

Aus dem Institut für Neuropathologie (Zentrum für
Neuropathologie und Prionforschung, ZNP)
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Jochen Herms



**CHARAKTERISIERUNG EINES WIRKSTOFFES
ZUR HEMMUNG PATHOLOGISCHER PROTEIN-AGGREGATION IN EINEM
SYNUCLEINOPATHIE-MAUSMODELL**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Catharina Prix

aus
Bad Oldesloe

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Armin Giese

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Stefan Engelhardt

PD Dr. Arndt Schottelius

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. Johannes Levin

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.02.2022

Inhalt

1. EINLEITUNG	6
1.1. Neurodegenerative Erkrankungen	6
1.2. α -Synuclein	8
1.3. Synucleinopathien	11
1.3.1. Morbus Parkinson	14
1.3.2. Demenz mit Lewy-Körperchen	15
1.3.3. Multiple Systematrophie	15
1.3.4. Synuclein als Ko-Pathologie	16
1.4. Anle138b	16
1.5. Mausmodell des Morbus Parkinson	20
2. ZIELSETZUNG	23
3. MATERIAL UND METHODEN	24
3.1. Materiallisten	24
3.1.1. Versuchstiere	24
3.1.2. Geräte	24
3.1.3. Chemikalien	25
3.1.4. Verbrauchsmaterial	27
3.1.5. Sonstiges	28
3.2. Behandlungs- und Versuchsprotokoll	29
3.3. Versuchstierhaltung und orale Dosierung	29
3.4. Untersuchung der Motorik mit dem RotaRod	31
3.5. Genotypisierung	34
3.5.1. DNA-Isolierung:	35
3.5.2. Polymerase-Kettenreaktion	36
3.5.3. Gelelektrophorese und Visualisierung	37
3.6. Biochemische Untersuchung	38
3.6.1. Ultrazentrifugation	38
3.6.2. Alpha-Synuclein-Sucrosegradient	41
3.6.3. Gelelektrophorese	44
3.6.4. Western Blot	46
3.6.5. Visualisierung	47
3.7. Histologie	49
3.7.1. Präparation der Tiere	49
3.7.2. Fixation und Färbungen	50
3.7.2.1. HE-Färbung	50

3.7.2.2.	Immunhistochemische Färbung	51
3.7.3.	Auswertung	52
3.7.3.1.	Semi-quantitative Auswertung	52
3.7.3.2.	Quantitative Auswertung	54
3.8.	Statistik	55
3.8.1.	Analyse des Überlebens der transgenen Versuchstiere	55
3.8.2.	Analyse der motorischen Leistung der Versuchstiere	56
3.8.3.	Analyse des krankheitsfreien Überlebens der transgenen Versuchstiere	56
3.8.4.	Retrospektive Analyse der Prodromalphase	56
3.8.5.	Analyse der Gewichtsentwicklung der Versuchstiere	57
3.8.6.	Analyse der α -Synuclein-Ablagerungen im Gehirn	57
3.8.7.	Analyse der Biochemischen Analyse	57
4.	ERGEBNISSE	58
4.1.	Klinik und Überleben der Versuchstiere	58
4.1.1.	Motorische Leistungen	58
4.1.2.	Krankheitsfreies Überleben	62
4.1.3.	Motorische Leistung in der Prodromalphase	64
4.1.4.	Gewichtsentwicklung	65
4.1.5.	Zusammenfassung	65
4.2.	Biochemie	66
4.2.1.	Ultrazentrifugation	66
4.2.2.	Sucrosegradient	68
4.3.	Histopathologie	71
4.3.1.	Histologie in der Prodromalphase	73
4.3.2.	Terminal erkrankte Tiere	77
4.3.3.	Andere Tiere	78
4.3.4.	Kontrollgruppe	79
4.3.5.	Zusammenfassung	79
5.	DISKUSSION	81
5.1.	Relevanz der vorliegenden Arbeit	81
5.2.	Anle138b	83
5.3.	Überleben und motorischer Phänotyp des Synukleopathie-Mausmodells	84
5.4.	Biochemische Untersuchungen	86
5.5.	Immunhistologische Untersuchungen	87
6.	ZUSAMMENFASSUNG	89
7.	ANHANG	92
7.1.	Abkürzungsverzeichnis	92

7.2.	Abbildungsverzeichnis	97
7.3.	Tabellenverzeichnis	100
7.4.	Literaturverzeichnis	102
7.5.	Danksagungen	111
7.6.	Eidesstattliche Versicherung	112

1. Einleitung

1.1. Neurodegenerative Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen sind sporadische, oder seltener erblich bedingte, Erkrankungen des Zentralnervensystems (ZNS). Sie betreffen das gesamte ZNS, sind aber in der Regel in einem oder mehreren Netzwerken oder einer Hirnregion betont. Sie gehen mit langsam fortschreitendem Funktionsverlust und Ausfall der betroffenen Nervenzellpopulationen und ihrer Verbindungen einher. Damit verbunden sind bei allen häufigen neurodegenerativen Erkrankungen Ablagerungen unlöslicher Eiweißaggregate extrazellulär, im Zellzytoplasma oder Zellkern. Einige wichtige Proteine sind in Tabelle 1 aufgeführt. ^{1,2}

Erkrankung	Protein
Alzheimer Krankheit	A β
	Tau
	α S
Parkinson Krankheit	α S
Huntington-Krankheit	HTT
Prionenerkrankungen	PrP
Polyglutamin Erkrankungen	Ataxine, Atrophin-1, Androgenrezeptor
Tauopathien	Tau
Amyotrophe Lateralsklerose / Frontotemporale Lobärdegeneration	SOD1, TDP43, FUS, TAF15, Ubiquitin

Tabelle 1: Merkmale von neurodegenerativen Erkrankungen, die durch Protein-Aggregation und Ablagerung abnormaler Proteine charakterisiert sind. Nach Kumar et al (2016) ³ Abkürzungen: Beta-Amyloid (A β), Tau-Protein (Tau), α -Synuclein (α S), Huntington (HTT), Prionprotein (PrP), Superoxiddismutase 1 (SOD1), TAR DNA-binding protein 43 (TDP43), Fused in Sarcoma (FUS), TATA-Box Binding Protein Associated Factor 15 (TAF15)

In den letzten Jahren gab es vermehrt Hinweise darauf, dass der grundlegende Pathomechanismus von neurodegenerativen Erkrankungen in der Produktion von löslichen Proteinoligomeren liegt, welche sich zu unlöslichen Aggregaten weiterentwickeln. Im Fall von Morbus Alzheimer (AD) und Morbus Parkinson (PD) sind das zum Beispiel Aggregate aus Beta-Amyloid (A β), Tau-Protein (Tau) und α -Synuclein (α S). Diese Oligomere scheinen schädlich für die Nervenzellen in ihrer

Umgebung zu sein, wobei der molekulare Mechanismus noch nicht vollständig geklärt ist.⁴

Neuere Studien zeigen die Möglichkeit auf, dass α S-Oligomere in der Lage sind Porenkomplexe zu bilden, welche die Elektrophysiologie der Nervenzellen stören und damit einen Zelluntergang induzieren könnten.⁵ Auch andere Pathomechanismen wie die Blockade des Ubiquitin-Proteasom-Systems werden diskutiert.⁶

Neurodegenerative Erkrankungen zeigen einen progredienten Verlauf mit charakteristischen klinischen, morphologischen und biochemischen Veränderungen. Da sie vornehmlich, wenn auch nicht ausschließlich, im fortgeschrittenen Alter auftreten, führen steigende Lebenserwartung und die Zunahme des Anteils älterer Menschen in der Bevölkerung zu einem drastischen Anstieg der Inzidenz dieser oft mit schweren neurologischen Ausfällen einhergehenden Leiden.

In der Europäischen Union (EU) wird bis 2030 eine Alterung der Bevölkerung mit Zunahme der 60 – 80-jährigen um 50 % und der über 80-jährigen um 200 % erwartet. Voraussichtlich ein Drittel der Bevölkerung wird über 65 Jahre und ein Viertel über 80 Jahre alt sein. Diese Menschen tragen ein erhöhtes Risiko für neurodegenerative Krankheiten. AD und PD als häufigste dieser Erkrankungen zeigen weltweit eine deutliche Zunahme.

Typisch ist ein schleichender Beginn, meist zwischen dem 50. und 75. Lebensjahr und eine langsame Krankheitsprogredienz bis hin zu schwerster Behinderung und Pflegebedürftigkeit.

Der Tod erfolgt meist durch Sekundärkomplikationen (Pneumonie, Harnwegs- und andere Infekte, Lungenembolie u.a.), kardiovaskuläre Prozesse oder dem Ausfall lebenswichtiger zerebraler Funktionen.

Angesichts der sich rasch verändernden Alterszusammensetzung der Bevölkerung und steigenden Gesundheitskosten ist diese Krankheitsgruppe ein aktuelles sozialmedizinisches wie gesundheitspolitisches Problem höchster Priorität.¹

1.2. α -Synuclein

α S gehört zusammen mit β - und γ -Synuclein zu einer Familie sehr eng verwandter Proteine, die in drei verschiedenen Bereichen des Genoms codiert sind. Beim Menschen ist die im Hirn vorherrschende Form α S ein kleines, lösliches Protein in der Größe von 140 Aminosäuren, welches 1% aller Proteine in Nervenzellen ausmacht. Es findet sich unter anderem in den präsynaptischen Nervenendigungen.⁷

Das humane Gen für α S (*SNCA*) liegt auf Chromosom 4, die exakte Position lautet 4q21.3-q22. Es umfasst eine Region von 111 kb und besteht aus sieben Exons.⁸

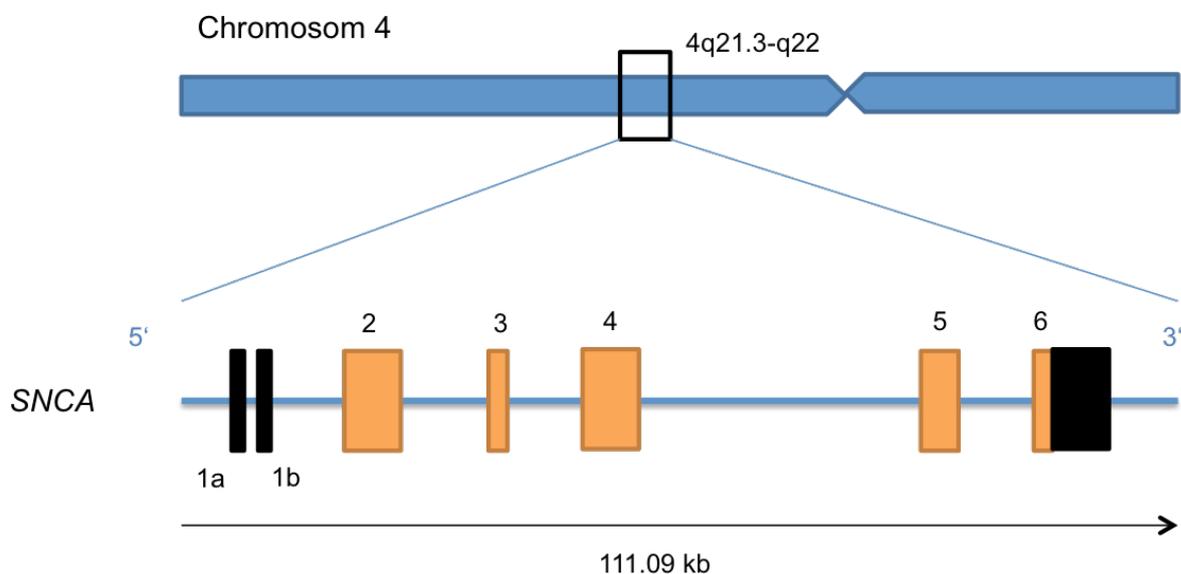


Abbildung 1: Schematische Darstellung des SNCA Gens. Nach Venda et al (2010)

Die primäre Struktur von α S kann grob in drei Regionen aufgeteilt werden, welche sehr unterschiedliche Eigenschaften haben.

1. Die N-terminale Region (1-60) ist amphipatisch und besteht aus einer imperfekten Sequenzwiederholung aus elf Aminosäuren, welche konsequent das Motiv KTKEGV beinhaltet. Diese Sequenz erinnert an die lipidbindende Domäne in Apolipoproteinen, welche unter bestimmten Umständen eine amphipatische Helix bilden können. Die fünf bekannten Missense-Mutationen (A30P, E46K, H50Q, G51D und A53T), die familiäre PD verursachen können, liegen in dieser Region. Diese Erkenntnis stützt die Vermutung, dass dieser Teil des Proteins für die Funktion sehr wichtig ist.^{9,10}

2. Die Zentralregion (61-95) besteht aus sehr hydrophoben Anteilen. Sie wird aus historischen Gründen auch Nicht-A β -Komponente der Alzheimer-Plaques (NAC) genannt. Teile dieser Region wurden als die monomeren Bestandteile identifiziert, die sich zu größeren Aggregaten und letztendlich zu amyloiden Fibrillen aggregieren.⁹
3. Die C-terminale Region (94-140) schließlich ist hydrophil und reich an den Aminosäuren Prolin, Glutamat und Aspartat. Größe und Sequenz variieren erheblich zwischen verschiedenen Spezies. Es wird angenommen, dass der C-Terminus dem α S Chaperonaktivität verleiht. Kurz zusammengefasst haben Chaperone die Aufgabe vor allem größere und komplexere Proteine bei der Faltung von der Primär- zur Sekundärstruktur zu unterstützen und vor der Bildung von unerwünschten, funktionsuntüchtigen Aggregaten zu schützen. Dieser saure Abschnitt ist im Wesentlichen ungefaltet und negativ geladen. Posttranslationale Modifizierungen dieser Region, wie Oxidierung, Nitrierung und Phosphorylierung, beeinflussen die Neigung zur Aggregation. Zum Beispiel erhöht die Phosphorylierung an Serin 129 die Wahrscheinlichkeit zur Aggregation, eine Phosphorylierung an Tyrosin 125 hingegen scheint vor einer Aggregation zu schützen. Trunkiertes α S scheint ebenfalls die Aggregationsneigung zu erhöhen, dies konnte *in vitro* gezeigt werden. Außerdem konnte trunkiertes α S in Patienten mit PD und Demenz mit Lewykörperchen (DLB) nachgewiesen werden.^{11,12,13,14,15,16,17,18,19}

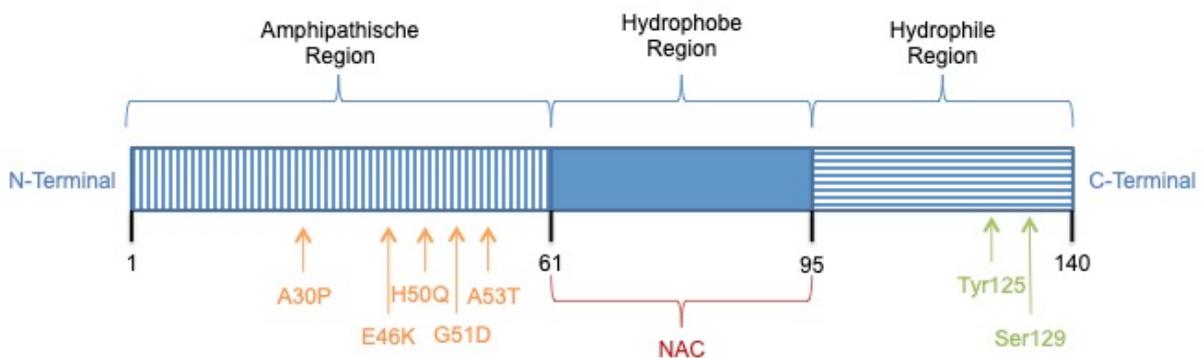


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Primärstruktur von α S. Nach Venda et al (2010)

Bis heute ist die Funktion von α S nicht vollständig geklärt. Studien zeigen, dass Mäuse mit Defekten in α - und β S ohne primären Hirndefekt überleben und einen weitgehend normalen Phänotyp zeigen. Lediglich in tiefergehenden Untersuchungen zeigen sich bei *knock-out* Mäusen eine leichte Reduktion der Dopaminspiegel und eventuell eine Protektion vor Amyloidpathologien.²⁰ α S in wässriger Lösung fehlen sekundäre oder tertiäre Strukturen und es gehört daher zu den natürlicherweise ungefalteten Proteinen, von denen viele als Chaperone agieren. Dies wird dadurch gestützt, dass bekannt ist, dass α S mit verschiedenen anderen Proteinen interagiert. Ein entsprechender Kontakt induziert dabei eine strukturelle Änderung des N-Terminus zu einer α -Helix, wie es insbesondere bei der Bindung von α S an bestimmte Membranoberflächen gezeigt wurde. Weitere Unterstützung der Chaperon-Theorie erhielt man durch Experimente mit genetisch-manipulierten Mäusen, in denen das *cystein-string-protein- α* (CSP α) entfernt wurde. CSP α ist ein Protein der synaptischen Vesikel, das als Co-Chaperon für SNARE Proteine (englische Abkürzung für *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) fungiert. α S scheint in der Lage zu sein als auxiliäres Chaperon die Funktion von CSP α zu komplettieren.

