ermöglichen und somit vorherige, Beobachter-basierte, subjektive und zeitintensive Bewertungsschemata ersetzen. In einem weiteren Schritt soll elektrophysiologisch

ausgeschlossen werden, dass Unterschiede in der Regeneration des Nervengewebes der Versuchstiere einen möglichen Einfluss auf den Phänotypen haben. Darüber hinaus soll eine mögliche Beteiligung immunologischer Faktoren in der Genese einer Dystonie ausgeschlossen werden. Es bestehen vereinzelte Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Störungen des Immunsystems und der Entwicklung einer Dystonie (Dale, 2003; Janavs & Aminoff, 1998; Jankovic & Patten, 1987; R. Kumar, Maraganore, Ahlskog, & Rodriguez, 1997; Moore, Behan, & Behan, 1986; Rajagopalan, Humphrey, & Bucknall, 1989). Diese konnten aber nicht eindeutig bestätigt werden (Muller et al., 2005). Hierzu werden Immunzellen in beteiligten Strukturen in PNS (N. ischiadicus) und ZNS (Rückenmark und Striatum) quantifiziert. Abschließend soll der Effekt der Nervenquetschläsion auf eine Veränderung in Volumen und Anzahl dopaminergere Neurone in der SN untersucht werden, wie es zuvor bei naiven Tieren ohne Nervenquetschung und ohne die Entwicklung eines dystonen Phänotypen durch Song et al. gezeigt wurde (Song et al., 2012). Anhand dessen soll festgestellt werden, ob ein direkter Zusammenhang zwischen Anzahl und Morphologie dopaminergere Zellen in der SN einerseits und einem symptomatischen Auftreten dystoner Bewegungen andererseits existiert.

2 Material und Methoden

2.1 Tierversuchsvotum

Da in dieser Studie anhand tierexperimenteller Versuchsreihen gearbeitet wurde, wurde zuvor ein Antrag zur Berechtigung zur Durchführung von Tierversuchen mit dem Aktenzeichen AZ- 2-1008 eingereicht und genehmigt.

2.2 Versuchstiere

Zur Durchführung der Versuche wurden männliche, heterozygote Mäuse des Stammes Tor1a^{tm2Wtd} auf einem C57BL/6J Hintergrund verwendet (Goodchild et al., 2005). Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 21°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70% mit einem Tag-Nacht-Rhythmus von zwölf Stunden unter nahezu pathogen-freien Bedingungen gehalten. Es bestand stetiger Zugang zu Futter und Wasser für alle Versuchstiere.

Sämtliche Versuchsdurchführungen sowie die Tierhaltung und -pflege geschahen artgerecht nach internationalen Richtlinien und Genehmigung durch die zuständige Behörde, die Regierung von Unterfranken (Würzburg, Deutschland).

Es erfolgte eine Aufteilung in vier Kohorten: „DYT1KI naiv“, „DYT1KI mit Nervenquetschung“, „wt naiv“ und „wt mit Nervenquetschung“. Die DYT1KI-Gruppen besaßen die Δ GAG-Mutation in ihrem endogenen TOR1A Gen (Goodchild et al., 2005). Die Gruppen mit Nervenquetschung wurden einer standardisierten Nervenquetschläsion des N. ischiadicus unterzogen, während die naiven Gruppen ohne diese blieben.

2.3 Substanzen und Chemikalien

Tabelle 2 Chemikalien und Substanzen der operativen Eingriffe

<u>Chemikalie</u>	<u>Hersteller</u>
Kohlenstoffdioxid (CO ₂)	
Isofluran CP	CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland
Bepanthen® Augensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland

2 Material und Methoden

Rimadyl® 50mg/ml (Wirkstoff: Carprofen)	Zoetis, Berlin, Deutschland
Cutasept®	BODE Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Puffer Lösung / Buffer solution:	AppliChem GmbH – An ITW Company, Darmstadt, Deutschland
- pH 7.00 (grün)	
- pH 4.00 (rot)	
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Eigenherstellung, siehe Tabelle 5
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm®	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
2-Methylbutan ≥ 99%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura, AV Alphen aan Den Rijn, Niederlande
Trockeneis	
D(+)-Saccharose ≥ 99,5%, p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 3 Chemikalien für die immunhistochemischen Färbungen

<u>Chemikalie</u>	<u>Hersteller</u>
Aceton ≥ 99,5%, puriss. p.a.	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA
PAP-Pen Liquid Blocker	Science Services GmbH, München, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA

2 Material und Methoden

Normal Rabbit Serum (NRS, 100%)	Dako Denmark, AS, Glostrup, Dänemark
Normal Goat Serum (NGS, 100%)	Dako Denmark, AS, Glostrup, Dänemark
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA
Standard Ultra-Sensitive ABC Staining Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
- Ultra Reagent A (Avidin)	
- Ultra Reagent B (Biotin)	
AB-Blocking Kit	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
- Avidin Serum	
- Biotin Serum	
AB-Komplex Kit	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂ , 30%)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol (MeOH)	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA
3,3-diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) Peroxidase Substrate Kit (SK-4100)	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
DAB Substrate Kit (ab64238)	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Kresylviolett (Acetat)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
70%	
96%	

2 Material und Methoden

Ethanol > 99,8% absolut	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA
Xylol (Isomere), >98%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Vitro-Cloud®	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Aquatex®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 4 Liste der verwendeten Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Verdünnung</u>
<u>Primärantikörper</u>		
rabbit anti-TH rat (ab112)	Abcam, Cambridge, Königreich	Vereinigtes 1:1000
rat anti-CD4 mouse (MCA 1767)	Serotec, Oxford, Königreich	Vereinigtes 1:1000
rat anti-CD8 mouse (MCA 609G)	Serotec, Oxford, Königreich	Vereinigtes 1:500
rat anti-CD45R / B220 (550286)	BD Biosciences, Franklin Lakes Jersey, USA	New 1:100
rat anti-CD11b mouse (MCA 711)	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA	Hercules, 1:100
<u>Sekundärantikörper</u>		
Biotinylated goat anti-rabbit IgG (H+L) (BA-1000)	Vector Laboratories, Kalifornien, USA	Burlingame, 1:100
Biotinylated rabbit anti-rat IgG (H+L) (BA-4001)	Vector Laboratories, Kalifornien, USA	Burlingame, 1:100

2.3.1 Lösungen

Tabelle 5 Angesezte Lösungen

<u>Lösung und verwendete Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u> (falls nicht bereits angegeben)
<u>1 M PBS (ein Liter)</u>	
80 g NaCl	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA
2 g KCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
17,8 g Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
2,7 g KH ₂ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Auffüllen mit Aqua dest. bis auf einen Liter	
<u>0,1 M PBS</u>	
100 ml 1 M PBS in 900 ml Aqua dest. gelöst	
<u>10% BSA</u>	
10g BSA in 100 ml 0,1 M PBS gelöst	
<u>PBS + Heparin</u>	
0,9 ml Heparin (Heparin-Natrium-2500-ratiopharm) in 250 ml 0,1 M PBS gelöst	
<u>2 % PFA, pH 7,4</u>	
6 g PFA in 300 ml 0,1 M PBS gelöst	
Umrühren, Erwärmen auf 60°C für 90 min	
Abkühlen auf Raumtemperatur (RT)	
Einstellen eines pH-Werts von 7,4 mithilfe von NaOH und HCl mit peqMeter 1.14 (peqlab / VWR Life Science, Radnor, Pennsylvania, USA) und Buffer Solution pH 4.00 und pH 7.00.	

2 Material und Methoden

30% Saccharose

30 g Saccharose in 100 ml 0,1 M PBS gelöst

Anti-Gefrier-Lösung

40% PBS

30% Glycerol

Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA

30 % Ethanol

Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA

Peroxidase-Block (POD-Block)

1,75 ml H₂O₂ in 100 ml MeOH

Kresylviolett-Gebrauchslösung

1g Kresylviolett

10 ml Essig

Auffüllen auf 1L mit Aqua dest.

DAB-Lösung für die TH⁺ + Nissl Färbung Vector Laboratories, SK 4100

2 Tropfen Buffer Lösung

4 Tropfen DAB-Stock

2 Tropfen H₂O₂

vermischt mit 5ml Aqua dest.

DAB-Lösung für die CD11b⁺ Färbung Abcam, ab 64238

1 ml Substrat Puffer

50 µl Enhancer

1 Tr. / 20 µl Chromogen

2.4 Technische Gerätschaften und Instrumentarium

Tabelle 6 Technische Gerätschaften und Instrumentarium der operativen Eingriffe

<u>Instrumentarium</u>	<u>Hersteller</u>
Rasierapparat	
Operationsbesteck	
Nahtmaterial	
Aufziehspritze (20ml) mit Microlance™ 3	
Gehirn Matrix Slicer	
Rasierklingen	
Coulter-Counter Gefäße	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Cryomolds®	Polysciences Inc., Warrington, Pennsylvania, USA
Embedding Molds – Multispecimen, Flat - Opaque	Polysciences Inc., Warrington, Pennsylvania, USA
Eppendorf Tubes®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Tabelle 7 Instrumentarium der verhaltensanalytischen Experimente

<u>Hard- und Software</u>	<u>Hersteller/Entwickler</u>
<i>Tail Suspension Test</i>	
Kamera: Sony FDR-AX 100E Zeiss	Sony, Minato, Tokio, Japan
Camcorder 4k, Full HD, HD 20,9	
Megapixel, 12xopt. Zoom	

Software:

- DeepLabCut	Open Source, Mathis Laboratory
- Anaconda	Open Source
- Python	Open Source
- Quick-Time-Player	Entwickler: Apple Inc., Cupertino, Kalifornien, USA

Tabelle 8 Instrumentarien und Software für die immunhistochemische Analyse und Auswertung

<u>Instrumentarium und Software</u>	<u>Hersteller</u>
Kryostat Leica 3050	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Lichtmikroskop Olympus BH-2	Olympus, Hamburg, Deutschland
Lichtmikroskop Zeiss Axiolab 5	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Lichtmikroskop Olympus BX53	Olympus, Hamburg, Deutschland
+ Einheit:	
ProScan III Prior (Bedienelement), Objektträgtisch Prior, Kamera QL Click Color (12 Bit, QImaging)	MBF Bioscience, Williston, Vermont, USA
Stereo Investigator® Software, Version 2019.1.3	MBF Bioscience, Williston, Vermont, USA
Axioplan 2 Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
+ Kamera Insight 4Mp Mosaic 14.2	Diagnostics Instruments, Inc., Sterling Heights, Michigan, USA

2 Material und Methoden

MetaVue Software, Version 7.8.0.0	Molecular Devices, LLC, San José, Kalifornien, USA
SPOT Imaging Software, Version 5.2	Diagnostics Instruments, Inc., Sterling Heights, Michigan, USA
Axiophot Imager.M2 Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
+ Kamera AxioCam 305 color	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
ZEN 2.3 pro (blue edition)	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
ImageJ Software, Version 2.1.0/1.53c	NIH (National Health Institutes), USA
Microsoft Office, Version 16.49	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Adobe Photoshop® CS5 extended Software, Version 12.0 x32	Adobe, San Jose, Kalifornien, USA
Fisher Scientific: chemische Struktursuche und Zeichentool	Open source (Website: www.fishersci.de)
Inkscape Software, Version 1.1.1	Open source
GraphPad Prism Software, Version 7 und 9	GraphPad Software, Inc., San Diego, Kalifornien, USA
Objektträger Superfrost® Plus	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Deckgläser (24 x 50mm)	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
SafeSeal Gefäß (1,5 ml und 2 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf Tubes® 5 ml screw cap	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Falcon® Cellstar Röhren (50 ml und 15 ml)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Nunc™ Zellkultur-Multischalen, behandelt	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Wippschüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland

2.5 Versuchsanordnung

Bei allen vier oben genannten Kohorten (DYT1KI und wt naiv sowie DYT1KI und wt mit Nervenquetschung) wurden die gleichen Verhaltensexperimente von erfahrenen Labormitarbeitern und -mitarbeiterinnen selbst oder nach eingehender vorheriger Anlernung durch diese nach standardisierten Protokollen durchgeführt. Alle beteiligten Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter besaßen die erforderlichen theoretischen und praktischen Qualifikationen zur Durchführung tierexperimenteller Studien mit operativen Eingriffen durch zuvor durchgeführte Kurse zum Tierschutz. Die Grundsätze der „3R: Reduction, Refinement und Replacement“, die für die Beschränkung der Versuchstiere auf ein Mindestmaß, die Optimierung der Haltungs- und Versuchsbedingungen und die Anwendung alternativer Methoden zum Ersatz von Versuchstieren stehen, wurden dabei stets beachtet und eingehalten.

Im Alter von drei Monaten wurde bei DYT1KI und wt Tieren eine Quetschläsion des rechten N. ischiadicus durchgeführt, weitere Tiere ohne Nervenquetschläsion wurden ebenfalls im Alter von drei Monaten in den Versuch eingeschlossen. 10 Wochen postoperativ wurden sowohl bei wt ($n = 7$) als auch bei DYT1KI ($n = 6$) Tieren elektroneurographische Untersuchungen des rechten und linken N. ischiadicus durchgeführt. Einmal wöchentlich wurde der TST unter Videoaufzeichnung bei allen im Versuch eingeschlossenen Tieren durchgeführt. Zwölf Wochen postoperativ erfolgte die transkardiale Perfusion, gefolgt von der Aufbereitung, Verarbeitung und anschließenden immunhistochemischen Untersuchungen des Gewebes.

2.6 Nervenquetschläsion des N. ischiadicus

Zunächst wurden die Tiere in einer mit 3%igem Isofluran-Sauerstoff- Gemisch gefluteten Kammer narkotisiert. Nach Überprüfen einer ausreichenden Anästhesietiefe mittels

Zwischenzehenreflex wurde die rechte Glutealregion der Mäuse rasiert. Zur intraoperativen Analgesie wurden 5 mg/kg Körpergewicht Rimadyl® subkutan injiziert. Zum Aufrechterhalten der Narkose wurden die Tiere auf einer 37°C warmen Platte in Bauchlage in eine Vorrichtung mit Atemmaske gelegt, die konstant eine 1-2%ige Isofluran-Sauerstoff-Mischung abgab. Nach der Hautdesinfektion mit Cutasept® und dem Schutz der Augen vor Austrocknung mit Bepanthen® Augensalbe wurde das rechte Hinterbein mit medizinischem Klebeband auf der Unterlage fixiert und ein circa 5 mm langer Schnitt in der rasierten Region von der Beckenschaufel bis zur Mitte des Oberschenkels vorgenommen. Nach dem Eröffnen der Faszien wurden die Musculi biceps femoris und gluteus maximus zur Seite präpariert und der N. ischiadicus freigelegt. Es erfolgte eine Quetschung des Nervs mit einer nicht-bezahnten Gefäßklemme, die in der zweiten Arretierung für eine Minute festgestellt wurde. Danach erfolgte die Kontrolle der gequetschten Stelle und des Nervs auf eine bestehende Durchgängigkeit mittels Mikroskops. Abschließend wurde der Nerv repositioniert und die Inzision mit 5-0 Fäden verschlossen. Nach Beendigung der Operation wurden die Mäuse von der Atemmaske genommen und konnten sich nach kurzer Zeit wieder frei im Käfig bewegen.

Die Nervenquetsch-Operationen wurden mit freundlicher Unterstützung von Frau Dr. Lisa Rauschenberger durchgeführt.

2.7 Elektroneurographie

Zur Überprüfung, ob potenzielle Unterschiede in der Nervenregeneration zwischen den Kohorten ein Grund für mögliche pathologische Bewegungsmuster sein können, wurden in wt und DYT1KI Tieren Elektroneurographien des linken und rechten N. ischiadicus zehn Wochen postoperativ durchgeführt. Dabei wurden die Nervenleitungsgeschwindigkeit („nerve conduction velocity“ = NCV) und Muskelsummenaktionspotenziale („compound muscle action potentials“ = CMAP) analog zu der Beschreibung von Ip et al. als Maß für die Nervenschädigung herangezogen (Ip et al., 2016). Dazu diente der Elektromyograph „Neurosoft-Evidence 3102“ (Schreiber & Tholen Medizintechnik GmbH). Die Versuchstiere wurden analog zu dem im vorigen Kapitel beschriebenen Vorgehen narkotisiert und auf der Operationsplatte fixiert. Da die Temperatur auf die NCV Einfluss nimmt, wurde stets darauf geachtet, dass die Messungen bei einer gleichmäßigen Körpertemperatur der Mäuse von 34°C bis 36°C durchgeführt wurden, wobei diese vor und nach den Messungen gemessen wurde (Baysal, Chang, & Oh, 1993). Zur Messung der distalen

Stimulation wurde eine ableitende Elektrode im M. flexor digitorum brevis geringfügig proximal des Fußballens (blau) und hierzu eine Referenzelektrode (braun) zwischen die zweite und dritte Zehe platziert. Analog dazu erfolgte eine Platzierung der Elektroden für die proximale Stimulation kurz proximal des Knöchels (ableitende Elektrode, grün) sowie zu dieser in unmittelbarer Nähe die Referenzelektrode (weiß). Zur Erdung diente eine weitere Elektrode in der seitlichen Bauchhaut (gelb). Die supramaximale Stimulation wurde über eine in der Region des Foramen ischiadicum majus subkutan platzierte Elektrode (rot) sowie einer weiteren, proximal davon platzierten Elektrode (weiß) ausgelöst. Nach dem Aufbau des Versuchs erfolgten die Stimulationen in Rechteckimpulsen mit einer jeweiligen Dauer von 0,05 ms in einer seriellen Stimulation mit einer Frequenz von 1 Hz, 5 Hz und 10 Hz und einer Stromstärke von 1 mA steigend auf 12 mA. Zur Ermittlung der NCV wurde eine Distanz von 20-24 mm zwischen auslösender und ableitender Elektrode gemessen und durch die Laufzeitlatenzen dividiert. Sowohl die Errechnung der NCV als auch die Messung der CMAP wurden durch das Programm „Evidence“ ermittelt.

Die für den Genotypen verblindeten elektromyographischen Messungen wurden freundlicherweise mit Unterstützung von Frau Dr. Lisa Rauschenberger durchgeführt.

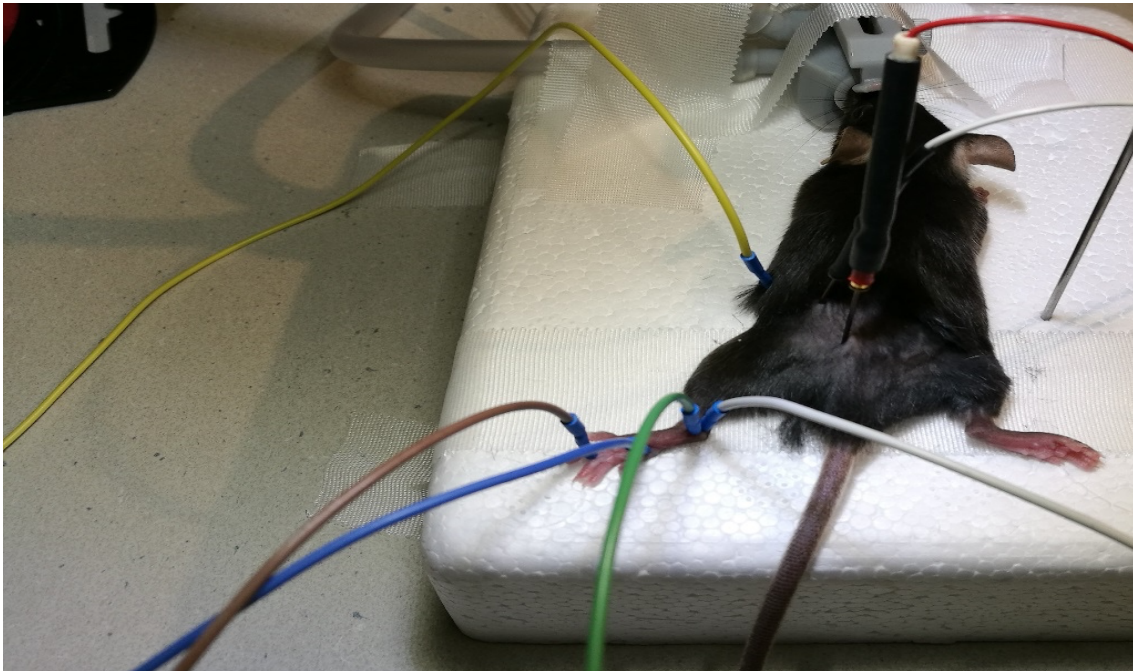


Abbildung 5

Versuchsaufbau der elektroneurographischen Messungen

Gezeigt wird der Versuchsaufbau der elektroneurographischen Messungen mit der Platzierung der Elektroden am Beispiel eines Versuchstiers.

2.8 Verhaltensanalyse

Zum Quantifizieren von Bewegungsstörungen an Nagern modellen existieren diverse Verfahren der Verhaltenstestung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der TST durchgeführt, da anhand dessen Dystonie-ähnliche Bewegungen festgestellt und charakterisiert werden können. Hierfür wurden die Mäuse im proximalen bis mittleren Drittel ihres Schwanzes angehoben, sodass sie mit ihrer Schnauze Richtung Boden hingen. Diese Position wurde für zwei Minuten gehalten und die ventrale Ansicht der Tiere mit der Videokamera Sony FDR-AX 100E mit einer Bildrate von 100 Bildern pro Sekunde („frames per second“ = FPS) aufgezeichnet. Dabei wurde stets auf eine einheitliche Ausrichtung hinsichtlich Ausleuchtung, Bildauflösung, Positionierung der Versuchstiere im Bild sowie eines homogenen, einfarbigen Bildhintergrundes beachtet. Die Testungen wurden sowohl prä-, als auch postoperativ einmal pro Woche über einen Zeitraum von 12 Wochen durchgeführt.

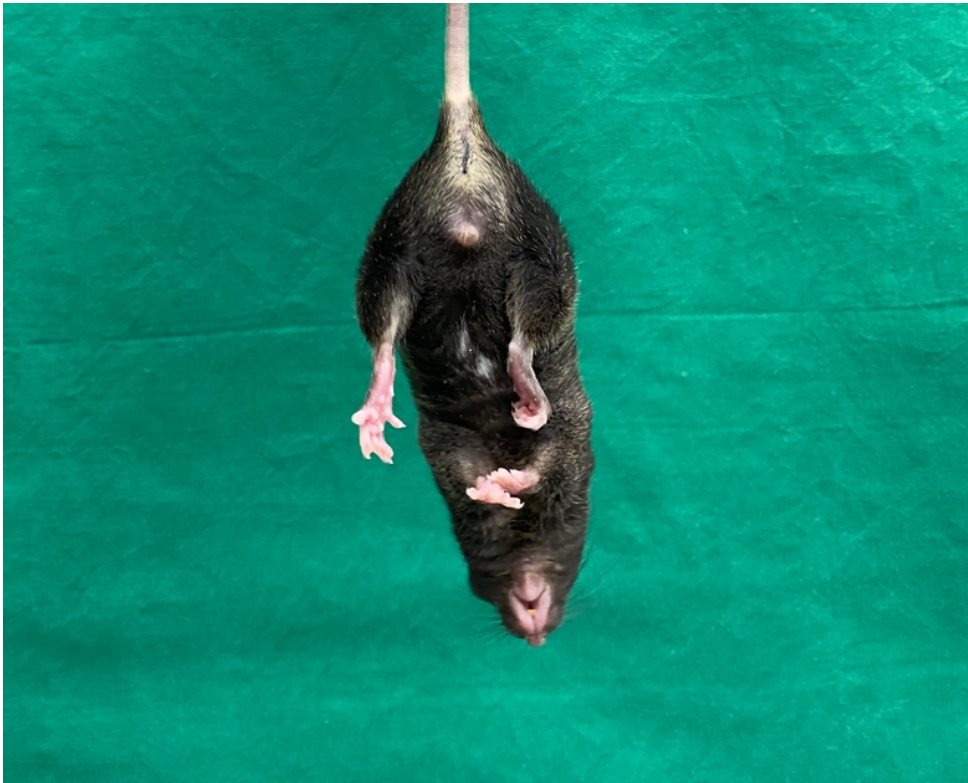


Abbildung 6

Versuchsaufbau des TST

Die Versuchstiere wurden an ihrem Schwanz mit dem Oberkörper Richtung Boden für zwei Minuten angehoben. Beispielhaft ist eine Verkrampfung der hinteren rechten Pfote erkennbar.

2.8.1 Erstellung eines neuronalen Netzwerks mittels DeepLabCut

Mittels der frei zugänglichen Computersoftware „DeepLabCut“ (Abbildung 7a) wurde ein neuronales Netzwerk etabliert, um Bewegungen der Versuchstiere im TST objektiv und effizient erfassen zu können (Nath et al., 2019). Zunächst wurden initial 64 TST-Videos von vorherigen Dystonie-Projekten (Knorr et al., 2021; Rauschenberger et al., 2019) mit einer Dauer von jeweils zwei Minuten und einer kodierten Bildrate von 50 FPS randomisiert ausgewählt (Abbildung 7b). Anschließend erfolgte das Erstellen des Netzwerks entsprechend der durch das Programm vorgegebenen Schritte (Abbildung 7c-l). Zur Konfiguration des Netzwerks wurde definiert, welche Körperteile für die weiterführende kinematische Analyse von Relevanz sind und entsprechend mit einer Markierung versehen werden sollten (Tabelle 9). Um ein sogenanntes Skelett des Tieres zu erstellen, wurden zudem Verbindungen zwischen diesen Markierungen festgelegt. Nach diesen Schritten wurden randomisiert aus jedem Video 9-20 Bilder extrahiert (Abbildung 7c). Im Folgenden wurden dann in jedem extrahierten Bild die zuvor festgelegten Körperteile markiert (Abbildung 7d-e). Nach der vollständigen Markierung aller Körperteile wurden die Richtigkeit und Einheitlichkeit der Markierungen über die Funktionen „build skeleton“ und „check labels“ kontrolliert. Anschließend wurde anhand der manuell markierten Bilder und einem künstlichen neuronalen Netzwerk („Convolutional Neural Network“, CNN) ein Datensatz zum Trainieren des angelegten Netzwerks erstellt (Abbildung 7f). Für dieses Training wurden 95% aller zuvor markierten Bilder verwendet. Die restlichen 5% der Bilder wurden nicht in das Training mit einbezogen. Sie wurden später zur Analyse der Genauigkeit des Netzwerks verwendet (siehe unten). Die Wiederholungszyklen innerhalb eines Trainings wurden bei diesem Projekt auf 500 000 bis 750 000 Iterationen festgelegt (Abbildung 7g). Nach dem Durchlaufen des Trainings wurde eine Evaluierung des Netzwerks durchgeführt (Abbildung 7h). Dabei berechnete DeepLabCut die mittlere Distanz zwischen den gesetzten Markierungen und denen vom Netzwerk vorhergesagten. Dazu wurden nur Marker einbezogen, die oberhalb einer vorherig festgelegten Wahrscheinlichkeitsschwelle von 0,6 lagen. Diese Schwelle gibt an, mit welcher Sicherheit die entsprechende Markierung gesetzt wurde. Die Distanz zwischen Markierung und Vorhersage wurde dann in Pixel in einem „Trainingsfehler“ und einem „Testfehler“ angegeben. Der Trainingsfehler bezog sich dabei jeweils auf die vom Benutzer gesetzten Markierungen, während beim Testfehler die 5% der nicht in das Training einbezogenen Bilder verwendet wurden. Zur Erhöhung der Genauigkeit der durch das Netzwerk gesetzten Markierungen, mussten weitere Wiederholungen der

Trainings stattfinden. Dies funktionierte durch ein Hinzufügen weiterer Videos in das Netzwerk und deren Analyse (Abbildung 7i). Die hinzugefügten TST-Videos stammten zunächst ebenfalls aus den oben erwähnten Projekten mit h Δ GAG3-Mäusen sowie aus einer Auswahl von Δ ETorA Ratten (Knorr et al., 2021; Rauschenberger et al., 2019). Die insgesamt 29 Videos der Ratten wurden zur weiteren Diversifizierung und breiteren Einsetzbarkeit des Netzwerks für alle in der Arbeitsgruppe verwendeten Nagermodelle in das Netzwerk eingespeist. Zusätzlich zur Verfeinerung des Netzwerks stellten diese weitere Videoqualitäten und Lichtverhältnisse zur Optimierung bereit. Über den im Arbeitsablauf fakultativen Bedienungsreiter „create videos“ (Abbildung 7j) konnten die analysierten Videos dann inklusive ihrer Markierungen abgespielt und vom Benutzer wiederkehrende Fehler erkannt werden. Mittels des folgenden Schrittes „extract outlier frames“ wurden aus den analysierten Videos Bilder mit solchen Fehlern automatisiert herausgesucht (Abbildung 7k): die Methode „jump“ wurde in diesem Projekt angewandt, um Bilder zu extrahieren, bei denen eine Markierung im vorhergehenden Bildausschnitt an einer weit abweichenden Stelle gesetzt wurde und die Position der Markierung somit zwischen diesen Bildausschnitten „springt“. Anhand dieser Methode wurden zehn Bilder pro Video extrahiert und eine manuelle Korrektur vorgenommen, indem die Markierungen an die korrekten Stellen verschoben wurden. Nach der erneuten Kontrolle aller Bilder, konnte in DeepLabCut anhand der korrigierten Bilder dann im folgenden Schritt ein erneuter Trainings-Datensatz erstellt werden (Abbildung 7l). Zum Training des Netzwerks wurden insgesamt 19 Iterationen angewandt. Hierbei wurden insgesamt 101 Videos verwendet, die, neben den oben genannten, zum Teil mit einer kodierten Bildrate von 100 FPS aufgenommen worden waren. Die zusätzlichen Trainingsiterationen dienten durch die Veränderung von Voreinstellungen und Parametern sowie dem Hinzufügen der weiteren Videos mit höherer kodierter Bildrate der Reduktion der Trainings- und Testfehler und somit der Verfeinerung des Netzwerks.



Abbildung 7 Die verwendeten Einstellungsparameter zur Erstellung des neuronalen Netzwerks
a: Startseite nach Öffnen des Programms

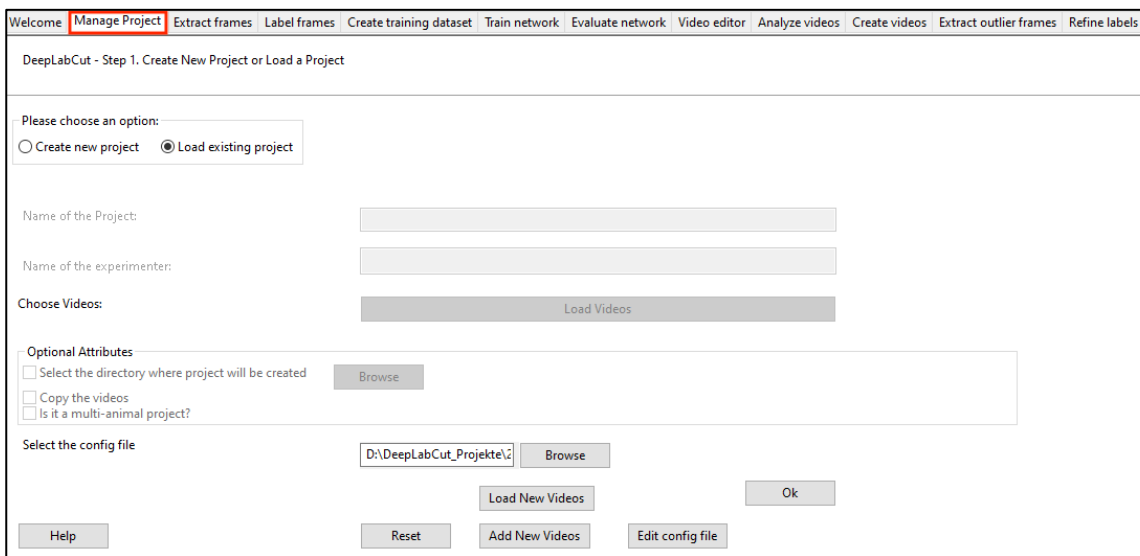


Abbildung 7b Schritt 1: Auswahl des Projekts und initialer Videos
Die Konfigurationsdatei des Projektes wurde über den Pfad ausgewählt. Zudem wurden initial 64 Videos zum Trainieren des Netzwerks ausgewählt.

2 Material und Methoden

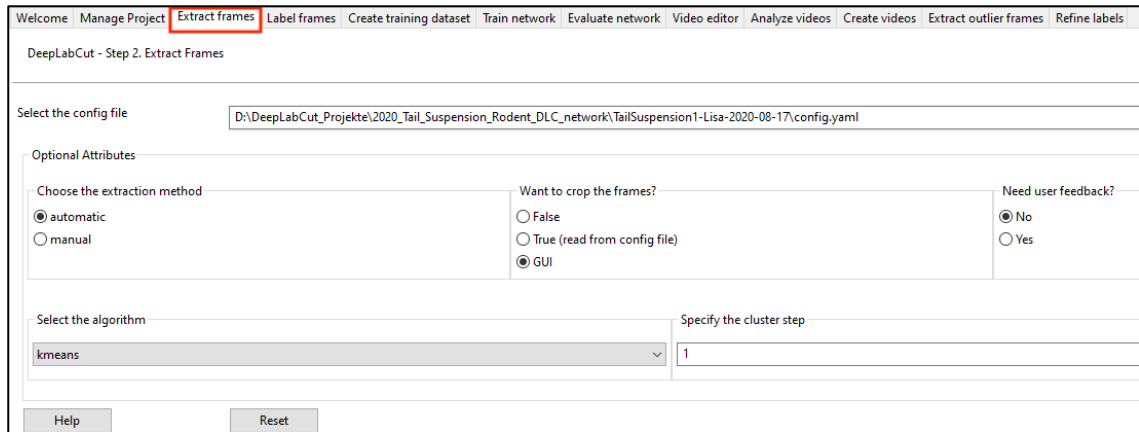


Abbildung 7c Schritt 2: Extrahieren von Bildern

Über diesen Schritt wurden aus den anfangs ausgewählten Videos je nach gewählter Einstellung 9-20 Bildausschnitte durch das Programm randomisiert ausgewählt.

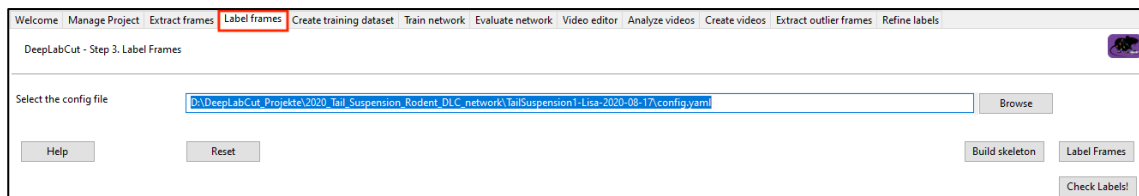


Abbildung 7d Schritt 3: Markierung der extrahierten Bilder

Im nächsten Schritt wurden in den extrahierten Bildern dann die anfangs in der Konfigurationsdatei festgelegten Körperteile (siehe auch Tabelle 9) markiert.



Abbildung 7e Beispiel-Bild während der Markierung der Körperteile

Die rechts aufgeführten, zuvor definierten Markierungen (Tabelle 9) wurden den entsprechenden Körperteilen durch Mausklick zugeordnet.

2 Material und Methoden

Welcome | Manage Project | Extract frames | Label frames | **Create training dataset** | Train network | Evaluate network | Video editor | Analyze videos | Create videos | Extract outlier frames | Refine labels

DeepLabCut - Step 4. Create training dataset

Select the config file: D:\DeepLabCut_Projekte\2020_Tail_Suspension_Rodent_DLC_network\TailSuspension1-Lisa-2020-08-17\config.yaml

Optional Attributes

Select the network: resnet_50 | Select the augmentation method: default

Set a specific shuffle index (1 network only): 1 | Specify the trainingset index: 0

User feedback (to confirm overwrite train/test split?): Yes No | Want to compare models?: Yes No

Help | Reset

Abbildung 7f Erstellen des Trainings-Datensatzes

Mit dem Datensatz wurden die gesetzten Punkte von den in Abbildung 7c extrahierten und manuell markierten Bilder (Abbildung 7 d-e) auf alle Bilder des Videos übertragen.

Welcome | Manage Project | Extract frames | Label frames | Create training dataset | **Train network** | Evaluate network | Video editor | Analyze videos | Create videos | Extract outlier frames | Refine labels

DeepLabCut - Step 5. Train network

Select the config file: D:\DeepLabCut_Projekte\2020_Tail_Suspension_Rodent_DLC_network\TailSuspension1-Lisa-2020-08-17\config.yaml

Optional Attributes

Specify the shuffle: 1 | Specify the trainingset index: 0

Display iterations: 1000 | Save iterations: 50000 | Maximum iterations: 1030000

Help | Reset

Abbildung 7g Trainieren des Netzwerks

Mit dem Trainings-Datensatz wurde das neuronale Netzwerk mit 500 000 – 750 000 Iterationen trainiert.

Welcome | Manage Project | Extract frames | Label frames | Create training dataset | Train network | **Evaluate network** | Video editor | Analyze videos | Create videos | Extract outlier frames | Refine labels

DeepLabCut - Step 6. Evaluate Network

Select the config file: D:\DeepLabCut_Projekte\2020_Tail_Suspension_Rodent_DLC_network\TailSuspension1-Lisa-2020-08-17\config.yaml

Attributes

Specify the shuffle: 1 | Specify the trainingset index: 0

Want to plot predictions (as in standard DLC projects?): Yes No | Compare all bodyparts?: Yes No

Help | Reset

Help (X-val)

Abbildung 7h Evaluation des Netzwerks

Das Programm berechnete dann die Trainings- und Testfehler. Anhand dieser wurde die Genauigkeit der durch DeepLabCut vorhergesagten Markierungen angegeben.

2 Material und Methoden

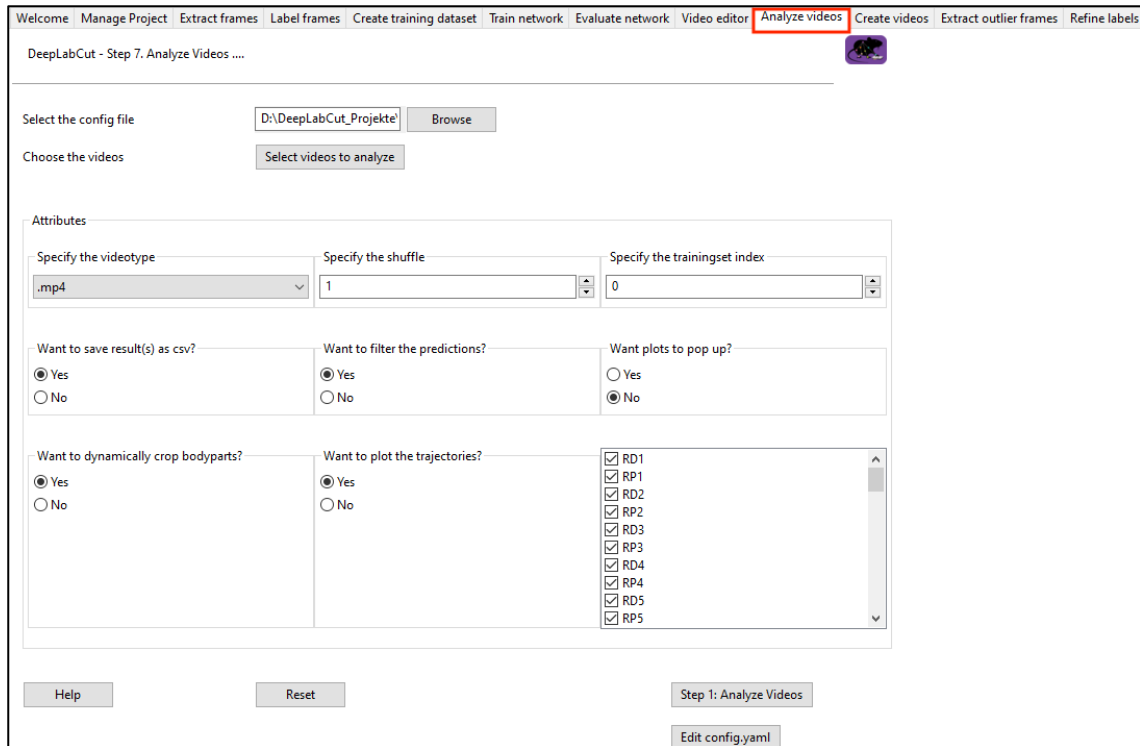


Abbildung 7i Analyse von Videos, die nicht für das Training genutzt wurden
Mit dem erstellten Netzwerk konnten dann neue, dem Netzwerk nicht bekannte Videos analysiert werden, d.h. die x- und y-Position der in Tabelle 9 genannten Körperteile automatisch für jedes Bild bestimmt werden.

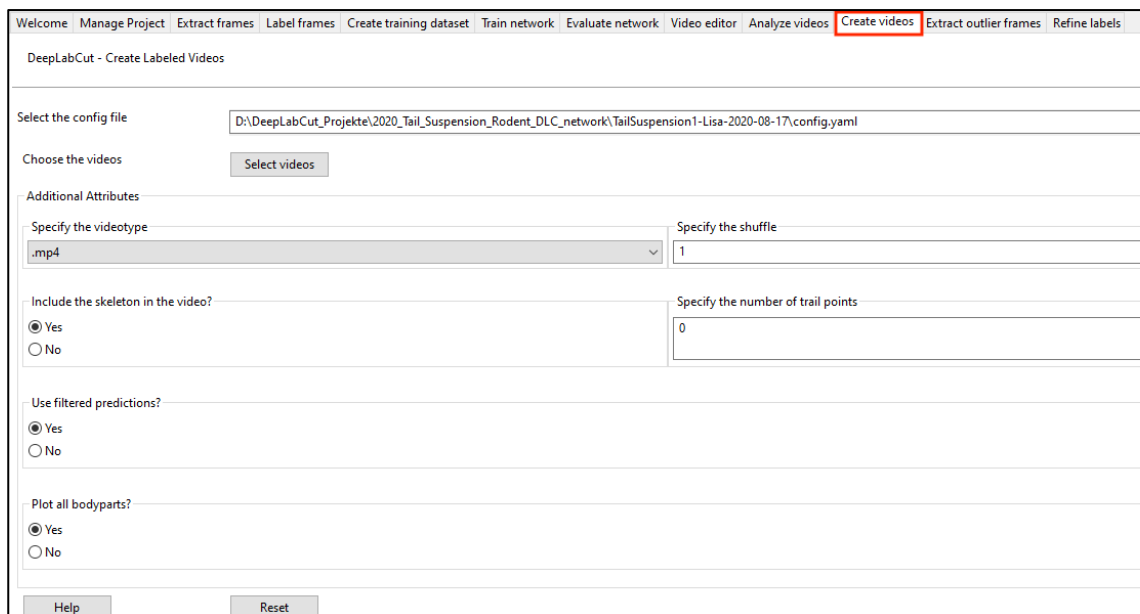


Abbildung 7j Erstellung der Videos mit Markierungen
Mit dieser Funktion konnten im Anschluss optional Videos mit den Markierungen erstellt werden.

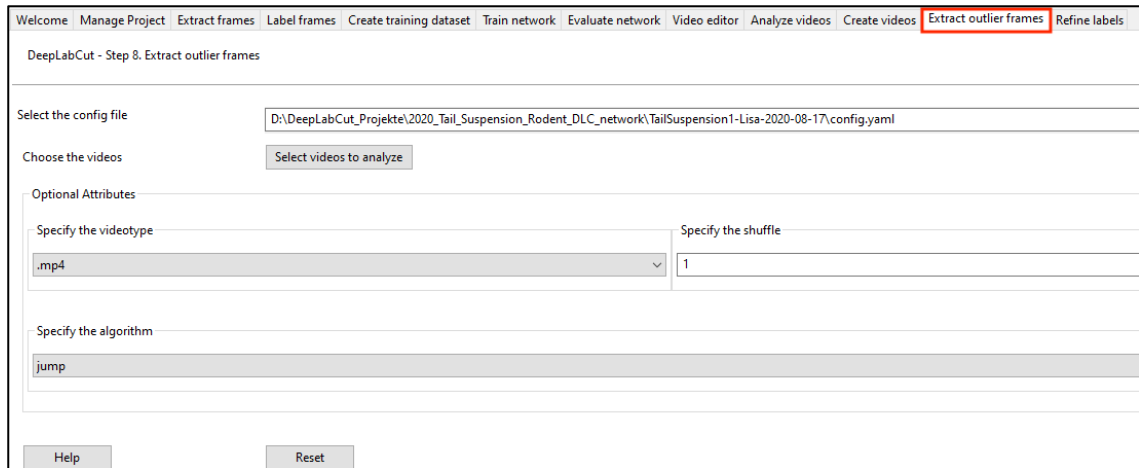


Abbildung 7k Extrahieren ungenauer Bilder der analysierten Videos

Zur Präzisierung des Netzwerks wurden aus den analysierten Videos erneut Bilder extrahiert. Hierbei erfolgte je Video eine erneute Auswahl an 10 Bildern durch DeepLabCut. Als Auswahlmethode für diese Bilder wurde stets „Jump“ ausgewählt. Dabei wurden Bilder aus dem Video ausgewählt, bei denen die Position von Markierungen im vorherigen Bild weit entfernt vom folgenden Bild lagen, was somit die Wahrscheinlichkeit eines zugrundeliegenden Markierungsfehlers erhöhte. Über „Label Frames“ (Abbildung 7d-e) wurden Markierungen an die richtige Stelle manuell versetzt.

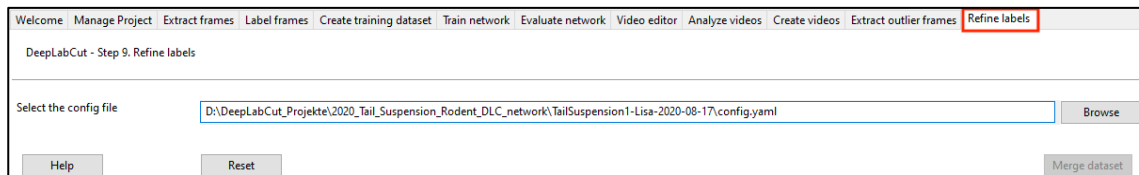


Abbildung 7l Verfeinerung des Netzwerks

Nach der manuellen Korrektur der Punkte wurde ein neuer Datensatz für eine erneute Trainingsiteration (ab Abbildung 7f) kreiert. Damit konnte das Netzwerk verfeinert und die Trainings- und Testfehler minimiert werden. Insgesamt wurden 19 Trainingsverfeinerungen durchgeführt.

Tabelle 9 Benennung der markierten Körperteile und deren Definition

Hintere Körperhälfte		Vordere Körperhälfte	
Abkürzung	Definition	Abkürzung	Definition
RD / LD 1-5	Markierung distal an der Phalanx der 1. – 5. Zehe der rechten (RD) / linken (LD) Hinterpfote	RFD / LFD 1-5	Markierung distal an der Phalanx der 1. – 5. Zehe der rechten (RFD) / linken (LFD) Vorderpfote
RP / LP 1-5	Markierung proximal an der Phalanx der 1. – 5. Zehe der rechten (RP) / linken (LP) Hinterpfote (Fußzehenwurzel am Übergang zum Mittelfuß)	RFP / LFP 1-5	Markierung proximal an der Phalanx der 1. – 5. Zehe der rechten (RFP) / linken (LFP) Vorderpfote (Fingerwurzel am Übergang zur Mittelhand)
RHM / LHM	Markierung der rechten (RHM) / linken (LHM) Mitte der Hinterpfote	RFHM / LFHM	Markierung der rechten (RFHM) / linken (LFHM) Mitte der Vorderpfote
RC / LC	Markierung der rechten (RC) / linken (LC) Fußwurzel	RW / LW	Markierung der rechten (RW) / linken (LW) Handwurzel
RKB / LKB	Markierung der Hinterseite des rechten (RKB) / linken (LKB) Knies	RE / LE	Markierung des rechten (RE) / linken (LE) Ellenbogens
RKF / LKF	Markierung der Vorderseite des rechten (RKF) / linken (LKF) Knies	-	kein korrespondierender Marker
Bellymid	Markierung der Mitte des Abdomens	Thorax	Markierung des Thorax, zwischen den Mm. pectorales
Tailbase	Markierung der Schwanzwurzel	-	kein korrespondierender Marker
Tail-proximal	Markierung des proximalen Schwanzanteils	-	kein korrespondierender Marker
Nose	Markierung der Nasenspitze	-	kein korrespondierender Marker

2.8.2 Analysesoftware zur weiterführenden kinematischen Auswertung

Um die durch DeepLabCut gelieferten Datenpunkte zur Identifizierung Dystonie-ähnlicher Merkmale der Versuchstiere zu verwenden und statistisch auswertbare Daten zu liefern, wurde eine Analysesoftware erstellt. Diese bietet gleichzeitig eine graphische Benutzeroberfläche, um das Arbeiten mit den erhaltenen Daten zu ermöglichen. Sowohl die Programmierung dieser Software als auch die Auswertung damit wurden durch Frau Dr. Lisa Rauschenberger durchgeführt.

Zur Normierung von Distanzen und Längen wurde die Körpergröße einer Maus als Abstand zwischen den Punkten „Nase“ und „Schwanzwurzel“ genutzt. Unter der Annahme, dass alle in die Auswertung einbezogenen Mäuse ungefähr die gleiche Körpergröße besaßen, stellte sich die tatsächliche Größe im Video somit lediglich in Abhängigkeit von Auflösung und Abstand zur Kamera dar. Aufgrund dessen wurde für die Größennormierung in jedem Video ein Zeitintervall ausgewählt, zu dem die Maus bewegungslos und gerade herunterhängend im TST zu erfassen war (Abbildung 8A). Mit dem auf diese Weise erhaltenen Faktor wurden alle weiteren Längenskalen im Programm normiert und auf das jeweilige Video angewandt. Für die Identifizierung Dystonie-ähnlicher Verhaltensweisen der Versuchstiere wurde, anlehnend an die Beobachter-basierte Auswertung des TST bisheriger Projekte, ein fixer Satz an Parametern definiert. Hierzu wurden Kombinationen aus korrelierenden Datenpunkten und Grenzwerte bestimmt, bei denen ein auffälliges kinematisches Verhalten erkennbar war. Die Korrelationen wurden für linke und rechte Körperhälfte gleichermaßen wie folgt definiert:

Die mittels der Software ausgewerteten phänotypischen Hauptmerkmale stellten die so genannten *Fuß- und Beinverkrampfungen* dar. Als „Fußgröße“ galt dabei der Abstand der Zehenspitzen 2-4 zur Fußmitte. Hieraus wurde der Mittelwert bestimmt. Ein *Fußkrampf* wurde dann identifiziert, wenn die Fußgröße den gesetzten Grenzwert unterschritt (Abbildung 8B). Für ein *Heranziehen des Beines* wurde einerseits das Unterschreiten der Distanz des Knies zur Körperlängsachse (definiert als Verbindung von Schwanzwurzel zu Nase) unter einen gesetzten Grenzwert als Parameter definiert. Außerdem wurde das Bein als herangezogen festgelegt, wenn der Abstand zwischen Fußmitte und Knöchel in der x-Achse einen gesetzten Grenzwert unterschritt. Weiterhin galt das Bein als herangezogen, wenn der Winkel zwischen Schwanzwurzel, Knie und Knöchel einen festgelegten Grenzwert unterschritt. Eine *Fuß- und Beinverkrampfung* als Auswertungsmerkmal wurde dann identifiziert, wenn ein *Fußkrampf* mit zusätzlich einer Distanz von Knie zur Körperachse unterhalb eines gesetzten Grenzwerts und einem Abstand zwischen Fußmitte und Knöchel unterhalb eines bestimmten Grenzwerts in der x-Achse vorlag (Abbildung 8C). Ebenfalls als *Fuß- und Beinverkrampfung* zählte ein *Fußkrampf* in Kombination mit einem Winkel zwischen Schwanzwurzel, Knie und Knöchel unterhalb eines definierten Grenzwerts (Abbildung 8D).

Ein weiterer wichtiger Parameter zur Auswertung der Videos war das Aussortieren von Bildern mit Störfaktoren, da die definierten Parameter teilweise von der

Kameraperspektive und der Position der Versuchstiere im Bild abhingen. Hierzu zählte das zeitgleiche Verkrampfen beider Hinterbeine (sog. „hindlimb claspung“), welches als eine unspezifische Verhaltensauffälligkeit in zahlreichen Tiermodellen für Bewegungsstörungen zu finden ist. Dabei wurden Bilder, in denen in beiden Füßen ein Fußkrampf identifiziert wurde und in denen der Abstand zwischen den Fußmitten der beiden Hinterfüße unter einem gesetzten Grenzwert lag, aussortiert (Abbildung 8E). Darüber hinaus galt die Überlappung von Vorder- und Hinterfüßen als Störfaktor und entsprechende Bilder wurden aussortiert, wenn die Distanz zwischen den jeweiligen Fußmitten unter einem gesetzten Grenzwert lag. Auch die Rotation eines Versuchstieres wurde von der Auswertung ausgeschlossen. Hierbei wurden Bilder ausgeschlossen, bei denen sich beide Füße auf der gegenüberliegenden Seite der Körperlängsachse befanden und dabei eine gesetzte Distanz zur Körperlängsachse überschritten. Zuletzt wurden Streckungen des Beines in Richtung der Kamera, definiert als Unterschreiten der Distanz von Fußmitte zum Knöchel unter einen Grenzwert, als Störfaktor gewertet und somit von der Auswertung exkludiert. Auch wurden ganze Videos nicht mit einbezogen, bei denen das rechte Hinterbein in über 50% der Einzelbilder mit einer Wahrscheinlichkeit von kleiner als 0,6 markiert wurden, was einer unzureichenden Videoqualität zugrunde lag.

Um statistisch vergleichbare Größen zu erlangen, wurde die Frequenz der definierten phänotypischen Merkmale im Video bestimmt und als Anzahl an Krämpfen pro Minute dargestellt. Als Bedingung für eine solche Zählung galt ein Anhalten der Verkrampfung über eine minimale Länge von sechs aufeinanderfolgenden Bildern. Bei einer Unterbrechung des Krampfs von bis zu acht Bildern durch Veränderungen der Positionsmarkierung, die beispielsweise durch vorübergehende Unschärfe des Videomaterials entstehen konnte, ging die Verkrampfung dennoch in die Auswertung ein. Hierdurch konnte neben der Anzahl auch die Länge der Krämpfe festgestellt werden. Ein Krampf wurde dann mittels eines Wertungssystems identifiziert:

1 = Ein bestimmtes Merkmal wurde identifiziert.

0 = Ein bestimmtes Merkmal wurde nicht identifiziert.

0.5 = Es konnte keine Aussage aufgrund fehlender Datenpunkte getroffen werden.

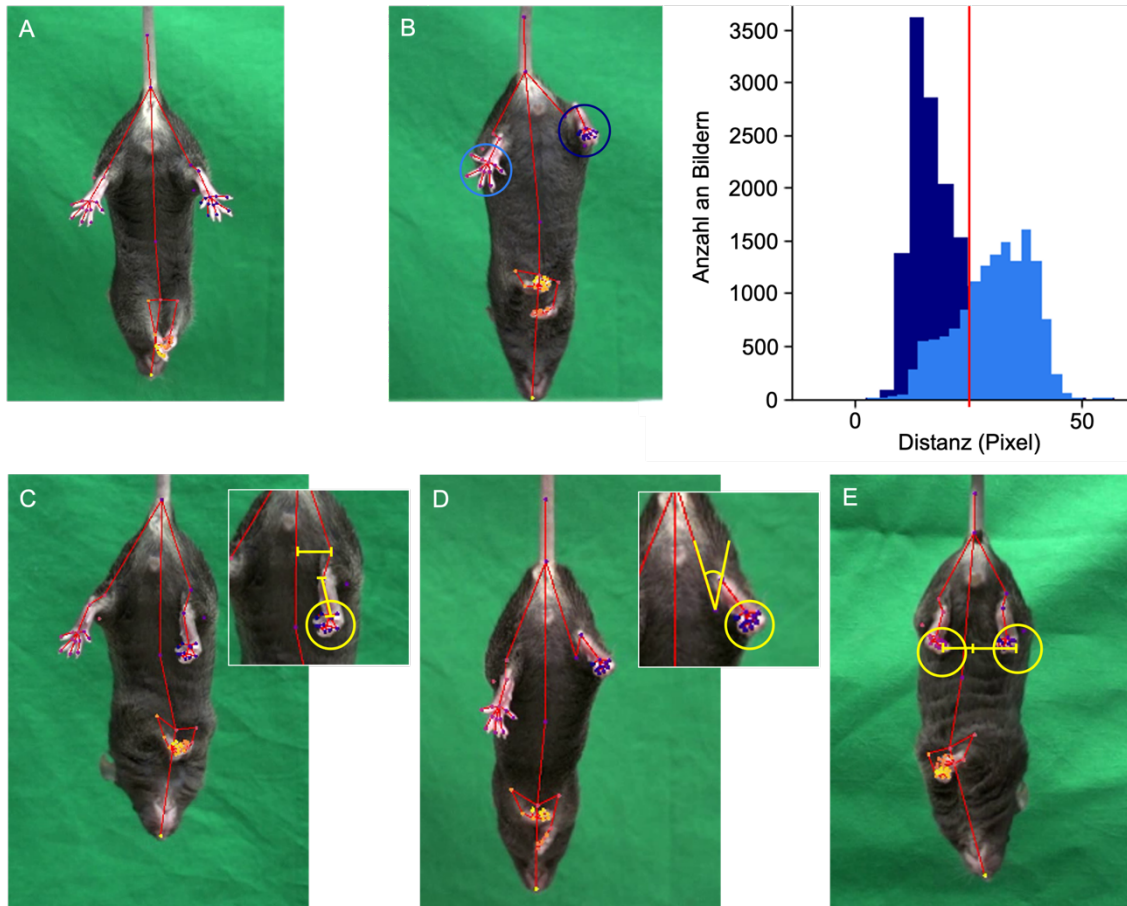


Abbildung 8

Phänotypische Erscheinungen im TST

A zeigt den ruhenden Zustand einer Maus ohne auffälliges Bewegungsmuster. In **Abbildung B** wird die Fußgröße dargestellt: Dabei ist die linke Fußgröße hellblau, die rechte dunkelblau markiert. Im Graphen sind die Anzahl an Bildern mit der Distanz des Mittelwerts von den Zehenspitzen 2-4 zur Fußmitte in Pixeln eines TST-Videos dargestellt. Die vertikale rote Linie im Graphen beschreibt den Grenzwert, bei dem ein Unterschreiten als auffälliges Verhaltensmuster gewertet wurde. Auffallend dabei ist die häufigere Unterschreitung des Grenzwerts der dunkelblauen, rechten Fußgröße verglichen zur hellblauen, linken Seite. **C** zeigt eine Fußverkrampfung mit Heranziehen des Beines mit Unterschreiten der Grenzwerte von Zehenspitzen zu Fußmitte, von Fußmitte zu Knöchel in der x-Achse sowie von Knie zu Körperlängsachse, jeweils rechtsseitig. In **Abbildung D** ist der Fußkrampf mit zusätzlich Heranziehen des rechten Hinterbeines als verkleinerter Winkel zwischen Schwanzwurzel, Knie und Knöchel abgebildet. **E** zeigt das gleichzeitige Heranziehen beider Hinterbeine (sog. „Hindlimb claspings“) als Beispiel einer unspezifischen Verhaltensauffälligkeit, was somit nicht gewertet wurde.