In den präsynaptischen Nervenendigungen ist α S assoziiert mit Membranen von synaptischen Vesikeln, was eine Rolle in der Regulation der Ausschüttung von Neurotransmittern nahe legt.⁷

Heute besteht die Meinung, dass kleine lösliche α S-Oligomere die wesentliche toxische Spezies darstellen und nicht die unlöslichen Fibrillen in den Lewy-Körperchen (LB).^{21,22} Die aktuellen Theorien gehen dabei davon aus, dass in einem Aggregationsprozess krankheitsspezifische Oligomere entstehen, die einen Zelltod induzieren.^{23,24}

1.3. Synucleinopathien

Die Beteiligung von α S an neurodegenerativen Erkrankungen wurde zum ersten Mal vermutet, als ein α S-Fragment aus Amyloidplaques eines Alzheimerpatienten isoliert werden konnte. Hier wurde es zunächst als *Precursor* der Nicht-A β -Komponente des Alzheimer-Amyloids (NAC) bezeichnet. 1997 wurde in einer Familie, in der die autosomal dominante *early-onset* Form von PD verbreitet war, eine krankheitsassoziierte Mutation im α S-Gen mit hoher Penetranz entdeckt. Diese Mutation führte zu einem einzelnen Aminosäureaustausch (Ala53Thr).²¹ Außerdem zeigte sich, dass α S der Hauptbestandteil der LB und Lewy-Dentriten (LD) ist. Dies legt den Schluss nahe, dass α S eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Morbus Parkinson spielt.^{25,26}

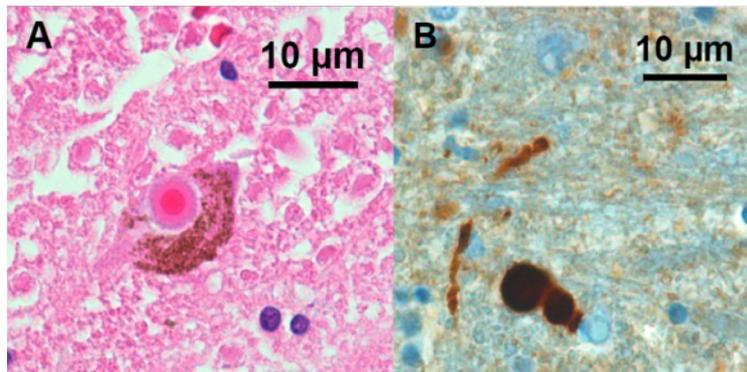


Abbildung 3: (A) Lewy-Körperchen (HE-Färbung). (B) Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten (Antikörper 15G7) (Bilder: Prof. Dr. Manuela Neumann, DZNE Tübingen und Dr. med. T. Högen, Neurologische Klinik und Poliklinik der LMU München).

α S wird heute mit mehreren neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht, diese werden als Synucleinopathien bezeichnet. α S wurde als Hauptbestandteil von LBs und LDs ausfindig gemacht. Diese intrazellulären Einlagerungen in Nervenzellen können histologisch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie PD, DLB, Lewy-Körperchen-Variante des Morbus Alzheimer und die Neurodegeneration mit zentraler Eisenablagerung Typ I (NBIA I, früher: Hallervorden-Spatz-Krankheit) nachgewiesen werden. Auch bei der Multiplen Systematrophie (MSA) können zytoplasmatisch Synuclein-Fibrillen beobachtet werden, im Gegensatz zu den oben aufgeführten Krankheiten sind die Einschlüsse

dabei aber auch zu einem wesentlichen Anteil in Gliazellen lokalisiert und werden hier als *glial cytoplasmic inclusions* (GCI) bezeichnet. Weitere Missens-Mutationen im α S codierenden Gen wurden als Ursache für familiäre Parkinson Krankheit identifiziert.

7,27–30

Die genaue Pathogenese von PD und anderer Synukleinopathien konnte bis heute nicht abschließend geklärt werden. Verschiedene im Folgenden aufgeführte Erkenntnisse legen aber eine Rolle von α S in der Pathogenese nahe.

1. Lösungen aus monomeren α S oder Peptidfragmente aus diesen aggregieren zu amyloiden Fibrillen, welche eine ähnliche Struktur haben, wie die Fibrillen, die aus LBs isoliert werden konnten.⁴
2. Des Weiteren sind sechs Mutationen im humanen α S-Gen (vier Missensemutationen (vgl.1.2), sowie die genomische Duplikation bzw. Triplikation) beschrieben, welche mit autosomal dominant vererbtem PD assoziiert sind. Die Mutationen lösen jeweils einen einzelnen Aminosäureaustausch aus, woraus eine α S-Variante resultiert, welche eine erhöhte Aggregationsneigung hat.^{31,32,33}
3. Die Duplikation oder Triplikation des α S-Genes auf einem Chromosom führen zu einem 50%igen bzw. 100%igen Anstieg der Expression des Proteins. Dies führt zu PD, wobei das Erkrankungsalter und die Symptomatik proportional zur Anzahl der Genkopien ist.³⁴
4. α S ist wesentlicher Bestandteil von LB. Viele der α S-Proteine sind posttranslational modifiziert, durch Trunkierung am C-Terminus, Phosphorylierung am Ser129 oder durch Nitration. Es hat sich gezeigt, dass durch die Modifikationen eine erhöhte Aggregations-Tendenz zu beobachten ist.^{35–37}
5. Dopamin und verwandte Katecholamine scheinen mit α S zu interagieren und das protofibrilläre Stadium der Aggregation zu stabilisieren. Dies könnte ein mögliche Erklärung für die erhöhte Anfälligkeit der dopaminergen Nervenzellen sein.³⁸

6. Die Aggregation von α S wird ebenfalls durch die Gegenwart von Metallionen gefördert. Bei Patienten mit PD ist die Eisenkonzentration in der Substantia nigra erhöht. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass unter Anwesenheit von Fe^{3+} α S vermehrt reaktive Sauerstoffspezies bildet, die Zellschäden verursachen können.⁵
7. α S-Oligomere sind in einigen Zellkulturen toxisch, so zum Beispiel in der humanen dopaminergen SH-SY5Y Neuroblastomzelllinie. Dabei gibt es Anhaltspunkte, dass nicht die Fibrillen sondern frühe Aggregate, wie lösliche Oligomere auf ihrem Weg zur fibrillären Formation die toxische Spezies sind. Neuere Studien zeigten darüber hinaus die Affinität von α S zu Phospholipidmembranen.³⁹
8. Die erhöhte Expression von humanem α S in transgenen Fliegen und Mäusen ist vergesellschaftet mit neuronalen Dysfunktionen und dem Verlust von synaptischen Endigungen bzw. Neuronen. Diese Art von Läsionen konnte ebenfalls in Gehirnen von PD Patienten gefunden werden. Die Tiere entwickelten ebenfalls motorische Auffälligkeiten.^{40,41}
9. Die Expression von mutierten Formen des α S in Zellkulturen fördert mitochondriale Schäden und Zelltod. Außerdem erhöht es die Anfälligkeit der Zelle für oxidativen Stress.⁴²
10. Mäuse ohne α S sind unter bestimmten Bedingungen resistent für die Toxizität von 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridi (MPTP), ein Toxin, das parkinsonartige Veränderungen induzieren kann.⁴³

Kleine α S-Oligomere scheinen im stärkeren Maße als die größeren α S-Aggregate die primäre pathogene Partikelspezies darzustellen, die ursächlich für die Neurodegeneration verantwortlich sein könnte.

1.3.1. Morbus Parkinson

PD ist nach dem englischen Arzt James Parkinson benannt, der die klinische Symptomatik erstmals 1817 in „*An Essay on the Shaking Palsy*“ beschrieben hat.⁴⁴



Abbildung 4: Front- und Seitenansicht eines Mannes, der unter PD leidet. Das Bild ist eine Reproduktion eines Holzschnittes von Paul de Saint-Leger's, welchen er 1879 in seiner Doktorarbeit "*Paralysie agitante*" zeigte. Veröffentlicht wurde es 1886 von W.R. Gowers.

PD ist eine irreversible, progredient verlaufende neurodegenerative Erkrankung, die vor allem die Bewegungsabläufe verändert. Die Inzidenz steigt im Alter. *Early-onset* PD, definiert als Erkrankung vor dem 40 Lebensjahr, macht jedoch lediglich 5% aller neu diagnostizierten Fälle aus. Im Alter von 65-69 Jahren sind ca. 0,6 % der Gesamtbevölkerung betroffen, im Lebensalter von 85-89 Jahren sind es schon 2,6 %. Somit ist der PD nach AD die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung. Die meisten Fälle von PD sind idiopathisch oder sporadisch. In den letzten Jahren haben Studien aber gezeigt, dass eine beträchtliche Zahl an Fällen eine genetische Komponente hat.^{45,46}

Die vier Kardinalsymptome des PD sind Ruhetremor, Rigor, Brady- oder Akinese und posturale Haltungsstörungen. Im Gegensatz zum AD haben die meisten Patienten,

zumindest im Anfangsstadium der Erkrankung, keine Gedächtnisstörungen im Sinne einer Demenz.⁴

Die Ursachen der Symptome liegen im Falle des PD in der Degeneration von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra des Mittelhirns und anderer monoaminerger Nervenzellen im Hirnstamm.

1.3.2. Demenz mit Lewy-Körperchen

Die DLB wird zusammen mit der multiplen Systematrophie (MSA), der progressiven supranukleären Blickparese (PSP) und der kortikobasalen Degeneration (CBD) zu den Parkinson plus oder atypischen Parkinsonerkrankungen (APD) gezählt. Die DLB ist eine neurodegenerative Demenz älterer Menschen. Klinisch ist sie durch das Auftreten eines dementiellen Syndroms mit Parkinsonismus, fluktuierender Aufmerksamkeit und visuellen Halluzination charakterisiert. Es gibt eine weite Überschneidung mit dem Krankheitsbild der Demenz bei Parkinson-Krankheit (PDD). Bei der DLB können kognitive Symptome jedoch der Bewegungsstörung vorangehen. Neuropathologisch lassen sich die Erkrankungen nicht voneinander trennen. Es wird vermutet, dass DLB nach der AD die zweithäufigste neurodegenerativ bedingte Demenz ist. Einige Studien legen einen Anteil von 11%-22% aller Demenzpatienten nahe.⁴⁷ Immunohistopathologisch handelt es sich um eine neuronale α -Synucleinopathie.

1.3.3. Multiple Systematrophie

Die MSA ist eine fortschreitende neurodegenerative Erkrankung, bei der neben Bewegungsstörungen vor allem autonome Störungen im Vordergrund stehen. In Abhängigkeit der dominanten motorischen Störung unterscheidet man zwischen dem Parkinson-Typ der Multiystematrophie (MSA-P), mit vorherrschenden hypokinetischen Symptomen, und dem zerebellären Typ der Multisystematrophie (MSA-C), bei dem zerebellären Ausfällen dominieren. Weitere motorische Symptome wie Dystonien, Myoklonien oder Spastik können bei beiden Untertypen auftreten, zudem können auch neuropsychologische Störungen wie Depression und Gedächtnisstörungen hinzukommen. Bei der MSA findet sich α S hauptsächlich als zytoplasmatische Einschlüsse in Oligodendrozyten.⁴⁸

1.3.4. Synuclein als Ko-Pathologie

Neben den Synucleinopathien im eigentlichen Sinne (PD, DLB, MSA) finden sich auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen häufig α S als Ko-Pathologie. So konnten Einschlüsse abnormen α S im Sinne von LB in Patienten mit der AD nachgewiesen werden. AD ist der häufigste Grund für eine Demenz und einer der Hauptursachen erhöhter Morbidität und Mortalität in der alternden Gesellschaft. Die Hauptpathologie besteht dabei aus β -Amyloid (A β) und hyperphosphoryliertem Tau (vgl.: 1.1), aber insbesondere im mittleren und späten Stadium der Alzheimererkrankung treten auch α S -Ablagerungen auf, welche sich gehäuft in der Amygdala nachweisen lassen.^{49,50} Auch in einigen familiären Formen der früh beginnenden Alzheimererkrankung (EOAD) konnte α S als Kopathologie nachgewiesen werden.^{25,51}

1.4. Anle138b

Anle138b [3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(3-bromophenyl)-1H-pyrazole], ist ein neuartiger Oligomermodulator. (Patent: Giese, A. et al (2009). EP2684873B1 (European Patent Office) (Abbildung 5).

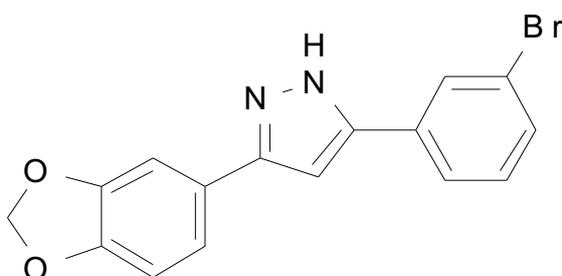


Abbildung 5: Strukturformel Anle138 b

Die Leitstruktur wurde mit einem Screening identifiziert und anschließend chemisch optimiert. (Abbildung 6)

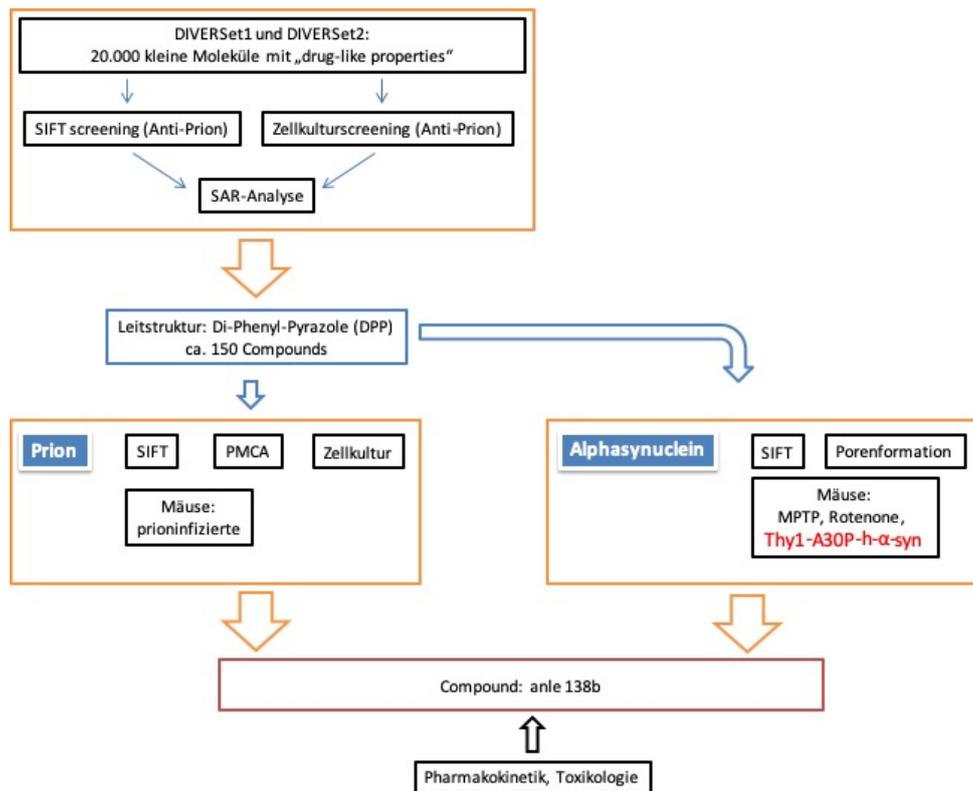


Abbildung 6: Entwicklung von Anle138b; in Rot dargestellt Inhalt dieser Dissertation

Im Detail wurden 20.000 Substanzen aus einer Substanz-Bibliothek auf die Inhibition von pathologischer Proteinaggregation in einem molekularen *SIFT screening assay* (*Scanning for Intensely fluorescent Targets*) getestet. Dabei handelt es sich um eine Methode zur hoch sensitiven Detektion von Aggregaten aus Proteinen.^{52,53} Die wirksamen Substanzen wurden in der Folge in einem zellbasierten Assay getestet. Im Anschluss daran Struktur-Aktivitäts-Analysen (SAR) und Clusteranalysen durchgeführt. Als Leitstruktur kristallisierte sich nach diesen Analysen N-Benzyliden-Benzohydrazide (NBB) und 3,5-Diphenyl-Pyrazole (DPP) heraus.^{54,23,55,56} In weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass NBBs *in vivo* chemisch labil sind, was am ehesten durch eine Schiff'sche Base und einer damit verbundenen raschen Metabolisierung erklärlich ist.

DPP-Substanzen hingegen zeigten in Modellen anderer Proteinaggregationskrankheiten z.B. in Experimenten mit prioninfizierten Mäusen eine Inhibition der Ablagerung (Abbildung 7) und ein verlängertes Überleben.^{54,23,56,55}

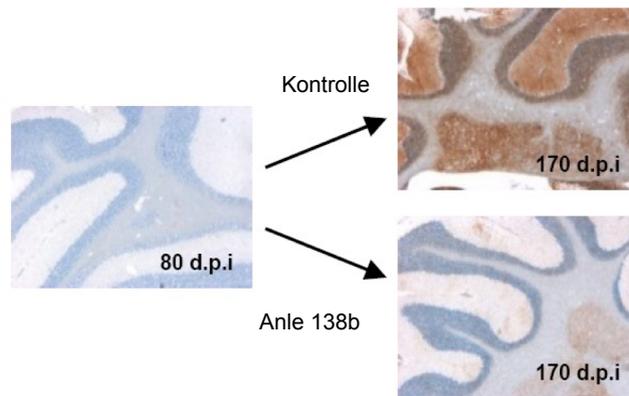


Abbildung 7: α S-Abblagerungen in prioninfizierten Mäusen mit und ohne Behandlung

Es wurde daher eine fokussierte Substanzbibliothek von DPPs erstellt, die in verschiedenen Versuchsansätzen (SIFT-Analyse, Einfluss auf Porenformation *in vitro*, verschiedene Mausmodelle) auch mit α S getestet wurde. Dabei zeigten sich vielversprechende Ergebnisse in Bezug auf die Modulation einer pathologischen Aggregation von α S insbesondere für die Substanz Anle138b⁵⁷ (Abbildung 8)

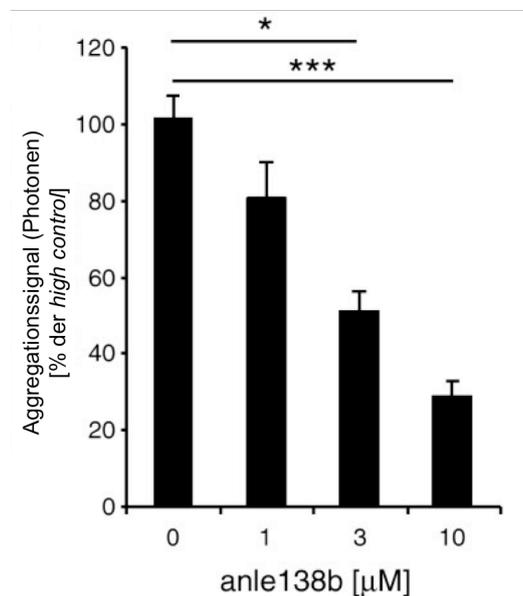


Abbildung 8: Effekt von Anle138b auf die Bildung von α S-Oligomere in der SIFT-Analyse. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. Aus Wagner et al (2013)

Darüber hinaus wurden mehrere pharmakokinetische und toxikologische Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurde C57/BL6 Wildtypmäusen je eine Dosis

intraperitoneal, oder mittels Schlundsonde oder in Erdnussbutter gemischt oral verabreicht. Tiere wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und die Konzentration von Anle138b in Serum (links) und Gehirn (rechts) mittels Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie (LC-MSMS) gemessen. (Abbildung 9).

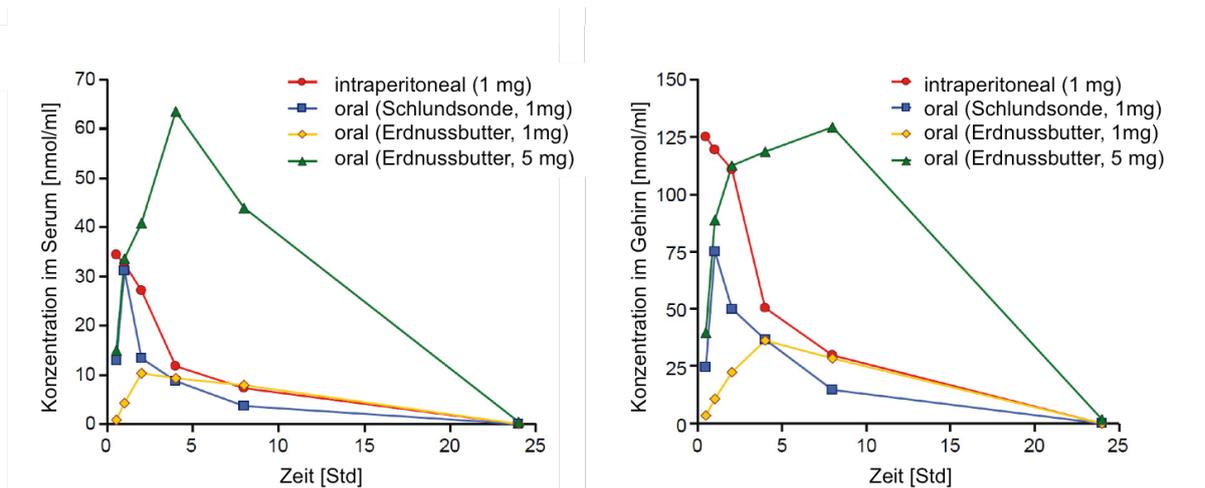


Abbildung 9: Pharmakokinetische Analyse von Anle138b. Aus Wagner et al (2013)

In Bezug auf die orale Verfügbarkeit, konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Anle138b im Tierversuch in handelsüblicher Erdnussbutter eingemischt gut funktioniert. Die Vorzüge liegen zum einen in einer retardierten Resorption und damit einer verlängerten Verfügbarkeit. Es ließen sich dabei hohe Wirkspiegel sowohl im Serum als auch im Gehirn feststellen. Zum anderen lässt sich durch diese Methode eine deutliche Stressreduktion der Versuchstiere im Vergleich zur intraperitonealen Gabe oder Applikation via Schlundsonde erreichen.

Ein weiterer Vorteil von Anle138b gegenüber den anderen Substanzen liegt neben der guten oralen Verfügbarkeit in den Tatsachen, dass es gut ZNS-gängig und bei bisherigen Versuchen nicht toxisch war.⁵⁷

Neuere Untersuchungen mittels Molekulardynamik-Simulation konnten die Wirkweise von Anle138b näher beleuchten. Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass die Substanz die Entstehung von Oligomeren durch Interaktion mit hydrophoben Wechselwirkungen verhindert. Es wird postuliert, dass Anle138b dabei in signifikanten Maßen die intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen verhindert. Dies geschieht

wahrscheinlich schon auf Ebene der Dimere, sodass die Bildung toxischer Oligomere vermindert werden kann. Im weiteren Verlauf kann Anle138b aber wahrscheinlich auch die Verbindungen inhibieren, die dazu führen, dass Oligomere zu einem stabilen Aggregat wachsen.⁵⁸ (Abbildung 10)

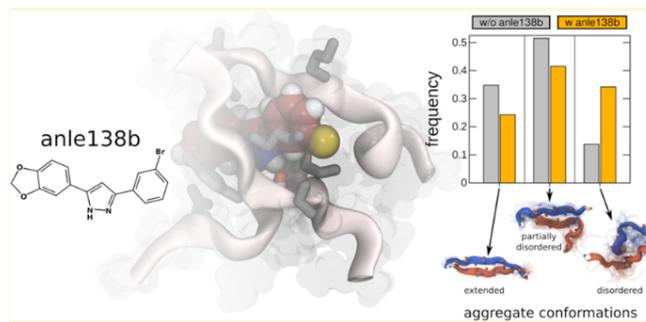


Abbildung 10: Schema des molekularen Wirkprinzips von Anle138b. (Aus: Matthes, et al., Resolving the Atomistic Modes of Anle138b Inhibitory Action on Peptide Oligomer Formation, ACS Chem., Neurosci. 2017)

1.5. Mausmodell des Morbus Parkinson

Tiermodelle von menschlichen Erkrankungen sind wichtige Werkzeuge der experimentellen Medizin, um die Auswirkungen von Noxen oder Genmutationen mit dem komplexen Ablauf von primären und sekundären pathophysiologischen Prozessen zu untersuchen und damit zu verstehen, wie es von einer ursächlichen zellulären Dysfunktion zum kranken Phänotyp kommt. Weiterhin kann man an diesen Modellen Behandlungsstrategien erproben, die vor dem ersten Einsatz am Menschen unabdingbar sind.²

Für Morbus Parkinson gibt es einerseits pharmakologisch-induzierte funktionelle Modelle bei denen durch Verabreichung von Neurotoxinen wie 6-Hydroxydopamine hydrochloride (6-OHDA), 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) oder Amphetamin-Derivaten zum Teil sehr selektiv dopaminerge Nervenzellen geschädigt werden und pathologische Veränderungen sowie motorische Symptome induziert werden.

Auf der anderen Seite gibt es Tiermodelle, die auf Beobachtungen beruhen, dass es eine Reihe von Genmutationen gibt, die familiäre Formen der PD hervorrufen (vgl 1.3).

Mithilfe molekularbiologischer Techniken werden bestimmte Gene, je nach dem humanen Befund, entweder ausgeschaltet oder überexprimiert.²

1998 wurde in einer italienisch-amerikanischen Familie die Punktmutation A30P in *SNCA* identifiziert, durch die die betroffenen Familienmitglieder eine aggressive, *early-onset* Form des PD entwickelten.^{59,60} Um die Auswirkungen dieser Mutation *in vivo* zu untersuchen wurde ein transgenes Mausmodell entwickelt. Die Expression von [A30P] α S wird durch den neuronenspezifischen Promotor Thy-1 geregelt (Abbildung 11)^{61, 62}



Abbildung 11: (A) C57Bl/6 Maus (B) Genkonstrukt des α -Synucleinopathie{(Thy1)-h[A30P] α -syn}Mausmodels. Nach Kahle et al (2000)

Das Mausmodell ist bereits gut charakterisiert. Es konnte schon ein altersabhängiger kognitiver Abbau gezeigt werden, während die Anzahl der α -Synucleinfibrillen ansteigt. Im Alter von 4 Monaten zeigten die transgenen Tiere keinen Unterschied zu ihren Wildtypaltersgenossen. Im Alter von 12 Monaten zeigten die transgenen Mäuse eine signifikant schlechtere Leistung in Test wie dem *Morris water maze* und im Angstverhalten.

Darüber hinaus konnte ein altersabhängiger motorischer Phänotyp gezeigt werden. Junge transgene Mäuse zeigten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe in ihren motorischen Leistungen keine signifikanten Unterschiede in einem *open field* – Test. Bei diesem Versuchsaufbau werden die Tiere in eine unbekannte, in Felder unterteilte Umgebung ohne Versteckmöglichkeiten gesetzt. Dabei wird das Explorationsverhalten anhand der Felder sowie die Defäkation als Maß des Stresses erhoben.⁶³ Ebenso wenig lässt sich eine verminderte motorische Leistung auf dem Rotarod (vgl.: 3.4) nachweisen. In ihrem mittleren Lebensabschnitt hingegen wurden sie zunächst hyperaktiv. Dieses Phänomen wurde bereits bei einer anderen α S Mauslinie

beobachtet, was mit der veränderten dopaminergen Neurotransmission erklärt wird. Dabei kommt es zu einer reduzierten Anzahl von Dopamintransportern im Nucleus accumbens und dem Striatum, wohingegen die Anzahl an D1-Rezeptoren in der Substantia nigra steigt.

Im zweiten Lebensjahr zeigen die transgenen Mäuse lokomotorische Defizite. Schlussendlich führte die genetische Modifikation zu einem vorzeitigen Tod.

Da die transgenen Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen vor Beginn der Symptome vergleichbare Leistungen zeigen, modellieren sie hinsichtlich des Krankheitsverlaufes und der Klinik einige Kardinalsymptome von PD. Die durch Überexpression von α S ausgelöste Pathologie macht dieses Morbus Parkinson-Modell brauchbar für weitere Studien über den molekularen Mechanismus von PD und assoziierten Krankheiten mit α S-Pathologie.⁶⁴

Zusätzlich zum Phänotyp zeigte sich in der biochemischen Aufarbeitung, dass das Mausmodell wichtige molekulare Aspekte der humanen PD nachvollzieht. Es zeigen sich unlösliche α S-Aggregate in den murinen Neuronen. (Abbildung 12)⁶⁵

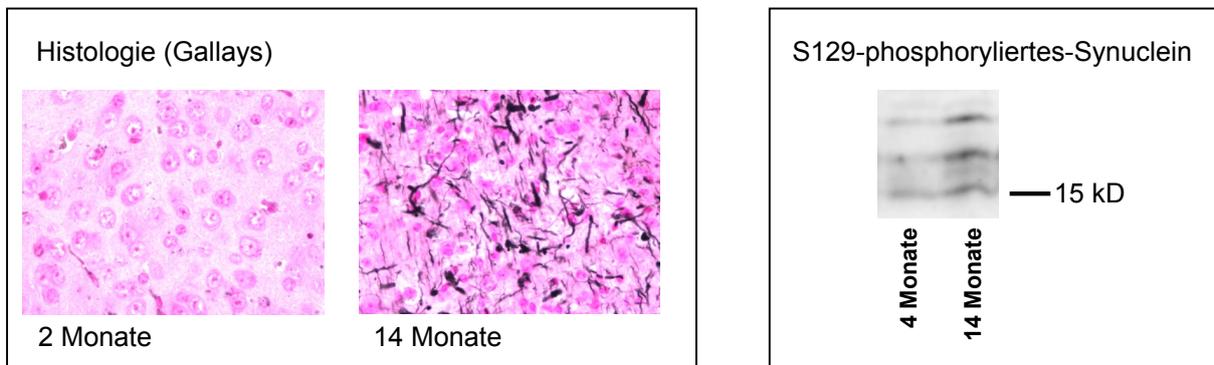


Abbildung 12: Links: Histologie einer jungen und alten transgenen Maus. Rechts: Nachweis unlöslicher α S Aggregate im WesternBlot. (Bilder: Prof. Dr. Johannes Levin, Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung, LMU München)

2. Zielsetzung

Bis heute konnte keine Medikation entwickelt werden, die in der Lage wäre, den Prozess, der bei Synukleinopathien zum Nervenzelltod führt, zu verlangsamen oder ganz zu verhindern. Alle bisher verfügbaren PD Therapien sind rein symptomatisch.

In vitro wurde bereits gezeigt, dass Anle138b eine Hemmung der Aggregation von α S bewirkt. Zudem ist Anle138b *in vivo* im Prion-Mausmodell wirksam.⁵⁷ Es gibt gute transgene Synukleinopathie-Mausmodelle.⁶⁴

Ziel dieser Studie war es die Wirksamkeit von Anle138b in einem α -Synucleinmausmodell *in vivo* zu untersuchen.

Die primäre Zielsetzung lag dabei in der Verbesserung des motorischen Phänotyps und der Verlängerung des krankheitsfreien Überlebens der Versuchstiere durch die Gabe von Anle138b.

In zweiter Linie sollte die mögliche Reduktion der pathologischen Proteinablagerung im ZNS der Versuchstiere mittels biochemischer und histopathologischer Untersuchungsmethoden dargestellt werden.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit Anle138b erstmals als Langzeittherapie über mehr als ein Jahr verabreicht. Es war also von großem Interesse welche potentiellen Nebenwirkungen bei einer langfristigen Gabe auftreten können.

3. Material und Methoden

3.1. Materiallisten

3.1.1. Versuchstiere

Material	Hersteller
{{(Thy1)-h[A30P] α -syn}Mausmodel	Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung (München, Deutschland). Nach Kahle et al, 2000 ⁶¹
C57BL/6 Wildtypiere	Harlan Winkelmann (Eystrup, Deutschland)

Tabelle 2: Materialliste, Versuchstiere

3.1.2. Geräte

Material	Hersteller
ChemiLux - Kamerasystem	Intas Science Imaging Instruments (Göttingen, Deutschland)
Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Gelelektrophorese - Apparatur	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
Gleichspannungsgenerator E385	Consort (Turnhout, Belgien)
Kamera Syngene	Syngene (Cambridge, Großbritannien)
LightCycler® 480	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
Magnetrührer Hei-Mix D	Heidolph Instruments (Schwabach, Deutschland)
Mikroskop Olympus BX 50	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Mikroskopkamera Olympus U - TV1 X	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Milli-Q Synthesis A10 System	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
MP R0 pH Meter	Mettler Toledo (Gießen, Deutschland)
Rotarod advanced für fünf Mäuse mit PC-Steuerung	TSE Systems GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Ultraschallbad	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Ultrazentrifuge Sw60Ti rotor	Beckman coulter (Brea, USA)
UV – Transilluminator ($\lambda = 254$ nm)	Syngene (Cambridge, Großbritannien)
Vortex-Schüttler	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Waage	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Zentrifuge Eppendorf 5415 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Tabelle 3: Materialliste, Geräte

3.1.3. Chemikalien

Material	Hersteller
15G7-Primärantikörper	Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung (München, Deutschland) Nach Kahle et al, 2000 ⁶¹
5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
6x Loading Dye Farbstoff	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Acrylamid	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
Agarose	Serva Elektrophoresis (Heidelberg, Deutschland)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Anle138b	Abteilung Griesinger, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie (Göttingen, Deutschland)
Aqua dest.	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Borsäure	Acros organics (New Jersey, USA)
BRIJ35	Serva Elektrophoresis (Heidelberg, Deutschland)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt, Deutschland)
CDP-Star®	Roche Diagnostics (Unterhaching, Deutschland)
cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
D(+)-Saccharose	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Diaminobenzidin (iVIEW DAB Detection Kit)	Roche (Unterhaching, Deutschland)
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
DNA-OFF	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Vereinigte Staaten)
Elutionspuffer für den DNA-Aufschluss	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
Eosin alkoholisch	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
Equilibrierungspuffer für den DNA-Aufschluss	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
Ethanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Eukitt® quick-hardening mounting medium for microscopy	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
Formaldehydlösung 4 %	Microcos GmbH (Garching, Deutschland)

Glycin	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
Hämalaun nach P. Mayer	Apotheke Klinikum Innenstadt der LMU (München, Deutschland)
HotMaster Mix	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
LightCycler® 480	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
Magnesium chloride hexahydrate	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
Magnesium ²⁺	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
N-Ethylmaleimide (NEM)	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
N-Lauroylsarcosin (Sarcosyl)	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl) 0,9 %	Braun Melsungen (Melsungen, Deutschland)
Natriumdesoxycholat (DOC)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat (SDS für engl. sodium dodecyl sulfate)	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Nonidet P40 Substitute (NP40)	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
O'RangeRuler 100 bp DNA-Leiter	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
PageRuler prestained protein ladder	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Vereinigte Staaten)
Paraffin	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
peqGOLD Tissue DNA Mini Kit	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
Polysorbat 20 (Tween 20)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Primer	MWG Eurofins Operon (Ebersberg, Deutschland)
Proteinase K	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
Proteinkinase K Stammlösung, rekombinant	Roche (Unterhaching, Deutschland)
<i>rabbit-anti-rat-AK</i>	Dako (Hamburg, Deutschland)
RNAse A	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
Ser129-Primärantikörper	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Vereinigte Staaten)

β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
SYBR® Gold Farbstoff	Invitrogen Molecular Probes (Eugene, USA)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
Tris-HCl (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid)	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
VENTANA BenchMark	Roche Diagnostics (Unterhaching, Deutschland)
Waschpuffer für den DNA-Aufschluss	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
Xylol	VWR International (Darmstadt, Deutschland)