2.9 Transkardiale Perfusion und Organentnahme

Nach Abschluss der Verhaltensexperimente erfolgte die Einschläferung der Tiere in einer mit CO₂ gefüllten Kammer. Nach Eintritt des Todes, der mit dem Zwischenzehenreflex überprüft wurde, wurden die Mäuse auf einer mit Aluminiumfolie ausgekleideten Polystyrol-Platte fixiert, der Thorax mit einer Präparierschere eröffnet und das Herz freigelegt. Zum Abfluss des gesamten Blutes folgte ein Schnitt in das rechte Atrium mit der gleichzeitig beginnenden Perfusion über den linken Ventrikel. Aufgrund der unterschiedlichen Anforderungen in der Gewebeaufbereitung

und -verarbeitung für die jeweiligen Färbungen wurden zwei Arten der Perfusion angewandt: die Perfusion mit 2% PFA für die TH⁺-Färbung dopaminerger Neurone in der SN und mittels PBS mit Heparin für die Immunzellfärbungen der Gehirnschnitte, des N. ischiadicus und des Rückenmarks. Die Mäuse für die TH⁺-Färbung wurden mit 100ml der 2%igen PFA-Lösung mittels einer Perfusionspumpe perfundiert, während bei den Versuchstieren für die Immunzellfärbungen 15 ml der PBS + Heparin Lösung mit einer Spritze injiziert wurde. Nach Abschluss der Perfusion wurden die Tiere in Rückenlage gedreht, die Schädelkalotte entlang der Sutura sagittalis eröffnet, die Dura mater entfernt und das Gehirn in toto entnommen. Mit Hilfe der Gehirn-Matrix und einer scharfen Rasierklinge wurden die Gehirne dorsal des Striatums (Bregma -2,30 mm) (Paxinos & Franklin, 2001) in der Koronarebene in zwei Hälften geteilt. Die PFA-perfundierten Gehirne wurden vor dem Einfrieren in den Coulter-Counter Gefäßen mit 2%iger PFA-Lösung für 24 Stunden bei 4°C fixiert und anschließend für weitere 48 Stunden, ebenfalls bei 4°C in 30%iger Saccharose-Lösung dehydriert. Für die Entnahme des rechten und linken N. ischiadicus und des lumbalen Rückenmarks wurden die Strukturen freipräpariert und vorsichtig mit einer Pinzette entnommen. Bei den Nerven wurde darauf geachtet Regionen proximal und distal der Nervenquetschläsion bei der Entnahme mit einzubeziehen. Die Präparation des N. ischiadus erfolgte dabei ähnlich wie die Freilegung des Nervs für die Quetschläsion, welche in Kapitel 2.6 beschrieben ist. Für das lumbale Rückenmark erfolgte nach Präparation der Wirbelsäule eine Auftrennung der Wirbelkörper von lateral, kaudal beginnend und nach kranial fortschreitend bis auf die Höhe der 12.-13. Rippe. Zum Vermeiden von Artefakten wurde das mit der Pinzette entnommene Gewebe an der Stelle der Pinzettenbranchen mit dem Skalpell entfernt, sodass je Präparat eine Länge von ca. 1-2 cm vorhanden waren. Das Einbetten und Einfrieren erfolgte dann bei allen Geweben auf gleiche Weise: Die halbierten Gehirnhälften wurden mit der Schnittfläche auf den Boden der ausführlich beschrifteten Cryomolds®, die Nerven und das Rückenmark mit dem proximalen bzw. kranialen Ende an das zulaufende, obere Ende der Einbettformen gelegt und dann Luftblasen-frei mit Tissue-Tek® umschlossen. Die mit dem Gewebe und Tissue-Tek® befüllten Einbettformen wurden anschließend im durch Trockeneis gekühlten 2-Methylbutan eingefroren. Nach dem Einfrieren wurden Nerven und Rückenmark aus den Förmchen entnommen und in ebenfalls ausführlich beschrifteten Eppendorf Tubes® gelegt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde das Gewebe bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

2.10 Gewebeverarbeitung

Das in Tissue-Tek® eingebettete und tiefgefrorene Gewebe wurde am Kryostat (Leica) bei einer Kammertemperatur von -20°C geschnitten. Zunächst wurde der Gewebekblock durch weiteres Tissue-Tek® über eine Metallklemme im Kryostat angefroren und befestigt. Die Fläche des nach der Entnahme angeschnittenen Gewebes schimmerte durch die Ausrichtung der Gehirne in den Cryomolds® bereits leicht durch, weshalb diese nach oben zeigend parallel zur Klinge ausgerichtet wurde. Anschließend folgte der Gewebeanschnitt: Für alle Färbungen der Gehirne wurde vom mittleren, angeschnittenen Teil ausgehend zunächst in $10\ \mu\text{m}$ dicken Schnitten das oberflächliche Tissue-Tek® entfernt und der Gewebekblock so eingestellt, dass der Anschnitt nach allen Seiten in gleicher Ebene, dem Mausatlas (Paxinos & Franklin, 2001) entsprechend, erfolgte. Auch die gefrorenen Blöcke der Nerven und des Rückenmarks wurden auf diese Weise eingespannt, wobei jeweils der proximale (Nerv) beziehungsweise kraniale (Rückenmark) Anteil des Gewebes nach oben zeigte und zunächst einige Schnitte verworfen wurden, bis die gesamte Fläche des jeweiligen Gewebes erschien. Abhängig von der jeweiligen Färbung wurde das Gewebe dann in unterschiedlicher Weise geschnitten und aufgenommen. Die Gehirne für die TH^+ -Färbung in der SN wurden von circa $-2,5\ \text{mm}$ bis circa $-3,9\ \text{mm}$ ausgehend vom Bregma in $40\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte in Richtung posterior geschnitten und anschließend in fünf beschrifteten Coulter-Counter Gefäßen mit Anti-Gefrier-Lösung fortlaufend eingelegt. Bei dem Gewebe für die Immunzellfärbungen wurden jeweils vier Gehirnschnitte und zehn bis zwölf Schnitte von Rückenmark und Nerven direkt nach dem Schnitt auf einen Objektträger aufgenommen. Für die Gehirnschnitte wurde die Region von circa $+1\ \text{mm}$ bis $-0,4\ \text{mm}$ vom Bregma auf die Objektträger fortlaufend aufgenommen. Diese Gehirne wurden von posterior des Striatums in Richtung anterior, das Rückenmark von kranial in Richtung kaudal und die Nerven von proximal nach distal geschnitten. Bei unklarer makroskopischer Topographie des Gewebes für die Immunzellfärbungen wurden zwischenzeitlich vereinzelt Schnitte mit Methyleneblau angefärbt und unter dem Mikroskop identifiziert. Zur Markierung und Unterscheidung der Hemisphären wurden feine Kerben mit einer Pinzettenspitze in die rechte Gehirnhälfte gestanzt. Die in den Coulter-Counter Gefäßen beziehungsweise auf den Objektträgern aufgenommenen Gewebeschnitte wurden dann bei -20°C im Gefrierschrank bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Die spätere Färbung der TH^+ -Zellen erfolgte durch die Auswahl eines der fünf Coulter-Counter Gefäße verteilt über die gesamte SN während für jede Immunzellfärbung jeweils ein Objektträger repräsentativ für je ein Areal im anterioren, mittleren und posterioren Striatum

ausgewählt wurde. Tabelle 10 zeigt die analysierten Gehirnregionen im Mausgehirnatlas von Paxinos et al. (Paxinos & Franklin, 2001):

Tabelle 10 Die gefärbten Gehirnregionen, orientiert am Mausgehirnatlas von (Paxinos & Franklin, 2001)

Abbildung im Mausgehirnatlas	Position verglichen zum Bregma	Areal des untersuchten Gewebes im Gehirn
<i>TH⁺- und Nissl-Färbung</i>		
52 bis 63	-2,54 mm bis -3,88 mm	Substantia nigra, pars compacta
<i>Immunzellfärbungen (CD4⁺, CD8⁺, CD45/B220⁺, CD11b⁺)</i>		
23	0,98 mm	Striatum, anteriorer Teil
30	0,14 mm	Striatum, mittlerer Teil
34	-0,34 mm	Striatum, posteriorer Teil

2.11 TH⁺- und Nissl-Färbung in der SN

Die Färbung der TH⁺-Zellen in der SN erfolgte nach dem „free floating“ Prinzip, wobei für jedes Tier eines der fünf Coulter-Counter Gefäße rein zufällig ausgewählt wurde. Jedes dieser beinhaltete circa zehn bis zwölf 40 µm dicke Schnitte, um mit Sicherheit die gesamte Ausdehnung der SNc zu erfassen (Tabelle 10). Der für die Auswertung relevante Teil belief sich später nach Einsicht über das Mikroskop der Ausdehnung der SNc entsprechend auf sechs bis sieben der 40 µm dicken Schnitte (Abbildung 9). Nach der Entnahme aus dem Gefrierschrank wurden die Schnitte in einer mit Aqua dest. gefüllten Glasküvette gewaschen. Die folgenden Schritte erfolgten in einer Nunc™ Zellkultur-Multischale mit sechs Kammern auf dem Wippschüttler, wobei bei jeder Überführung in die nächste Kammer mittels Glasangel die Schnitte gezählt und auf ihre Vollständigkeit geprüft wurden. Zunächst wurden alle Schnitte von der Glasküvette in die mit 0,1M PBS gefüllte Nunc™ Zellkultur-Multischale überführt, um sie somit dreimalig je fünf Minuten zu waschen. Zum Block unspezifischer Bindungen erfolgte eine Inkubation der Schnitte in einer Lösung aus 10% NGS, 2% BSA und 0,5% Triton® X-100 in 0,1M PBS über eine Stunde. Danach wurden die Schnitte in eine Lösung aus 2% NGS, 2%

BSA, 0,5% Triton® X-100 in 0,1M PBS mit dem Erstantikörper (Anti-TH, Abcam AB112) in einer Verdünnung von 1 : 1000 gelegt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Am zweiten Tag erfolgte ein weiterer Waschschrift der Schnitte in 0,1M PBS über dreimal 5 Minuten, gefolgt von der Inkubation mit dem Sekundäantikörper (biotinyliert Ziege anti-Hase, Vector, BA-1000) mit einer Verdünnung von 1 : 100 in derselben Lösung wie bei dem Primäantikörper über zwei Stunden. Nach einem weiteren dreimal 5 Minuten andauernden Waschschrift mit 0,1M PBS wurden die Schnitte mit dem Avidin-Biotin-Komplex (ABC Staining Kit, Ultra Sensitive, Thermo Scientific #32050) für weitere 2 Stunden inkubiert. Dieser bestand abermals aus derselben Lösung wie bei den Antikörper-Schritten, mit je 1,8 µl Avidin und Biotin auf 100 µl Lösung zugesetzt und wurde 30 Minuten vor dem Gebrauch angesetzt. Es erfolgte eine weitere 15-minütige Waschung in 0,1M PBS (3x 5 Minuten), bevor die Schnitte mit einer 3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) Lösung (5 ml Aqua dest., 2 Tropfen Bufferlösung, 4 Tropfen DAB-Lösung, 2 Tropfen H₂O₂-Lösung; Vektor #SK 4100) für 4 Minuten angefärbt wurden. Da es sich bei DAB um eine stark kanzerogene Chemikalie handelt, wurde dieser Schritt unter strengen Sicherheitsvorkehrungen unter dem Abzug, mit doppelten Handschuhen, eigens für das DAB genutzten Glasangeln und Nunc™ Zellkultur-Multischalen sowie mit Einwegartikeln, die ebenso wie die gebrauchte Flüssigkeit in einem gesonderten Müll entsorgt wurden, durchgeführt. Nach einem zweimal fünfminütigen Waschen in Aqua dest. wurden die Schnitte abschließend vorsichtig auf zuvor beschriftete Objektträger mit einem feinen Pinsel aufgezogen und für mindestens eine Stunde getrocknet.

Neben der Färbung der TH⁺-Zellen wurde zusätzlich eine Nissl-Färbung zur unspezifischen Visualisierung von Nervenzellen durchgeführt. Hierzu wurden die getrockneten Objektträger zunächst für 30 Minuten mit der Kresylviolett-Gebrauchslösung inkubiert und anschließend dreimal 5 Minuten in Aqua dest. gewaschen. Es folgte eine aufsteigende Alkoholreihe:

70% - 70% - 70% - 96% - 96% - 100% (je 60 sek) - 100% (35 sek)

Danach wurden die Schnitte für zweimal 5 Minuten in Xylol für das Eindeckeln mit Vitrocloud und Deckgläsern vorbereitet. Bevor die Schnitte analysiert wurden, trockneten sie für mindestens 48 Stunden unter dem Abzug.



Abbildung 9

Übersicht über die ausgewerteten Regionen der SNc in der TH⁺/Nissl Färbung

Der Übersichtlichkeit sind Nachbarstrukturen (insb. Kortexareale) entfernt. Der anterior-posterioren Ausdehnung der SNc entsprechend wurden stets sechs bis sieben Gehirnschnitte für die Auswertung herangezogen.

2.12 Färbung der Immunzellen

Für die immunhistochemische Färbung des Striatums wurden je Färbung und Tier jeweils drei Objektträger entsprechend dem anterioren, mittleren und posterioren Anteil ausgewählt (Tabelle 10), für die Färbung des linken und rechten N. ischiadicus und des Rückenmarks wurde jeweils ein Objektträger pro Färbung und Tier zufällig ausgewählt. Bei den CD4⁺-, CD8⁺- und CD45/B220⁺-Färbungen erfolgten die einzelnen Schritte jeweils mit den gleichen Lösungen. Sie werden deshalb im Folgenden gemeinsam beschrieben. Die Färbung der CD11b⁺-Zellen wurde nach einem anderen Protokoll durchgeführt und wird gesondert beschrieben.

Färbung der CD4⁺-, CD8⁺- und CD45/B220⁺-Zellen

Nach der Entnahme aus dem Gefrierfach wurden die Objektträger für 1-2 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Dann erfolgte die Fixierung für 10 Minuten bei -20°C in Aceton (CD4⁺ und CD8⁺) beziehungsweise für 15 Minuten bei Raumtemperatur in 4% PFA (CD45/B220⁺). Der Schritt des POD-Blocks erfolgte dann nach einem dreimal fünfminütigen Waschschrift mit 0,1M PBS lediglich bei der CD45/B220⁺ Färbung, nicht jedoch bei den CD4⁺- und CD8⁺-Färbungen. Hierzu wurden die Schnitte in einer Lösung aus 1,75 ml H₂O₂ in 100 ml MeOH für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die folgenden Schritte entsprachen dann wieder den drei Färbungen gleichermaßen: Es folgte die Umrandung der Schnitte auf den Objektträgern mit dem PAP Pen und eine dreimal fünfminütige Waschung mit 0,1M PBS. Zum Block wurde eine Lösung aus 5% BSA in 0,1M PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur auf den Schnitten appliziert. Darauffolgend wurden die Antikörper in einer Lösung aus 1% BSA in 0,1M PBS in folgenden Konzentrationen auf das Gewebe gegeben:

Ratte anti-CD4: 1 : 1000

Ratte anti-CD8: 1 : 500

Ratte anti-CD45, B220: 1 : 100

Nach der Inkubation bei 4°C über Nacht wurden die Objektträger mit 0,1M PBS für 15 Minuten (3x 5 min) gewaschen und anschließend für eine Stunde mit dem Zweitantikörper (biotinyliert Hase anti-Ratte, Verdünnung 1 : 100) mit 1% BSA in 0,1M PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte erneut dreimalig für 5 Minuten mit 0,1M PBS gewaschen und danach der Avidin-Biotin-Komplex (Ultra

scientific ABC Kit, Thermo scientific #32050) appliziert. Dieser wurde 30 Minuten zuvor aus 1,8 µl Avidin + 1,8 µl Biotin in 100 ml 0,1M PBS zur Vorinkubation angesetzt. Nach einer weiteren Waschung (0,1M PBS für 3x 5 min) erfolgte die Anfärbung mit DAB unter den oben beschriebenen Sicherheitsvorkehrungen. Analog zur Herstellung der DAB-Lösung bei der TH-Färbung wurden zu 5 ml vorgelegten Aqua dest. 2 Tropfen der Buffer-Lösung (Reagens 1), 4 Tropfen DAB (Reagens 2) und 2 Tropfen der H₂O₂-Lösung (Reagens 3) beigemischt. Das auf diese Weise angesetzte DAB wurde dann mit einer Einweg-Transferpipette direkt auf den Gewebeschnitt appliziert und nach 10 Minuten bei Raumtemperatur mit Aqua dest. in den DAB-Flüssigabfall abgespült und somit entsorgt. Nach zweimal fünfminütiger Waschung der Objektträger in Aqua dest. wurden diese mit Deckglas und Aquatex eingedeckelt und vor der Analyse für mindestens 48 Stunden getrocknet.

Färbung der CD11b⁺-Zellen

Die auf gleiche Weise wie oben beschrieben ausgewählten Objektträger wurden zunächst nach der Entnahme aus dem Gefrierfach für 60 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden sie mit 4% PFA für 8 Minuten bei Raumtemperatur unter dem Abzug fixiert und danach für dreimal 3 Minuten mit 0,1M PBS gewaschen. Nach der Umrandung der Schnitte mit dem PAP Pen erfolgte der Block mit einer Lösung aus 1% BSA und 5% NRS in 0,1M PBS mit zugesetzten 4 Tropfen/ml des Avidin Serums aus dem AB-Blocking Kit (Vector #SP-2001) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Darauf folgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (Ratte anti-CD11b) in einer Konzentration von 1 : 100 in einer Lösung aus 1% BSA und 5% NRS in 0,1M PBS plus 4 Tropfen/ml des Biotin Serums aus dem AB-Blocking Kit (Vector #SP-2001) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Erneut wurden die Schnitte dann mit 0,1M PBS für dreimal 3 Minuten gewaschen. Mit der gleichen Lösung wie beim Erstantikörper aus 1% BSA und 5% NRS in 0,1M PBS wurde danach der Zweitantikörper (biotinyliert Hase anti-Ratte) in einer Verdünnung von 1 : 100 für eine Stunde bei Raumtemperatur zur Inkubation des Gewebes appliziert. Zur Vorbereitung des AB-Komplexes (AB-Komplex Kit, Vector #PK 6100) wurden 2 Tropfen Avidin + 2 Tropfen Biotin in 5 ml 0,1M PBS für 30 Minuten vorinkubiert, bevor die Schnitte wieder in 0,1M PBS für dreimal 3 Minuten gewaschen wurden. Es folgte eine Inkubation der Schnitte für 10 min in 30% H₂O₂ in 0,1M PBS im Verhältnis 1 : 100 und anschließend ein selbiger Waschschrift wie zuvor. Danach wurde das Gewebe mit dem vorinkubierten AB-Komplex für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend ein weiteres Mal für 3 Mal 3 Minuten mit 0,1M PBS

gewaschen. Auch bei dieser Färbung erfolgte der abschließende Färbeschritt mittels DAB unter den erwähnten Sicherheitsvorkehrungen und nach dem gleichen Prinzip wie bei den bereits beschriebenen Immunzellfärbungen. Für die CD11b-Färbung wurde das DAB-Kit (Abcam #ab64238) verwendet. Dieses wurde durch Vorlegen von 1,5 ml des DAB-Substrats mit der Zugabe von 1 Tropfen des DAB-Chromogens angesetzt und nach dem Durchmischen für 3 Minuten auf dem Gewebe appliziert. Nach zweimal fünfminütigem Waschen in Aqua dest. wurden die Objektträger mit Aquatex und Deckgläsern eingedeckelt und ebenfalls für 48 Stunden vor der Analyse getrocknet.

2.13 Analyse der immunhistochemischen Färbungen

2.13.1 Analyse der Immunzellfärbungen

Zur Quantifizierung von T-, B- Zellen und Mikroglia beziehungsweise Makrophagen wurde eine verblindete Zählung der Zellzahl des linken, zur Nervenquetschläsion kontralateralen Striatums, des ipsilateralen Rückenmarks und der Nn. ischiadici beidseits durchgeführt. Für die CD4⁺-, CD8⁺- und CD45/B220⁺ gefärbten Gewebe sowie die CD11b⁺-Färbungen des N. ischiadicus wurde mit dem Mikroskop „BH-2“ (Olympus) der jeweils gesamte Schnitt des Striatums, der Nerven und der Rückenmarkshälfte analysiert, wobei beim Rückenmark graue und weiße Substanz differenziert voneinander ausgezählt wurden. Bei den Gehirnschnitten wurde dabei zunächst die Hemisphäre in einer vierfachen Übersichtsvergrößerung eingestellt. Das zu untersuchende Striatum wurde identifiziert und mit den jeweiligen Abbildungen im Mausgehirn-Atlas abgeglichen (Paxinos & Franklin, 2001) (siehe auch Tabelle 10). Die Zählung erfolgte dann bei oben genanntem Gewebe in 40-facher Vergrößerung. Zur Auszählung der CD11b⁺-Färbung des Striatums und des Rückenmarks wurde das Mikroskop „Axiolab 5“ (Zeiss) mit einem integrierten Zählgitter mit einer Fläche von 0,04 mm² verwendet. Dieses wurde bei den Schnitten zweimalig bei zehnfacher Vergrößerung eingestellt; für das Striatum repräsentativ im oberen und unteren Anteil sowie für das Rückenmark in der grauen und weißen Substanz jeweils einmal. Gezählt wurden dann alle Zellen innerhalb des Gitters bei 63-facher Vergrößerung. Für die in der Auswertung benötigte Fläche wurde von jedem Versuchstier je ein Bild des anterioren, mittleren und posterioren Striatums sowie von linkem und rechtem Nerven und des Rückenmarks mit der Computersoftware „SPOT Imaging 5.2“ über das verbundene Mikroskop „Axioplan 2“ (Zeiss) aufgenommen. Die Fläche der Gewebe wurde dann mit der Software „ImageJ“ (NIH) ausgemessen, um mit dem Ergebnis als Anzahl an Zellen pro mm² die Ergebnisse auswerten zu können.

2.13.2 Analyse der TH⁺/Nissl Färbung

Die Analyse der TH⁺/Nissl Färbung in der SNc beinhaltete sowohl die Zählung der jeweiligen Neurone als auch die Messung derer Volumina, je in der linken Hemisphäre, kontralateral zu den Nervenquetschläsionen. Alle Objektträger wurden des Weiteren vorher durch Abkleben der Beschriftung verblindet. Für die Untersuchung des Gewebes wurde das Programm „Stereo Investigator®“ in der Version 2019.1.3 von der Firma „MicroBrightfield Biosciences“ verwendet. Die Untersuchungseinheit setzte sich aus einem Computer mit Verbindung zu einem Mikroskop (Olympus BX53) und einer daran angeschlossenen Kamera (Insight 4Mp Mosaic 14.2) und einem Bedienelement für die Ausrichtung des Objektträgertischs (ProScan III, MBF) zusammen. Da diese Methode eine etablierte Standardmethode des Labors darstellt, soll an dieser Stelle lediglich auf die für dieses Projekt vorgenommenen Einstellungen eingegangen werden. Die Zählweise erfolgte nach eingehender vorheriger Einarbeitung durch erfahrende Labormitarbeiterinnen, dem Üben mit zuvor ausgezähltem und ausgewertetem Probegewebe aus anderen Projekten des Labors und anhand des Protokolls aus Ip et al., 2017 (Ip, Cheong, & Volkmann, 2017). Folgende Einstellungen wurden vorgenommen: Nach Öffnen des Programms wurde über den Reiter „Probes“ > „Optical Fractionator Workflow“ > „Start a new subject“ ein Projekt, das die Auszählung für je ein Versuchstier beinhaltete, gestartet. Alternativ konnten noch nicht beendete Projekte durch eine Zwischenspeicherung wieder aufgerufen und weitergeführt werden. Durch die Bestätigung mit „OK“ wurden als nächstes die Einstellungen ausgewählt. Die Dicke der Schnitte wurde auf 40 µm und die Schnittintervalle entsprechend der Anzahl von angefertigten Schnittserien auf 5 eingegeben. Es folgte die Einlage des Objektträgers auf den Objektträgertisch und eine zunächst zweifache Vergrößerung des ersten Schnitts, die auch im Programm ausgewählt wurde. Als nächstes wurde die Region der SNc, die zur Analyse herangezogen wurde, mit der linken Maustaste umrandet und mit rechtem Mausklick der Bereich geschlossen. Als Orientierung für die Ausdehnung der SNc diente dabei einerseits der Mausgehirn-Atlas (Paxinos & Franklin, 2001) sowie andererseits die Publikation von Baquet et al. (Baquet, Williams, Brody, & Smeyne, 2009), in denen die Ausweitung der SNc in histologischen Schnitten genauestens abgebildet sind. Anschließend erfolgte der Wechsel auf die 100-fache Vergrößerung an Mikroskop und Computer. Dabei wurde stets Immersionsöl verwendet und die Helligkeit angepasst. Nun wurden der Zählrahmen in X- und Y-Achse auf eine Fläche von 50 µm x 50 µm und das Raster auf eine Fläche von 110 µm x 110 µm festgelegt. In der Z-Achse wurde zum Ausschluss der Einbeziehung von Schnittartefakten eine Grenzzone auf 2

µm ober- und unterhalb der Schnittoberfläche definiert. Die tatsächliche Schichtdicke, in der ein Schnitt als scharfes Bild erscheint und die zur stereologischen Analyse herangezogen wurde, wurde auf 16 µm festgelegt. Nach Speichern der Einstellungen, welche standardmäßig für alle zu untersuchenden Gewebeschnitte angewandt wurden, wurde über die Option „Probes“ > „Nucleator“ > „Isotopic 4 Rays“ noch zusätzlich die Volumenmessung aktiviert. Dadurch erscheint vom Zentrum der Markierung der Zelle ausgehend strahlenförmig ein Kreuz aus vier Linien im Winkel von je 90° zueinander. Anhand der Schnittstelle der Linien mit dem Rand der Zelle wurde dann das Volumen der Zelle markiert und durch das Programm berechnet (Abbildung 10). Dieses Vorgehen wurde anhand zweier verschiedener Marker durch Linksklick und durch Klick auf das Mausrad für die gefärbten Nissl⁺- sowie die TH⁺-Zellen durchgeführt. Nach Abschluss der Zählung eines Schnittes wurde über die Option „Add new Section“ ein weiterer Schnitt hinzugefügt. Da die Ausdehnung der SNc eine Größe von 1,34 mm in rostro-kaudaler Richtung hat und in 5 Serien von einer Schichtdicke von 40 µm geschnitten wurde, wurden somit pro Tier 6-7 Schnitte einer SNc ausgezählt (Paxinos & Franklin, 2001) (vergleiche: Abbildung 9). Nach Zählen des letzten Schnittes eines Tieres wurde die Analyse beendet und die Ergebnisse der Zählung in Excel exportiert. Für die Berücksichtigung systematischer Abweichungen innerhalb der stereologischen Methodik und damit einer Erzielung valider Ergebnisse wurde dabei zugleich der Fehlerkoeffizient nach Gundersen berechnet. Lag dieser unter 0,1, wurde das Versuchstier in die Auswertung mit einbezogen. Abschließend wurden die Ergebnisse der Volumenmessung über „Display Probe Run List“ > Auswahl der „Nucleator“ > „Export to excel“ angezeigt und abgespeichert.

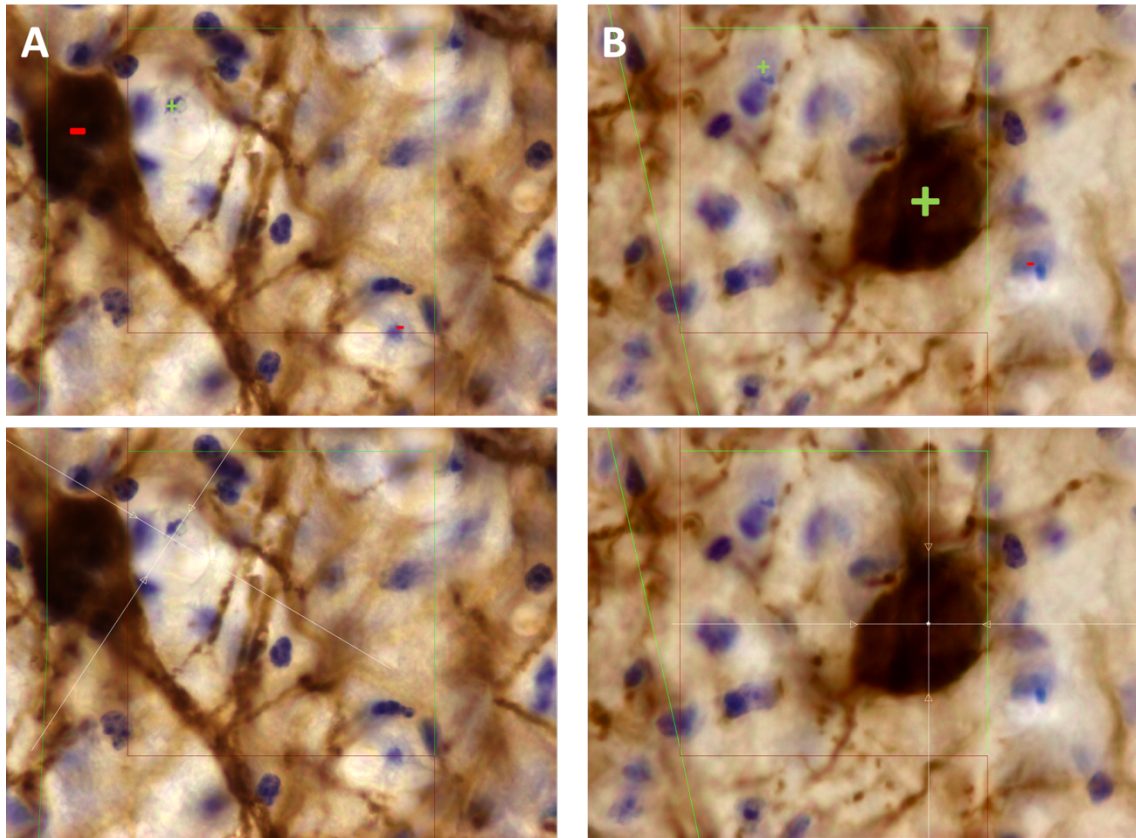


Abbildung 10

Stereologische Analyse der TH⁺/Nissl-Färbung

Gezeigt wird die Zählweise der TH⁺- und Nissl-Zellen sowie deren Volumenbestimmung mittels des Programms „Stereoinvestigator“. Die Zellen wurden nur gezählt, sofern sie in X-, Y- und Z-Achse im so genannten optischen Disektor lagen. Bei Touchieren der roten Begrenzung an der linken und unteren Seite des Quaders werden Zellen nicht gezählt. Zudem muss ein scharfes Bild der Zelle in der Z-Achse zu liegen kommen, um in die Analyse einbezogen zu werden. **A** zeigt hierfür eine TH-Zelle, die außerhalb dieser Begrenzung liegt (-), sowie eine Nissl-Zelle innerhalb des Zählrasters (+). In **B** sind eine Nissl- und eine TH⁺-Zelle innerhalb des Rasters abgebildet, die somit gezählt werden (+). Eine weitere, außerhalb liegende Nissl-Zelle ist ebenfalls zu erkennen (-). Die Volumenbestimmungen der TH⁺- und Nissl-Zellen sind im jeweils unteren Bild dargestellt.