Tabelle 4: Materialliste, Chemikalien

3.1.4. Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Cellstar PP-Test Tubes 15 ml steril	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Cellstar Tubes 50 ml	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
epT.I.P.S.® Pipettenspitzen (0,1-10µl ; 50-1000 µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Erlenmeyerkolben	Duran (Wertheim/Main, Deutschland)
Glaspipette 10 ml in 1/10 ml	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Glaspipetten 2ml x 1/50 ml	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging (Chicago, USA)
PerfectBind DNA Säulen	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
Petrischale	Nunc A/S (Roskilde, Dänemark)
Pipetten Research® (Volumen 10/20/200/1000 µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Polyallomerröhrchen	Beckman coulter (Brea, USA)
Quarzglaseröhrchen und –deckel	Anton Paar GmbH (Graz, Österreich)
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäß LoBind 1,5 ml	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Skalpell	Bruno Bayha (Tuttlingen, Deutschland)
Skalpell	Bruno Bayha (Tuttlingen, Deutschland)

Spritzen 2 ml	Becton Dickinson (Madrid, Spanien)
Wiegeschalen	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)

Tabelle 5: Materialliste, Verbrauchsmaterial

3.1.5. Sonstiges

Material	Hersteller
Erdnussbutter	Barney's best creamy peanut butter, Dockhorn & Co (Hamburg, Germany)
Haltungsfutter V 1536	Ssniff Spezialdiäten GmbH (Soest, Deutschland)

Tabelle 6: Materialliste, Sonstiges

3.2. Behandlungs- und Versuchsprotokoll

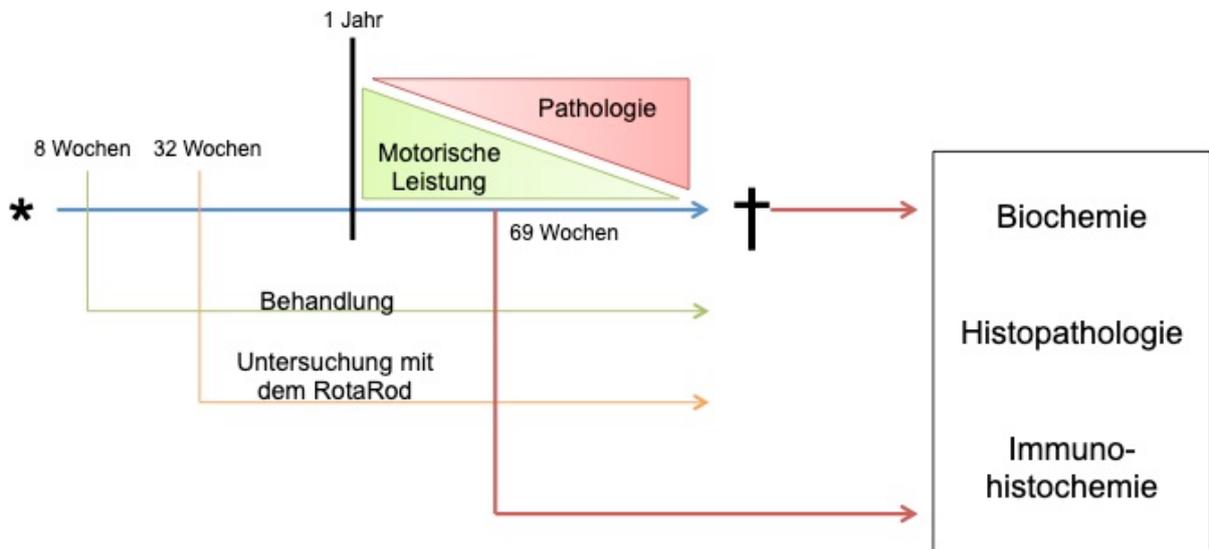


Abbildung 13: Behandlungs- und Versuchsprotokoll

Um die *in vivo* Wirksamkeit von Anle138b in einem transgene Synukleinopathie-Mausmodelle (vgl. 3.3) zu untersuchen, begann die Behandlung mit Verum bzw. Placebo in der 8. Lebenswoche. Ab diesem Zeitpunkt erfolgte eine kontinuierliche Beobachtung der Tiere mit Dokumentation klinischer Veränderungen. Ab einem Alter von 250-260 Tagen wurden mit Hilfe eines RotaRod (vgl. 3.4) die motorischen Leistungen gemessen und die Versuchstiere 14-tägig gewogen. Im Alter von 69 Wochen wurden jeweils 4 Tiere der Behandlungs-, Kontroll- und Wildtypgruppe für weitergehende biochemische, histopathologische und immunohistochemische Untersuchungen entnommen. Nach Erreichen der Entnahmekriterien (vgl. 3.4) wurden auch für alle anderen Versuchstiere eine α S-Sucrosegradientenzentrifugation zum Nachweis pathologischer Ablagerungen, eine Histopathologie und sowie Immunohistopathologie durchgeführt.

3.3. Versuchstierhaltung und orale Dosierung

Die Versuchstiere (vgl. 1.5) wurden in einer „spezifisch pathogenfreien“ (SPF) Tierhaltung mit Schleusen und einzelbelüfteten Käfigen (IVC = individuell ventilierte Käfige) gehalten. Die Tiere lebten dabei in einem konstanten Tag-/Nachtrhythmus mit

zwölf Stunden Licht und zwölf Stunden Dunkelheit. Futter und Wasser standen den Tieren *ad libidum* zur Verfügung.

Für den Kernversuch wurden die transgenen Tiere, auf Alter und Geschlecht abgestimmt, in eine Verum- und eine Placebogruppe aufgeteilt. Beide Gruppen enthielten je zwölf Tiere.

Fünf Tage vor der ersten Dosis wurden die Mäuse bereits an Erdnussbutter gewöhnt, dafür wurden täglich einmal 200µl Erdnussbutter in einer Petrischale auf den Käfigboden gestellt, sodass die Maus sie *ad libidum* zu sich nehmen konnte. Hierfür wurde eine Einzeltierhaltung gewählt, um sicherzustellen, dass die angebotene Substanz von jeder Maus aufgenommen wird und nicht nur von einem dominanten Tier der Gruppe.

Die Verumgruppe erhielt Anle138b ab einem Alter von acht Wochen in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und mit Erdnussbutter vermengt verabreicht.

Die Placebogruppe wurde entsprechend ab der 8. Woche mit der äquivalenten Menge DMSO ohne Anle138b in Erdnussbutter behandelt.

In den ersten zwei Behandlungswochen erhielt die Verumgruppe 2 mg Anle138b gelöst in 10µl DMSO in 200µl Erdnussbutter gerührt.

Nach zwei Wochen wurde die Dosis auf 5 mg Anle138b in 10 µl DMSO erhöht. Im Alter von 33 Wochen wurde die Dosis nochmals auf zweimal täglich 5 mg anle138b in 10 µl DMSO gesteigert. (Tabelle 7 und Abbildung 13)

Behandlungs- woche	Lebenswoche	Verumgruppe	Placebogruppe
5 Tage vor Behandlungsstart	8. Lebenswoche	Reine Erdnussbutter (200 µl)	Reine Erdnussbutter (200 µl)
1. und 2. Behandlungswoche	9. und 10. Lebenswoche	1x täglich Erdnussbutter + 2 mg Anle138b in 10µl DMSO	1x täglich Erdnussbutter + 10µl DMSO
ab 3. Behandlungswoche	ab 11. Lebenswoche	1x täglich Erdnussbutter + 5 mg Anle138b in 10µl DMSO	1x täglich Erdnussbutter + 10µl DMSO
ab 21. Behandlungswoche	ab 34. Lebenswoche	2x täglich Erdnussbutter + 5 mg Anle138b in 10µl DMSO	2x täglich Erdnussbutter + 10µl DMSO

Tabelle 7: Behandlungs- und Aufdosierungsschema der Kernversuchsgruppe

Die Mäuse wurden täglich auf Zeichen der Erkrankung wie Tremor, hypokinetische Bewegungsstörungen oder Ataxie kontrolliert. Alle zwei Wochen wurde ausführlich das Verhalten und die Bewegung untersucht. Zur Auswertung wurden die Parameter Überlebenszeit, motorischen Leistung und Körpergewicht herangezogen. *Post-mortem* wurden Menge und Art der α S-Ablagerungen histopathologisch, biochemisch und immunhistochemisch untersucht.

3.4. Untersuchung der Motorik mit dem RotaRod

Der RotaRod-Test ist ein weit verbreitetes Instrument zur Untersuchung der motorischen Leistungsfähigkeit in Tiermodellen von neurodegenerativen Erkrankungen. Die Tiere müssen dabei auf einer rotierenden Stange balancieren. Die

Leistung wird durch die Dauer, die ein Tier auf der rotierenden Stange verbringt, gemessen.⁶⁶

Zur Beurteilung der Bewegungsstörungen wurde ein *RotaRod advanced* für fünf Mäuse mit PC-Steuerung (TSE Systems GmbH, Bad Homburg) verwendet (Abbildung 14). Das Gerät ist laut Datenblatt für die Untersuchung der Wirksamkeit von Arzneimitteln auf motorische Koordinationsstörungen der Skelettmuskulatur zugelassen (*TSE RotaRod System V 4.1.3 Computerized Treadmill for Mice and Rats, Operating Manual*©; Copyright © 2009 TSE Systems International Group). Der Drehstab hat einen Durchmesser von 30 mm. Die fünf separaten Laufbahnen haben jeweils eine Breite von 55 mm. Das Gerät verfügt über eine Lichtschranke, die bei einem Sturz des Tieres die gelaufene Zeit und Endgeschwindigkeit der Walze misst.

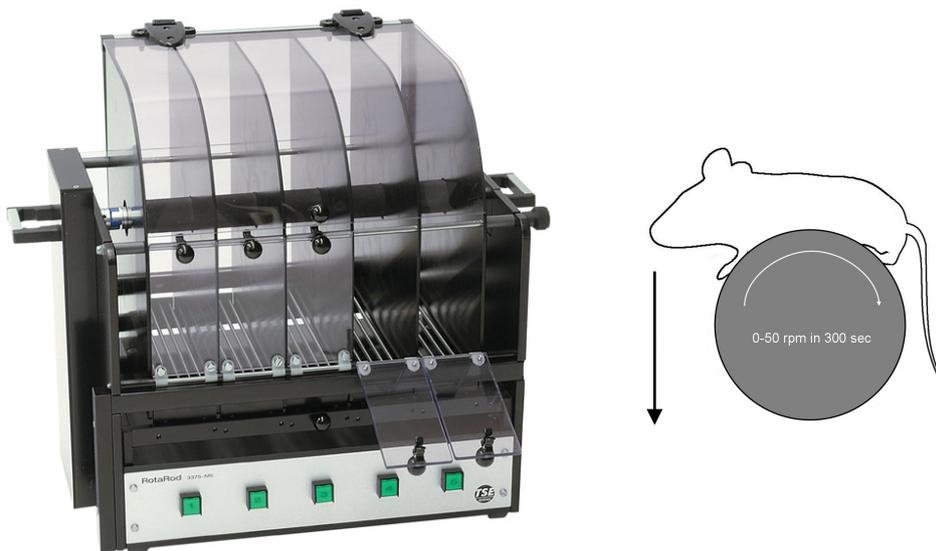


Abbildung 14: Links: Rotarod advanced (TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Bildquelle: www.tse-systems.com), Rechts: Schema des Untersuchungsprinzips

Alle Mäuse wurden im Alter von 250 bis 260 Tagen erstmals an das RotaRod gewöhnt und in der Folge alle zwei Wochen gemessen. Jedem Testtag gingen dabei zwei Trainingstage voraus an denen die Mäuse wieder an das RotaRod gewöhnt wurden. Parallel zueinander wurden immer drei Mäuse gemessen.

Die zwei Tage vor dem eigentlichen Messtag wurden die Mäuse in drei Läufen trainiert, wobei sie eine ansteigende Geschwindigkeit von 0 bis 30 rpm in einer Zeit von 180 Sekunden bewältigen mussten (Tabelle 8).

Trainingstag	Anzahl der Läufe pro Tier	Maximalgeschwindigkeit der Walze	Maximaldauer eines einzelnen Laufes
1. Tag	3	30 rpm	180 sek
2. Tag	3	30 rpm	180 sek

Tabelle 8: Versuchsparameter der Trainingstage

Am Testtag wurden ebenfalls drei Läufe absolviert, wobei die Geschwindigkeit von 0 bis 50 rpm in einer Zeit von 300 Sekunden anstieg. Die längere Laufzeit wurde gewählt, um in der Messung einen Deckeneffekt zu vermeiden. (Tabelle 9). Jedem Tier wurden zwischen zwei Läufen eine Ruhezeit von mindestens 40 Sekunden gegeben.

Testtag	Anzahl der Läufe pro Tier	Maximalgeschwindigkeit der Walze	Maximaldauer eines einzelnen Laufes
1. Tag	3	50 rpm	300 sek

Tabelle 9: Versuchsparameter des Testtages

Ein Lauf unter zehn Sekunden wurde als ungültig gewertet. Da auch gesunde Mäuse öfter einmal beim Anlaufen der Walze herabfallen, wurden die Einzelläufe bis zu dreimal gestartet. Wenn auch nach dem dritten Anlauf die zehn Sekunden nicht erreicht wurden, wurde der Lauf gewertet.

Zur primären Gewöhnung wurden die Mäuse einzeln auf die Walze gesetzt. Das Versuchsprotokoll wurde so oft gestartet, bis die Maus drei Mal zehn Sekunden oder länger auf der Walze verblieben ist.⁶⁷

Zur Auswertung wurde immer der Längste von drei gemessenen Läufen herangezogen.

Für jede Maus wurde die Leistung auf dem RotaRod mit dem arithmetischen Mittelwert der Leistung in den Lebenswochen 42 bis 51 individuell normiert, um eine Streuung durch individuelle Leistungen zu vermeiden.

Als erkrankt wurden Mäuse bezeichnet, die in ihrer Leistung aus drei Läufen unter dem normierten Mittelwert blieben, der aus der Leistung alterspassender Wildtypmäuse minus drei Sigma (=55,28 sek) ermittelt wurde. Als terminal erkrankt wurden die Tiere angesehen, die nicht in der Lage waren, 20 Sekunden auf dem RotaRod zu verbleiben. Diese Tiere wurden dem Versuch entnommen und durch zervikale Dislokation getötet.

Nach Beendigung des Experiments erfolgte zusätzlich zur prospektiven Beobachtung eine retrospektive Analyse der motorischen Leistung. Die Laufleistung wurde hierbei relativ zum Zeitpunkt des letztendlichen Todes untersucht. Als Datengrundlage galt auch hier die in individuell auf Woche 38-42 normierte motorische Laufleistung (s.o.). Der Unterschied der Analyse bestand aber darin, dass die Laufleistungen der gesamten Gruppe (Verum vs. Placebo) nicht nach der Lebenswoche, sondern nach den Testtagen in den zwölf Wochen vor dem letztendlichen Todeszeitpunkt gepoolt wurden. Dies ermöglicht die Fluktuation der motorischen Leistung über die gesamte Gruppe in diesem Zeitraum der Prodromalphase bewertet.

3.5. Genotypisierung

Um die Persistenz des Transgens zu überprüfen, wandten wir eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit anschließender Darstellung auf einem Agarosegel an. Dabei untersuchten wir, ob das humane A30P- α S-Gen noch im Genom der Mäuse nachzuweisen war.

Das Gewebe zur Analyse wurde mittels Schwanzspitzenbiopsie bei ausgewählten Tieren *prä mortem* (zwischen dem 14. und 21. Lebenstag) und von allen Tieren *post mortem* gewonnen. Dies ist eine häufig verwendete Methode zur Genotypisierung. Sie liefert im Vergleich zu anderen Methoden eine größere Menge genomischer DNA (> 50 μ g).

Zur Probengewinnung wird die Schwanzspitze mit einer Schere abgesetzt. Dabei wurde bei lebenden Tieren darauf geachtet, dass die Größe des Biopsates 5 mm nicht

überschritt, da der Schwanz bei Mäusen als Balanceorgan und zur Wärmeabgabe dient. Eine lokale Betäubung der Schwanzspitze wurde durch Eintauchen in eiskaltes Ethanol für zehn Sekunden erreicht.⁶⁸ Zwischen den Tieren wurde das Biopsieinstrumentarium mit DNA-OFF und Ethanol gereinigt.

Eine Genotypisierung erfolgte mit dem *peqGOLD Tissue DNA MiniKit* (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen). Eigennamen der Puffer und Produkte aus diesem Kit sind im folgenden Text kursiv dargestellt.