2.14 Statistische Auswertung

Zur selbstständig angefertigten statistischen Auswertung wurde das Programm „GraphPad Prism“ in den Versionen 7 und 9 verwendet. Für jede Auswertung standen die vier Versuchsgruppen zum Vergleich: wt naiv, wt mit Nervenquetschung, DYT1KI naiv und DYT1KI mit Nervenquetschung. Zunächst wurden die zu analysierenden Werte anhand eines Quantil-Quantil-Diagramms (QQ-Plot) auf ihre Normalverteilung getestet. Im Falle einer Normalverteilung und einem Vergleich von mehr als 2 Gruppen, wurde die Varianz anhand der einfachen ANOVA mit einem post-hoc Tukey-Test untersucht. Nicht-normalverteilte Daten wurden anhand des Kruskal-Wallis-Tests mit einem post-hoc Dunn-Test verglichen. Der Mann-Whitney Test wurde für den Vergleich von 2 Gruppen und nicht-normalverteilten Daten eingesetzt. Im Falle von Daten mit multiplen

Zeitpunkten erfolgte eine Bonferroni-Holm Korrektur (§). Als signifikant wurden die folgenden p-Werte gewertet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Die Abbildungen im Folgenden repräsentieren die Mittelwerte und deren Standardfehler (SEM).

3 Ergebnisse

3.1 Auswirkungen der Nervenquetschung auf Bewegungsmuster im TST

3.1.1 Das neuronale Netzwerk

Zur Analyse möglicher Dystonie-ähnlicher Bewegungen wurde anhand von TST-Videos unterschiedlicher Projekte mit dem Programm DeepLabCut ein neuronales Netzwerk trainiert und auf die auszuwertenden Videos für eine automatisierte Verhaltensanalyse angewandt. Bei der 19. und damit letzten Iteration wurde das Netzwerk mit einer Wahrscheinlichkeitsschwelle der Markierungen von 0,6 und einem für das Training genutzten Anteil an Bildern von 80% trainiert. 20% der Bilder wurden demnach für die Kalkulation des Testfehlers in der Evaluation genutzt. Diese ergab abschließend einen Trainingsfehler von 2,79 Pixel und einen Testfehler von 9,66 Pixel. Bei einer Länge einer Maus von durchschnittlich 650 Pixel, was circa 9 cm entspricht, ergibt sich damit eine Distanz von circa 0,014 cm pro Pixel. Der Trainingsfehler entspricht somit ca. 0,04 cm und der Testfehler ca. 0,14 cm, welches als akzeptable Größen angesehen wurde, um eine aussagekräftige Analyse der Bewegungen zu ermöglichen.

3.1.2 DYT1KI Tiere entwickeln signifikant mehr Dystonie-ähnliche Bewegungen im TST als wt Tiere

Für alle Videos, die zur Auswertung herangezogen wurden, galten dieselben vorherig definierten Korrelationsparameter (vgl. Kapitel 2.8.2). Für die Auswertung wurden die registrierten Verkrampfungen als Dystonie-ähnliche Bewegungen („dystonia-like movements“ = DLM) der rechten Hinterbeine und -pfoten pro Minute gewertet (Abbildung 11). Bei den beiden Gruppen ohne Nervenquetschung konnten keine signifikanten Veränderungen der DLM über den gesamten Versuchszeitraum festgestellt werden. Diese lagen zwischen $5,41 \pm 2,57$ (DYT1KI in Woche 4) und $1,32 \pm 0,9$ (DYT1KI in Woche 11) DLM pro Minute. Nach der Nervenquetschung in Woche 1 nach Versuchsbeginn entwickelten die DYT1KI und wt Tiere in Woche 2 mehr DLM pro Minute als im naiven Zustand. Die Anzahl der DLM pro Minute schwankte bis Woche 5 bei DYT1KI Tieren nach der Quetschung zwischen $19,32 \pm 2,18$ (Woche 2) und $16,84 \pm 2,2$ DLM pro Minute (Woche 5) und bei den wt Tieren postoperativ zwischen $17,82 \pm 2,15$ (Woche 2) und $12,84 \pm 3,68$ DLM pro Minute (Woche 4). Nach den Zählungen in Woche 5 war ein Abfall beider Gruppen mit Nervenquetschung in Woche 6 erkennbar (DYT1KI: $10,66 \pm 1,34$ DLM/min; wt: $6,45 \pm 1,07$ DLM/min). Nach Woche 7 nahmen die registrierten DLM bei der wt Kohorte mit Nervenquetschung ($8,08 \pm 2,98$ DLM/min)

kontinuierlich ab, bis sie in Woche 10 ($3,9 \pm 0,94$ DLM/min) wieder den Zustand vor der Quetschung sowie den der naiven Tiere erreichten. Bei der DYT1KI Kohorte mit Nervenquetschung hielt die Anzahl an registrierten DLM pro Minute weiterhin an. Eine signifikant höhere Anzahl an DLM pro Minute wurde dann bei der DYT1KI Gruppe in Woche 10 ($11,53 \pm 1,17$ DLM/min) verglichen mit den wt Tieren ($3,9 \pm 0,94$ DLM/min; $p < 0,001$) festgestellt. Sowohl in Woche 11 als auch zum Abschluss der Versuchsreihe in Woche 12 wiesen DYT1KI Tiere mit Nervenquetschung (Woche 11: $15,67 \pm 1,79$ DLM/min und Woche 12: $13,24 \pm 2,02$ DLM/min) signifikant mehr DLM als die wt Kohorte mit Nervenquetschung (Woche 11: $6,14 \pm 1,6$; $p < 0,01$ und Woche 12: $2,93 \pm 1,28$; $p < 0,001$) auf.

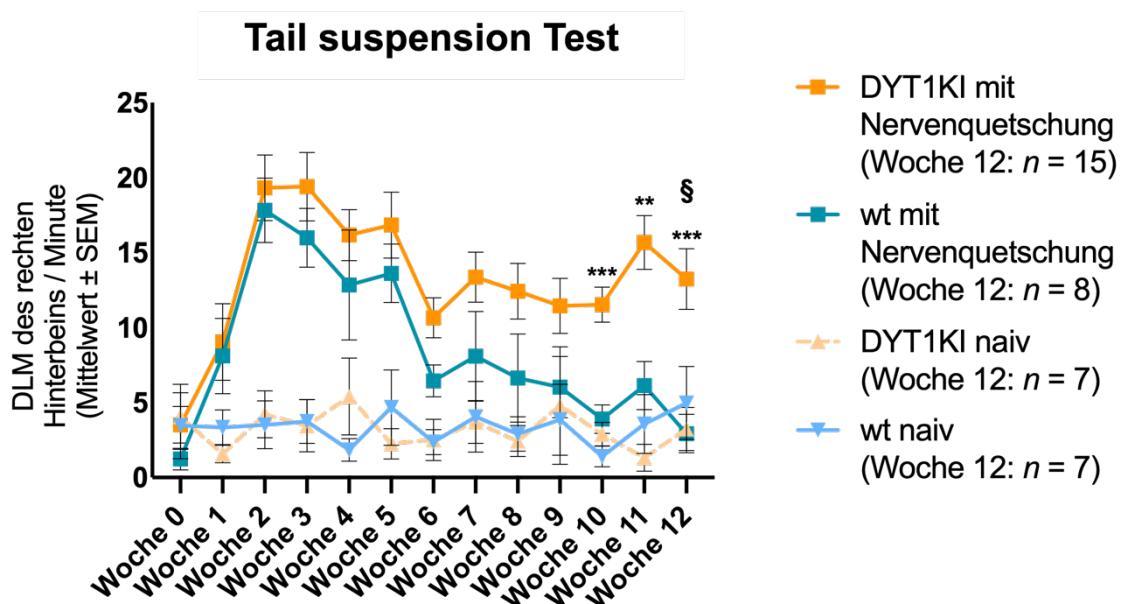


Abbildung 11

Anzahl der Dystonie-ähnlichen Bewegungen im TST

Dargestellt sind die durch die Auswertungssoftware registrierten DLM der rechten Hinterbeine und -pfoten bei wt (naiv: $n = 7$, hellblau; mit Nervenquetschung: $n = 8$, dunkelblau) und DYT1KI Kohorten (naiv: $n = 7$, gelb; mit Nervenquetschung: $n = 15$, orange) über den Versuchszeitraum von 12 Wochen. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM, die statistische Analyse wurde mittels Mann-Whitney Test gefolgt von einer Bonferroni-Holm Korrektur (§) durchgeführt. Signifikante p-Werte: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ für die DYT1KI Gruppe mit Nervenquetschung verglichen mit der wt Kohorte mit Nervenquetschung. Weitere Signifikanzen sind der Übersichtlichkeit halber nicht aufgeführt. Es wurden keine signifikanten Änderungen zwischen DYT1KI und wt naiven Tieren festgestellt.

3.2 Auswirkungen der Nervenquetschung auf die Funktion des N. ischiadicus

Zur Differenzierung, ob die beobachteten Dystonie-ähnlichen Bewegungen zwischen den Versuchsgruppen durch einen Unterschied in der nervalen Restitution nach der peripheren Nervenschädigung entstanden, wurden Messungen der CMAP und NCV mittels Elektroneurographien der Nn. ischiadici durchgeführt. Die Ergebnisse dieser

elektrophysiologischen Messungen weisen auf keine signifikanten Unterschiede in der Regeneration der Nerven zwischen wt und DYT1KI Kohorte nach der Quetschläsion hin. Zum Vergleich wurden an nicht-gequetschten Nn. ischiadici die Parameter gemessen, die eine intakte Nervenleitung repräsentieren (Abbildung 12A). Anhand des ausbleibenden Signals über der ableitenden Elektrode in der proximalen Stimulation wurde in beiden Gruppen dahingegen unmittelbar nach der Quetschläsion ein Leitungsblock im gequetschten Teil des rechten Nervs festgestellt, während das distale CMAP unverändert abgeleitet werden konnte (Abbildung 12B). Somit wurde bestätigt, dass durch die Quetschung eine funktionelle Unterbrechung des Nervens hervorgerufen wurde. In der zweiten Messreihe, 10 Wochen postoperativ, konnten dahingegen wieder Signale abgeleitet werden. Anhand einer Erhöhung der Stromstärke, einer Verkleinerung der Amplitude und einer Verbreiterung des Potenzials der CMAP der distalen Stimulation konnte jedoch in beiden Gruppen gezeigt werden, dass durch eine erst partielle Regeneration die Funktion des Nervens weiterhin leichtgradig eingeschränkt war (Abbildung 12C). Die NCV zeigte dabei 10 Wochen postoperativ eine signifikante Reduktion bei der wt Kohorte im rechten, gequetschten Nerven ($26,21 \pm 1,96$ m/s) verglichen mit den kontralateralen Nerven derselben Kohorte ($35,67 \pm 0,81$ m/s; $p < 0,01$) und den linken Nerven der DYT1KI Gruppe ($36,07 \pm 1,16$ m/s; $p < 0,01$). Im rechten Nerven der DYT1KI Tiere mit Nervenquetschung ($27,23 \pm 2,84$ m/s) wurde ebenfalls eine signifikante Verringerung der NCV verglichen mit der kontralateralen Seite ($36,07 \pm 1,16$ m/s; $p < 0,05$) und dem ebenfalls linken Nerven der wt Tiere ($35,67 \pm 0,81$ m/s; $p < 0,05$) festgestellt (Abbildung 12D). Zusätzlich war das CMAP der distalen Stimulation im rechten Nerven der wt Gruppe mit Nervenquetschung ($11,28 \pm 0,77$ mV) nach der Quetschung gegenüber den linken, naiven Nerven in wt ($15,24 \pm 0,85$ mV; $p < 0,05$) und DYT1KI Kohorte ($15,90 \pm 1,11$ mV; $p < 0,01$) signifikant verringert (Abbildung 12E). Im Vergleich der proximalen Stimulation war eine signifikante Verringerung des CMAPs des rechten Nervs der wt Gruppe mit Nervenquetschung ($8,87 \pm 0,81$ mV) zum linken Nerven der wt ($12,76 \pm 0,65$ mV; $p < 0,05$) und der DYT1KI Gruppe ($12,26 \pm 1,09$ mV; $p < 0,05$) festzustellen (Abbildung 12F).

3 Ergebnisse

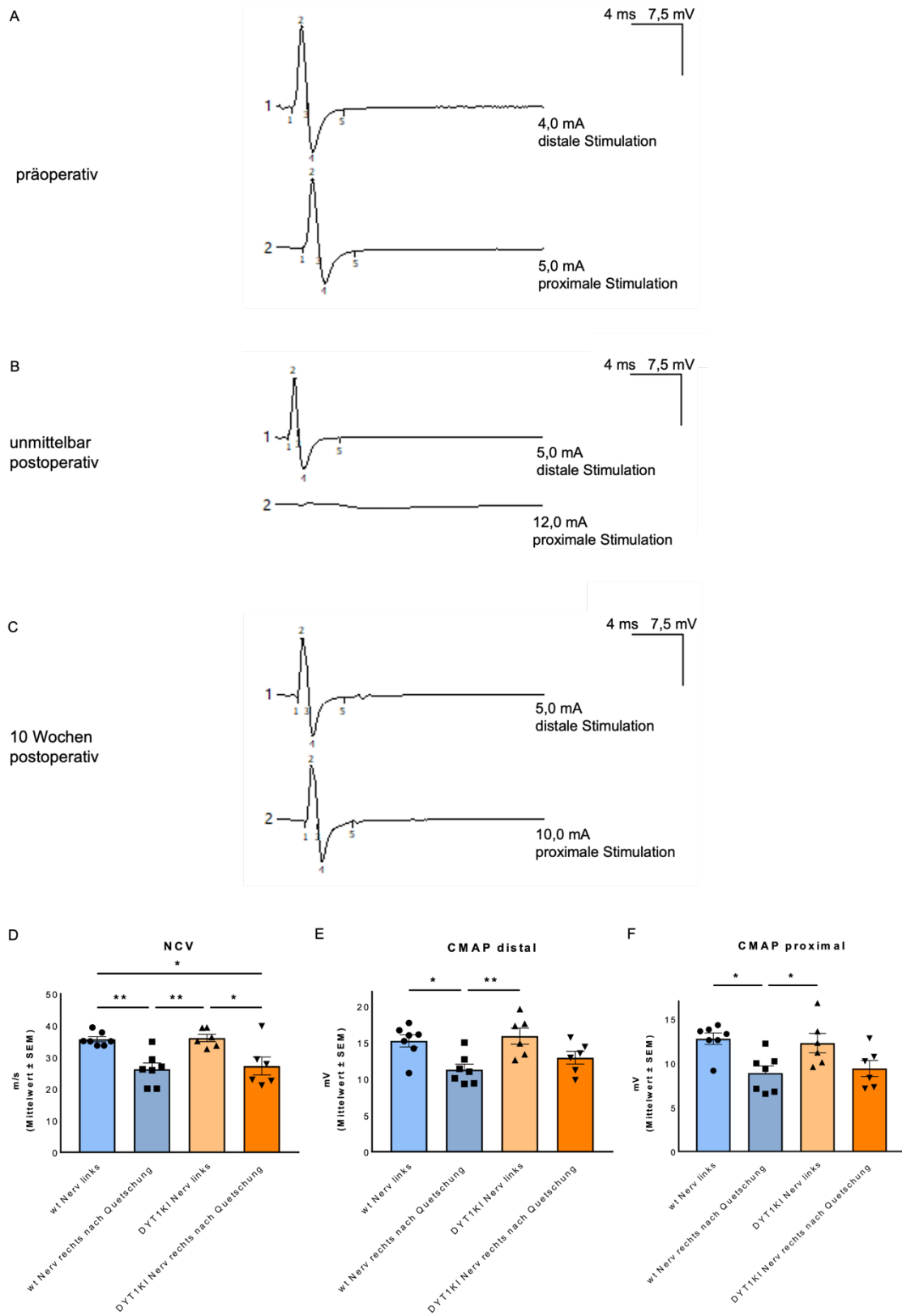


Abbildung 12 Nervenregeneration in den elektroneurographischen Messungen
Dargestellt werden die Ergebnisse der elektroneurographischen Messungen. **A** zeigt eine distale und proximale CMAP eines nicht-gequetschten N. ischiadicus präoperativ. Dahingegen konnte unmittelbar nach der Nervenquetschung über der proximalen Stimulation kein Signal mehr abgeleitet und somit ein so genannter Leitungsblock nachgewiesen werden (**B**). 10 Wochen postoperativ ließ sich bei erhöhter Stromstärke (10 mA statt zuvor 5 mA) wiederum ein Signal ableiten (**C**). Weiterhin sind die NCV (**D**) sowie die distalen und proximalen CMAPs (**E**, **F**) naiver, linker Nerven von wt ($n=7$) und DYT1KI ($n=6$) Mäusen und den jeweilig rechten, gequetschten Nerven von wt ($n=7$) und DYT1KI Kohorten ($n=6$) zum Zeitpunkt 10 Wochen postoperativ abgebildet. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM, die statistische Analyse wurde mittels einfacher ANOVA gefolgt von einem post-hoc Tukey-Test durchgeführt. Signifikante p-Werte: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3.3 Auswirkungen der Nervenquetschung auf die Immunreaktion in PNS und ZNS

3.3.1 Keine erhöhte Immunreaktion nach Quetschläsion im Striatum

Im Striatum der zur Nervenquetschung kontralateralen, linken Hemisphäre konnten keine signifikanten Unterschiede in den Färbungen für CD4⁺-, CD8⁺-, CD45/B220⁺- sowie für CD11b⁺-Zellen festgestellt werden (Abbildung 13 A-H).

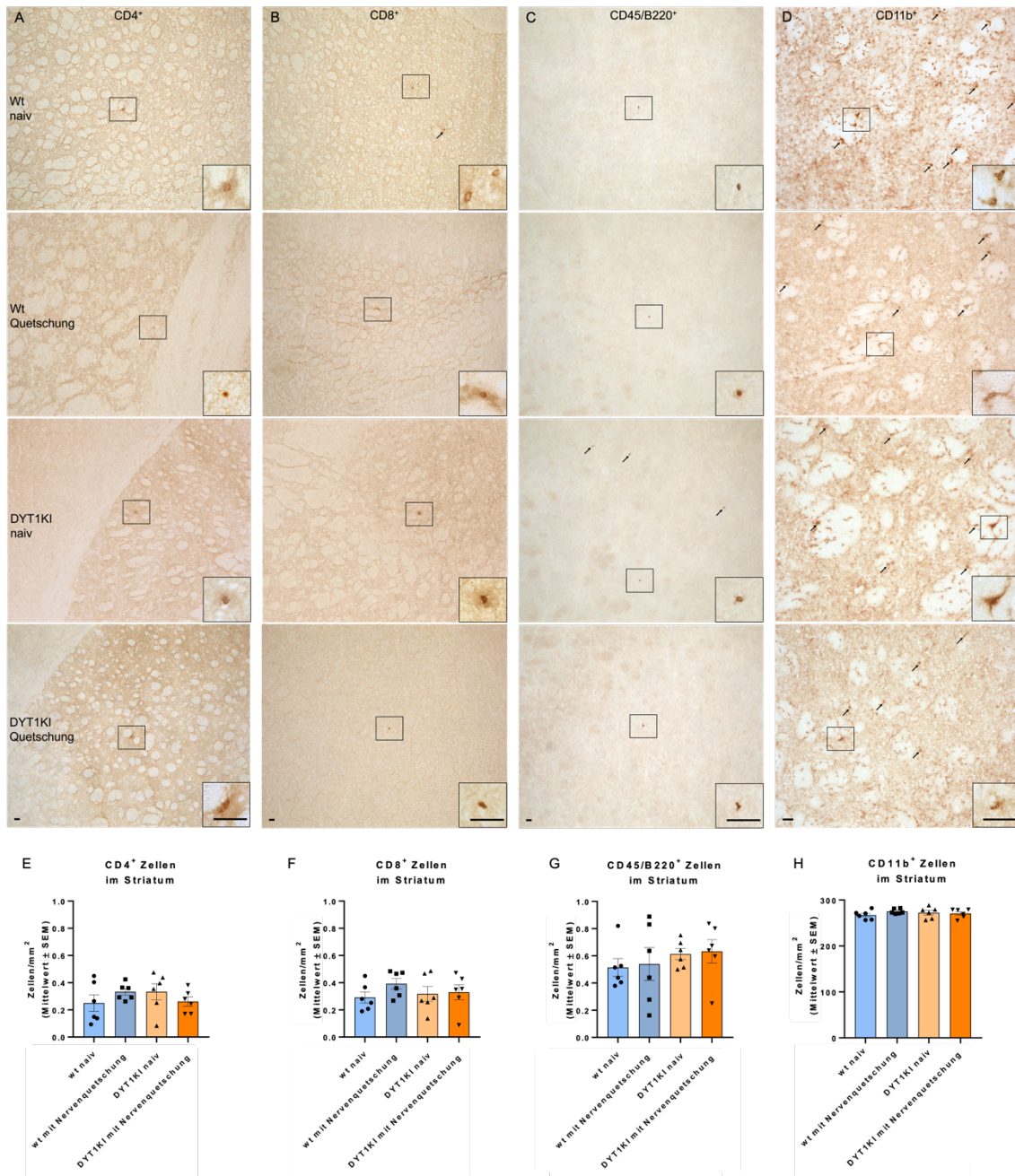


Abbildung 13

Anzahl der Immunzellen im Striatum

A – D zeigen repräsentative Bilder des zur Nervenquetschung kontralateralen Striatums der CD4⁺- (A), CD8⁺- (B), CD45/B220⁺- (C) und CD11b⁺- (D) Färbungen von allen vier Versuchskohorten mit Vergrößerung ausgewählter Zellen im Kasten am rechten unteren Rand des jeweiligen Bildes. Der Maßstab in A – C gibt 50 µm an, in D 25 µm. E – H zeigen die Ergebnisse der Zählungen von CD4⁺- (E), CD8⁺- (F), CD45/B220⁺- (G) und CD11b⁺- (H) Zellen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Immunzellen im linken Striatum zwischen den Kohorten (je n=6) festgestellt werden. Angegeben sind Mittelwerte ± SEM, die statistische Analyse wurde mittels einfacher ANOVA gefolgt von einem post-hoc Tukey-Test durchgeführt.

3.3.2 Geringe Erhöhungen an Immunzellen im Rückenmark nach Nervenquetschung

Die Anzahlen an Immunzellen im Rückenmark weisen auf leichte bis signifikante Unterschiede zwischen den Kohorten mit Nervenquetschung verglichen mit jenen ohne hin (Abbildung 14 A-D).

Bei der Auszählung der zur Nervenquetschläsion ipsilateralen, *grauen Substanz des Rückenmarks* zeigte sich eine signifikante Erhöhung bei den CD4⁺ Zellen der wt Kohorte mit Quetschung ($0,46 \pm 0,08$ Zellen/mm²), verglichen mit den wt Tieren ohne Nervenquetschung ($0,20 \pm 0,06$ Zellen/mm²; $p < 0,05$) (Abbildung 14 E). Bei den DYT1KI Tieren mit Nervenquetschung zeigte sich ein milder, nicht-signifikanter Anstieg der CD4⁺ Zellen im Vergleich zu den naiven DYT1KI Tieren. Es konnte kein Unterschied in der Anzahl von CD8⁺ T-Zellen und von CD45/B220⁺ Zellen zwischen den verschiedenen Gruppen gefunden werden (Abbildung 14 F, G). Signifikant erhöht stellten sich CD11b⁺ Zellen zwischen den DYT1KI Gruppen (mit Nervenquetschung: $392,50 \pm 7,08$ Zellen/mm², naiv: $334,60 \pm 15,29$ Zellen/mm²; $p < 0,05$) dar (Abbildung 14 H). Zwischen den wt Gruppen mit und ohne Nervenquetschung fand sich ebenfalls ein Anstieg der CD11b⁺ Zellen, wenn auch dies nicht signifikant war.

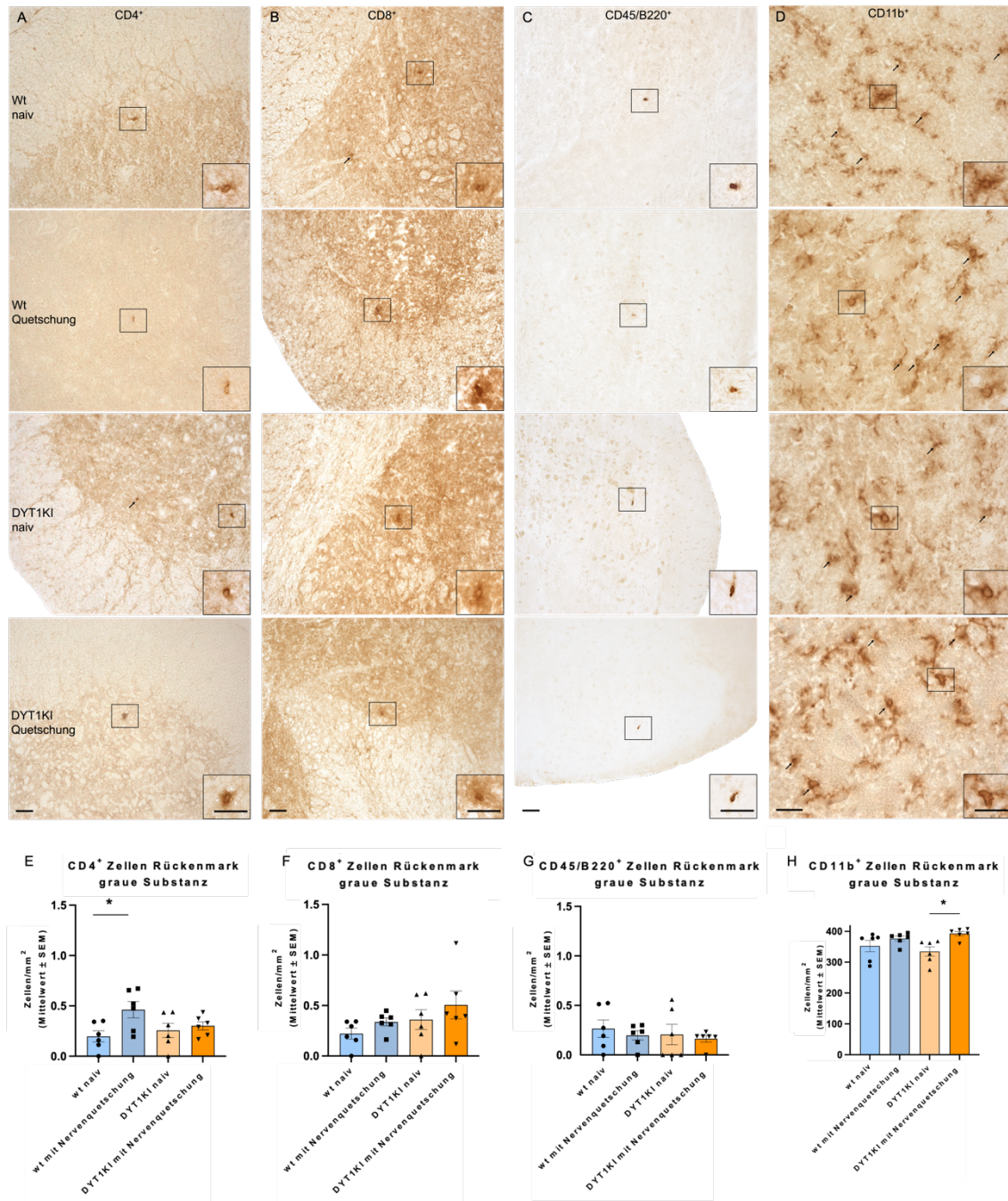


Abbildung 14

Anzahl der Immunzellen im Rückenmark (graue Substanz)

A – D zeigen repräsentative Bilder der zur Nervenquetschung ipsilateralen, grauen Substanz des Rückenmarks der CD4⁺- (A), CD8⁺- (B), CD45/B220⁺- (C) und CD11b⁺- (D) Färbungen von allen vier Versuchskohorten mit Vergrößerung ausgewählter Zellen im Kasten am rechten unteren Rand des jeweiligen Bildes. Der Maßstab in A – C gibt 50 µm an, in D 25 µm. E – H zeigen die Ergebnisse der Zählungen von CD4⁺- (E), CD8⁺- (F), CD45/B220⁺- (G) und CD11b⁺- (H) Zellen. Die Auszählung der Immunzellen im rechten Rückenmark (graue Substanz) ergaben leichte bis signifikante Unterschiede zwischen den Kohorten (je n=6). Angegeben sind Mittelwerte ± SEM, die statistische Analyse wurde mittels einfacher ANOVA mit post-hoc Tukey-Test durchgeführt. Signifikante p-Werte: * p < 0,05.

Es erfolgte darüber hinaus eine Analyse der Immunzellen in der rechtsseitigen, *weißen Substanz des Rückenmarks* (Abbildung 15 A-D). Dort zeigte sich eine milde, nicht signifikante Erhöhung der CD4⁺ T-Zellen in den wt Tieren und den DYT1KI Tieren mit Nervenquetschung im Vergleich zu den jeweiligen naiven Gruppen (Abbildung 15 E). Die Analyse der Anzahl an CD8⁺ T-Zellen und CD45/B220⁺ B-Zellen zeigten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen (Abbildung 15 F, G). Es konnte jedoch eine signifikant höhere Anzahl an CD11b⁺-Zellen bei den DYT1KI Tieren mit Quetschung ($391,90 \pm 9,58$ Zellen/mm²) im Vergleich zu den naiven DYT1KI Tieren ($319,90 \pm 15,40$ Zellen/mm²; $p < 0,01$) festgestellt werden. Darüber hinaus war eine leichte Erhöhung an CD11b⁺-Zellen bei den wt Tieren mit Quetschung verglichen mit den naiven wt Tieren festzustellen (Abbildung 15 H).

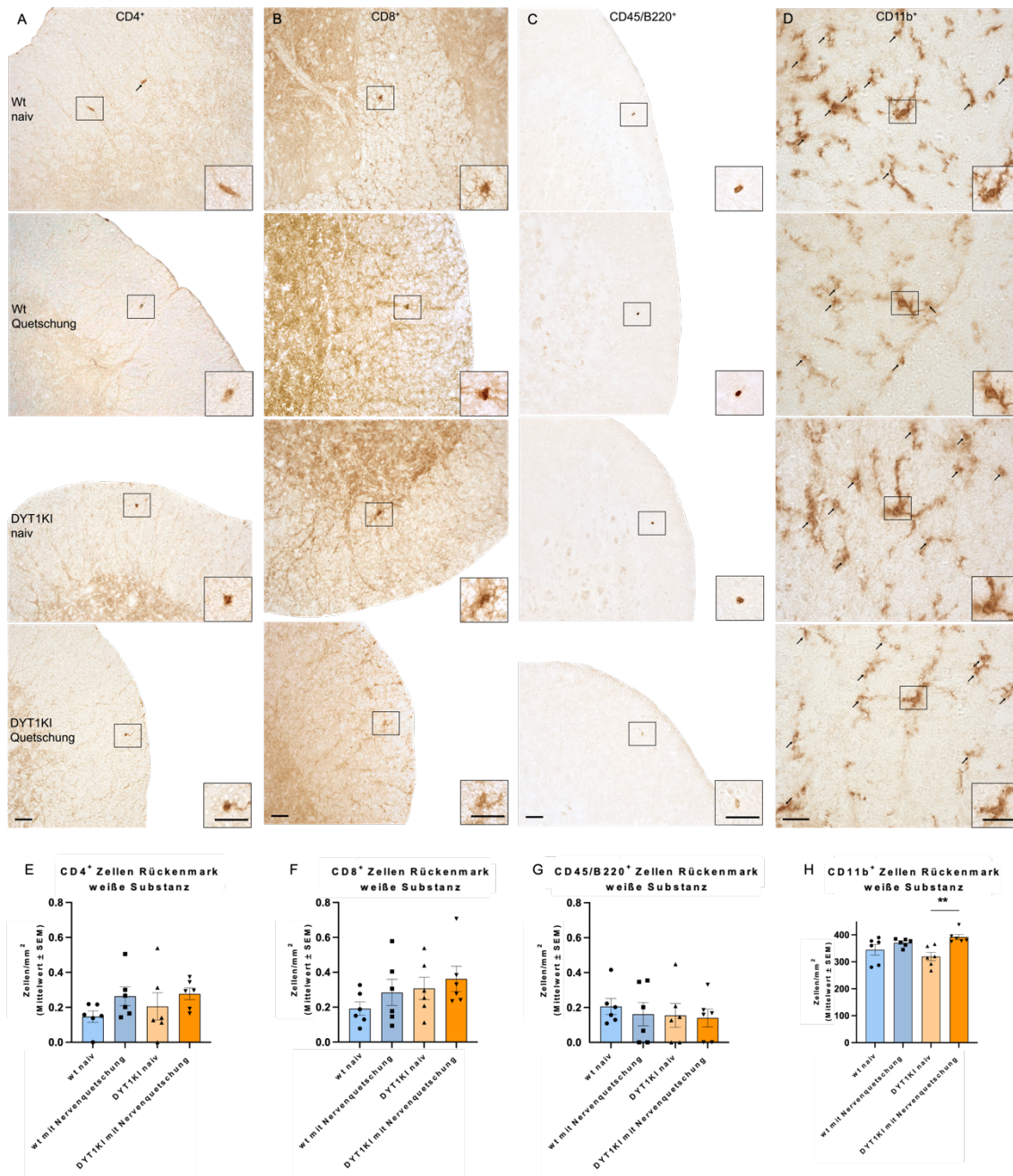


Abbildung 15

Anzahl der Immunzellen im Rückenmark (weiße Substanz)

A – D zeigen repräsentative Bilder der zur Nervenquetschung ipsilateralen weißen Substanz des Rückenmarks der CD4⁺- (**A**), CD8⁺- (**B**), CD45/B220⁺- (**C**) und CD11b⁺- (**D**) Färbungen von allen vier Versuchskohorten mit Vergrößerung ausgewählter Zellen im Kasten am rechten unteren Rand des jeweiligen Bildes. Der Maßstab in **A – C** gibt 50 µm an, in **D** 25 µm. **E – H** zeigen die Ergebnisse der Zählungen von CD4⁺- (**E**), CD8⁺- (**F**), CD45/B220⁺- (**G**) und CD11b⁺- (**H**) Zellen. Die Auszählung der Immunzellen in der weißen Substanz des rechten Rückenmarks ergaben leichte bis signifikante Unterschiede zwischen den Kohorten mit Quetschung, verglichen mit jenen ohne (je *n*=6). Angegeben sind Mittelwerte ± SEM, die statistische Analyse wurde mittels einfacher ANOVA mit post-hoc Tukey-Test durchgeführt. Signifikante p-Werte: ** *p* < 0,01.

3.3.3 Erhöhung der Immunzellen im N. ischiadicus nach Quetschläsion

Bei keiner der Immunzellfärbungen der *linken Nn. ischiadici* konnten signifikante Unterschiede in der Anzahl der untersuchten Immunzellen festgestellt werden (Abbildung 16 A-H). Auffälligkeiten zeigten sich jedoch bei der Untersuchung der Immunzellen in den *rechten Nn. Ischiadici* (Abbildung 17 A-D). Die CD4⁺ Zellen in den *rechten Nn. ischiadici* waren bei den DYT1KI Tieren mit Nervenquetschung ($6,62 \pm 1,01$ Zellen/mm²) verglichen mit der naiven DYT1KI ($1,59 \pm 0,53$ Zellen/mm²; $p < 0,05$) und wt naiven ($0,98 \pm 0,39$ Zellen/mm²; $p < 0,01$) Gruppe signifikant erhöht (Abbildung 17 E). Ebenfalls erhöht, wenn auch nicht signifikant, waren die Anzahlen an CD4⁺ Zellen in der wt Gruppe mit Nervenquetschung im Vergleich zu den naiven Gruppen. Bei der CD8-Färbung stellte sich in den rechten Nerven eine signifikante Erhöhung der Zellen in den Gruppen DYT1KI mit Quetschung ($4,21 \pm 0,46$ Zellen/mm²) verglichen mit DYT1KI naiv ($1,08 \pm 0,43$ Zellen/mm²; $p < 0,05$) und wt naiv ($1,01 \pm 0,38$ Zellen/mm²; $p < 0,05$) dar (Abbildung 17 F). Auch die wt Gruppe mit Nervenquetschung ($4,50 \pm 0,69$ Zellen/mm²) wies signifikant erhöhte Anzahlen an CD8⁺ Zellen verglichen mit den Tieren der DYT1KI naiven Gruppe ($1,08 \pm 0,43$ Zellen/mm²; $p < 0,05$) und den wt naiven Tieren ($1,01 \pm 0,38$ Zellen/mm²; $p < 0,05$) auf. Darüber hinaus zeigte sich bei der CD45/B220-Färbung im rechten Nerven lediglich eine leichte, nicht signifikant erhöhte Anzahl an Zellen bei den Gruppen der Nervenquetschung (Abbildung 17 G). Die CD11b-Färbung zeigte eine signifikant erhöhte Anzahl an Makrophagen im rechten Nerven der DYT1KI Gruppe mit Nervenquetschung ($188,50 \pm 14,25$ Zellen/mm²) im Vergleich zur DYT1KI naiven Gruppe ($117,50 \pm 4,40$ Zellen/mm²; $p < 0,05$) (Abbildung 17 H). Ebenfalls leicht, aber nicht signifikant erhöht stellten sich die Werte der CD11b⁺ Zellen der beiden Gruppen mit Nervenquetschung verglichen mit der wt naiven Gruppe sowie die wt Kohorte mit Quetschung verglichen mit der DYT1KI naiven Versuchsgruppe dar.

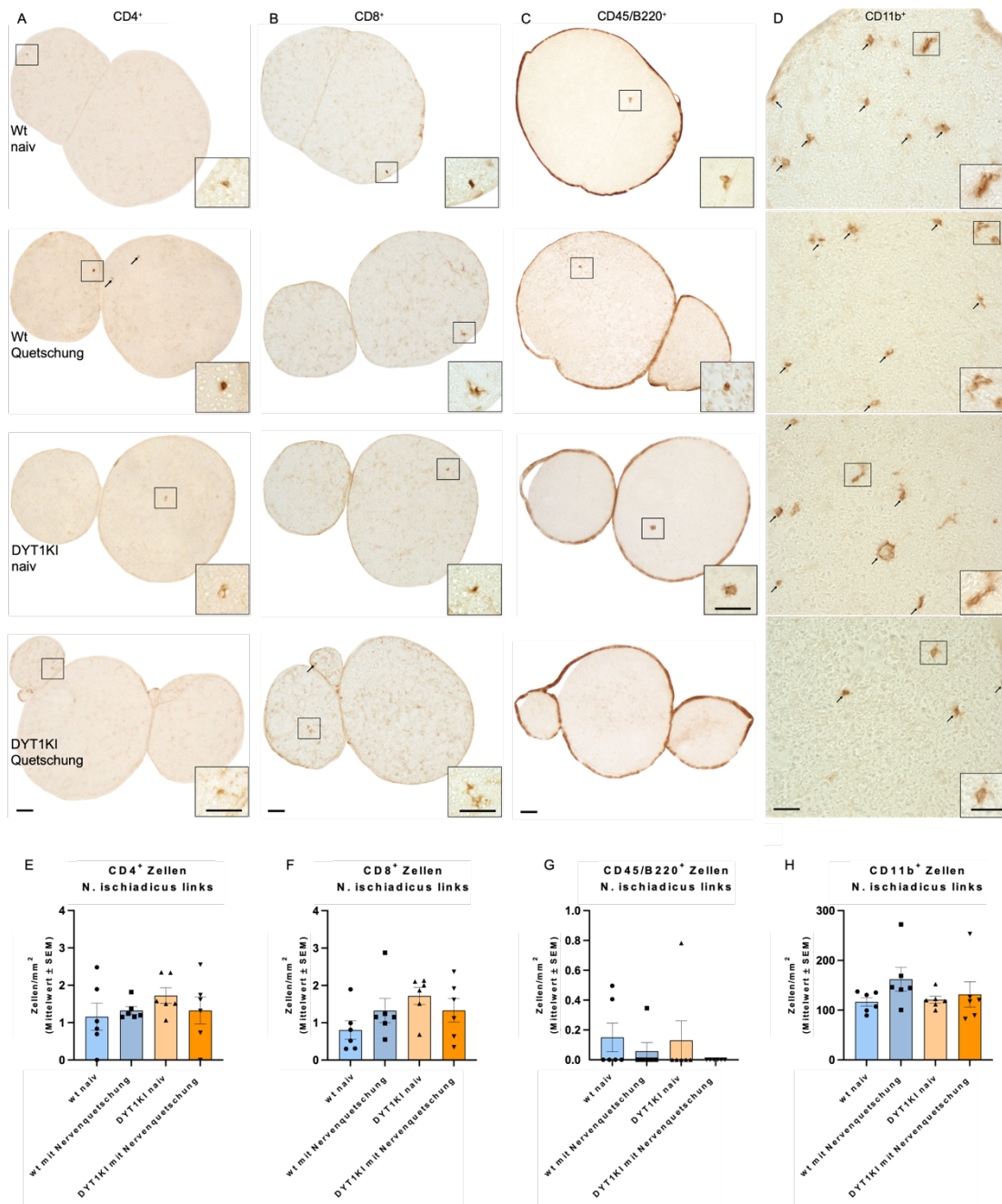


Abbildung 16

Anzahl der Immunzellen im linken N. ischiadicus

A – D zeigen repräsentative Bilder der linken Nn. ischiadici der CD4⁺- (A), CD8⁺- (B), CD45/B220⁺- (C) und CD11b⁺- (D) Färbungen von allen vier Versuchskohorten mit Vergrößerung ausgewählter Zellen im Kasten am rechten unteren Rand des jeweiligen Bildes. Der Maßstab in A – C gibt 50 µm an, in D 25 µm. E – H zeigen die Ergebnisse der Zählungen von CD4⁺- (E), CD8⁺- (F), CD45/B220⁺- (G) und CD11b⁺- (H) Zellen. Die Auszählung der Immunzellen im linken N. ischiadicus ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten (je n=6). Angegeben sind Mittelwerte ± SEM, die statistische Analyse wurde mittels Kruskal-Wallis-Test gefolgt von einem post-hoc Dunn Test durchgeführt.

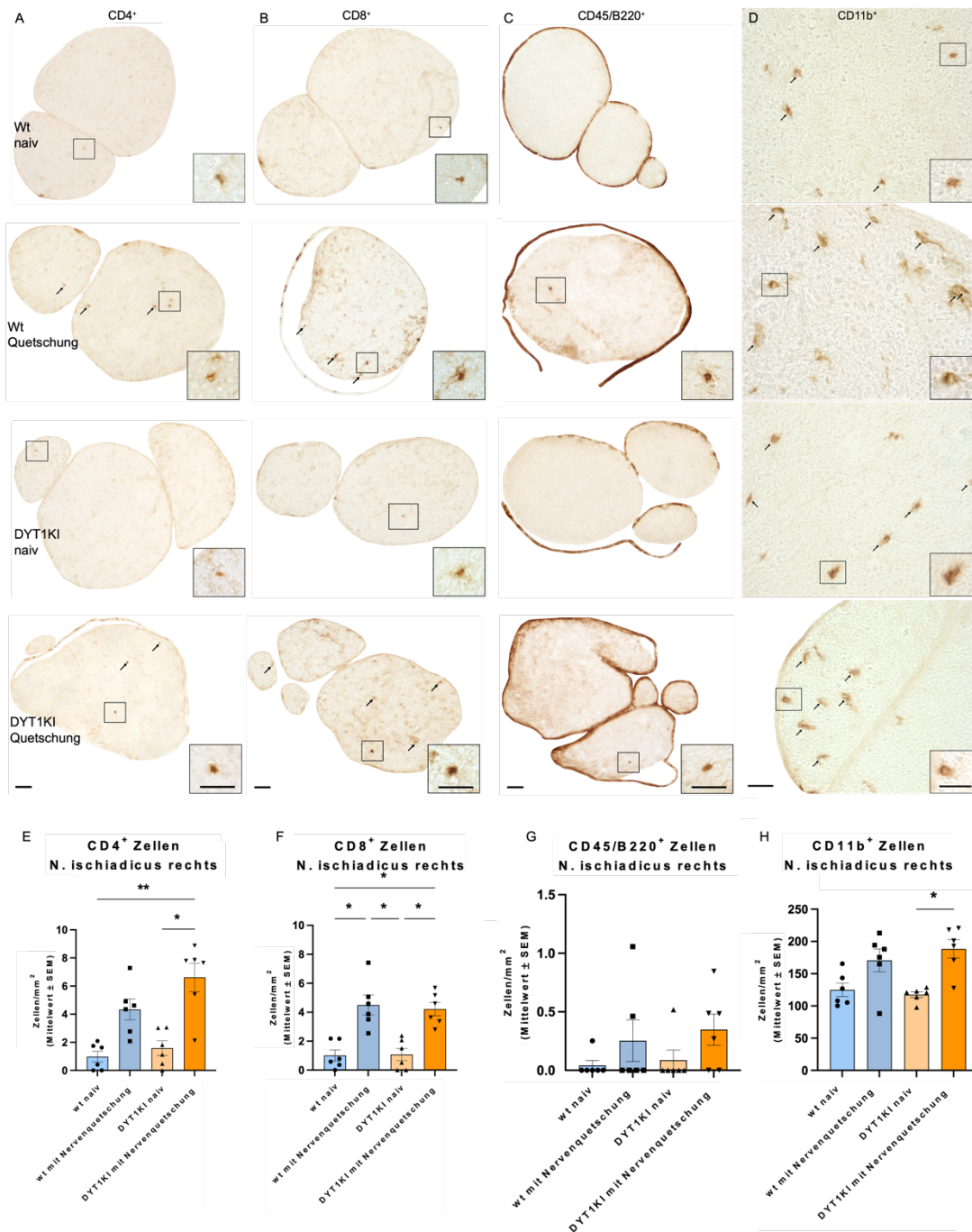


Abbildung 17

Anzahl der Immunzellen im rechten N. ischiadicus

A – D zeigen repräsentative Bilder der rechten Nn. ischiadici der CD4⁺- (**A**), CD8⁺- (**B**), CD45/B220⁺- (**C**) und CD11b⁺- (**D**) Färbungen von allen vier Versuchskohorten mit Vergrößerung ausgewählter Zellen im Kasten am rechten unteren Rand des jeweiligen Bildes. Der Maßstab in **A – C** gibt 50 µm an, in **D** 25 µm. **E – H** zeigen die Ergebnisse der Zählungen von CD4⁺- (**E**), CD8⁺- (**F**), CD45/B220⁺- (**G**) und CD11b⁺- (**H**) Zellen. Die Auszählung der Immunzellen im rechten N. ischiadicus ergaben leichte bis signifikante Unterschiede zwischen den Kohorten naiver Tiere zu solchen mit Nervenquetschung (je *n*=6). Angegeben sind Mittelwerte ± SEM, die statistische Analyse wurde mittels Kruskal-Wallis-Test gefolgt von einem post-hoc Dunn Test durchgeführt. Signifikante p-Werte: * *p* < 0,05; ** *p* < 0,01.

3.4 Auswirkungen der Nervenquetschung auf dopaminerge Neurone in der SN

3.4.1 Signifikante Reduktion der TH⁺-Neurone in den DYT1KI Tieren

Die mit dem „Stereo Investigator®“ geschätzte Anzahl an TH⁺-Neuronen in der linken Hemisphäre (Abbildung 18 A-D) betrug bei den DYT1KI Tieren, die einer Nervenquetschung unterzogen wurden, $6746,57 \pm 74,49$ Zellen (Abbildung 18 E). Signifikant höher im Vergleich dazu waren die Werte der wt Tiere mit Nervenquetschung ($7633,38 \pm 173,9$ Zellen; $p < 0,001$) und wt naiven Tiere ($7484,47 \pm 133,6$ Zellen; $p < 0,01$). Ebenfalls zeigte sich eine signifikant verminderte Anzahl der geschätzten TH⁺ Zellpopulationen bei DYT1KI naiven Tiere ($6925,79 \pm 83,17$ Zellen) verglichen mit den wt-Kohorten ohne Nervenquetschung ($7484,47 \pm 133,6$ Zellen; $p < 0,05$), sowie mit Nervenquetschung ($7633,38 \pm 173,9$ Zellen; $p < 0,01$). Innerhalb der DYT1KI sowie der wt Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

3.4.2 Signifikante Hypertrophie der TH⁺-Zellen bei DYT1KI Tieren

Die Abschätzung der Volumina der TH⁺-Zellen in der linken SNc der Versuchstiere zeigt signifikante Unterschiede zwischen den Kohorten: Die DYT1KI Tiere mit Quetschläsion wiesen ein signifikant erhöhtes Volumen ($4201,83 \pm 65,38 \mu\text{m}^3$) verglichen mit der DYT1KI naiven ($3422,82 \pm 69,02 \mu\text{m}^3$; $p < 0,0001$) und der wt Kohorte sowohl mit ($2937,37 \pm 28,14 \mu\text{m}^3$; $p < 0,0001$) als auch ohne Nervenquetschung ($2937,34 \pm 64,40 \mu\text{m}^3$; $p < 0,0001$) auf (Abbildung 18 F). Darüber hinaus stellte sich das Volumen der DYT1KI naiven Tiere ($3422,82 \pm 69,02 \mu\text{m}^3$) verglichen mit den naiven wt Tieren ($2937,34 \pm 64,40 \mu\text{m}^3$; $p < 0,0001$) und jenen mit Nervenquetschung ($2937,37 \pm 28,14 \mu\text{m}^3$; $p < 0,0001$) signifikant erhöht dar. Zwischen den beiden wt Kohorten bestand keine signifikante Veränderung der Volumina.

3.4.3 Keine Veränderungen der Nissl-Zellen in der SN

Die Schätzung der Nissl-Zellen gibt keinen Anhalt auf signifikante Änderungen in der Anzahl oder im Volumen zwischen den vier Versuchsgruppen (Abbildung 18 G, H).

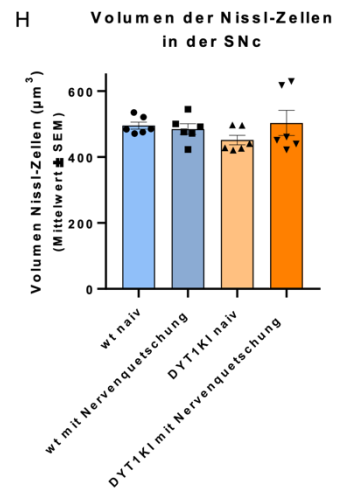
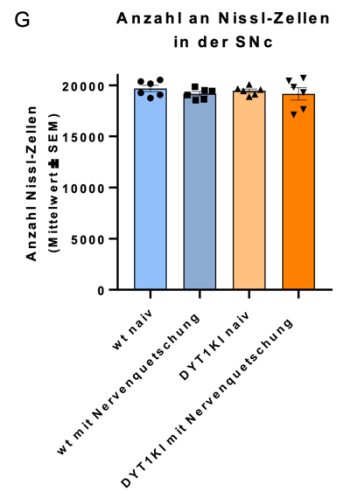
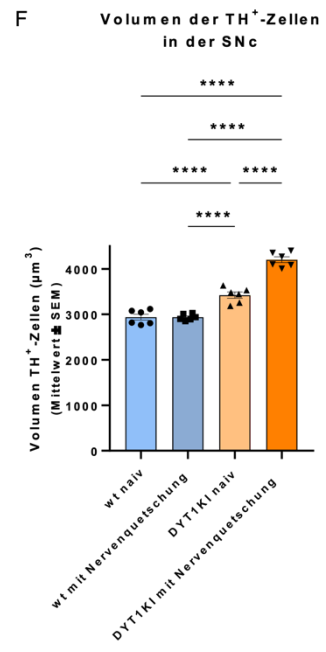
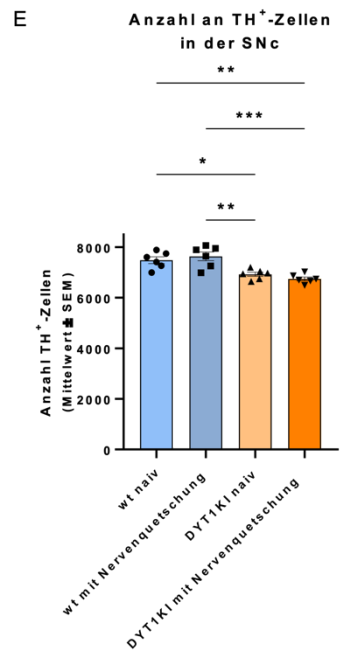
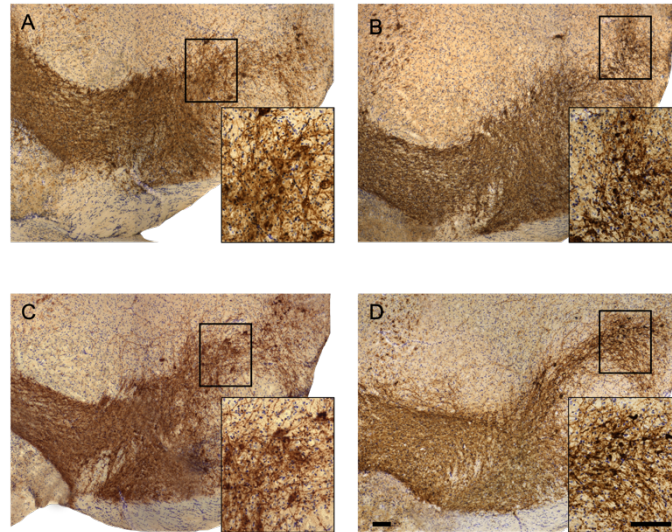


Abbildung 18

Anzahl und Volumen der TH⁺-Zellen in der SNc

Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte aus der linksseitigen SN von wt Tieren ohne (A) und mit Nervenquetschung (B) sowie DYT1KI Tiere ohne (C) und mit Nervenquetschung (D). Am jeweils linken unteren Bildrand sind in Vergrößerung TH⁺- und Nissl-Zellen abgebildet. Die Maßstäbe in A - D geben 100 µm an. Weiterhin sind die Ergebnisse der stereologischen Messungen mit dem StereoInvestigator® graphisch dargestellt: In der Anzahl an TH⁺-Zellen (E) sind signifikante Unterschiede zwischen den wt und DYT1KI-Kohorten (je n=6) festzustellen. Das Volumen der TH⁺-Zellen (F) weist signifikante Unterschiede der TH⁺-Zellen zwischen den wt und DYT1KI Kohorten sowie zwischen DYT1KI naiven und DYT1KI Tieren mit Nervenquetschung auf. In der Anzahl (G) und im Volumen (H) der Nissl-Zellen wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Angegeben sind Mittelwerte ± SEM, die statistische Analyse wurde mittels einfacher ANOVA gefolgt von einem post-hoc Tukey-Test durchgeführt. Signifikante p-Werte: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

4 Diskussion

4.1 Überblick über die Hauptergebnisse

Die pathophysiologischen Ursachen der DYT-TOR1A Dystonie sind bislang nur unzureichend geklärt. Das symptomatische DYT1KI Mausmodell soll eine Möglichkeit darstellen, diese Ursachen zu quantifizieren und sie auf die Vorgänge beim Menschen übertragen zu können. In der vorliegenden Arbeit wurde hierzu zunächst durch verhaltensanalytische Studien im TST gezeigt, dass bei diesem genetisch veränderten Mausmodell mittels einer Nervenquetschläsion ein Dystonie-ähnlicher Phänotyp hervorgerufen werden konnte. Durch elektroneurographische Messungen wurde zudem bestätigt, dass die Dystonie-ähnlichen Bewegungen nicht durch eine unterschiedliche nervale Regeneration zustande kam. Bei beiden Kohorten mit Nervenquetschung konnten erhöhte Zahlen an Immunzellen im lädierten Nerven und im ipsilateralen Rückenmark, nicht jedoch im kontralateralen Striatum festgestellt werden. Von einer pathologischen Rolle des Immunsystems in der Entstehung der Dystonie-ähnlichen Bewegungen ist somit nicht auszugehen. Pathophysiologisch konnte vielmehr eine signifikante Hypertrophie und eine geringere Anzahl an dopaminergen Neuronen in der SNc der naiven DYT1KI Tiere verglichen mit wt Tieren bestätigt werden. Durch die Nervenquetschung konnte eine weitere, deutliche Verstärkung der Hypertrophie der dopaminergen Neurone bei der DYT1KI Kohorte beobachtet werden.

4.2 Kritische Bewertung der Ergebnisse und Methoden

4.2.1 Etablierung eines symptomatischen Mausmodells für die DYT-TOR1A Dystonie

Entwicklung des Dystonie-ähnlichen Phänotypen

Mit dem Hintergrund der Two-hit Hypothese, in diesem Fall bestehend aus der genetischen Prädisposition und einem peripheren Trauma, konnten wir bei dem DYT1KI Mausmodell durch eine standardisierte Nervenquetschläsion im TST signifikant mehr Dystonie-ähnliche Bewegungen als bei den Kontrollgruppen feststellen. Diese Methode wurde bereits bei anderen Nagernmodellen etabliert (Ip et al., 2016; Knorr et al., 2021; Rauschenberger et al., 2019) und mit dieser Arbeit auf das DYT1KI Modell übertragen. Ein wichtiger Aspekt stellt hierbei dar, dass das DYT1KI Mausmodell aus translationaler Sicht eine höhere Bedeutung als die bisherig in der Arbeitsgruppe verwendeten Nagernmodelle hat, da die In-frame ΔE Deletion vergleichbar mit der beim Menschen stattfindenden 3-Basenpaaren-Deletion im TOR1A Gen ist. Damit soll ein Mausmodell mit

hoher Konstruktvalidität und hoher Augenscheinvalidität etabliert werden. Das bedeutet, dass sowohl Genotyp als auch Phänotyp der Versuchstiere den beim Menschen auftretenden genetischen und symptomatischen Zustand gut widerspiegelt (Tadenev & Burgess, 2019). Im Vergleich zu diesem DYT1KI Mausmodell existieren zahlreiche Nagermodelle, die in dieser Hinsicht nachteilig sind: Es gibt solche, die trotz ähnlicher Mutation und mikrostrukturellen Veränderungen zumeist keine offensichtlichen Zeichen einer Dystonie zeigen, nicht überlebensfähig sind oder einen Dystonie-ähnlichen Phänotypen mit Nebenbefunden entwickeln, die nicht mit den beim Menschen gefundenen Befunden übereinstimmen (vergleiche Kapitel 1.5). Beispielsweise generierten Liang et al. und Pappas et al. Mausmodelle, die im TST ebenfalls Dystonie-ähnliche Bewegungen aufwiesen (Liang, Tanabe, Jou, Chi, & Dauer, 2014; Pappas et al., 2015). Der genetische Hintergrund verursachte aber im ZNS lediglich einen selektiven Mangel an TorsinA und war von neurodegenerativen Prozessen begleitet. Darüber hinaus stellten Dang et al. die Relevanz aus Studien mit Nagern, die das humane mutierte TorsinA exprimieren, aus den folgenden Gründen infrage: Durch die Expression des humanen, mutierten Proteins durch einen viralen Vektor oder einen Enolase Promotor kann es zu ektopischen Expressionen des Proteins kommen. Gleichzeitig kann dessen Überexprimierung das Gesamtsystem unphysiologisch belasten und damit zu Artefakten führen, die dem Phänotypen zugeschrieben werden, obwohl die Kausalität der eigentlichen Fragestellung damit nicht beantwortet werden kann (Dang et al., 2005). Song et al. beschrieben das in dieser Arbeit verwendete DYT1KI Mausmodell als asymptomatisch und ohne offensichtliche Zeichen einer Dystonie (Song et al., 2012). Diese Feststellung lässt sich anhand dieser Arbeit aber auf zwei Faktoren zurückführen und modifizieren: Einerseits lässt sich durch den „zweiten Treffer“, also die periphere Nervenquetschläsion die Penetranz der Mutation bei den betroffenen Versuchstieren erhöhen, sodass diese überhaupt erst dystone Bewegungsmuster entwickeln. Andererseits wurde durch den TST ein Verhaltenstest zur Offenlegung Dystonie-ähnlicher Symptome mit hoher Sensitivität angewandt, während Song et al. die motorische Aktivität, Ganganalysen, Ausdauer und Koordination untersuchten. Somit konnte gleichzeitig bestätigt werden, dass die phänotypische Variabilität Anhalt darauf gibt, dass ein Modifikator vonnöten ist, der zum Auftreten dystoner Symptome führt (Rauschenberger et al., 2021).