3.5.1. DNA-Isolierung:

- 1) Die Schwanzspitzen wurden in Eppendorfer Reaktionsgefäßen mit 180µl *DNA Lysis Buffer T* und 20 µl *Proteinase K*, sowie 15 µl *RNase A* versetzt und über Nacht im Schüttelwasserbad bei 55°C und 600 rpm inkubiert.
- 2) Am nächsten Tag wurden die Proben bei 8000 rpm für zwei Minuten abzentrifugiert. Der komplette Überstand wurde ohne Verschleppen des Pellets in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen.
- 3) Die Proben wurde mit 410 µl *DNA Binding Buffer* versetzt und mittels eines Vortexmischers gut vermengt und im Anschluss für fünf Minuten bei 70°C inkubiert.
- 4) *HiBind-DNA-Säulen* wurden in Sammeltubes platziert, mit den Ansätzen beladen und anschließend für eine Minute bei 8000*g zentrifugiert.
- 5) Die Säulen wurden anschließend auf ein neues Sammeltube gesteckt, mit 600 µl *Waschpuffer* beladen und erneut bei 8000*g für eine Minute zentrifugiert. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt.
- 6) Im Anschluss wurde die Säule auf einem neuen Sammeltube bei 13000*g für zwei Minuten trocken zentrifugiert.
- 7) Die Säulen wurden auf ein PCR-geeignetes Reaktionsgefäß gesetzt und mit 200 µl *Elutionspuffer* versetzt. Nach dreiminütiger Inkubation erfolgte eine Zentrifugation mit 8000*g für eine Minute. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt.
- 8) Abschließend wurde die Qualität der isolierten DNA mit einer Messung der Absorption mittels Photometer überprüft. Dabei kann neben der Konzentrationsbestimmung auch eine mögliche Verunreinigung aufgespürt

werden. Während Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm besitzen, absorbieren Proteine am besten Licht der Wellenlänge 280 nm. Bildet man den Quotienten aus dem OD-Wert von 260/280, so erhält man für reine DNA-Lösungen einen Wert von ca. 1,8. Bei höheren Werten sind die Proben oft mit RNA kontaminiert, bei niedrigeren Werten könnte eine Protein- oder Phenolkontamination vorliegen.⁶⁹

3.5.2. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird zur Vervielfältigung von DNA *in vitro* angewandt. Die Vervielfältigung läuft dabei in 3 Schritten ab. 1. Die Denaturierung, hier wird durch Erhitzen die Doppelhelix der DNA aufgetrennt. 2. Die Primerhybridisierung, bei der sich die Primer an die DNA anlagern. 3. Die Elongation, bei der die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auffüllt.⁷⁰

Zur Multiplikation unserer gewonnenen DNA verwendeten wir folgenden Primer:

- 1) hafwd: Sequenz (5'-3') ATG GAT GTA TTC ATG AAA GG (20 bp, Tm 51,2°C)
- 2) harev: Sequenz (5'-3') TTA GGC TTC AGG TTC GTA G (19 bp, Tm 54.5 °C)

Die PCR führten wir wie folgt durch:

10 µl	Eppendorf HotMasterMix (x2,5)
0,25 µl (100µM)	Primer (hafwd)
0,25 µl (100µM)	Primer (harev)
2 µl	Template DNA
13,5 µl	H ₂ O

Tabelle 10: PCR Master Mix (für eine Probe)

- 1) In einem PCR- Reaktionsgefäß wurden 23 µl *Mastermix* (Tabelle 10) und 2 µl aufgereinigte Probe zusammenpipettiert.
- 2) Die PCR selbst wurde im *LightCycler® 480* mit folgendem Protokoll durchgeführt:

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (Minuten)	Wiederholungen
1	95	5	1
2	95	30	30
3	62	1	
4	72	1,5	
5	72	8	1
6	4	Über Nacht	

Tabelle 11: PCR Programm

3.5.3. Gelelektrophorese und Visualisierung

Zur Darstellung der isolierten DNA wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass DNA ihrer Größe nach aufgetrennt werden und durch Vergleich mit einem bekannten DNA-Fragment und einer DNA-Leiter bestimmt werden kann.⁷¹ Die Konzentration des Gels bestimmt dabei die Größe der Poren und damit die Laufgeschwindigkeit. Wir verwendeten ein 2%iges Agarosegel. (Tabelle 12)

3 g	Agarose
150 ml	TBE 1x Puffer
3 µl	SYBR-Gold-Farbstoff

Tabelle 12: 2% Agarosegel

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt durch das Anlegen eines elektrischen Feldes, welches die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle durch das Gel zum Pluspol zieht.

Um die Lauffront sichtbar zu machen wurde jeweils 7 µl Lämmli-Puffer (Tabelle 20) mit 1 µl Probe gemischt und auf das Gel aufgetragen. Als DNA-Leiter wurde eine 100 bp DNA-Leiter gewählt.

Dafür wurde das Gel zunächst in einer Elektrophoresekammer für 15 Minuten bei 50 V eingespannt und im Anschluss für ca. eine Stunde eine Spannung von 80 V angelegt.

Die Darstellung erfolgte direkt vom Gel mittels UV-Transilluminators ($\lambda=254$ nm) und wurde mit einer Digitalkamera dokumentiert.

Wir konnten in allen transgenen Mäusen des Versuchs das Vorhandensein des humanen α S-Gens mit der Punktmutation A30P nachweisen. Die DNA - Fragmente wiesen wie erwartet eine Größe von ca. 250 Basenpaaren auf.⁷²

3.6. Biochemische Untersuchung

3.6.1. Ultrazentrifugation

Von allen Versuchstieren wurden eine Hirnhälfte der median-sagittal geteilten Hirne einer histopathologischen Untersuchung zugeführt (vgl.: 3.7).

Um detergens-unlösliche α S-Aggregate aus murinen Gehirn zur biochemischen Proteinanalyse zu gewinnen, wurde die andere Gehirnhälfte zunächst bei -80 °C asserviert und später in folgenden Schritten aufgereinigt. Das Protokoll basiert auf einer Modifikation des Aufreinigungsprotokolls von Tzaban et al. aus dem Jahr 2002.⁷³ Im Folgenden werden die Schritte der Proteinaufreinigung beschrieben. (Abbildung 15)

1. Homogenisierung: Die Hemisphäre wurde zu Beginn der Aufreinigung *weight per volume* in TBS +/- Puffer (Tabelle 13) manuell homogenisiert. Dafür wurde 200 mg Gehirn in 2 ml TBS+/- gelöst. Um die Proteasen zu inhibieren wurde dieser Vorgang komplett auf Eis durchgeführt sowie PMSF und „Complete“ zugesetzt. Die Probe wurde als homogen angesehen, wenn makroskopisch keine Gewebeteile mehr gesehen wurden. 1 ml dieses Homogenisats wurde zur sofortigen Aufreinigung genutzt. Der Rest wurde bei -80°C für eine mögliche wiederholte Aufreinigung aufbewahrt.

50 mM	Tris HCl pH 7,4
175 mM	NaCl
0,1 mM	PMSF
1 mM	N-Ethylmaleimide
	Complete (EDTA free)
1mM	Mg ²⁺
0,1 %	NP40

Tabelle 13: TBS +/- Puffer

2. DNA-Verdau: Zunächst wurde dem Homogenisat 1µl Benzonase zugefügt und für 30 min bei 37°C und 300 rpm auf einem Thermoblock inkubiert. Dieser Schritt ist für die spätere Handhabe der Proben essenziell, da diese sonst eine gallertartige Konsistenz annehmen würde.

3. Ultrazentrifugation 1: Anschließend wurde die Probe für 30 Minuten bei 4°C und 120.000*g ultrazentrifugiert. Der Überstand (Ü1) wurde abgenommen und auf Eis aufbewahrt. Die Grenzschicht wurde verworfen. Das Pellet (P1) wurde in 500 µl TBS+ (Tabelle 14) mit 5% SDS resuspendiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

50 mM	Tris HCl ph 7,4
175 mM	NaCl
0,1 mM	PMSF
1 mM	N-Ethylmaleimide
	Complete (EDTA free)
5mM	EDTA

Tabelle 14: TBS +

4. Ultrazentrifugation 2: Im Anschluss wurde die Probe für 30 Minuten bei RT und 120.000*g ultrazentrifugiert. Der Überstand (Ü2) wurde abgenommen und bei RT aufbewahrt. Die Grenzschicht wurde verworfen. Das Pellet (P2) wurde

wiederum in 500 µl TBS+ mit 5% SDS resuspendiert und für 30 Minuten bei RT inkubiert.

5. Ultrazentrifugation 3: Zuletzt wurde die Probe erneut für 30 Minuten bei RT und 120.000*g ultrazentrifugiert. Der Überstand (Ü3) wurde wieder abgenommen und bei RT aufbewahrt. Die Grenzschicht wurde verworfen. Das Pellet (P3) wurde in 200µl TBS+ mit 5% SDS und 8M Urea resuspendiert und für 30 Minuten bei RT inkubiert.

Proteinfällung: Im Anschluss wurden alle Überstände (Ü1-3) und das resuspendierte Pellet (P3) in Aliquots á 40 µl in 160 µl vorgekühltem Methanol über Nacht bei -20°C ausgefällt. Am Folgetag wurden die Proteine abzentrifugiert und das Methanol abgenommen. Nach dem das Methanol abgedampft war, waren die Proben für die weitere Proteinbiochemie bereit.

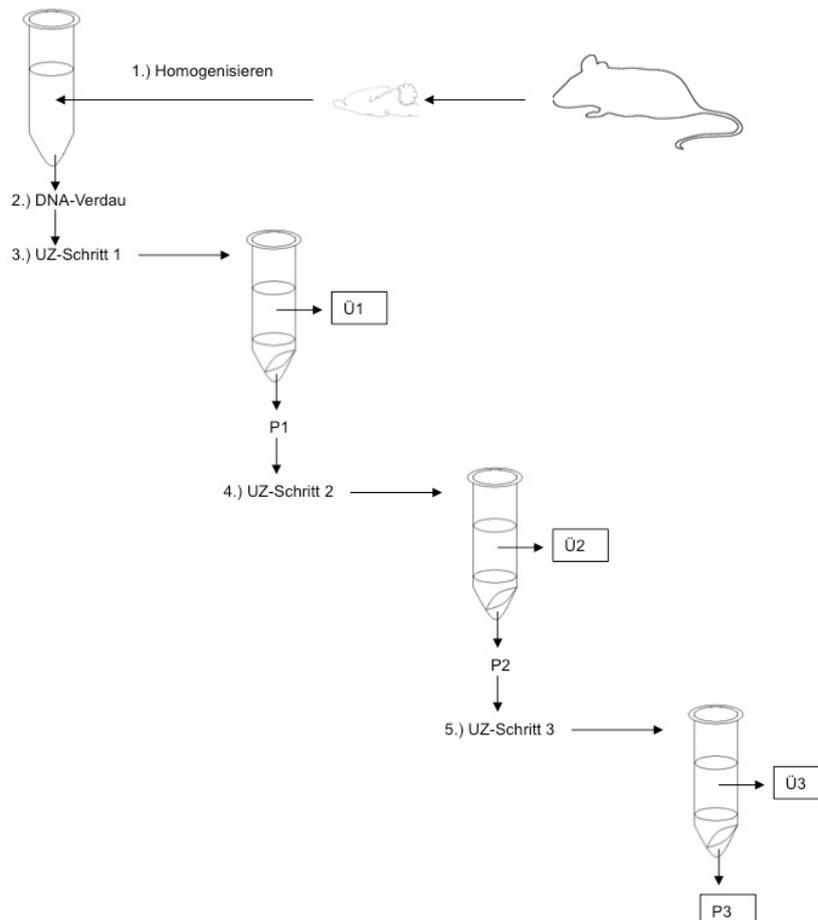


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Proteinaufreinigung durch Ultrazentrifugation

3.6.2. Alpha-Synuclein-Sucrosegradient

Zur weiteren Analyse der Proteine und ihrer Größe wurde ein Sucrosegradient durchgeführt, dessen Protokoll auf Studien von *Tzaban et al.*⁷³ beruht und nur minimal angepasst wurde. Ein Sucrosegradient ist eine Art der Dichtegradientenzentrifugation. Hierbei werden Moleküle rein physikalisch aufgrund ihrer Dichte aufgetrennt. Dies geschieht durch Zentrifugation in einem Medium, welches ein Dichtegefälle aufweist.⁷⁵

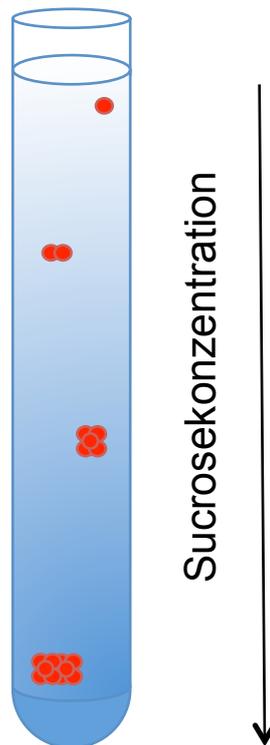


Abbildung 16: Schemazeichnung des Prinzips des Sucrosegradienten

Dazu wurde das Hirn wie unter 3.6.1 beschrieben homogenisiert, die Homogenate zunächst bei -80°C eingefroren und zur Detektion schonend bei 4°C im Kühlschrank aufgetaut.

20 μl davon wurden dann 1:10 verdünnt, also in 180 μl Probenpuffer aufgenommen. Dieser enthält im Vergleich zum Gradientenpuffer zusätzlich 0,5% Natriumdesoxycholat (DOC) ein anionisches Tensid, das dem Zellaufschluss dient und membranständige Proteine solubilisiert.

50 mM	Tris-HCl, pH=7.4,
175 mM	NaCl,
0.5 % (w/v)	Natriumdesoxycholat,
1 % (w/v)	N-Lauroylsarcosin

Tabelle 15: Probenpuffer Sucrosegradient

Die Proben wurden im Probenpuffer (Tabelle 15) aufgenommen und 30 Minuten bei 1200 rpm und 4°C inkubiert, um die Proteine im Homogenat in Lösung zu bringen. Anschließend wurde die Probe noch einmal 1 Minute bei 4°C und 20.000*g zentrifugiert, um Zelldebris zu entfernen. Als Zelldebris werden alle Bestandteile bezeichnet, die keine löslichen Proteine sind, sich aber durch den Gesamtzellaufschluss im Homogenat befinden, beispielsweise Membranbestandteile.

Zur Vorbereitung des Sucrosegradienten wurden Polyallomerröhrchen befüllt, die ein Fassungsvermögen von 4 ml und die Maße 11 x 60 mm hatten.

Der Gradient entsteht durch die vorsichtige Schichtung des Gradientenpuffers mit unterschiedlicher Sucrosekonzentration. Die unterschiedlichen Sucrosekonzentrationen wiederum wurden durch die Mischung von Gradientenpuffer A (Tabelle 16) und Gradientenpuffer B (Tabelle 17) erzielt.

50 mM	Tris-HCl, pH=7.5,
60% (w/v)	D(+)-Saccharose
1% (w/v)	N-Lauroylsarcosin

Tabelle 16: Gradientenpuffer A

50mM	Tris-HCl, pH=7.5,
1% (w/v)	N-Lauroylsarcosin

Tabelle 17: Gradientenpuffer B

Im Detail entstanden die Schichten folgendermaßen:

Schicht	Sucrosekonzentration	Gradientenpuffer A+B	Probe
1	0 %	Enthält kein Puffer	200 µl
2	10 %	1+5	Enthält keine Probe
3	20 %	2+4	Enthält keine Probe
4	30 %	3+3	Enthält keine Probe
5	40 %	4+2	Enthält keine Probe
6	50 %	5+1	Enthält keine Probe
7	60 %	6+0	Enthält keine Probe

Tabelle 18: Bestandteile der Schichten im Sucrosegradienten

Der unverdünnte Puffer A stellt nun die unterste Schicht des Gradienten (60%, 200 µl). Die Schichten 50, 40, 30, 20, 10% (jeweils 400µl Volumen) entstehen durch vorherige Mischung von Gradientenpuffer A und Gradientenpuffer B. Praktisch heißt das, man mischt z.B. für 50% 5ml A mit 1ml B und mischt dies gut durch mehrfaches manuelles Invertieren in einem 15 ml-Falcon Röhrchen. Die einzeln präparierten Schichten werden vorsichtig im UZ-Röhrchen nacheinander überschichtet, den Abschluss bildet dabei die 0%-Schicht, welche ausschließlich aus den 200µl Probe besteht (Tabelle 18).

Das so vorbereitete Röhrchen wurde für eine Stunde bei 4°C und 100.000*g ultrazentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Flüssigkeit von oben nach unten in 200 µl Schritten abgenommen und auf ein Gel zur Gelelektrophorese und anschließenden Detektion mittels Westernblot transferiert. Dabei stellt die Fraktion 1 die oberste Schicht und die Fraktion 12 die unterste Schicht des Glucosegradienten dar. (Abbildung 17).

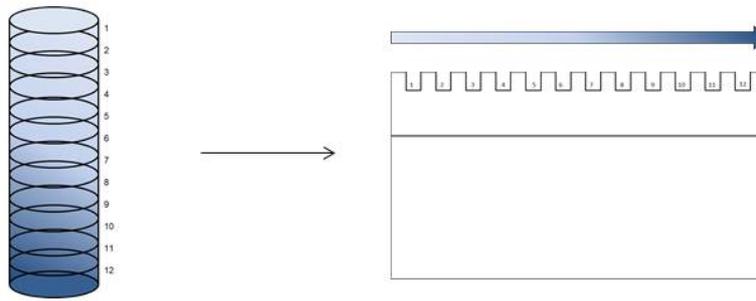


Abbildung 17: Prinzip des Sucrosegradienten

3.6.3. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Methode um verschiedene Arten von Molekülen, wie DNA, RNA oder Proteine, zu trennen. Dabei wandern elektrisch geladene Moleküle unter Einfluss von elektrischer Spannung durch ein Gel, welches in einer ionischen Pufferlösung liegt. Je nach Größe und Ladung der Moleküle bewegen sich diese unterschiedlich schnell durch das Gel. Kleine, negativ geladene Moleküle werden Anionen genannt und wandern in Richtung der positiv geladenen Anode und positiv geladene Moleküle werden Kationen genannt und bewegen sich in Richtung der negativ geladenen Kathode.^{76,77}

Für die von uns durchgeführte Gelelektrophorese verwendeten wir 15%-SDS-Gele, diese wurden nach untenstehendem Rezept (Tabelle 19) gegossen und über Nacht bei 4°C auspolymerisiert.

Trenngel (2 Gele)	3,75 ml	Lower Tris 4x
	3,60 ml	H ₂ O
	7,5 ml	Acrylamid
	12,5 µl	Temed
	125 µl	APS (10%)
Sammelgel (2 Gele)	1,7 ml	Upper Tris 4x
	4,9 ml	H ₂ O
	925 µl	Acrylamid
	7,5 µl	Temed
	75 µl	APS (10%)

Tabelle 19: 15% Gel; Lower Tris = 36,33g Tris ad 200 ml Aqua Dest; pH 8,8 ± 1,5 M Tris; Upper Tris= 12,11 g Tris ad 200 ml Aqua Dest; pH 6,8 ± 0,5 M Tris

Die ausgefällten Proteinproben aus der Proteinaufreinigung (vgl.: 3.6.1) wurden in Lämmli-Puffer mit 6M Urea (Tabelle 20) resuspendiert und bei 96 °C aufgekocht.