Die Dystonie-ähnlichen Bewegungen wurden analog zu den Arbeiten von Ip et al. und Knorr et al. in einem Bewertungssystem als ein Verkrampfen der Fußzehen zur Fußmitte und einem Heranziehen des Beins in Richtung der Körperlängsachse definiert (Ip et al.,

2016; Knorr et al., 2021). Diese fokalen, Dystonie-ähnlichen Bewegungen sind gut vereinbar mit der phänotypischen Beschreibung in der zuletzt veröffentlichten, einheitlichen Definition von Dystonie (Albanese et al., 2013). Diese abnormalen Bewegungen traten sowohl bei der wt als auch bei der DYT1KI Kohorte ab Woche 1 nach der Nervenquetschläsion auf. In diesen ersten Wochen ist zunächst von einer Pseudodystonie auszugehen, welche durch die Deafferentierung zustande kommt (Albanese et al., 2013). Mit zunehmender Nervenregeneration zeigte die wt Kohorte nach circa 6 Wochen deutlich weniger abnormale Bewegungen und erholte sich nach circa 10 Wochen zum Ausgangszustand. Die DYT1KI Kohorte zeigte jedoch bis zur Beendigung der Versuchsreihe 12 Wochen nach der Nervenquetschung durchgehend vermehrt Dystonie-ähnliche Bewegungen. Dementsprechend konnte bei der DYT1KI Kohorte ein bleibender Dystonie-ähnlicher Phänotyp erzeugt werden. Auszuschließen ist hierbei, dass dem Dystonie-ähnlichen Phänotypen eine unterschiedliche nervale Regeneration zugrunde liegt. Dieser Ausschluss erfolgte durch elektroneurographische Messungen, welche ähnliche Ergebnisse in der NCV und CMAP bei beiden Kohorten aufwies. Diese Ergebnisse finden mit denen der Studien von Ip et al. und Knorr et al. Übereinstimmung (Ip et al., 2016; Knorr et al., 2021).

Die Auswertung mittels eines neuronalen Netzwerks

Für das zur Bewegungsanalyse verwendete Programm „DeepLabCut“ wird eine Genauigkeit der Markierungen angegeben, die mit der durch menschliches Markieren vergleichbar ist (A. Mathis et al., 2018). Darüber hinaus stellt es durch den Verzicht auf physische Marker und das Benötigen von nur minimalen Datensätzen optimale Voraussetzungen für die Anwendung als objektives und effizientes Analysewerkzeug dar (M. W. Mathis & Mathis, 2020). Somit ist es in der Lage, ähnliche Ergebnisse zum bisherigen Goldstandard der ethologischen Verhaltensanalyse, die menschliche Bewertung, zu erzielen und kommerzielle Systeme gar zu übertreffen (Sturman et al., 2020). Die Beobachter-basierte Auswertung, die sich jedoch durch zeitliche und subjektive Kriterien im Vergleich zu dem neuronalen Netzwerk als nachteilig erweist, kann nun also durch das Netzwerk abgelöst werden. Mit der Aufzeichnung der Tiere und dem Erstellen des Netzwerks wurde ein Instrument zur Analyse des TST kreiert, welches auch auf andere Projekte übertragbar ist, in denen der TST als Auswertungsparameter herangezogen wird. Dieses Instrument bietet auch im Hinblick auf die weitere Entwicklung Möglichkeiten zur Anwendung und Erkennung zusätzlicher Parameter. Eine dreidimensionale Erweiterung des Netzwerks ist für den TST möglich. Eine solche

dreidimensionale Darstellung konnte durch Nath et al. in einer kooperativen Arbeit in einer Studie über die Bewegungsanalyse von Geparden anhand multipler Kameraperspektiven gezeigt werden (Nath et al., 2019; A. M. Wilson et al., 2013). Durch eine zusätzliche, seitliche Perspektive könnten „falsch-positiv“ gewertete Bewegungen in Richtung der Kamera (vergleiche Kapitel 2.8.2) definitiv ausgeschlossen werden. Darüber hinaus wäre eine Identifizierung des Schweregrades der Dystonie-ähnlichen Bewegungen über den aktuell gewerteten Parameter der andauernden Länge der Verkrampfung hinaus möglich. Um für das Erstellen eines solchen Netzwerks eine gleichwertig hohe Qualität im Prozess der Markierung der Körperteile und somit der Auswertung zu erreichen, ist eine hohe Bildqualität der aufgezeichneten Videos obligat. Da die Schnelligkeit der Bewegungen der Versuchstiere augenscheinlich Einfluss auf die Trainings- und Testfehler sowie die Wahrscheinlichkeitsschwelle der Markierungen nimmt, sind kodierte Bildraten von 50 bis 100 FPS für eine qualitativ hochwertige Analyse Voraussetzung. Des Weiteren gilt es im Fortlauf der Anwendung des Netzwerkes, für die eindeutige Definition der Körperlängsachse eine passende Strukturierung zu etablieren, um weitere, möglicherweise auftretende Dystonie-ähnliche Bewegungen oder eine Generalisierung der Symptome zu identifizieren. Da insbesondere zu dem Marker der Mitte des Abdomens keine eindeutig definierte anatomische Struktur korreliert, ist eine Identifizierung von möglicherweise auftretenden Torsionen des Rumpfes bislang nicht eindeutig möglich. Als Lösungsansatz könnte die Bestimmung der Kontur der Versuchstiere dienen. Da die Videos des TST durchgehend vor einem einfarbigen Hintergrund aufgenommen wurden, sind zu einer solchen Skelettierung optimale Voraussetzungen vorhanden.

4.2.2 Auswirkungen der Nervenquetschung auf das Immunsystem im PNS und ZNS

Entzündliche Geschehen tragen in der Pathogenese einiger neurologischer Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Multipler Sklerose, Chorea Huntington, Morbus Alzheimer oder amyotropher Lateralsklerose zu degenerativen Prozessen bei (W. W. Chen, Zhang, & Huang, 2016; McGeer & McGeer, 2004; Pajares, A, Manda, Boscá, & Cuadrado, 2020; Stephenson et al., 2018). Studien über den Morbus Parkinson weisen sowohl im Nagermodell als auch im Menschen auf einen Anstieg proinflammatorischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der SN, im Striatum und im Blut hin, was somit für eine Beteiligung des adaptiven Immunsystems spricht (Bas et al., 2001; Brochard et al., 2009; Garfias et al., 2019; Kurkowska-Jastrzebska, Wrońska, Kohutnicka, Członkowski, & Członkowska, 1999). Zusätzlich wurde durch eine Beteiligung der Mikroglia in der

Entstehung oben genannter Krankheiten auch dem angeborenen Immunsystem eine tragende Rolle zugeschrieben (Ho, 2019). Dabei wurde insbesondere im Rahmen neurodegenerativer Prozesse eine Aktivierung der Mikroglia beobachtet (Imamura et al., 2003; McGeer, Itagaki, Boyes, & McGeer, 1988). Darüber hinaus wurden die Einwanderung von Immunzellen in lädierte Nerven sowie in Anteile des Rückenmarks zur Förderung der Regeneration nach Traumata in Studien zur Entstehung neuropathischen Schmerzes nachgewiesen (siehe Kapitel 1.6) (Bombeiro, Lima, Bonfanti, & Oliveira, 2020; Coyle, 1998). Auch wurde im Zuge der Schmerzverarbeitung gezeigt, dass das Striatum sowie dopaminerge Bahnen hierbei involviert sind (Barceló, Filippini, & Pazo, 2012; Hagelberg et al., 2004; Taylor, Murphy, Evans, & Cahill, 2014). Aufgrund dessen bietet die Untersuchung eines möglichen Einflusses immunologischer Faktoren auf die Entstehung und Penetranz der Dystonien eine interessante Möglichkeit, denkbare Pathomechanismen der DYT-TOR1A Dystonie besser zu verstehen.

Unsere Ergebnisse zeigen jedoch 12 Wochen postoperativ keine signifikanten Unterschiede in der Infiltration von CD4⁺-, CD8⁺-, CD45/B220⁺- und CD11b⁺-Zellen im zur Nervenquetschung kontralateralen Striatum der symptomatischen DYT1KI Tiere mit Nervenquetschung im Vergleich mit den Kontrollgruppen. Leichte bis signifikante Unterschiede waren im zur Nervenquetschung ipsilateralen, lumbalen Rückenmark zwischen den Gruppen mit Nervenquetschung verglichen mit den Kontrollgruppen zu erkennen. Signifikante Unterschiede entstanden vor allem in der Anzahl aller Zelltypen im rechten, gequetschten Nerven von DYT1KI- und wt-Kohorte verglichen mit der kontralateralen, unberührten Seite sowie verglichen mit den rechten und linken Nn. ischiadici der naiven Kontrollgruppen. Es gibt demnach, anders als bei den oben genannten neurodegenerativen Erkrankungen, in rein quantitativer Hinsicht keinen Anhalt darauf, dass eine veränderte Aktivierung des Immunsystems eine Rolle in der Entstehung Dystonie-ähnlicher Bewegungen bei den DYT1KI Tieren spielt. Ob diese Feststellung rein durch nicht vorhandene Unterschiede in der Immunantwort oder etwa durch Limitierungen in der Methodik zu bewerten ist, bleibt kritisch zu hinterfragen. Es ist dabei zu bedenken, dass der Prozess bis zum gefärbten, auswertbaren histologischen Präparat eine Reihe an Arbeitsschritten enthält, der mit der Perfusion der Versuchstiere beginnt und mit verschiedensten Methoden, Chemikalien, Verdünnungen und Inkubationszeiten durchgeführt wird. Vereinheitlichte Vorgehensweisen und etablierte und modifizierte Laborprotokolle helfen dabei, standardisierte Ergebnisse in der Gewebeerarbeitung zu erlangen. Dennoch muss bedacht werden, dass es sich auch bei Versuchstieren um Individuen mit eigenen, zum Teil unterschiedlichen

Verhaltensweisen und körperlichen Eigenschaften handelt. Diese Annahmen sind für alle in dieser Arbeit verwendeten Methoden gültig. Eine Vergrößerung der Anzahl der Versuchstiere validiert dementsprechend gefundene Ergebnisse und sollte daher für zukünftige Experimente berücksichtigt werden. Ferner stellt sich insbesondere die Quantifizierung der CD11b⁺-Zellen im Vergleich zur Zählweise der CD4⁺-, CD8⁺- und CD45/B220⁺-Zellen, die aufgrund der insgesamt geringeren Anzahl im jeweils gesamten Präparateschnitt der Nerven, des kontralateralen Striatums und des ipsilateralen Rückenmarks ausgezählt wurden, als komplex dar. Da dabei aufgrund der hohen Anzahl ein Zählgitter für das Striatum und das Rückenmark verwendet wurde, welches stets in ähnliche Regionen eingelegt wurde, sind diese Werte als rein repräsentativ anzusehen. Zudem wird durch eine Färbemethode lediglich ein für eine Zellpopulation spezifischer Oberflächenantikörper angefärbt. Eine Unterscheidung in einzelne Phänotypen innerhalb der Zellreihe konnte dadurch nicht erfolgen. Kalinski et al. konnten beispielsweise nach einer Quetschläsion fünf unterschiedliche Subpopulationen an Makrophagen im N. ischiadicus finden (Kalinski et al., 2020). Darüber hinaus wird innerhalb der T-Lymphozyten in CD4⁺ und CD8⁺ unterschieden. Diese werden jeweilig nochmals in Subtypen untergliedert und sind für die Sekretion unterschiedlicher Zytokine verantwortlich (Brummelman, Pilipow, & Lugli, 2018). Beispielsweise gibt es für die CD4⁺ T-Lymphozyten eine Vielzahl an regulatorischen T-Zellen, die bei einer Entzündungsreaktion als „Gegenspieler“ zur Inflammation stets auch eine Limitierung in der Immunantwort zum Abwenden von Gewebeschäden bewirken (Mills, 2004). Ein für diese Zellen spezifischer Marker ist das „Forkhead-Box-Protein P3“ (Foxp3) (Fontenot, Gavin, & Rudensky, 2003; Hori, Nomura, & Sakaguchi, 2003). Quantitative oder qualitative Störungen in der Homöostase der CD4⁺Foxp3⁺ Zellen wurden bei autoimmunen aber auch bei neurodegenerativen Erkrankungen nachgewiesen (Rosenkranz et al., 2007). Diese Beobachtung wurde von den Autoren jedoch abhängig vom steigenden Alter der betroffenen Patienten getroffen. Da die DYT-TOR1A Dystonie nach der aktuellen Klassifikation jedoch dem früh-beginnenden Typ zugeschrieben wird und somit nicht in Korrelation mit erhöhtem Lebensalter gebracht wird (Albanese et al., 2013), ist ein direkter Zusammenhang zwischen der Dystonie und dysfunktionalen T-Zellen nicht zu erwarten. Neben den regulatorischen T-Zellen existieren innerhalb der CD4⁺-Zellen zudem die T-Helferzellen (Th) 1, Th2, Th9, Th17 und Th22 (Mousset et al., 2019). Der Transfer von Lymphozyten aus der Milz von Mäusen mit Nervenquetschung zu axotomierten Mäusen bewirkte neben einer verbesserten Nervenregeneration, einen Anstieg der proinflammatorischen Subtypen Th1 und Th17 mit einer konstant hohen

Konzentration, die auch drei Wochen postoperativ noch nachweisbar war (Bombeiro et al., 2020). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine chemotaktisch antiinflammatorisch wirkende T-Zellpopulation eine Abschwächung der Schmerzempfindlichkeit nach einer Nervenkonstriktion bewirkte. Die T-Zellen waren in dieser Studie auch noch 40 Tage postoperativ signifikant erhöht (Moalem, Xu, & Yu, 2004). Im Rahmen unserer Versuche wurden 12 Wochen nach der Nervenquetschung erhöhte Zahlen an CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten im gequetschten Nerven bei DYT1KI und wt Tieren gefunden. Die Steuerung der Regenerationsphase nach einer Nervenverletzung ist dementsprechend vom Zusammenspiel pro- und antiinflammatorischer Zytokine abhängig. Es gibt aber im Rahmen dieser Arbeit aufgrund nicht vorhandener Unterschiede in der Anzahl von CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten bei DYT1KI und wt Kohorte keinen Anhalt darauf, dass eine Dysbalance zwischen diesen Wirkungen ein möglicher Grund für die Entwicklung der Dystonie-ähnlichen Bewegungen ist. Unterstützt wird diese These dadurch, dass auch die Nervenregeneration auf physikalischer Ebene mit den Ergebnissen der elektroneurographischen Messungen keinen Unterschied zwischen DYT1KI und wt Tieren zeigt. Eine Differenzierung der oben genannten T-Zell Subtypen könnte die genannte Annahme in zukünftigen Experimenten verifizieren. Weiterhin geben die gefundenen Ergebnisse wenig Anhalt auf eine Beteiligung der B-Lymphozyten, da die Gesamtzahl an CD45/B220⁺-Zellen in allen untersuchten Gewebeschnitten im niedrigen Bereich liegt. Es konnte zwar nachgewiesen werden, dass sie nach einer Rückenmarksverletzung bis zu einer Woche in das Gebiet der Läsion einwandern, jedoch ist über die Funktion der Antikörper-produzierenden und zur humoralen Immunantwort gehörenden Zellen im Verlauf des Heilungsprozesses nur wenig bekannt (Schnell, Schneider, Berman, Perry, & Schwab, 1997; Trivedi, Olivas, & Noble-Haeusslein, 2006).

Darüber hinaus wurde eine Beteiligung von Makrophagen und Mikroglia im Zusammenhang mit Dystonie bereits von Ip et al. untersucht. Die symptomatischen Tor1a^{+/-} Tiere wiesen eine leichte, nicht signifikante Erhöhung an F4/80⁺-Makrophagen in den gequetschten Nerven 8 Wochen postoperativ auf (Ip et al., 2016). Dieses Oberflächenantigen wird auf allen Makrophagen und mikroglialen Zellen exprimiert (Hume, Perry, & Gordon, 1984). Zudem konnten in dieser Studie keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl von CD11b⁺-Zellen im ipsilateralen, lumbalen Rückenmark zwischen naiven und transgenen Tieren festgestellt werden, was Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Studie bei den DYT1KI Mäusen findet (Ip et al., 2016). Eine

weitere Einschränkung in der Methodik wird dadurch offensichtlich, dass bei der CD11b-Färbung eine eindeutige Differenzierung der mikroglialen Zellen in den ruhenden und aktiven Zustand nicht möglich ist. Eine Aktivierung der Mikroglia im Rückenmark erreichte bei einer Nervenverletzung in einem Rattenmodell beispielsweise ihren Höhepunkt 14 Tage postoperativ mit einem Abfall bis Tag 22. Das Maß an mikroglialer Aktivierung blieb jedoch auch bis Versuchsende an Tag 150 verglichen zum Ausgangszustand erhöht (Zhang & De Koninck, 2006). Da die Mikroglia neben einer Abwehrfunktion für die Wahrnehmung von Veränderungen in ihrer Umgebung und der Anpassung für das „neuronale Wohlbefinden“ zuständig ist (Hickman, Izzy, Sen, Morsett, & El Khoury, 2018) und damit auch für die neuronale Plastizität entscheidend mitwirkt (Sominsky, De Luca, & Spencer, 2018), sollte die Untersuchung der mikroglialen Aktivität Gegenstand weiterer Studien sein. Die unveränderte Zellanzahl an Mikroglia im Striatum sowie die lediglich leichten bis signifikanten Erhöhungen im Rückenmark können zudem auch damit zusammenhängen, dass die neuronale Plastizität bei reversiblen Nervenverletzungen lediglich solange aktiv vorhanden bleibt, wie die Signaltransmission unterbrochen ist (C. Li et al., 2021). Da die nervale Regeneration in den Elektroneurographien durch eine wiederkehrende Signalableitung zehn Wochen postoperativ bei beiden Gruppen nachweislich fortgeschritten war, ist davon auszugehen, dass dieser Zustand bereits wieder erreicht wurde und dementsprechend die Vorgänge durch eine Aktivierung, nicht jedoch einen vermehrten Einstrom der Mikroglia geschahen. Eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung der Mikroglia kann zudem durch Zählen der Zellen mittels des Programms „Stereo Investigator®“ erwogen werden. Diese Methode beruht auf dem Prinzip des optischen Fraktionators, wie es auch bei der in dieser Arbeit angewandten Quantifizierung der dopaminergen Neurone angewandt wurde. Nach einer Nervenläsion konnte auf diese Weise ein deutlicher Anstieg an Mikroglia im dorsalen Horn des Rückenmarks in der Region des N. ischiadicus geschätzt werden (Beggs & Salter, 2007). Eine mögliche Kombinationsfärbung aus Iba-1 als genereller Myeloid-Marker, CD86 als Marker von proinflammatorischer beziehungsweise aktivierter Mikroglia und Makrophagen und P2RY12 als Marker für homöostatische Mikroglia könnte darüber hinaus eine Möglichkeit darstellen, den Grad der Aktivierung der Mikroglia spezifisch zu Visualisieren. Experimentell wurde des Weiteren nach einer thorakalen Rückenmarksverletzung bei Mäusen mit einer Depletion von Mikroglia eine verringerte Neuroinflammation in Rückenmark und Gehirn festgestellt. Interessanterweise wurde dadurch auch eine Verbesserung motorischer Eigenschaften der Tiere erreicht (Y. Li et

al., 2020). Es lässt sich damit abschließend feststellen, dass die gefundenen Ergebnisse bei den DYT1KI Mäusen zunächst keinen direkten Anhalt auf einen Einfluss inflammatorischer Prozesse in der Entwicklung von Dystonie-ähnlichen Bewegungen durch den mutierten Genotyp ergeben. Schließlich sollte im Hinblick auf die Beteiligung der Vielzahl an möglichen pro- und antiinflammatorischen Entzündungszellen dennoch eine Erhöhung der Anzahl untersuchter Tiere sowie die Vertiefung der Untersuchungen anhand weiterer immunhistochemischer Färbungen erfolgen.

4.2.3 Hinweise auf eine Affektion des dopaminergen Stoffwechsels im DYT1KI-Mausmodell

Für die Beteiligung des dopaminergen Stoffwechsels in der Pathophysiologie von Dystonien gibt es eine breite Studienlage (Augood et al., 2004; Augood et al., 2002; Casey, 2004; Mihara et al., 2002; Perlmutter & Mink, 2004). Auch wird eine mögliche Dysregulation des dopaminergen Stoffwechsels speziell für die DYT-TOR1A Dystonie diskutiert (Wichmann, 2008). Hinsichtlich der TH⁺-Neurone in der SNc wurde in einer post mortem Studie von Patienten mit Dopa-responsiver Dystonie keine signifikante Reduktion an dopaminergen Neuronen festgestellt (Furukawa, Hornykiewicz, Fahn, & Kish, 2000). Ähnlich beschrieben Zweig et al. nur bei einem von vier Fällen mit einer klinisch diagnostizierten idiopathischen oder genetischen Dystonie einen moderaten bis schwerwiegenden Zellverlust in der SNc (Zweig et al., 1988). Andererseits wurde eine Volumenzunahme der dopaminergen Neurone in menschlichen Gehirnen von DYT-TOR1A Patienten beschrieben, was durch eine reduzierte Exozytose an den biologischen Membranen der betroffenen Zellen aufgrund des dysfunktionellen TorsinA Proteins vermutet wurde (Rostasy et al., 2003). In einer weiteren Studie wurde ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten dystoner Symptome bei DYT-TOR1A Mutationsträgern und Veränderungen nigraler Neurone festgestellt (Iacono, Geraci-Erck, Peng, Rabin, & Kurlan, 2019). Die Autoren fanden eine Volumenzunahme der Somata der dopaminergen Neurone in der SN manifestierender DYT-TOR1A Mutationsträger verglichen mit nicht-manifestierenden Mutationsträgern und Kontrollgruppen. Die beobachteten Veränderungen an humanpathologischem Gewebe besitzen aufgrund der begrenzten Anzahl an untersuchtem Gewebe nur eine limitierte Aussagekraft, weisen insgesamt aber auf eine Affektion dopaminergener Neurone hin (Song et al., 2013; Zhao, DeCuypere, & LeDoux, 2008). Im unbehandelten, asymptomatischen DYT1KI Mausmodell wurde bereits eine Vergrößerung sowie auch eine verminderte Zellzahl der dopaminergen Neurone in der SNc beschrieben (Song et al., 2012). Diese Tiere zeigten jedoch nur geringe Unterschiede in ihrer motorischen

Aktivität und Koordination verglichen mit der Kontrollgruppe und offenbarten keine eindeutigen Zeichen einer Dystonie. Durch die Nervenläsion und den damit entstehenden dystonen Phänotypen konnten wir bei ebendiesem DYT1KI Mausmodell eine Relation zwischen dem Auftreten einer dystonen Symptomatik und nigraler Veränderungen feststellen: Bei den Versuchstieren mit der Δ GAG-Mutation im endogenen TOR1A Gen in Kombination mit der Nervenquetschläsion wurde durch stereologische Messungen eine signifikante Volumenzunahme dopaminerger Neurone mit gleichzeitig signifikanter Verringerung der Zellzahl festgestellt. Naive DYT1KI Tiere wiesen eine um circa 8% verringerte Anzahl und ein um circa 17% vergrößertes Volumen der TH⁺-Neurone verglichen mit den wt Kohorten auf. Die symptomatischen DYT1KI Tiere mit Nervenquetschung zeigten ebenfalls eine um 11% reduzierte Anzahl verglichen mit den wt Tieren. Verglichen mit den naiven, asymptomatischen DYT1KI Tieren war jedoch das Somavolumen in den symptomatischen DYT1KI Tieren mit Nervenquetschung nochmals signifikant erhöht.

Hinsichtlich der Anzahl der dopaminerger Neurone weist die Studienlage im Kontext der Verhaltensforschung auf eine große Variabilität der Anzahl im Mesenzephalon hin. So konnten zwischen ähnlichen Mausmodellen nicht nur signifikante Unterschiede in der Anzahl an TH⁺-Neuronen festgestellt werden. Auch trat eine signifikante asymmetrische laterale Verteilung der untersuchten Zellen innerhalb der Mausstämmen auf (Zaborszky & Vadasz, 2001). Darüber hinaus weisen Studien zum Morbus Parkinson auf eine sogenannte Dopamin-Reserve hin. Das bedeutet, dass ein Auftreten motorischer Defizite einen Verlust von circa 30-50% der nigralen dopaminerger Neurone voraussetzt (Fearnley & Lees, 1991; Ross et al., 2004). Aufgrund dessen ist eine Korrelation der verminderten Anzahl an TH⁺-Neuronen mit dem Auftreten der Dystonie-ähnlichen Symptome unwahrscheinlich. Vielmehr bleibt die signifikante Hypertrophie der TH⁺-Neurone bei den DYT1KI Kohorten zu diskutieren. Da eine signifikante Volumenzunahme bereits bei den asymptomatischen, naiven DYT1KI Tieren gegenüber den wt Gruppen gefunden wurde, scheint bereits die der DYT-TOR1A Dystonie zugrundeliegende Mutation zu Veränderungen zu führen, welche direkt oder als Kompensationsmechanismus zu einer Hypertrophie der dopaminerger Neurone führen. Durch die weitere signifikante Zunahme der Hypertrophie bei den DYT1KI Tieren mit Nervenquetschung verglichen mit den naiven DYT1KI Tieren ergeben sich Hinweise darauf, dass das Ausmaß der Volumenzunahme mit dem Auftreten der Dystonie-ähnlichen Symptome korreliert. Einschränkend ist dabei zu bemerken, dass im Rahmen dieser Studie keine genauere Untersuchung hinsichtlich der Ausbreitung der Dystonie

erfolgte. Als symptomatisch wurden Tiere definiert, die vermehrt und über einen längeren Zeitraum eine Verkrampfung des rechten Beines oder Fußes aufzeigten. Dabei wurde jedoch keine Unterscheidung der Ausbreitung der dystonen Bewegungen in fokal und generalisiert vorgenommen. Zudem wurde stets die SNc der zur Nervenläsion kontralateralen Hemisphäre untersucht. Aufgrund dessen sollte es im Bereich zukünftiger Untersuchungen liegen, die ipsilaterale Hemisphäre in die Untersuchung mit einzubeziehen, um somit Rückschlüsse zwischen dem Grad der Ausprägung der abnormen Bewegungen und der nigralen Ausdehnung betroffener Neurone ziehen zu können. Darüber hinaus wäre eine Behandler-unabhängige Untersuchung der jeweiligen Areale, die in Analogie zu dem Erstellen des neuronalen Netzwerks der TST-Videos gestützt auf dem Prinzip der künstlichen Intelligenz basiert, ein weiterer Schritt, die zeitintensive Analyse der Gewebeschnitte zu optimieren und Ergebnisse zu verifizieren. Trotz der guten Etablierung und weit verbreiteten Anwendung beschreiben Alahmari et al. (2019) die auf unvoreingenommenen Prinzipien basierenden stereologischen Messverfahren als zeit- und kostenintensiv. Zudem würden sie durch menschliche Faktoren, wie individuelles Training und Einarbeitung, Erkennungsfehler und Ermüdung beeinflusst, womit die Reproduzierbarkeit sinkt und die Fehleranfälligkeit steigt (Alahmari et al., 2019). Nichtsdestotrotz konnte gezeigt werden, dass sich die angewandte Methode zur Schätzung von TH⁺-Neuronen in der SN von Mäusen eignet (Ip et al., 2017), sodass diese als standardmäßiges Verfahren angewandt wird und valide Ergebnisse liefert.