375 mM	Tris Base
30% (v/v)	Glycin
6% (w/v)	SDS
5% (v/v)	B-Mercaptoethanol
~0,03% (w/v)	Bromphenolblau

Tabelle 20: 5x Lämmli pH 6,8

Die Gele wurden dann mit den Proben beladen. In der Elektrophoresekammer mit einfachem Laufpuffer (Tabelle 21) wurden die Proteine für ca. drei Stunden aufgetrennt. Dabei wurde zum Sammeln der Proteine zunächst für 30 Minuten eine Spannung von 80 V angelegt, zum eigentlichen Auftrennen wurde dann eine Spannung von 140 V gewählt. Als Endpunkt wurde das Erreichen des Gelendes durch die Lauffront definiert. Durch die niedrige Spannung wurde eine möglichst optimale Auftrennung der Proteine gewährleistet. Als Proteinmarker wurde *PageRuler prestained protein ladder* von Thermo scientific genutzt, als Standard diente eine Verdünnungsreihe aus rekombinanten αS.

30 g	Tris Base
144 g	Glycin
10 g	SDS
1000 ml	H ₂ O

Tabelle 21: 10x Laufpuffer

3.6.4. Western Blot

Western Blot ist eine Technik, welche die Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran ermöglicht. Auf dieser sind die bei der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine besser für Reagenzien zugänglich und es können eine Reihe von Verfahren zur Proteinanalyse eingesetzt werden.^{77,78} In unserem Fall ein Immunoblot, bei dem mit spezifischer Bindung eines Antikörpers an das gesuchte Protein dieses sichtbar gemacht wird. Wir fertigten immer parallel zwei Westernblots an, um die identischen Proben mit zwei verschiedenen Primärantikörpern zu detektieren (vgl.: 3.6.5). Der Transfer des Proteins auf die Membran erfolgt durch das Anlegen einer Spannung, also als Elektroblot. Wir verwendeten dabei das halbtrockenen Blotverfahren (*semi-dry blot*), bei dem der Transfer über puffergesättigte (Tabelle 22) Filterpapiere erfolgt. Dafür legten wir in einer Blottingkammer über zwei Stunden eine Stromstärke von 50 mA pro Membran an.⁷⁹

7,58 g	Tris Base
36 g	Glycin
500 ml	Methanol
Ad 2500 ml	H ₂ O

Tabelle 22: Blotting Puffer

Um ein unspezifisches Binden des Primärantikörpers zu vermeiden wurden die Membranen nach dem Blottingvorgang geblockt. Dafür wurden sie für eine Stunde in einer 5% Milchpulver-TBST-Lösung (Tabelle 23) geschwenkt.

10 g	Milchpulver
ad 200 ml	1x TBST (Tabelle 24)

Tabelle 23: 5% Milchpulver-TBST

100 ml	1 M Tris-HCl –Lösung (pH 8)
300 ml	5 M NaCl – Lösung
20 ml	Tween 20
ad 1000 ml	H ₂ O

Tabelle 24: 10x TBST

3.6.5. Visualisierung

Zur Visualisierung der Proteine verwendeten wir das Prinzip der Immunmarkierung. Die Darstellung beruht hierbei auf der Affinität von Antikörpern zu einer bestimmten Gewebeeigenschaft als Antigen-Antikörper-Reaktion. Ziel dabei ist es eine spezifische Markierung zu erhalten, die auch schon bei geringen Mengen der gesuchten Proteine dargestellt werden kann. Wir verwendeten dafür die indirekte Methode, d.h. in einem ersten Schritt wird spezifischer Antikörper, der Primärantikörper genannt wird, aufgebracht. In einem zweiten Schritt wird ein Antikörper aufgetragen, der sich gegen den ersten Antikörper richtet. Dieser Sekundärantikörper ist in unserem Fall über Chemolumineszenz detektierbar.⁸⁰

Der erste Antikörper (Ser129-Ak), der α S detektiert, welches an Serin 129 phosphoryliert ist, wurde in der Verdünnung 1:3000 in TBST (Tabelle 24) eingesetzt. Dieser Antikörper ist nicht humanspezifisch, sondern bindet ebenfalls an murines phosphoryliertes α -Synuclein.⁶²

Daher wurde ein zweiter Primärantikörper eingesetzt. 15G7 reagiert ausschließlich mit humanen α -Synuclein und nicht mit murinem. Die Zielregion der Bindung ist die Sequenz MPV DPD NEA YEM PSEE (aa 116-131) im humanen α -Synuclein⁸¹⁻⁸³, im Vergleich dazu hat das murine α -Synuclein an dieser Stelle die Sequenz MPV DPG SEA YEM PSEE (aa116-131 Isoform 1) bzw endet in der zweiten Isoform bei Base 121 mit der davor liegenden Sequenz TMS LHA (aa 116-131)⁸⁴. Der Antikörper wurde

in der Verdünnung 1:1000 in TBST (Tabelle 24) eingesetzt. Beide Primärantikörper wurden über Nacht bei 4°C unter ständiger Bewegung inkubiert.

Nach mehreren Waschschritten mit TBST (Tabelle 24) zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurden Sekundärantikörper zur Verstärkung des Signals aufgetragen.

Der Ser129-Ak wurde dabei mit *Goat-anti-Rabbit* (AP) verstärkt, der 15G7-AK durch *Rabbit-anti-Rat* (AP). AP steht für alkalische Phosphatase, es wird im Folgenden als Substrat zur Chemolumineszenz gebraucht.

Die Membranen inkubierten dabei zwei Stunden bei Anwesenheit der Sekundärantikörper, im Anschluss wurden die überschüssigen Antikörper etwa eine Stunde unter ständiger Bewegung und mehrfachem Pufferwechsel mit TBST (Tabelle 24) ausgewaschen.

Die Darstellung erfolgte zunächst mit CDP-Star® (Disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetane-3,2'-(5-chlorotricyclo[3.3.1.1.3.7]decan])-4-yl]-1-phenyl phosphate), einem Substrat der alkalischen Phosphatase, das nach Bindung mit eben dieser mittels Chemolumineszenz Licht mit einer maximalen Längenwelle von 475 nm aussendet.⁸⁵

Dafür wurden die Membranen zunächst für fünf Minuten in einem Puffer mit Alkalischer Phosphatase (Tabelle 25) geschwenkt.

100 mM	NaCl
5mM	Cl ₂ Mg x 6 H ₂ O (Magnesium chloride hexahydrate)
100 mM	Tris
ad 1000ml	H ₂ O

Tabelle 25: Alkalische Phosphatase (AP) - Puffer pH 9,5

Danach wurden die Membranen vorsichtig trockengetupft und mit CDP-Star® beträufelt. Die Darstellung erfolgte dann mit einem ChemiLux –Kamerasystem.

Die Blots wurden im Anschluss gescannt und mit der AIDA Software (Raytest, Straubenhardt, Deutschland) quantifiziert.

Als zusätzliche Kontrolle wurde im Anschluss noch eine NBT-BCIP-Färbung (Tabelle 26 und Tabelle 27) durchgeführt.

50 mg/ml	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)
500 µl	Dimethylformamid (DMF)
166 µl	H ₂ O

Tabelle 26: NBT-Stammlösung

50 mg/ml	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP)
1 ml	Dimethylformamid (DMF)

Tabelle 27: BCIP-Stammlösung

Eine Membran wurde dabei zunächst in 10 ml AP-Puffer (Tabelle 25) geschwenkt. Im Verlauf wurden 35 µl BCIP-Stammlösung (Tabelle 27) und 45µl NBT-Stammlösung (Tabelle 26) dazu pipettiert. Die Färbung erfolgte dann unter visueller Kontrolle bis zum gewünschten Ergebnis. Der Färbevorgang wurde durch Waschen in H₂O unterbrochen.

3.7. Histologie

3.7.1. Präparation der Tiere

Die protokollgemäß (vgl.: 3.4) aus dem Experiment zu entnehmenden Tiere wurden exekutiert und im Anschluss direkt präpariert. Dafür wurde der Schädel des Tieres abgetrennt und die Schädeldecke freipräpariert. Im nächsten Schritt wurde die Schädeldecke halbmondförmig eingeschnitten und dadurch das darunter liegende Gehirn freigelegt. Das Hirn wurde mit Hilfe eines Skalpells sagittal halbiert. Eine Hemisphäre wurde entnommen unbehandelt bei -80°C in einem Reaktionsgefäß eingefroren. Das Gewebe wurde für die biochemischen Versuche verwendet. Die

andere Hemisphäre verblieb im Schädel und wurde in 4%iger Formaldehyd-Lösung fixiert.

Zur Freipräparation der inneren Organe wurde ein longitudinaler Schnitt vom Anus bis Sternum durch Haut und subkutanes Fettgewebe durchgeführt. In einem zweiten Schritt wurde Thorax und Peritoneum eröffnet. Anschließend wurden Herz, Lunge, Magen, Darm, Leber, Pankreas, Milz, Niere und Genitalien freipräpariert und in 4 %igem Formaldehyd fixiert.

Zuletzt erfolgte die Freilegung des Rückenmarks. Dieses wurde im Wirbelkanal belassen, Rippen und Schwanz wurden abgetrennt, auch das Rückenmark wurde in 4-%igem Formaldehyd fixiert.

3.7.2. Fixation und Färbungen

Für die Histopathologie und die immunhistologischen Untersuchungen wurden Gehirn und innere Organe direkt nach der Präparation in 4% Formalin für sieben Tage fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Es wurden zwei verschiedenen Färbungen durchgeführt. Zur Beurteilung der Strukturen und krankhaften Veränderungen wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) von Großhirn, Hirnstamm und Kleinhirn, sowie der innere Organe angefertigt.⁸⁶ Zur Detektion pathologischer α S-Ablagerungen wurden die Antikörper, welche unter Immunhistochemische Färbung beschrieben sind, verwendet.

3.7.2.1. HE-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine Übersichtsfärbung. Sie wird, wie der Name sagt, durchgeführt, um einen Überblick über das gesamte Gewebe, die Strukturen, die Zellverteilung, die Kern-Plasma-Relationen und die Anfärbbarkeit des Gewebes zu erhalten. Die Übersichtsfärbungen bestehen aus Kernfärbung und Zytoplasmafärbung. Dazu setzt man möglichst kontrastreiche Farbstoffe ein. Durch die Hämalaun-Färbung werden saure, basophile Strukturen, wie beispielsweise Zellkerne mit der enthaltenen DNA oder das raue endoplasmatische Retikulum bläulich gefärbt.

Eosin ist ein synthetischer Farbstoff, der basische, acidophile Gewebestrukturen wie zum Beispiel Plasmaproteine rötlich färbt.⁸⁷

Konkret wurden zunächst 1 µm Schnitte mit dem Mikrotom angefertigt und diese mit Xylol zweimal 10 Minuten entparaffiniert. Dann wurden die Schnitte jeweils fünf Minuten in eine absteigende Alkoholreihe (2x 100 %, 96 % und 70 %) eingetaucht und mit destilliertem Wasser gespült. Im Anschluss erfolgte die Färbung mit Hämalaun für zehn Minuten. Danach wurden die Schnitte 20 Minuten mit fließend kaltem Leitungswasser gewässert. Danach erfolgte das 3-malige Eintauchen in 70 % Alkohol. Anschließend wurden die Schnitte zwei Minuten mit Eosin alkoholisch gefärbt und schnell in 70 % und 96 % Alkohol getaucht. Danach wurden die Schnitte zwei Mal für jeweils fünf Minuten in 100 % Alkohol und anschließend in Xylol getaucht.

3.7.2.2. *Immunhistochemische Färbung*

Immunhistochemische Färbungen beruhen auf dem Konzept der eindeutigen Identifizierung von Gewebeeigenschaften durch spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen. Der Nachweis beruht dabei auf der Affinität von Antikörpern zu einer bestimmten Gewebeeigenschaft (= Epitop; bspw. Aminosäurengruppe, Oligosaccharidkette u.a.) als Antigen-Antikörper-Reaktion. Im Idealfall kommt es zu einer spezifischen und starken Bindung zwischen Antikörper und Epitop am Gewebeschnitt. Der Antikörper ist mit einem Detektionssystem gekoppelt, das sein Vorhandensein auf dem Gewebeschnitt sichtbar macht.⁸⁷

Zur Detektion pathologischer αS-Ablagerungen wurde das Protokoll nach Neumann, M. et al.⁶² mit dem anti-human-α-S Antikörper 15G7 verwendet. Es wurden immunhistochemisch gefärbte Schnitte von Großhirn, Hirnstamm, Kleinhirn, zervikalem und lumbalem Rückenmark angefertigt.

Dafür wurden die 1 µm starken Gewebescheiben deparaffiniert und zunächst mit 0,2 M Borsäure (pH 9) für 25 Minuten bei 63°C behandelt und anschließend in gleicher Lösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Im nächsten Schritt wurden die Proben in Miliporewasser gewaschen und mit Hämalaun gefärbt.

Es erfolgte ein Schritt zur enzymatischen Aufspaltung. Hierfür wurde Proteinkinase K (PK) verwendet. Sinn dieses entscheidenden Schrittes ist, dass nur das pathologische, PK-resistente α S dargestellt werden soll. Für den PK-Verdau wurde PK-Stocksolution (50mg/ml) im Verhältnis 1:500 mit dem Verdauungspuffer (Tabelle 28) verdünnt.

10 mM	Tris-HCl, pH 7.8
100 mM	NaCl
0.1%	BRIJ35

Tabelle 28: Verdauungspuffer

Für den Verdau wurden die Proben für zehn Minuten bei 37°C behandelt. Nach dem Waschen mit Miliporwasser wurden die Präparate für 32 Minuten in 15G7 – AK (Verdünnung: 1:4000) geschwenkt. Als Sekundärantikörper wurde *rabbit-anti-rat-AK* verwendet (Verdünnung 1:300) und die Proben damit 20 Minuten behandelt. Anschließend wurde zur Detektion der angefärbten Proteine 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) verwendet.

Zum Abschluss wurde die Färbung mit Hämalaun für zwei Minuten wiederholt, gefolgt von einem fünf-minütigem Waschschrift mit Wasser.

3.7.3. Auswertung

Zur Darstellung und Fotografie der histologischen Schnitte wurde das *Mikroskop Olympus BX 50* und die *Mikroskopkamera Olympus U-TV1 x* verwendet und mit der Cell^D Software (Olympus (Hamburg, Deutschland)) analysiert.

3.7.3.1. Semi-quantitative Auswertung

Es wurde zunächst eine semi-quantitative Auswertung der Bilder vorgenommen. Hierfür wurden die 10-fach vergrößerten immunohistochemisch gefärbten Schnitte fotografiert und ausgedruckt. Drei verblindete Untersucher vergaben anhand der Menge und der Qualität (granulär, kompakt, zytoplasmatisch oder entlang der Neuriten) eine Punktwert von 0 bis 4 anhand folgender Legende. (Abbildung 18; keine Ablagerungen im Bildausschnitt = Gruppe 0; einzelne, kompakte Ablagerungen im Bildausschnitt = Gruppe 1, einzelne Ablagerungen entlang der Neuriten im

Bildausschnitte = Gruppe 2; >5 Ablagerungen (kompakt oder entlang der Neuriten) im
Bildausschnitte = Gruppe 3; > 25 Ablagerungen (kompakt oder entlang der Neuriten)
im Bildausschnitte = Gruppe 4)

Pro Maus wurden je ein Schnitt aus dem Hirnstamm und aus dem Marklager des
Großhirns gewählt. Von diesen Schnitten wurden jeweils 4 lichtmikroskopische Bilder
(Vergrößerung 4x) an jeweils verschiedenen, nicht überlappenden Stellen angefertigt.

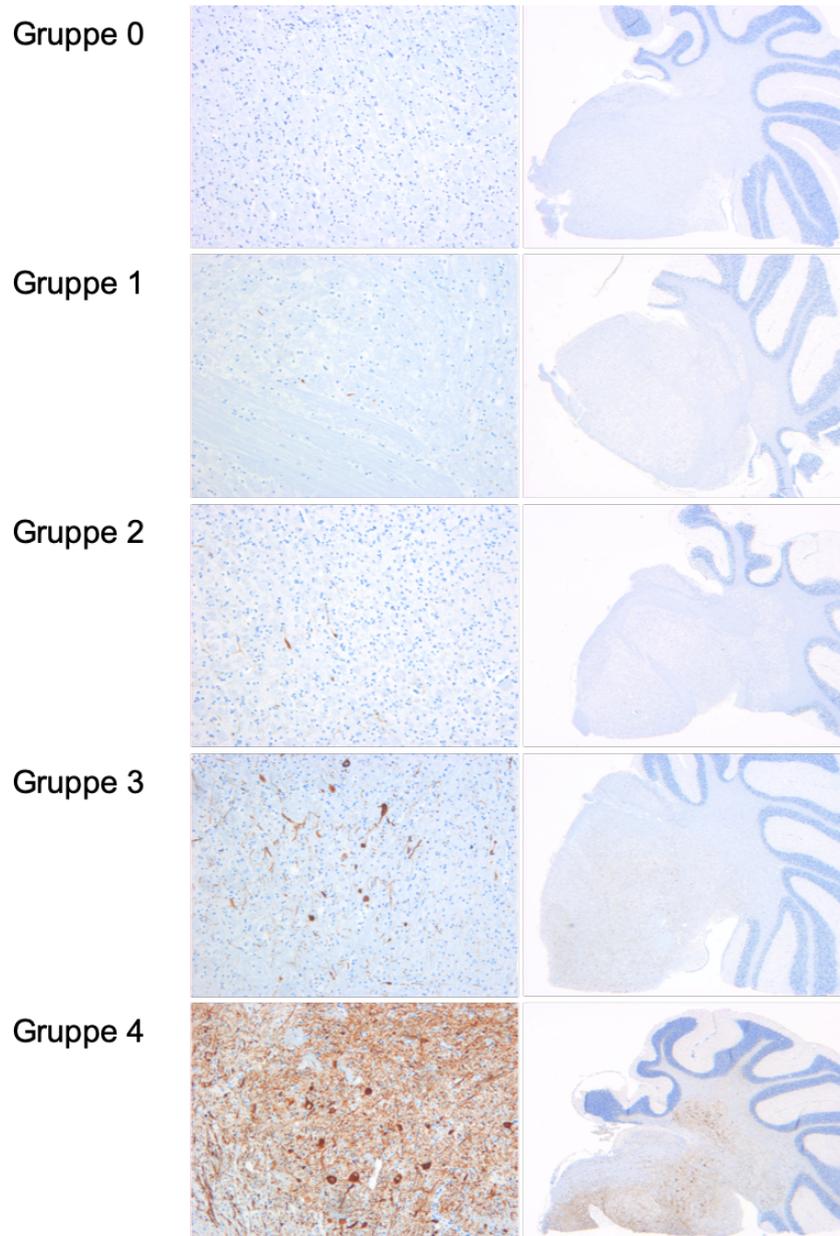


Abbildung 18: Legende zur semiquantitativen Auswertung

3.7.3.2. *Quantitative Auswertung*

Um eine quantitative Auswertung der immunohistochemisch dargestellten Ablagerungen zu ermöglichen, wurden jeweils aus einem Schnitt des Hirnstamms (Abbildung 19) und des Großhirns (Abbildung 20) ausgewählt. Von diesen Schnitten wurden jeweils vier lichtmikroskopische Bilder (Vergrößerung 10x) an jeweils verschiedenen, nicht überlappenden Stellen angefertigt. In die Analyse ging jeweils der Mittelwert ein.

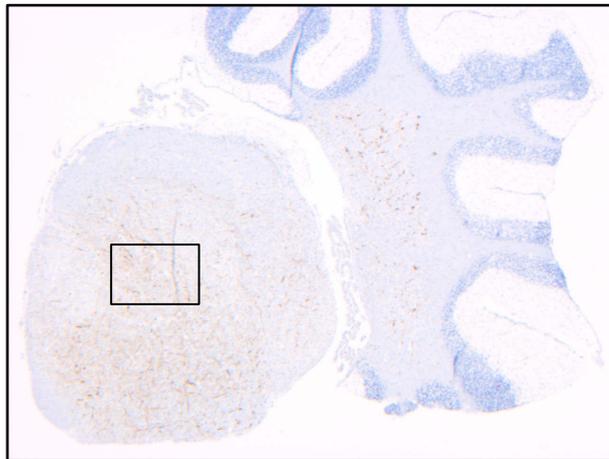


Abbildung 19: Schnitt durch den Hirnstamm mit Darstellung des Cerebellums. Der Kasten bezeichnet den Bereich, der als HS1 vergrößert und ausgewertet wurde. Immunhistologische Färbung: 15G7, Objektiv: Olympus DF PLAPO 1.2x PF; Vergrößerung: 1,2-fach

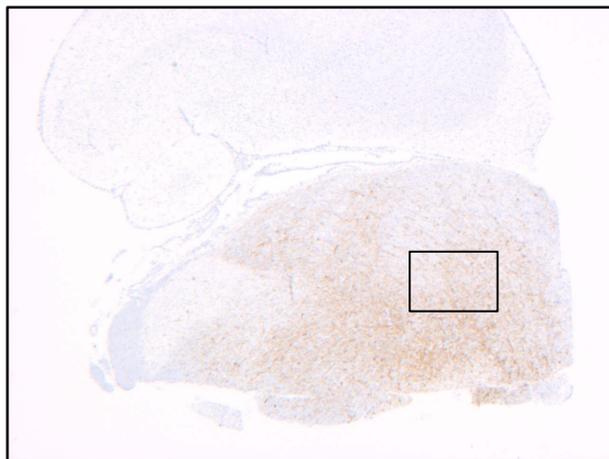


Abbildung 20: Schnitt durch den oberen Hirnstamm und das angrenzende Großhirn. Der Kasten bezeichnet den Bereich, der als HS2 vergrößert und ausgewertet wurde. Immunhistologische Färbung: 15G7, Objektiv: Olympus DF PLAPO 1.2x PF; Vergrößerung: 1,2-fach

Die erstellten Bilder wurden binarisiert. Dazu wählten wir einen Farbbereich (Rot 100-255, Grün 0-210, Blau 0-210) aus, bei dem visuell die angefärbten Strukturen markiert wurden, ohne dass eine Hintergrundfärbung mit ausgewählt wurde. (Abbildung 21)

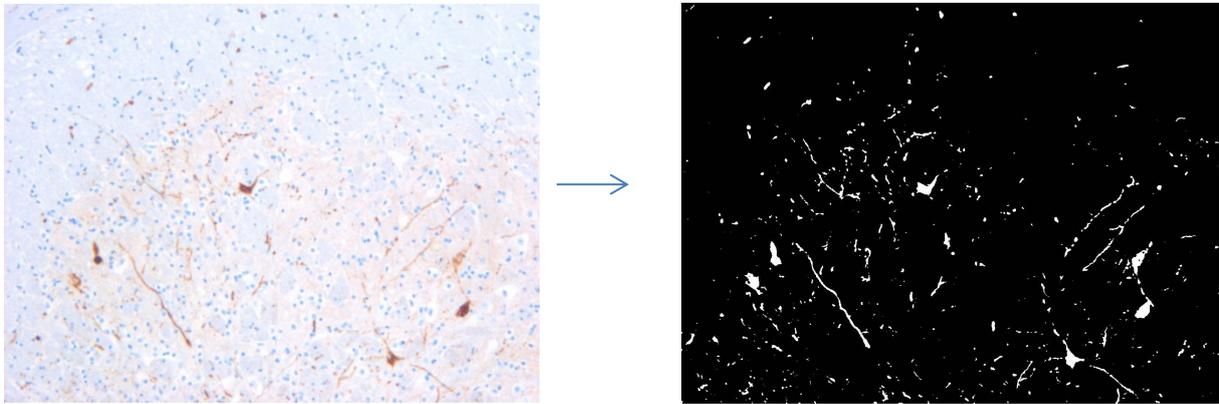


Abbildung 21: Beispiel für die Binarisierung eines Histoschnittes (hier #65). Links: Immunhistologische Färbung: 15G7, Objektiv: Olympus UPlanFI 10x/0,30; Vergrößerung: 10-fach. Rechts binarisierte Form des Schnittes.

Durch diese binarisierten Bilder erstellten wir ein Histogramm, aus welchem die Prozentzahl der angefärbten Fläche errechnet werden konnte. (Tabelle 29)

Grauwert		Häufigkeit
0	= schwarz	1217282
255	= weiß	26926
Summe der Pixel		1244208
Prozentualer Anteil der weißen Flächen		2,16 %

Tabelle 29: Exemplarische Darstellung eines Histogramms am Beispiel von #65

3.8. Statistik

Für sämtliche statistischen Analyse wurde *XLSTAT-Base für Mac OS X* (Addinsoft, New York, USA) verwendet.

3.8.1. Analyse des Überlebens der transgenen Versuchstiere

Um das Gesamtüberleben der verum (Anle138b)- und placebo (DMSO)-behandelten Tiere zu untersuchen wurden diese mit transgenen unbehandelten Tieren aus der Zucht verglichen, welche nicht Teil der motorischen Untersuchungen waren. Als

Todeszeitpunkt gilt die Entnahme aus dem Versuch nach oben genannten Kriterien (vgl.: 3.4). Um die mittlere Überlebensdauer zwischen den einzelnen Gruppen zu vergleichen wurden zunächst die Mittelwerte sowie die zugehörigen Standardfehler ermittelt. Kaplan-Meier-Überlebenskurven wurden mittels Log-Rank-Test und Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test auf signifikante Unterschiede überprüft.⁸⁸

3.8.2. Analyse der motorischen Leistung der Versuchstiere

Zur Auswertung der Laufleistungen wurde jeweils der beste Lauf aus den drei gültigen Läufen am Testtag herangezogen. (vgl.: 3.4). Die Laufleistungen von Versuchstieren, die aufgrund der terminalen Erkrankung aus dem Versuch entnommen wurden, wurden ab dem Entnahmezeitpunkt mit der Laufleistung von 0 Sekunden in der folgenden Gruppenanalyse mit einbezogen. Tiere, die aufgrund anderer Gründe aus dem Versuch entnommen wurden, wurden im Zeitraum nach der Entnahme statistisch nicht mehr berücksichtigt. Um die interindividuellen Unterschiede in der basalen Laufleistung auszugleichen wurde eine normierte Laufleistung berechnet (vgl.: 3.4) und zur Analyse verwendet. Für die statistische Analyse verwendeten wir den Student T Test.⁸⁹

3.8.3. Analyse des krankheitsfreien Überlebens der transgenen Versuchstiere

Als krankheitsfreies Überleben wurde der Zeitraum bis zum Erreichen der zuvor definierten Kriterien zum Eintritt in die Krankheitsphase (vgl.: 3.4) bezeichnet. Das krankheitsfreie Überleben wurde anhand des Mittelwertes sowie der zugehörigen Standardfehler verglichen. Zur weiteren Analyse wurden ebenfalls eine Kaplan-Meier-Statistik mit nachfolgendem Log-Rank-Test und Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test herangezogen.⁸⁸

3.8.4. Retrospektive Analyse der Prodromalphase

Um zu untersuchen, ob Anle138b auch schon in der frühen Phase der Erkrankung Effekte hat untersuchten wir die motorische Laufleistung in der Prodromalphase der Erkrankung, Hierfür wurde die motorische Leistung der Tiere im Zeitraum von 90 Tagen vor dem letztendlich eingetretenem Tod retrospektiv betrachtet. Die Analyse

erfolgte ebenfalls mit dem den Student T Test.⁸⁹ Im Vorfeld wurde mittels D'Angostino-Pearson-Tests auf Normalverteilung geprüft.

3.8.5. Analyse der Gewichtsentwicklung der Versuchstiere

Das Gewicht der Tiere wurde 14 tägig gemonitort um eine Auswirkung der Erkrankung auf den Organismus der Tiere zu untersuchen. Um die geschlechtsspezifischen Gewichtsunterschiede auszugleichen wurde das Körpergewicht analog zur motorischen Laufleistung (vgl.: 3.8.2) auf den Ausgangswert normiert. Dies ermöglicht die prozentuale Gewichtsentwicklung einzelner Versuchstiere unabhängig von grundsätzlicher Konstitution sowie Geschlecht zu vergleichen. Für die statistische Analyse verwendeten wir den Student T Test.⁸⁹

3.8.6. Analyse der α -Synuclein-Ablagerungen im Gehirn

Zur Auswertung der α S-Ablagerungen wurden eine semi-quantitative und quantitative Bewertung der Hirnschnitte durchgeführt (vgl.:3.7.3). Es wurden Mittelwerte, sowie Standardabweichungen und – fehler berechnet. Um die Ergebnisse in Bezug auf das Alter zum Analysezeitpunkt zu analysieren wurde eine Korrelation nach Spearman sowie eine lineare Regression berechnet.⁹⁰

3.8.7. Analyse der Biochemischen Analyse

Um die nachgewiesenen Fraktionen des Sucrosegradienten (vgl.: 3.6.2) statistisch miteinander zu vergleichen wurde eine ANOVA-Analyse und multifaktorielle Post-hoc-Analysen durchgeführt.⁸⁹

4. Ergebnisse

4.1. Klinik und Überleben der Versuchstiere

4.1.1. Motorische Leistungen

Um die Streuung innerhalb der Gruppen durch Unterschiede in der basalen Laufleistung zu reduzieren wurde die Laufleistung der einzelnen Tiere mit dem arithmetischen Mittelwert der Leistung in den Lebenswochen 42 bis 51 individuell normiert (vgl.: 3.4).

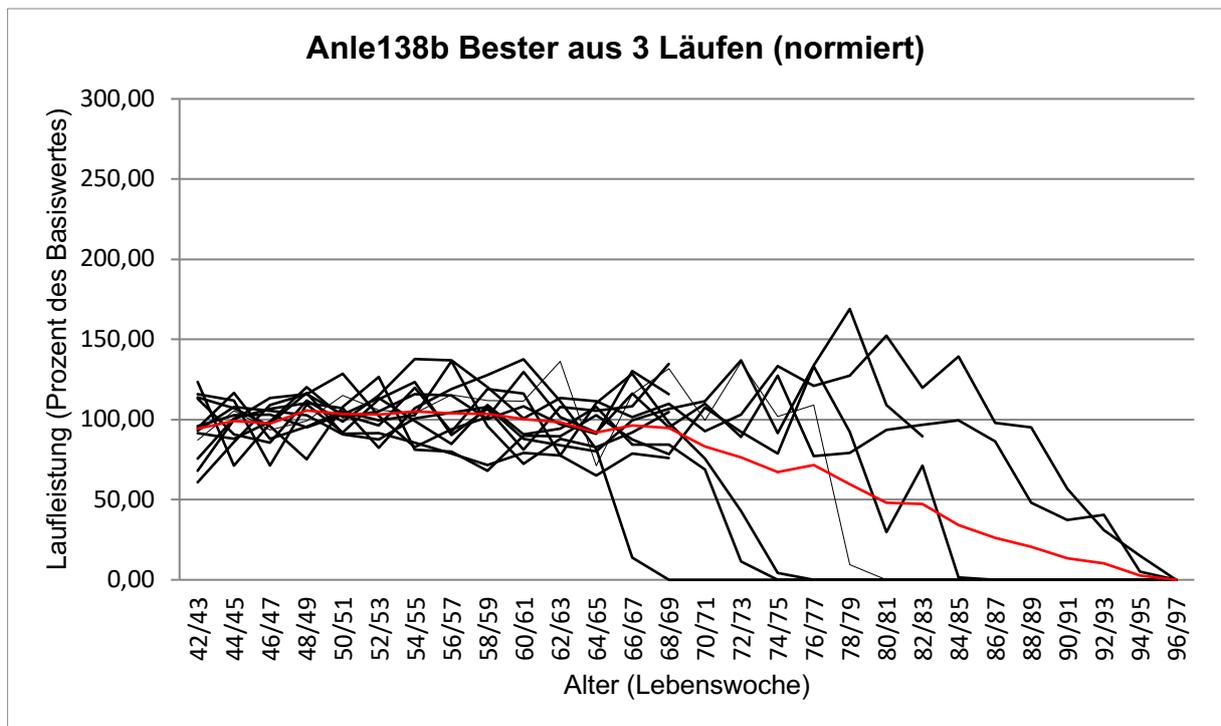


Abbildung 22: Normierte Laufleistung der Verum - behandelten Tiere auf dem RotaRod in Sekunden. Eine Linie entspricht der Laufleistung eines einzelnen Tieres. Die rote Linie entspricht dem Mittelwert der gesamten Gruppe

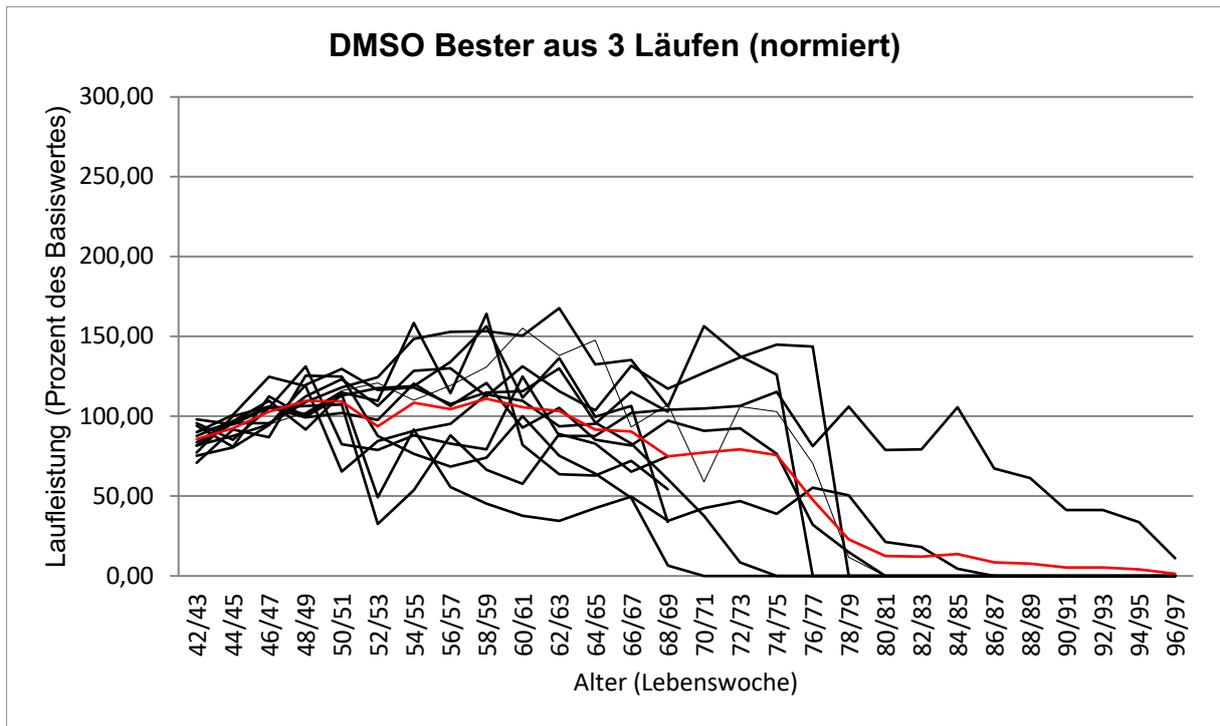


Abbildung 23: Normierte Laufleistung der placebo-behandelten Tiere auf dem RotaRod in Sekunden. Eine Linie entspricht der Laufleistung eines einzelnen Tieres. Die rote Linie entspricht dem Mittelwert der gesamten Gruppe