Hinsichtlich der Ursache für die Hypertrophie der TH⁺-Neurone in den asymptomatischen und symptomatischen DYT1KI Tieren erfolgte im Rahmen dieser Arbeit keine weitere Untersuchung. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass das bei der DYT-TOR1A Dystonie mutierte TorsinA eine Beeinträchtigung des Transports oder der Freisetzung von Dopamin bewirkt, da es Einfluss auf die Regulierung der Dopamintransporter und anderer membrangebundener Proteine nimmt (Cao, Gelwix, Caldwell, & Caldwell, 2005; Ribot et al., 2019; Torres, Sweeney, Beaulieu, Shashidharan, & Caron, 2004). Dies kann als eine mögliche Ursache für die Volumenzunahme bei den DYT1KI Tieren in Betracht gezogen werden. Im Hinblick auf diese Annahme bleibt deshalb zu verifizieren, ob auch bei dem DYT1KI Mausmodell Änderungen in Anzahl oder Struktur an Dopamintransportern und -rezeptoren oder im nigrostriatalen Dopaminumsatz vorliegen. Song et al konnten hierzu im Mesenzephalon von sechs Monate alten, asymptomatischen DYT1KI Mäusen bereits eine signifikante Reduktion des Dopamingehalts um 31% verglichen zu den drei Monate alten DYT1KI

Tieren feststellen. Letztere wiesen, verglichen mit der Kontrollgruppe, keine Signifikanzen auf (Song et al., 2012). Auch zeigt die Studie eine signifikante Verringerung des Dopamingehalts im Striatum der DYT1KI Kohorte im Vergleich zu den wt Tieren im Ausgangsniveau sowie auf Stimulierung mittels Amphetamingabe. Das hMT-Mausmodell zeigte bezüglich der Dichte striataler Dopamintransporter und -Bindungsstellen keine Unterschiede, jedoch fand sich auch hier eine deutlich eingeschränkte Antwort der Dopaminausschüttung auf Amphetamingabe in den transgenen Tieren im Vergleich zu wt Kontrolltieren (Balcioglu et al., 2007). Weiterhin gaben die Quantifizierung von Dopamin sowie dessen Metabolit 3,4-Dihydroxyphenylethylsäure (DOPAC) und wiederum dessen Umbauprodukt Homovanillinsäure (HVA) im Gewebe Hinweise auf Änderungen im nigrostriatalen Dopaminstoffwechsel von DYT-TOR1A Mausmodellen. Dang et al. berichten 2006 von signifikant reduzierten Mengen an DOPAC bei einem DYT1 Knockdown Mausmodell und einer um 27% verringerten Menge an HVA bei einem DYT1KI Mausmodell (Dang et al., 2005; Dang, Yokoi, Pence, & Li, 2006) mit jeweils unverändertem striatalen Dopamingehalt verglichen mit den Kontrollgruppen. Weiterhin existieren Studien, die jedoch eine uneinheitliche Studienlage bezüglich dieser Thematik feststellen lassen: Es gibt sowohl Evidenz für ein vergrößertes (Augood et al., 2002) als auch für ein verkleinertes Verhältnis von DOPAC zu Dopamin (Shashidharan et al., 2005). Auch existiert eine Untersuchung, die keine signifikanten Veränderungen striataler HVA-Konzentrationen zeigt (Furukawa et al., 2000). Die meisten Nagermodelle sind jedoch trotz der genetischen Variation weitgehend asymptotisch. Der wichtige Faktor, der durch Ip et al. und Knorr et al. mit der Grundlage des dopaminergen Stoffwechsels darüber hinaus untersucht wurde, sind die Zusammenhänge zu dem Auftreten Dystonie-ähnlicher Symptome. Ip et al begründen die intensivierten, abnormen Bewegungen mit einer im Ausgangszustand verringerten, aber durch die Quetschung hochregulierten dopaminergen Neurotransmission bei den transgenen Tieren, während bei der wt Kohorte eine gewisse zentrale Hemmung des Dopaminstoffwechsel in der Regenerationsphase nach der Quetschung eintrat (Ip et al., 2016). Es wird dementsprechend vermutet, dass im striatalen dopaminergen System eine Maladaptation durch das periphere Trauma bei den transgenen Tieren provoziert wird. Diese führt zu einer dopaminergen Überverfügbarkeit und damit zu einer überschießenden Signalkaskade im nachgeschalteten System mit folglich extendierten Bewegungsmustern (Knorr et al., 2021).

Die im Rahmen dieser Arbeit festgestellten Veränderungen an Größe und Anzahl der dopaminergen Neurone in der SNc in den asymptomatischen sowie insbesondere in den symptomatischen DYT1KI Mäusen unterstreichen nochmals die bereits vermutete Rolle des dopaminergen Stoffwechsels in der Pathophysiologie der Dystonie. Die Ursache dieser Dysfunktion kann im gesamten Komplex dieses eng verknüpften Netzwerks liegen. Striosomale Neurone, die ihre Afferenzen aus dem prälimbischen Kortex beziehen, projizieren über GABAerge Neurone in die SNc (Matsushima & Graybiel, 2020; McGregor et al., 2019) und bilden dort bouquetartige Verzweigungen mit dopaminergen Neuronen, die wiederum in das Striatum rückprojizieren (Crittenden et al., 2016). Diese Schleife gilt auch bei Morbus Parkinson als betroffen. Da also der dopaminerge Tonus in der SNc durch die striosomalen Neurone beeinflusst wird, könnte durch eine striosomale Dysfunktion rückwirkend eine beeinträchtigte Hemmung nigraler Neurone zu einer Überaktivität dopaminergener Neurone in der SNc führen (Brüggemann, 2021). Diese Überaktivität könnte auch als mögliche Ursache für die bei den DYT1KI Mäusen gefundenen Volumenzunahmen der dopaminergen Neurone gelten. Daher ist es essenziell in einem nächsten Schritt die Beteiligung der striosomalen Neurone in die Untersuchung mit einzubeziehen, um diese Hypothese zu verifizieren. Die Untersuchung des nigrostriatalen Systems spielt abschließend eine Rolle von tragender Bedeutung, die zum Verständnis der Pathomechanismen der DYT-TOR1A Dystonie und damit verbundener möglicher therapeutischer Maßnahmen beitragen kann.

5 Zusammenfassung

Die dem Formenkreis der Dystonien zugrundeliegenden, pathophysiologischen Grundlagen sind bislang nicht abschließend geklärt. Für die DYT-TOR1A Dystonie ist bekannt, dass eine 3-bp Deletion eines GAG-Codons im TOR1A-Gen auf Chromosom 9 einen Funktionsverlust des Proteins TorsinA bewirkt. Dieser Funktionsverlust wird als auslösender Faktor für die Entstehung der DYT-TOR1A Dystonie angenommen. Nichtsdestotrotz entwickeln lediglich circa 30% der Mutationsträger eine dystone Bewegungsstörung. Als Grund dafür wird eine Two-hit Hypothese diskutiert, die zusätzlich zur genetischen Prädisposition einen Umweltfaktor wie ein peripheres Trauma für die Entstehung von Symptomen postuliert. Durch eine standardisierte Quetschläsion des N. ischiadicus konnte mit dieser Arbeit bei DYT1KI Mäusen, die die Δ GAG-Mutation im endogenen Genom tragen, ein dystoner Phänotyp hervorgerufen werden. Mit den Aufzeichnungen der Mäuse im TST wurde ein neuronales Netzwerk mittels der Software „DeepLabCut“ trainiert, sodass die Dystonie-ähnlichen Bewegungen automatisiert erfasst und ausgewertet werden konnten. Das Netzwerk trägt dazu bei, dem vorwiegend klinischen Syndrom der Dystonie eine objektive kinematische Charakterisierung zu bieten und kann auf andere TSTs anderer Nagermodelle übertragen werden. Ferner wurde überprüft, ob die beobachteten Bewegungen durch Unterschiede in der Regeneration nach der Nervenquetschung zustande kamen. Elektroneurographien zeigten jedoch diesbezüglich keine Unterschiede zwischen wt und DYT1KI Tieren. Darüber hinaus sind mikromorphologische Prozesse im zentralen und peripheren Nervensystem Gegenstand dieser Studie. Einerseits konnten wir mittels Immunzellfärbungen von T-, B-Zellen, Makrophagen und Mikroglia feststellen, dass sowohl zentral als auch peripher kein Anhalt darauf besteht, dass die beim DYT1KI Mausmodell entstandenen Dystonie-ähnlichen Bewegungen auf einer Dysfunktion oder Aktivierung des Immunsystems, wie es bei anderen neurologischen Erkrankungen bereits nachgewiesen wurde, eine Rolle spielt. Andererseits konnte anhand stereologischer Messungen gezeigt werden, dass bei den naiven DYT1KI Tieren im Vergleich zu wt Tieren dopaminerge Neurone der SN in der Anzahl verringert und im Volumen vergrößert sind, was auf einen Endophänotypen hinweist. Bei den symptomatischen, nervergequetschten DYT1KI Mäusen zeigte sich wiederum eine weitere, signifikante Zunahme der Hypertrophie der dopaminergen Neurone als Hinweis auf eine unmittelbar mit dem dystonen Phänotypen in Zusammenhang stehende Veränderung. Zusammenfassend konnte ein symptomatisches Mausmodell von hoher

translationaler Bedeutung etabliert werden, in dem sich Hinweise für eine dopaminerge Dysregulation ergaben und welches für weitere Studien, insbesondere therapeutischer Art, eingesetzt werden könnte.

6 Literaturverzeichnis

- Alahmari, S. S., Goldgof, D., Hall, L., Phoulady, H. A., Patel, R. H., & Mouton, P. R. (2019). Automated Cell Counts on Tissue Sections by Deep Learning and Unbiased Stereology. *J Chem Neuroanat*, 96, 94-101. doi:10.1016/j.jchemneu.2018.12.010
- 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. *Mov Disord*, 28(7), 863-873. doi:10.1002/mds.25475
- Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*, 12(10), 366-375. doi:10.1016/0166-2236(89)90074-x
- Andersen, M. L., & Winter, L. M. F. (2019). Animal models in biological and biomedical research - experimental and ethical concerns. *An Acad Bras Cienc*, 91(suppl 1), e20170238. doi:10.1590/0001-3765201720170238
- Augood, S. J., Hollingsworth, Z., Albers, D. S., Yang, L., Leung, J., Breakefield, X. O., & Standaert, D. G. (2004). Dopamine transmission in DYT1 dystonia. *Adv Neurol*, 94, 53-60.
- Augood, S. J., Hollingsworth, Z., Albers, D. S., Yang, L., Leung, J. C., Muller, B., . . . Standaert, D. G. (2002). Dopamine transmission in DYT1 dystonia: a biochemical and autoradiographical study. *Neurology*, 59(3), 445-448. doi:10.1212/wnl.59.3.445
- Augood, S. J., Penney, J. B., Jr., Friberg, I. K., Breakefield, X. O., Young, A. B., Ozelius, L. J., & Standaert, D. G. (1998). Expression of the early-onset torsion dystonia gene (DYT1) in human brain. *Ann Neurol*, 43(5), 669-673. doi:10.1002/ana.410430518
- 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. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04590.x
- Balint, B., Mencacci, N. E., Valente, E. M., Pisani, A., Rothwell, J., Jankovic, J., . . . Bhatia, K. P. (2018). Dystonia. *Nat Rev Dis Primers*, 4(1), 25. doi:10.1038/s41572-018-0023-6
- Baquet, Z. C., Williams, D., Brody, J., & Smeyne, R. J. (2009). A comparison of model-based (2D) and design-based (3D) stereological methods for estimating cell number in the substantia nigra pars compacta (SNpc) of the C57BL/6J mouse. *Neuroscience*, 161(4), 1082-1090. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.04.031
- Barceló, A. C., Filippini, B., & Pazo, J. H. (2012). The striatum and pain modulation. *Cell Mol Neurobiol*, 32(1), 1-12. doi:10.1007/s10571-011-9737-7
- Barrette, B., Hébert, M. A., Filali, M., Lafortune, K., Vallières, N., Gowing, G., . . . Lacroix, S. (2008). Requirement of myeloid cells for axon regeneration. *J Neurosci*, 28(38), 9363-9376. doi:10.1523/jneurosci.1447-08.2008
- Bas, J., Calopa, M., Mestre, M., Molleví, D. G., Cutillas, B., Ambrosio, S., & Buendia, E. (2001). Lymphocyte populations in Parkinson's disease and in rat models of parkinsonism. *J Neuroimmunol*, 113(1), 146-152. doi:10.1016/s0165-5728(00)00422-7
- Batla, A. (2018). Dystonia: A review. *Neurol India*, 66(Supplement), S48-s58. doi:10.4103/0028-3886.226439
- Baysal, A. I., Chang, C. W., & Oh, S. J. (1993). Temperature effects on nerve conduction studies in patients with carpal tunnel syndrome. *Acta Neurol Scand*, 88(3), 213-216. doi:10.1111/j.1600-0404.1993.tb04219.x

- Beggs, S., & Salter, M. W. (2007). Stereological and somatotopic analysis of the spinal microglial response to peripheral nerve injury. *Brain Behav Immun*, 21(5), 624-633. doi:10.1016/j.bbi.2006.10.017
- Benowitz, L. I., & Popovich, P. G. (2011). Inflammation and axon regeneration. *Curr Opin Neurol*, 24(6), 577-583. doi:10.1097/WCO.0b013e32834c208d
- Berardelli, A., Rothwell, J. C., Hallett, M., Thompson, P. D., Manfredi, M., & Marsden, C. D. (1998). The pathophysiology of primary dystonia. *Brain*, 121 (Pt 7), 1195-1212. doi:10.1093/brain/121.7.1195
- Bombeiro, A. L., Lima, B. H. M., Bonfanti, A. P., & Oliveira, A. L. R. (2020). Improved mouse sciatic nerve regeneration following lymphocyte cell therapy. *Mol Immunol*, 121, 81-91. doi:10.1016/j.molimm.2020.03.003
- Breakefield, X. O., Blood, A. J., Li, Y., Hallett, M., Hanson, P. I., & Standaert, D. G. (2008). The pathophysiological basis of dystonias. *Nat Rev Neurosci*, 9(3), 222-234. doi:10.1038/nrn2337
- Bressman, S. B., de Leon, D., Brin, M. F., Risch, N., Burke, R. E., Greene, P. E., . . . Fahn, S. (1989). Idiopathic dystonia among Ashkenazi Jews: evidence for autosomal dominant inheritance. *Ann Neurol*, 26(5), 612-620. doi:10.1002/ana.410260505
- Bressman, S. B., Sabatti, C., Raymond, D., de Leon, D., Klein, C., Kramer, P. L., . . . Risch, N. J. (2000). The DYT1 phenotype and guidelines for diagnostic testing. *Neurology*, 54(9), 1746-1752. doi:10.1212/wnl.54.9.1746
- Brochard, V., Combadière, B., Prigent, A., Laouar, Y., Perrin, A., Beray-Berthet, V., . . . Hunot, S. (2009). Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J Clin Invest*, 119(1), 182-192. doi:10.1172/jci36470
- Brüggemann, N. (2021). Contemporary functional neuroanatomy and pathophysiology of dystonia. *J Neural Transm (Vienna)*, 128(4), 499-508. doi:10.1007/s00702-021-02299-y
- Brummelman, J., Pilipow, K., & Lugli, E. (2018). The Single-Cell Phenotypic Identity of Human CD8(+) and CD4(+) T Cells. *Int Rev Cell Mol Biol*, 341, 63-124. doi:10.1016/bs.ircmb.2018.05.007
- Callan, A. C., Bunning, S., Jones, O. T., High, S., & Swanton, E. (2007). Biosynthesis of the dystonia-associated AAA+ ATPase torsinA at the endoplasmic reticulum. *Biochem J*, 401(2), 607-612. doi:10.1042/bj20061313
- Cao, S., Gelwix, C. C., Caldwell, K. A., & Caldwell, G. A. (2005). Torsin-mediated protection from cellular stress in the dopaminergic neurons of *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci*, 25(15), 3801-3812. doi:10.1523/jneurosci.5157-04.2005
- Capetian, P., Pauly, M. G., Azmitia, L. M., & Klein, C. (2014). Striatal cholinergic interneurons in isolated generalized dystonia-rat and perspectives for stem cell-derived cellular models. *Front Cell Neurosci*, 8, 205. doi:10.3389/fncel.2014.00205
- Carter, R. J., Lione, L. A., Humby, T., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G. P., . . . Morton, A. J. (1999). Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci*, 19(8), 3248-3257. doi:10.1523/jneurosci.19-08-03248.1999
- Casey, D. E. (2004). Pathophysiology of antipsychotic drug-induced movement disorders. *J Clin Psychiatry*, 65 Suppl 9, 25-28.
- Cepeda, C., Galvan, L., Holley, S. M., Rao, S. P., André, V. M., Botelho, E. P., . . . Levine, M. S. (2013). Multiple sources of striatal inhibition are differentially affected in Huntington's disease mouse models. *J Neurosci*, 33(17), 7393-7406. doi:10.1523/jneurosci.2137-12.2013

- Chen, P., Piao, X., & Bonaldo, P. (2015). Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Acta Neuropathol*, *130*(5), 605-618. doi:10.1007/s00401-015-1482-4
- Chen, W. W., Zhang, X., & Huang, W. J. (2016). Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Mol Med Rep*, *13*(4), 3391-3396. doi:10.3892/mmr.2016.4948
- Cooper, I. S. (1969). Dystonia musculorum deformans: natural history and neurosurgical alleviation. *J Pediatr*, *74*(4), 585-592. doi:10.1016/s0022-3476(69)80042-9
- Costigan, M., Moss, A., Latremoliere, A., Johnston, C., Verma-Gandhu, M., Herbert, T. A., . . . Fitzgerald, M. (2009). T-cell infiltration and signaling in the adult dorsal spinal cord is a major contributor to neuropathic pain-like hypersensitivity. *J Neurosci*, *29*(46), 14415-14422. doi:10.1523/jneurosci.4569-09.2009
- Coyle, D. E. (1998). Partial peripheral nerve injury leads to activation of astroglia and microglia which parallels the development of allodynic behavior. *Glia*, *23*(1), 75-83.
- Crittenden, J. R., Tillberg, P. W., Riad, M. H., Shima, Y., Gerfen, C. R., Curry, J., . . . Graybiel, A. M. (2016). Striosome-dendron bouquets highlight a unique striatonigral circuit targeting dopamine-containing neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *113*(40), 11318-11323. doi:10.1073/pnas.1613337113
- Dale, R. C. (2003). Autoimmunity and the basal ganglia: new insights into old diseases. *Qjm*, *96*(3), 183-191. doi:10.1093/qjmed/hcg026
- 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. *Exp Neurol*, *196*(2), 452-463. doi:10.1016/j.expneurol.2005.08.025
- 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. doi:10.1016/j.neures.2006.09.005
- Defazio, G. (2010). The epidemiology of primary dystonia: current evidence and perspectives. *Eur J Neurol*, *17 Suppl 1*, 9-14. doi:10.1111/j.1468-1331.2010.03053.x
- Deutzmann, R. (2021). Biosynthese, Sekretion, Inaktivierung und Abbau. In J. Behrends, J. Bischofberger, R. Deutzmann, H. Ehmke, S. Frings, S. Grissmer, M. Hoth, A. Kurtz, J. Leipziger, F. Müller, C. Pedain, J. Rettig, C. Wagner, & E. Wischmeyer (Eds.), *Duale Reihe Physiologie* (4., unveränderte Auflage ed.): Georg Thieme Verlag KG.
- Dluzen, D. E., Gao, X., Story, G. M., Anderson, L. I., Kucera, J., & Walro, J. M. (2001). Evaluation of nigrostriatal dopaminergic function in adult +/- and +/- BDNF mutant mice. *Exp Neurol*, *170*(1), 121-128. doi:10.1006/exnr.2001.7698
- Dluzen, D. E., Liu, B., Chen, C. Y., & DiCarlo, S. E. (1995). Daily spontaneous running alters behavioral and neurochemical indexes of nigrostriatal function. *J Appl Physiol* (1985), *78*(4), 1219-1224. doi:10.1152/jappl.1995.78.4.1219
- Edwards, M., Wood, N., & Bhatia, K. (2003). Unusual phenotypes in DYT1 dystonia: a report of five cases and a review of the literature. *Mov Disord*, *18*(6), 706-711. doi:10.1002/mds.10411
- Ehmedah, A., Nedeljkovic, P., Dacic, S., Repac, J., Draskovic Pavlovic, B., Vucevic, D., . . . Bozic Nedeljkovic, B. (2019). Vitamin B Complex Treatment Attenuates Local Inflammation after Peripheral Nerve Injury. *Molecules*, *24*(24). doi:10.3390/molecules24244615
- Eldridge, R., Riklan, M., & Cooper, I. S. (1969). The limited role of psychotherapy in torsion dystonia. Experience with 44 cases. *Jama*, *210*(4), 705-708.
- Emos, M. C., & Agarwal, S. (2021). Neuroanatomy, Upper Motor Neuron Lesion. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.

- Fahn, S. (2011). Classification of movement disorders. *Mov Disord*, 26(6), 947-957. doi:10.1002/mds.23759
- Fahn, S., & Eldridge, R. (1976). Definition of dystonia and classification of the dystonic states. *Adv Neurol*, 14, 1-5.
- Fan, X., Donsante, Y., Jinnah, H. A., & Hess, E. J. (2018). Dopamine Receptor Agonist Treatment of Idiopathic Dystonia: A Reappraisal in Humans and Mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 365(1), 20-26. doi:10.1124/jpet.117.246348
- Fazl, A., & Fleisher, J. (2018). Anatomy, Physiology, and Clinical Syndromes of the Basal Ganglia: A Brief Review. *Semin Pediatr Neurol*, 25, 2-9. doi:10.1016/j.spn.2017.12.005
- Fearnley, J. M., & Lees, A. J. (1991). Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain*, 114 (Pt 5), 2283-2301. doi:10.1093/brain/114.5.2283
- Flatau, E., & Sterling, W. (1911). Progressiver torsionsspasmus bei Kindern. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie*, 7(1), 586-612.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 4(4), 330-336. doi:10.1038/ni904
- Furukawa, Y., Hornykiewicz, O., Fahn, S., & Kish, S. J. (2000). Striatal dopamine in early-onset primary torsion dystonia with the DYT1 mutation. *Neurology*, 54(5), 1193-1195. doi:10.1212/wnl.54.5.1193
- Garfias, S., Tamaya Domínguez, B., Toledo Rojas, A., Arroyo, M., Rodríguez, U., Boll, C., . . . Fleury, A. (2019). Peripheral blood lymphocyte phenotypes in Alzheimer and Parkinson's diseases. *Neurologia (Engl Ed)*. doi:10.1016/j.nrl.2018.10.004
- Gattlen, C., Clarke, C. B., Piller, N., Kirschmann, G., Pertin, M., Decosterd, I., . . . Suter, M. R. (2016). Spinal Cord T-Cell Infiltration in the Rat Spared Nerve Injury Model: A Time Course Study. *Int J Mol Sci*, 17(3), 352. doi:10.3390/ijms17030352
- Gaudet, A. D., Popovich, P. G., & Ramer, M. S. (2011). Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation*, 8, 110. doi:10.1186/1742-2094-8-110
- Gioltozoglou, T., Milonas, I., & Lees, A. J. (2006). Case of DYT1 dystonia triggered by bite from a moray. *Mov Disord*, 21(9), 1536-1537. doi:10.1002/mds.20994
- Gittis, A. H., & Kreitzer, A. C. (2012). Striatal microcircuitry and movement disorders. *Trends Neurosci*, 35(9), 557-564. doi:10.1016/j.tins.2012.06.008
- Gonzalez-Alegre, P. (2019). Advances in molecular and cell biology of dystonia: Focus on torsinA. *Neurobiol Dis*, 127, 233-241. doi:10.1016/j.nbd.2019.03.007
- Goodchild, R. E., & Dauer, W. T. (2005). The AAA+ protein torsinA interacts with a conserved domain present in LAP1 and a novel ER protein. *J Cell Biol*, 168(6), 855-862. doi:10.1083/jcb.200411026
- Goodchild, R. E., Grundmann, K., & Pisani, A. (2013). New genetic insights highlight 'old' ideas on motor dysfunction in dystonia. *Trends Neurosci*, 36(12), 717-725. doi:10.1016/j.tins.2013.09.003
- 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. doi:10.1016/j.neuron.2005.11.010
- Granata, A., & Warner, T. T. (2010). The role of torsinA in dystonia. *Eur J Neurol*, 17 Suppl 1, 81-87. doi:10.1111/j.1468-1331.2010.03057.x
- Granata, A., Watson, R., Collinson, L. M., Schiavo, G., & Warner, T. T. (2008). The dystonia-associated protein torsinA modulates synaptic vesicle recycling. *J Biol Chem*, 283(12), 7568-7579. doi:10.1074/jbc.M704097200
- Graybiel, A. M., Aosaki, T., Flaherty, A. W., & Kimura, M. (1994). The basal ganglia and adaptive motor control. *Science*, 265(5180), 1826-1831. doi:10.1126/science.8091209

- Greene, P., Kang, U. J., & Fahn, S. (1995). Spread of symptoms in idiopathic torsion dystonia. *Mov Disord*, *10*(2), 143-152. doi:10.1002/mds.870100204
- Groenewegen, H. J. (2003). The basal ganglia and motor control. *Neural Plast*, *10*(1-2), 107-120. doi:10.1155/np.2003.107
- Grundmann, K., Glöckle, N., Martella, G., Sciamanna, G., Hauser, T. K., Yu, L., . . . Ott, T. (2012). Generation of a novel rodent model for DYT1 dystonia. *Neurobiol Dis*, *47*(1), 61-74. doi:10.1016/j.nbd.2012.03.024
- Grundmann, K., Reischmann, B., Vanhoutte, G., Hübener, 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. doi:10.1016/j.nbd.2007.04.015
- Haber, S. N. (2014). The place of dopamine in the cortico-basal ganglia circuit. *Neuroscience*, *282*, 248-257. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.10.008
- Haber, S. N., Ryoo, H., Cox, C., & Lu, W. (1995). Subsets of midbrain dopaminergic neurons in monkeys are distinguished by different levels of mRNA for the dopamine transporter: comparison with the mRNA for the D2 receptor, tyrosine hydroxylase and calbindin immunoreactivity. *J Comp Neurol*, *362*(3), 400-410. doi:10.1002/cne.903620308
- Hagelberg, N., Jääskeläinen, S. K., Martikainen, I. K., Mansikka, H., Forssell, H., Scheinin, H., . . . Pertovaara, A. (2004). Striatal dopamine D2 receptors in modulation of pain in humans: a review. *Eur J Pharmacol*, *500*(1-3), 187-192. doi:10.1016/j.ejphar.2004.07.024
- Herz, E. (1944a). Dystonia: I. Historical review; analysis of dystonic symptoms and physiologic mechanisms involved. *Archives of Neurology & Psychiatry*, *51*(4), 305-318.
- HERZ, E. (1944b). Dystonia: II. Clinical classification. *Archives of Neurology & Psychiatry*, *51*(4), 319-355.
- HERZ, E. (1944c). Dystonia: III. Pathology and conclusions. *Archives of Neurology & Psychiatry*, *52*(1), 20-26.
- Hickman, S., Izzy, S., Sen, P., Morsett, L., & El Khoury, J. (2018). Microglia in neurodegeneration. *Nat Neurosci*, *21*(10), 1359-1369. doi:10.1038/s41593-018-0242-x
- Ho, M. S. (2019). Microglia in Parkinson's Disease. *Adv Exp Med Biol*, *1175*, 335-353. doi:10.1007/978-981-13-9913-8_13
- Hori, S., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, *299*(5609), 1057-1061. doi:10.1126/science.1079490
- Hu, P., Bembrick, A. L., Keay, K. A., & McLachlan, E. M. (2007). Immune cell involvement in dorsal root ganglia and spinal cord after chronic constriction or transection of the rat sciatic nerve. *Brain Behav Immun*, *21*(5), 599-616. doi:10.1016/j.bbi.2006.10.013
- Hume, D. A., Perry, V. H., & Gordon, S. (1984). The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localisation of antigen F4/80: macrophages associated with epithelia. *Anat Rec*, *210*(3), 503-512. doi:10.1002/ar.1092100311
- Iacono, D., Geraci-Erck, M., Peng, H., Rabin, M. L., & Kurlan, R. (2019). Hypertrophy of nigral neurons in Torsin1A deletion (DYT1) carriers manifesting dystonia. *Parkinsonism Relat Disord*, *58*, 63-69. doi:10.1016/j.parkreldis.2018.08.020
- Ilardi, J. M., Mochida, S., & Sheng, Z. H. (1999). Snapin: a SNARE-associated protein implicated in synaptic transmission. *Nat Neurosci*, *2*(2), 119-124. doi:10.1038/5673
- Imamura, K., Hishikawa, N., Sawada, M., Nagatsu, T., Yoshida, M., & Hashizume, Y. (2003). Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia

- and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol*, 106(6), 518-526. doi:10.1007/s00401-003-0766-2
- Ip, C. W., Cheong, D., & Volkmann, J. (2017). Stereological Estimation of Dopaminergic Neuron Number in the Mouse Substantia Nigra Using the Optical Fractionator and Standard Microscopy Equipment. *J Vis Exp*(127). doi:10.3791/56103
- Ip, C. W., Isaias, I. U., Kusche-Tekin, B. B., Klein, D., Groh, J., O'Leary, A., . . . Volkmann, J. (2016). Tor1a^{+/-} mice develop dystonia-like movements via a striatal dopaminergic dysregulation triggered by peripheral nerve injury. *Acta Neuropathol Commun*, 4(1), 108. doi:10.1186/s40478-016-0375-7
- Janavs, J. L., & Aminoff, M. J. (1998). Dystonia and chorea in acquired systemic disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 65(4), 436-445. doi:10.1136/jnnp.65.4.436
- Jankovic, J., & Patten, B. M. (1987). Blepharospasm and autoimmune diseases. *Mov Disord*, 2(3), 159-163. doi:10.1002/mds.870020303
- Jankovic, J., & Van der Linden, C. (1988). Dystonia and tremor induced by peripheral trauma: predisposing factors. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 51(12), 1512-1519. doi:10.1136/jnnp.51.12.1512
- Jinnah, H., Richter, A., Mink, J. W., Caldwell, G. A., Caldwell, K. A., Gonzalez-Alegre, P., . . . Hess, E. J. (2008). Animal models for drug discovery in dystonia. *Expert Opin Drug Discov*, 3(1), 83-97. doi:10.1517/17460441.3.1.83
- Jinnah, H. A., & Hess, E. J. (2008). Experimental therapeutics for dystonia. *Neurotherapeutics*, 5(2), 198-209. doi:10.1016/j.nurt.2008.01.001
- Kalinski, A. L., Yoon, C., Huffman, L. D., Duncker, P. C., Kohen, R., Passino, R., . . . Giger, R. J. (2020). Analysis of the immune response to sciatic nerve injury identifies efferocytosis as a key mechanism of nerve debridement. *Elife*, 9. doi:10.7554/eLife.60223
- Kato, K., Vogt, T., & Kanosue, K. (2019). Brain Activity Underlying Muscle Relaxation. *Front Physiol*, 10, 1457. doi:10.3389/fphys.2019.01457
- Kim, H. J., & Jeon, B. (2021). Arching deep brain stimulation in dystonia types. *J Neural Transm (Vienna)*, 128(4), 539-547. doi:10.1007/s00702-021-02304-4
- Knorr, S., Rauschenberger, L., Pasos, U. R., Friedrich, M. U., Peach, R. L., Grundmann-Hauser, K., . . . Ip, C. W. (2021). The evolution of dystonia-like movements in TOR1A rats after transient nerve injury is accompanied by dopaminergic dysregulation and abnormal oscillatory activity of a central motor network. *Neurobiol Dis*, 154, 105337. doi:10.1016/j.nbd.2021.105337
- Konakova, M., Huynh, D. P., Yong, W., & Pulst, S. M. (2001). Cellular distribution of torsin A and torsin B in normal human brain. *Arch Neurol*, 58(6), 921-927. doi:10.1001/archneur.58.6.921
- Kramer, P. L., de Leon, D., Ozelius, L., Risch, N., Bressman, S. B., Brin, M. F., . . . et al. (1990). Dystonia gene in Ashkenazi Jewish population is located on chromosome 9q32-34. *Ann Neurol*, 27(2), 114-120. doi:10.1002/ana.410270203
- Kramer, P. L., Heiman, G. A., Gasser, T., Ozelius, L. J., de Leon, D., Brin, M. F., . . . et al. (1994). The DYT1 gene on 9q34 is responsible for most cases of early limb-onset idiopathic torsion dystonia in non-Jews. *Am J Hum Genet*, 55(3), 468-475.
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 19(8), 312-318. doi:10.1016/0166-2236(96)10049-7
- Kumar, H., & Jog, M. (2011). Peripheral trauma induced dystonia or post-traumatic syndrome? *Can J Neurol Sci*, 38(1), 22-29. doi:10.1017/s0317167100011057
- Kumar, R., Maraganore, D. M., Ahlskog, J. E., & Rodriguez, M. (1997). Treatment of putative immune-mediated and idiopathic cervical dystonia with intravenous methylprednisolone. *Neurology*, 48(3), 732-735. doi:10.1212/wnl.48.3.732
- Kurkowska-Jastrzebska, I., Wrońska, A., Kohutnicka, M., Członkowski, A., & Członkowska, A. (1999). MHC class II positive microglia and lymphocytic

- infiltration are present in the substantia nigra and striatum in mouse model of Parkinson's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 59(1), 1-8.
- Lanciego, J. L., Luquin, N., & Obeso, J. A. (2012). Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(12), a009621. doi:10.1101/cshperspect.a009621
- Lange, L. M., Junker, J., Loens, S., Baumann, H., Olschewski, L., Schaake, S., . . . Lohmann, K. (2021). Genotype-Phenotype Relations for Isolated Dystonia Genes: MDSGene Systematic Review. *Mov Disord*, 36(5), 1086-1103. doi:10.1002/mds.28485
- Lavoie, B., & Parent, A. (1991). Dopaminergic neurons expressing calbindin in normal and parkinsonian monkeys. *Neuroreport*, 2(10), 601-604. doi:10.1097/00001756-199110000-00012
- Li, C., Liu, S. Y., Pi, W., & Zhang, P. X. (2021). Cortical plasticity and nerve regeneration after peripheral nerve injury. *Neural Regen Res*, 16(8), 1518-1523. doi:10.4103/1673-5374.303008
- Li, Y., Ritzel, R. M., Khan, N., Cao, T., He, J., Lei, Z., . . . Wu, J. (2020). Delayed microglial depletion after spinal cord injury reduces chronic inflammation and neurodegeneration in the brain and improves neurological recovery in male mice. *Theranostics*, 10(25), 11376-11403. doi:10.7150/thno.49199
- 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. doi:10.1172/jci72830
- Marras, C., Lang, A., van de Warrenburg, B. P., Sue, C. M., Tabrizi, S. J., Bertram, L., . . . Klein, C. (2016). Nomenclature of genetic movement disorders: Recommendations of the international Parkinson and movement disorder society task force. *Mov Disord*, 31(4), 436-457. doi:10.1002/mds.26527
- Martino, D., Gajos, A., Gallo, V., Cif, L., Coubes, P., Tinazzi, M., . . . Bhatia, K. P. (2013). Extragenetic factors and clinical penetrance of DYT1 dystonia: an exploratory study. *J Neurol*, 260(4), 1081-1086. doi:10.1007/s00415-012-6765-2
- Mathis, A., Mamidanna, P., Cury, K. M., Abe, T., Murthy, V. N., Mathis, M. W., & Bethge, M. (2018). DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nat Neurosci*, 21(9), 1281-1289. doi:10.1038/s41593-018-0209-y
- Mathis, M. W., & Mathis, A. (2020). Deep learning tools for the measurement of animal behavior in neuroscience. *Curr Opin Neurobiol*, 60, 1-11. doi:10.1016/j.conb.2019.10.008
- Matsuda, W., Furuta, T., Nakamura, K. C., Hioki, H., Fujiyama, F., Arai, R., & Kaneko, T. (2009). Single nigrostriatal dopaminergic neurons form widely spread and highly dense axonal arborizations in the neostriatum. *J Neurosci*, 29(2), 444-453. doi:10.1523/jneurosci.4029-08.2009
- Matsushima, A., & Graybiel, A. M. (2020). Combinatorial Developmental Controls on Striatonigral Circuits. *Cell Rep*, 31(11), 107778. doi:10.1016/j.celrep.2020.107778
- McGeer, P. L., Itagaki, S., Boyes, B. E., & McGeer, E. G. (1988). Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*, 38(8), 1285-1291. doi:10.1212/wnl.38.8.1285
- McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (2004). Inflammation and the degenerative diseases of aging. *Ann N Y Acad Sci*, 1035, 104-116. doi:10.1196/annals.1332.007
- McGregor, M. M., McKinsey, G. L., Girasole, A. E., Bair-Marshall, C. J., Rubenstein, J. L. R., & Nelson, A. B. (2019). Functionally Distinct Connectivity of Developmentally Targeted Striosome Neurons. *Cell Rep*, 29(6), 1419-1428.e1415. doi:10.1016/j.celrep.2019.09.076

- Mihara, K., Kondo, T., Higuchi, H., Takahashi, H., Yoshida, K., Shimizu, T., & Kaneko, S. (2002). Tardive dystonia and genetic polymorphisms of cytochrome P4502D6 and dopamine D2 and D3 receptors: a preliminary finding. *Am J Med Genet*, *114*(6), 693-695. doi:10.1002/ajmg.10602
- Mills, K. H. (2004). Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol*, *4*(11), 841-855. doi:10.1038/nri1485
- Moalem, G., Xu, K., & Yu, L. (2004). T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. *Neuroscience*, *129*(3), 767-777. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.08.035
- Moore, A. P., Behan, P. O., & Behan, W. M. (1986). Lymphocyte subset abnormalities in patients with spasmodic torticollis. *Acta Neurol Scand*, *74*(5), 371-378. doi:10.1111/j.1600-0404.1986.tb03528.x
- Moussset, C. M., Hobo, W., Woestenenk, R., Preijers, F., Dolstra, H., & van der Waart, A. B. (2019). Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry. *Cytometry A*, *95*(6), 647-654. doi:10.1002/cyto.a.23724
- Muller, U. J., Frick, B., Winkler, C., Fuchs, D., Wenning, G. K., Poewe, W., & Mueller, J. (2005). Homocysteine and serum markers of immune activation in primary dystonia. *Mov Disord*, *20*(12), 1663-1667. doi:10.1002/mds.20667
- Munts, A. G., & Koehler, P. J. (2010). How psychogenic is dystonia? Views from past to present. *Brain*, *133*(Pt 5), 1552-1564. doi:10.1093/brain/awq050
- Nadeau, S., Filali, M., Zhang, J., Kerr, B. J., Rivest, S., Soulet, D., . . . Lacroix, S. (2011). Functional recovery after peripheral nerve injury is dependent on the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF: implications for neuropathic pain. *J Neurosci*, *31*(35), 12533-12542. doi:10.1523/jneurosci.2840-11.2011
- Nath, T., Mathis, A., Chen, A. C., Patel, A., Bethge, M., & Mathis, M. W. (2019). Using DeepLabCut for 3D markerless pose estimation across species and behaviors. *Nat Protoc*, *14*(7), 2152-2176. doi:10.1038/s41596-019-0176-0
- Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L., & Koonin, E. V. (1999). AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res*, *9*(1), 27-43.
- Neychev, V. K., Gross, R. E., Lehericy, S., Hess, E. J., & Jinnah, H. A. (2011). The functional neuroanatomy of dystonia. *Neurobiol Dis*, *42*(2), 185-201. doi:10.1016/j.nbd.2011.01.026
- Oppenheim, H. (1911). Uber eineeigenartige Krampfkrankheit des kind-lichen und jugendlichen Alters (Dysbasia lordotica lordotica progressive, Dystonia musculorum deformans). *Neurol Cbl*, *30*, 1090-1107.
- Ozelius, L., Kramer, P. L., Moskowitz, C. B., Kwiatkowski, D. J., Brin, M. F., Bressman, S. B., . . . et al. (1989). Human gene for torsion dystonia located on chromosome 9q32-q34. *Neuron*, *2*(5), 1427-1434. doi:10.1016/0896-6273(89)90188-8
- 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. doi:10.1038/ng0997-40
- Packard, M. G., & Knowlton, B. J. (2002). Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu Rev Neurosci*, *25*, 563-593. doi:10.1146/annurev.neuro.25.112701.142937
- Pajares, M., A. I. R., Manda, G., Boscá, L., & Cuadrado, A. (2020). Inflammation in Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Cells*, *9*(7). doi:10.3390/cells9071687
- Pappas, S. S., Darr, K., Holley, S. M., Cepeda, C., Mabrouk, O. S., Wong, J. M., . . . Dauer, W. T. (2015). Forebrain deletion of the dystonia protein torsinA causes dystonic-like movements and loss of striatal cholinergic neurons. *Elife*, *4*, e08352. doi:10.7554/eLife.08352

- Pauls, D. L., & Korczyn, A. D. (1990). Complex segregation analysis of dystonia pedigrees suggests autosomal dominant inheritance. *Neurology*, *40*(7), 1107-1107.
- Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (Second ed.): Academic Press.
- Perlmutter, J. S., & Mink, J. W. (2004). Dysfunction of dopaminergic pathways in dystonia. *Adv Neurol*, *94*, 163-170.
- Pierce, J. E., & Péron, J. (2020). The basal ganglia and the cerebellum in human emotion. *Soc Cogn Affect Neurosci*, *15*(5), 599-613. doi:10.1093/scan/nsaa076
- Radić, B., Radić, P., & Duraković, D. (2018). PERIPHERAL NERVE INJURY IN SPORTS. *Acta Clin Croat*, *57*(3), 561-569. doi:10.20471/acc.2018.57.03.20
- Rajagopalan, N., Humphrey, P. R., & Bucknall, R. C. (1989). Torticollis and blepharospasm in systemic lupus erythematosus. *Mov Disord*, *4*(4), 345-348. doi:10.1002/mds.870040410
- Rassow, J. (2016). Dopamin. In J. Rassow, K. Hauser, R. Deutzmann, & R. Netzker (Eds.), *Duale Reihe Biochemie* (4. Auflage ed.): Georg Thieme Verlag.
- Rauschenberger, L., Knorr, S., Pisani, A., Hallett, M., Volkmann, J., & Ip, C. W. (2021). Second hit hypothesis in dystonia: Dysfunctional cross talk between neuroplasticity and environment? *Neurobiol Dis*, *159*, 105511. doi:10.1016/j.nbd.2021.105511
- Rauschenberger, L., Stengl, A., Knorr, S., Grundmann-Hauser, K., Volkmann, J., & Ip, C. W. (2019). Striatal dopaminergic dysregulation and dystonia-like movements induced by peripheral nerve crush in a transgene DYT1 mouse model [abstract]. *Mov Disord*, *34*.
- Reichel, G., Kamm, C., Kang, J. S., Müngersdorf, M., Paus, S., Reuter, I., . . . Weise, D. (2018). [Cervical Dystonia]. *Fortschr Neurol Psychiatr*, *86*(6), 368-386. doi:10.1055/s-0043-107834
- Ribot, B., Aupy, J., Vidailhet, M., Mazère, J., Pisani, A., Bezard, E., . . . Burbaud, P. (2019). Dystonia and dopamine: From phenomenology to pathophysiology. *Prog Neurobiol*, *182*, 101678. doi:10.1016/j.pneurobio.2019.101678
- Richter, A., & Löscher, W. (1998). Pathology of idiopathic dystonia: findings from genetic animal models. *Prog Neurobiol*, *54*(6), 633-677. doi:10.1016/s0301-0082(97)00089-0
- 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. *Nat Genet*, *9*(2), 152-159. doi:10.1038/ng0295-152
- 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.
- Rodrigues, F. B., Duarte, G. S., Castelão, M., Marques, R. E., Ferreira, J., Sampaio, C., . . . Costa, J. (2021). Botulinum toxin type A versus anticholinergics for cervical dystonia. *Cochrane Database Syst Rev*, *4*(4), Cd004312. doi:10.1002/14651858.CD004312.pub3
- Rosenkranz, D., Weyer, S., Tolosa, E., Gaenslen, A., Berg, D., Leyhe, T., . . . Stoltze, L. (2007). Higher frequency of regulatory T cells in the elderly and increased suppressive activity in neurodegeneration. *J Neuroimmunol*, *188*(1-2), 117-127. doi:10.1016/j.jneuroim.2007.05.011
- Ross, G. W., Petrovitch, H., Abbott, R. D., Nelson, J., Markesbery, W., Davis, D., . . . White, L. R. (2004). Parkinsonian signs and substantia nigra neuron density in decedents elders without PD. *Ann Neurol*, *56*(4), 532-539. doi:10.1002/ana.20226

- 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. doi:10.1016/s0969-9961(02)00010-4
- Saunders-Pullman, R., Shriberg, J., Shanker, V., & Bressman, S. B. (2004). Penetrance and expression of dystonia genes. *Adv Neurol*, *94*, 121-125.
- Schnell, L., Schneider, R., Berman, M. A., Perry, V. H., & Schwab, M. E. (1997). Lymphocyte recruitment following spinal cord injury in mice is altered by prior viral exposure. *Eur J Neurosci*, *9*(5), 1000-1007. doi:10.1111/j.1460-9568.1997.tb01450.x
- Scholz, J., & Woolf, C. J. (2002). Can we conquer pain? *Nat Neurosci*, *5 Suppl*, 1062-1067. doi:10.1038/nn942
- Seddon, H. (1943). Three types of nerve injury. *Brain*, *66*(4), 237-288.
- Serpe, C. J., Tetzlaff, J. E., Coers, S., Sanders, V. M., & Jones, K. J. (2002). Functional recovery after facial nerve crush is delayed in severe combined immunodeficient mice. *Brain Behav Immun*, *16*(6), 808-812. doi:10.1016/s0889-1591(02)00017-x
- 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. doi:10.1523/jneurosci.0855-05.2005
- Shashidharan, P., Kramer, B. C., Walker, R. H., Olanow, C. W., & Brin, M. F. (2000). Immunohistochemical localization and distribution of torsinA in normal human and rat brain. *Brain Res*, *853*(2), 197-206. doi:10.1016/s0006-8993(99)02232-5
- 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. doi:10.1093/hmg/ddi012
- Sheehy, M. P., & Marsden, C. D. (1980). Trauma and pain in spasmodic torticollis. *Lancet*, *1*(8171), 777-778. doi:10.1016/s0140-6736(80)91281-7
- Sominsky, L., De Luca, S., & Spencer, S. J. (2018). Microglia: Key players in neurodevelopment and neuronal plasticity. *Int J Biochem Cell Biol*, *94*, 56-60. doi:10.1016/j.biocel.2017.11.012
- 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. doi:10.1016/j.nbd.2013.01.008
- Song, C. H., Bernhard, D., Hess, E. J., & Jinnah, H. A. (2014). Subtle microstructural changes of the cerebellum in a knock-in mouse model of DYT1 dystonia. *Neurobiol Dis*, *62*, 372-380. doi:10.1016/j.nbd.2013.10.003
- 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. doi:10.1016/j.nbd.2012.05.009
- Standaert, D. G. (2011). Update on the pathology of dystonia. *Neurobiol Dis*, *42*(2), 148-151. doi:10.1016/j.nbd.2011.01.012
- Stephenson, J., Nutma, E., van der Valk, P., & Amor, S. (2018). Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. *Immunology*, *154*(2), 204-219. doi:10.1111/imm.12922
- Sturman, O., von Ziegler, L., Schläppi, C., Akyol, F., Privitera, M., Slominski, D., . . . Bohacek, J. (2020). Deep learning-based behavioral analysis reaches human accuracy and is capable of outperforming commercial solutions. *Neuropsychopharmacology*, *45*(11), 1942-1952. doi:10.1038/s41386-020-0776-y
- Surmeier, D. J., & Graybiel, A. M. (2012). A feud that wasn't: acetylcholine evokes dopamine release in the striatum. *Neuron*, *75*(1), 1-3. doi:10.1016/j.neuron.2012.06.028

- Tadenev, A. L. D., & Burgess, R. W. (2019). Model validity for preclinical studies in precision medicine: precisely how precise do we need to be? *Mamm Genome*, 30(5-6), 111-122. doi:10.1007/s00335-019-09798-0
- Tanabe, L. M., Kim, C. E., Alagem, N., & Dauer, W. T. (2009). Primary dystonia: molecules and mechanisms. *Nat Rev Neurol*, 5(11), 598-609. doi:10.1038/nrneuro.2009.160
- Taylor, A. M., Murphy, N. P., Evans, C. J., & Cahill, C. M. (2014). Correlation between ventral striatal catecholamine content and nociceptive thresholds in neuropathic mice. *J Pain*, 15(8), 878-885. doi:10.1016/j.jpain.2014.05.006
- Tolosa, E., & Compta, Y. (2006). Dystonia in Parkinson's disease. *J Neurol*, 253 Suppl 7, Vii7-13. doi:10.1007/s00415-006-7003-6
- Tong, X., Ao, Y., Faas, G. C., Nwaobi, S. E., Xu, J., Hausteiner, M. D., . . . Khakh, B. S. (2014). Astrocyte Kir4.1 ion channel deficits contribute to neuronal dysfunction in Huntington's disease model mice. *Nat Neurosci*, 17(5), 694-703. doi:10.1038/nn.3691
- Torres, G. E., Sweeney, A. L., Beaulieu, J. M., Shashidharan, P., & Caron, M. G. (2004). Effect of torsinA on membrane proteins reveals a loss of function and a dominant-negative phenotype of the dystonia-associated DeltaE-torsinA mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(44), 15650-15655. doi:10.1073/pnas.0308088101
- Torres-Russotto, D., & Perlmutter, J. S. (2008). Task-specific dystonias: a review. *Ann N Y Acad Sci*, 1142, 179-199. doi:10.1196/annals.1444.012
- Tritsch, N. X., & Sabatini, B. L. (2012). Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. *Neuron*, 76(1), 33-50. doi:10.1016/j.neuron.2012.09.023
- Trivedi, A., Olivas, A. D., & Noble-Haeusslein, L. J. (2006). Inflammation and Spinal Cord Injury: Infiltrating Leukocytes as Determinants of Injury and Repair Processes. *Clin Neurosci Res*, 6(5), 283-292. doi:10.1016/j.cnr.2006.09.007
- Tsuda, M., Inoue, K., & Salter, M. W. (2005). Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia. *Trends Neurosci*, 28(2), 101-107. doi:10.1016/j.tins.2004.12.002
- Watkins, L. R., Milligan, E. D., & Maier, S. F. (2001). Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci*, 24(8), 450-455. doi:10.1016/s0166-2236(00)01854-3
- Wichmann, T. (2008). Commentary: Dopaminergic dysfunction in DYT1 dystonia. *Exp Neurol*, 212(2), 242-246. doi:10.1016/j.expneurol.2008.04.020
- Wickremaratchi, M. M., Knipe, M. D., Sastry, B. S., Morgan, E., Jones, A., Salmon, R., . . . Morris, H. R. (2011). The motor phenotype of Parkinson's disease in relation to age at onset. *Mov Disord*, 26(3), 457-463. doi:10.1002/mds.23469
- Wijemanne, S., & Jankovic, J. (2015). Dopa-responsive dystonia--clinical and genetic heterogeneity. *Nat Rev Neurol*, 11(7), 414-424. doi:10.1038/nrneuro.2015.86
- Wilson, A. M., Lowe, J. C., Roskilly, K., Hudson, P. E., Golabek, K. A., & McNutt, J. W. (2013). Locomotion dynamics of hunting in wild cheetahs. *Nature*, 498(7453), 185-189. doi:10.1038/nature12295
- Wilson, B. K., & Hess, E. J. (2013). Animal models for dystonia. *Mov Disord*, 28(7), 982-989. doi:10.1002/mds.25526
- Wu, Y., Dissing-Olesen, L., MacVicar, B. A., & Stevens, B. (2015). Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. *Trends Immunol*, 36(10), 605-613. doi:10.1016/j.it.2015.08.008
- Yin, H. H., & Knowlton, B. J. (2006). The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat Rev Neurosci*, 7(6), 464-476. doi:10.1038/nrn1919
- Zaborszky, L., & Vadasz, C. (2001). The midbrain dopaminergic system: anatomy and genetic variation in dopamine neuron number of inbred mouse strains. *Behav Genet*, 31(1), 47-59. doi:10.1023/a:1010257808945

- Zeman, W., Kaelbling, R., Pasamanick, B., & Jenkins, J. T. (1959). Idiopathic dystonia musculorum deformans. I. The hereditary pattern. *Am J Hum Genet*, 11(2 Part 1), 188-202.
- Zhang, J., & De Koninck, Y. (2006). Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury. *J Neurochem*, 97(3), 772-783. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03746.x
- 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. doi:10.1016/j.expneurol.2007.12.027
- Zilber, N., Korczyn, A. D., Kahana, E., Fried, K., & Alter, M. (1984). Inheritance of idiopathic torsion dystonia among Jews. *J Med Genet*, 21(1), 13-20. doi:10.1136/jmg.21.1.13
- Zoons, E., Booij, J., Nederveen, A. J., Dijk, J. M., & Tijssen, M. A. (2011). Structural, functional and molecular imaging of the brain in primary focal dystonia--a review. *Neuroimage*, 56(3), 1011-1020. doi:10.1016/j.neuroimage.2011.02.045
- Zweig, R. M., Hedreen, J. C., Jankel, W. R., Casanova, M. F., Whitehouse, P. J., & Price, D. L. (1988). Pathology in brainstem regions of individuals with primary dystonia. *Neurology*, 38(5), 702-706. doi:10.1212/wnl.38.5.702

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A2AR	Adenosin 2-Rezeptor
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BSA	Bovines Serum Albumin
ChAT	Cholin-Acetyltransferase
cm	Centimeter
CMAP	Muskelsummenaktionspotenzial
CNN	Convolutional neural network
CR	Calreticulin
D1-5DR	Dopaminrezeptoren 1-5
DAB	3,3-diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
DAT	Dopamintransporter
DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanin
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure
DRD	Dopamin-responsive Dystonie
DLM	Dystonie-ähnliche Bewegungen
DYT1KI	DYT1 Knock-in
Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3

FPS	frames per second
g	Gramm
GABA	γ -Aminobuttersäure
GPe	Globus pallidus externus
GPI	Globus pallidus internus
H₂O	Wasser
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff
HVA	Homovanillinsäure
Hz	Hertz
KCl	Kaliumchlorid
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
L-DOPA	Levodopa
M.	Musculus
mA	Milliampere
MeOH	Methanol
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure

MSN	mittelgroße Projektionsneurone im Striatum
N.	Nervus
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCV	Nervleitungsgeschwindigkeit
NGS	Normal Goat Serum
nNOS	neuronale Stickoxid-Synthase
NOS	Stickoxid-Synthase
NRS	Normal Rabbit Serum
PFA	Paraformaldehyd
PNS	peripheres Nervensystem
POD-Block	Peroxidase-Block
PV	Parvalbumin
QQ-Plot	Quantil-Quantil-Diagramm
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunden
SEM	Standardfehler
SN	Substantia nigra
SNc	Substantia nigra, pars compacta
SNr	Substantia nigra, pars reticulata

STN	Nucleus subthalamicus
Th	T-Helferzellen
TH	Tyrosinhydroxylase
TST	Schwanzsuspensionstest = Tail Suspension Test
vgl.	vergleiche
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
µm	Mikrometer

II **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1	Regelkreis zur Steuerung der Willkürmotorik im ZNS	11
Abbildung 2	Direkte und indirekte Signalwege der Basalganglien	12
Abbildung 3	Dopaminsynthese	14
Abbildung 4	Seddon-Klassifizierung	20
Abbildung 5	Versuchsaufbau der elektroneurographischen Messungen	34
Abbildung 6	Versuchsaufbau des TST	35
Abbildung 7	Die verwendeten Einstellungsparameter zur Erstellung des neuronalen Netzwerks	38
Abbildung 8	Phänotypische Erscheinungen im TST.....	46
Abbildung 9	Übersicht über die ausgewerteten Regionen der SNc in der TH ⁺ /Nissl Färbung.....	51
Abbildung 10	Stereologische Analyse der TH ⁺ /Nissl-Färbung	57
Abbildung 11	Anzahl der Dystonie-ähnlichen Bewegungen im TST	60
Abbildung 12	Nervenregeneration in den elektroneurographischen Messungen	63
Abbildung 13	Anzahl der Immunzellen im Striatum	64
Abbildung 14	Anzahl der Immunzellen im Rückenmark (graue Substanz).....	66
Abbildung 15	Anzahl der Immunzellen im Rückenmark (weiße Substanz)	68
Abbildung 16	Anzahl der Immunzellen im linken N. ischiadicus.....	70
Abbildung 17	Anzahl der Immunzellen im rechten N. ischiadicus	71
Abbildung 18	Anzahl und Volumen der TH ⁺ -Zellen in der SNc	74

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Aktuell gültige Klassifizierung der Dystonie [nach (Albanese et al., 2013)].	3
Tabelle 2	Chemikalien und Substanzen der operativen Eingriffe.....	23
Tabelle 3	Chemikalien für die immunhistochemischen Färbungen.....	24
Tabelle 4	Liste der verwendeten Antikörper.....	26
Tabelle 5	Angesetzte Lösungen.....	27
Tabelle 6	Technische Gerätschaften und Instrumentarium der operativen Eingriffe	29
Tabelle 7	Instrumentarium der verhaltensanalytischen Experimente.....	29
Tabelle 8	Instrumentarien und Software für die immunhistochemische Analyse und Auswertung.....	30
Tabelle 9	Benennung der markierten Körperteile und deren Definition	43
Tabelle 10	Die gefärbten Gehirnregionen, orientiert am Mausgehirnatlas von (Paxinos & Franklin, 2001).....	49

IV Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen herzlichen Dank aussprechen, wobei mir eine Seite dafür nicht genug erscheint. Zuerst gilt ein großes Dankeschön meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Chi Wang Ip, für die grandiose Unterstützung über die letzten Jahre. Von der Findung des Themas bis hin zur Durchführung aller Experimente konnte ich unter seiner Leitung immer auf einen großen Schatz an Erfahrung und Expertise vertrauen. Hierdurch habe ich so vieles mehr gelernt als „nur“ wissenschaftlich zu arbeiten. Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Philip Tovote und Herrn Prof. Dr. Lars Dölken für die Zweit- und Drittbegutachtung meiner Doktorarbeit.

Ein besonderer Dank gilt weiterhin Frau Dr. Lisa Rauschenberger, für die grandiose Betreuung während des gesamten Zeitraums meiner Dissertation vom ersten Tag an. Ohne diese Unterstützung wäre die Arbeit in diesem Ausmaß bei weitem nicht möglich gewesen und hätte wohl auch einige Zeit mehr in Anspruch genommen. Vielen Dank für das immer offene Ohr, die immer unglaublich schnellen Antworten, egal auf welchen Kanälen, zu welchen Jahres- und Tageszeiten und das Verständnis für meine Fragen jeglicher Art. Eine bessere Betreuung hätte ich mir nicht wünschen können.

Anknüpfend daran spreche ich ein großes Dankeschön auch an den Rest der Arbeitsgruppe aus, allen voran Louisa Frieß und Veronika Senger. Mit euch waren selbst die längsten Tage im Labor eine große Freude und auch ihr habt immer sehr geduldig alle Fragen beantwortet und uns allen immer viel Aufmerksamkeit und Verständnis für unsere Anliegen, welcher Art auch immer, entgegengebracht. So viele großartige Menschen kennenzulernen, hat mich auch persönlich im Leben sehr viel weitergebracht.

Zuletzt gilt mein allergrößter Dank meiner Familie. Ohne eure bedingungslose Liebe und Unterstützung in jeglicher Hinsicht über all die Jahre wäre das alles nicht möglich gewesen. Ihr wart und seid immer für mich da, egal in welcher Situation und ich kann mich immer auf euch verlassen. Euer Rückhalt spornt mich jeden Tag an und ich danke euch von Herzen für alles, was ihr für mich tut.

Danke!

VI Publikation

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Lisa Rauschenberger, Esther-Marie Krenig, Alea Stengl, Susanne Knorr, Tristan H. Harder, Felix Steeg, Maximilian U. Friedrich, Kathrin Grundmann-Hauser, Jens Volkmann, Chi Wang Ip,

Peripheral nerve injury elicits microstructural and neurochemical changes in the striatum and substantia nigra of a DYT-TOR1A mouse model with dystonia-like movements,

Neurobiology of Disease,

Volume 179,

2023