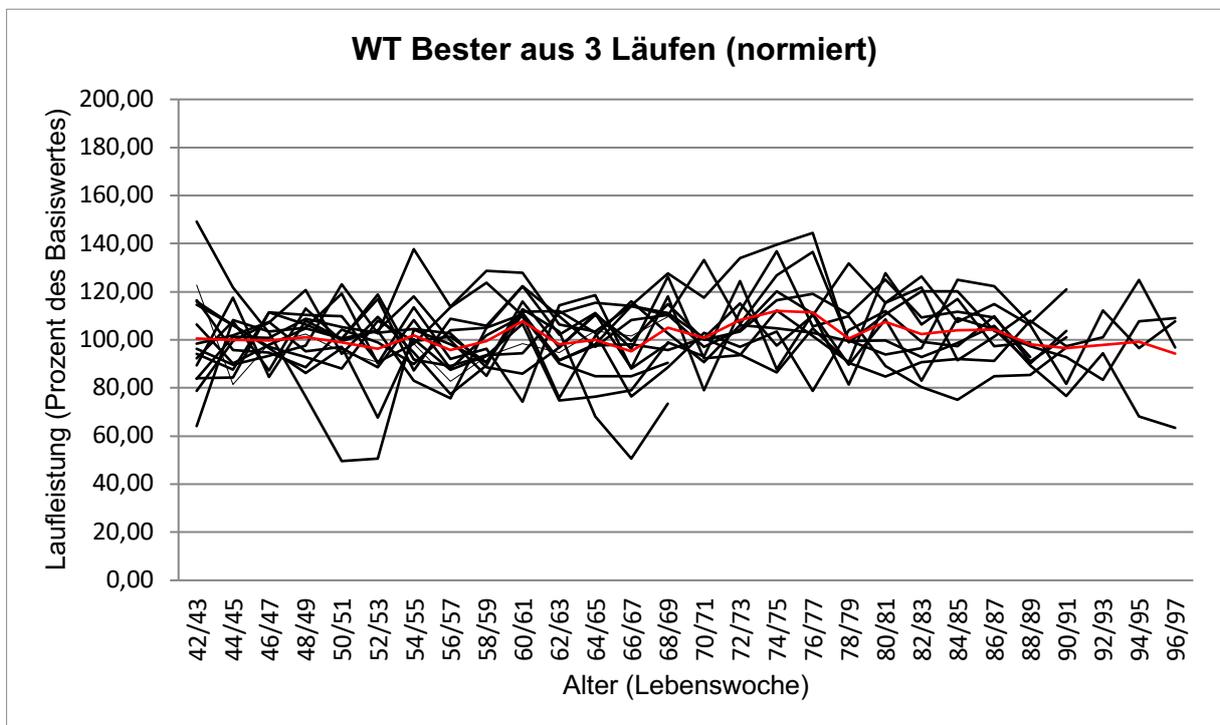


Abbildung 24: Normierte Laufleistung der Kontrollgruppe auf dem RotaRod in Sekunden. Eine Linie entspricht der Laufleistung eines einzelnen Tieres. Die rote Linie entspricht dem Mittelwert der gesamten Gruppe

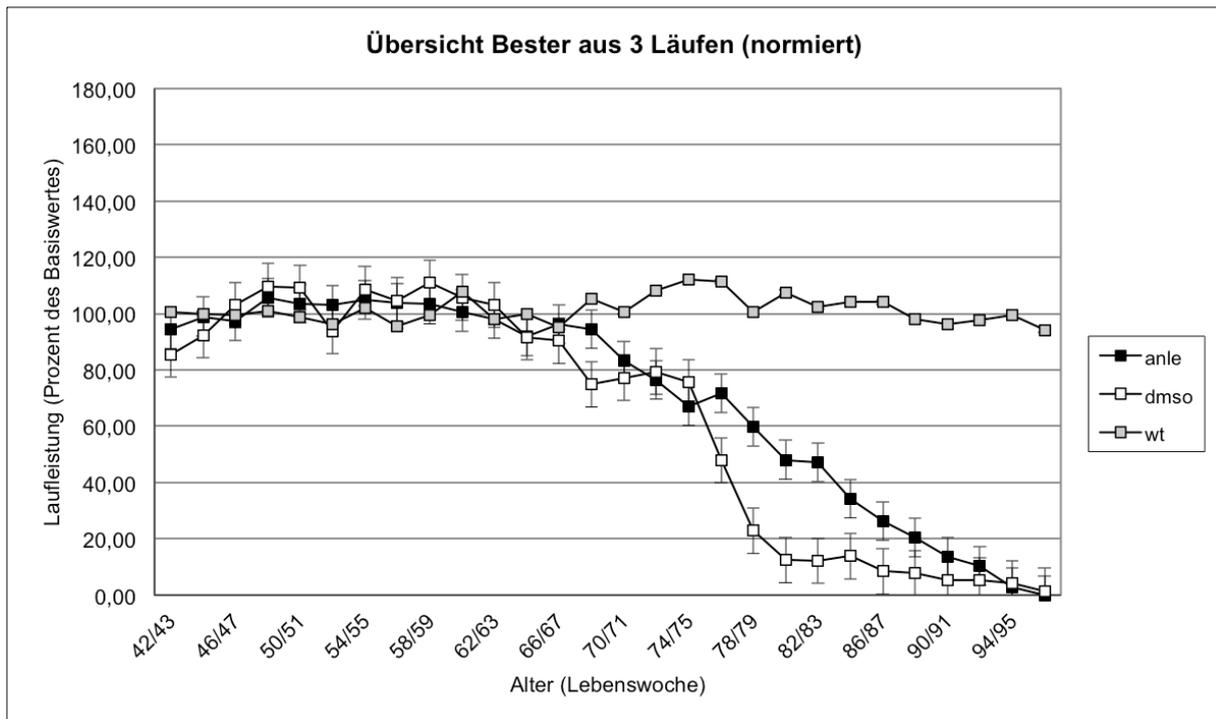


Abbildung 25: Zusammenfassung der normierten Laufleistung. Abgebildet sind die Mittelwerte der einzelnen Gruppen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an

Die Laufleistungen für alle Versuchsgruppen zeigten sich in den ersten Lebenswochen auf Gruppenebene in der normierten Darstellung zunächst konstant. Ab der 74. Woche zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen. (Abbildung 25).

In der Prodromalphase der Erkrankung (300-450 Lebenstag) zeigten sich in der DMSO-Gruppe (Abbildung 23) Schwankung der Laufleistungen auf Einzeltierebene.

In der Darstellung der Fluktuation, bei welcher jeweils individuell die Standardabweichung von der besten Laufleistung im Zeitraum zwischen dem 300. und 450. Lebenstag der einzelnen Versuchstiere bemessen wurde, zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, wobei in der Anle138b-Gruppe die Fluktuation nahezu auf den Wert der Kontrollgruppe gesenkt werden konnte. (Abbildung 26).

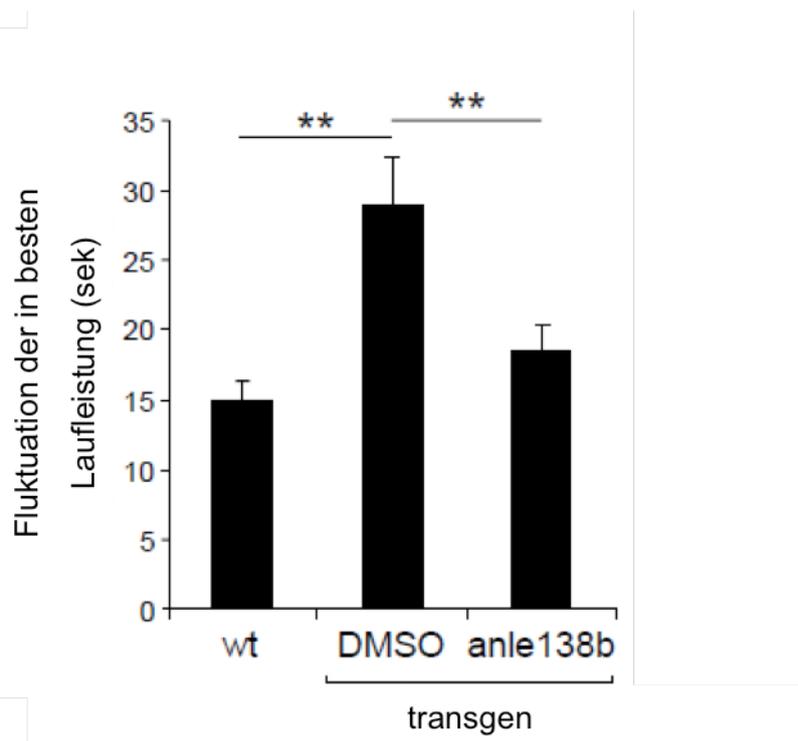


Abbildung 26: Fluktuation der Laufleistung. (** $p < 0.01$, Student - T -Test)

4.1.2. Krankheitsfreies Überleben

Definitionsgemäß wurde ein Versuchstier als erkrankt bezeichnet, wenn ihre beste Leistung aus drei Läufen unter dem Mittelwert blieb, der aus der Leistung adulter Wildtypmäuse minus drei Sigma (=55,28 s) ermittelt wurde. (vgl.: 3.4)

Tiernummer	Substanz	Lebenstage
# 31(♀)	Anle138b	588
# 32(♀)	Anle138b	546
# 36(♂)	Anle138b	644
# 43(♀)	Anle138b	* 483
# 44(♀)	Anle138b	518
# 45(♀)	Anle138b	* 483
# 46(♂)	Anle138b	* 483
# 61(♂)	Anle138b	504
# 62(♂)	Anle138b	616
# 64(♀)	Anle138b	* 483
# 66(♂)	Anle138b	* 483
# 67(♂)	Anle138b	462
# 33(♀)	dms0	490
# 34(♀)	dms0	546
# 37(♂)	dms0	462
# 40(♀)	dms0	476
# 41(♀)	dms0	532
# 42(♀)	dms0	532
# 47(♂)	dms0	* 483
# 59(♂)	dms0	630
# 60(♂)	dms0	546
# 65(♀)	dms0	* 483
# 68(♂)	dms0	* 483
# 69(♂)	dms0	406

Tabelle 30: Alter der Versuchstiere (Lebenstage) bei Erfüllung der Erkrankungskriterien. Mit Stern markierte Tiere wurden vor Erreichen der Kriterien aus dem Versuch entnommen, um die Pathologie zum Zeitpunkt 69 Wochen zu analysieren.

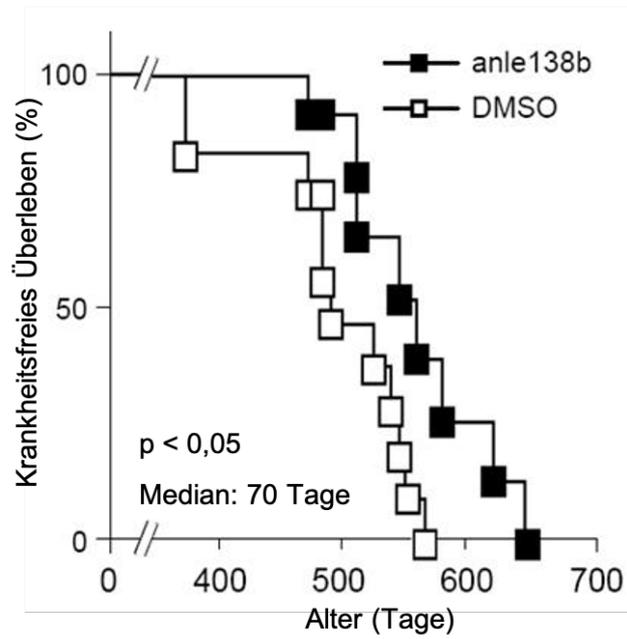


Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurve krankheitsfreies Überleben.

Bei der Analyse des Erkrankungsbeginns zeigt sich bei Behandlung mit Anle138b im Mittel ein verlängertes krankheitsfreies Überleben um 70 Tage (Abbildung 27)

4.1.3. Motorische Leistung in der Prodromalphase

Um zu untersuchen, ob Anle138b auch schon in der frühen Phase der Erkrankung Effekte hat, untersuchten wir die motorische Laufleistung in der Prodromalphase, also in der Phase, in der die Tiere noch nicht die Kriterien der Erkrankung erfüllen. Hierfür wurden Leistungen retrospektiv 90 Tage vom Todeszeitpunkt aus verglichen.

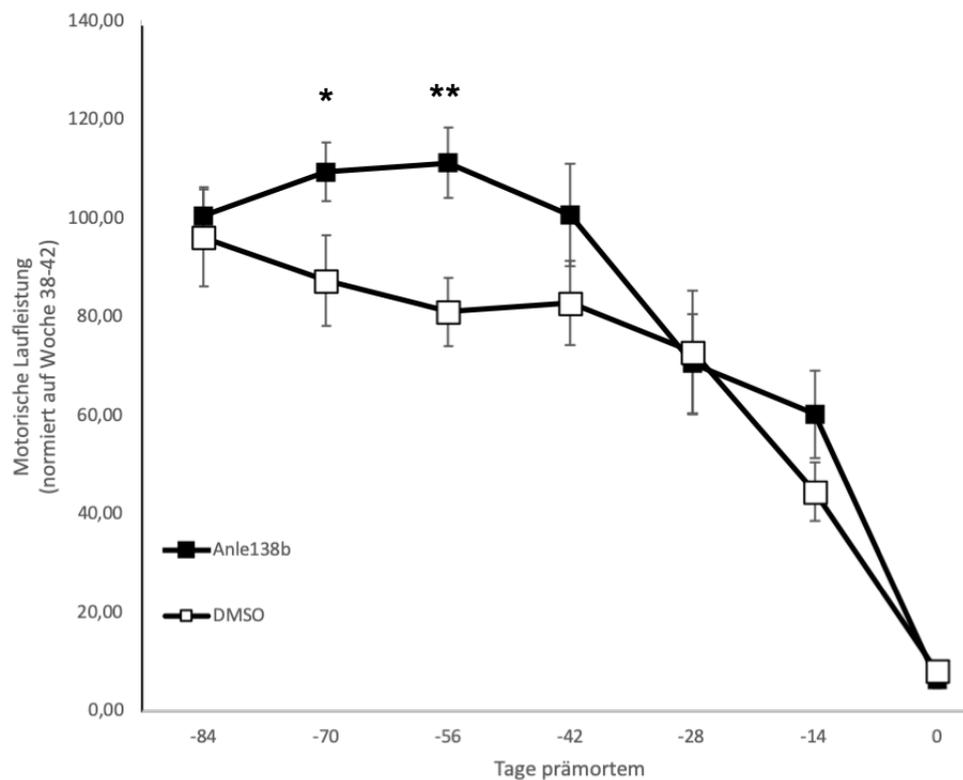


Abbildung 28: Motorische Leistung in der Prodromalphase, retrospektiv betrachtet, (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, Student - T -Test), Fehlerbalken: SEM

In der retrospektiven Betrachtung der Prodromalphase (2-3 Monate vor dem Tod) zeigt sich der motorische Phänotyp von Anle138b-behandelten Tieren signifikant verbessert (Abbildung 28).

4.1.4. Gewichtsentwicklung

Um frühzeitig eine Krankheit zu erkennen wurden alle Versuchstiere 14-tägig gewogen.

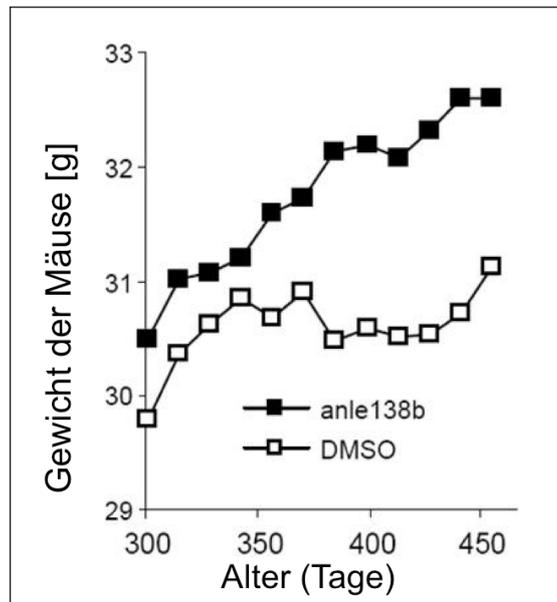


Abbildung 29: Gewichtsentwicklung in der Prodromalphase

In der Prodromalphase der Erkrankung (Alter von 300 bis 450 Tagen) konnte in der Anle138b-Gruppe eine fast normale Gewichtsentwicklung analog zu den Wildtyp-Mäusen beobachtet werden. Die DMSO-Gruppe hingegen zeigte eine reduzierte Gewichtszunahme. (Abbildung 29)

4.1.5. Zusammenfassung

Bei den DMSO-behandelten, transgenen Kontrolltieren zeigten sich im Krankheitsverlauf eine deutliche Fluktuation in der motorischen Leistung und eine Stagnation der Gewichtszunahme. In einer Prodromalphase, die sich dadurch auszeichnete, dass die betroffenen Tiere durch das tägliche Monitoring noch nicht als erkrankt eingestuft wurden, aber in der motorischen Untersuchung schon Fluktuationen in der ihrer Leistung zeigten, konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Placebo- und Verumgruppe beobachtet werden. In der Anle138b Gruppe konnte die Fluktuation in der Motorik auf Niveau des nicht-transgenen Wildtyps

reduziert werden. Im Schnitt trat diese Prodromalphase in der Placebogruppe im Alter zwischen 300 bis 450 Tagen auf.

In derselben Zeitspanne konnte beobachtet werden, dass die Gewichtszunahme der Versuchstiere der Placebogruppe abnahm. Im Vergleich dazu zeigte die Verumgruppe eine kontinuierliche Gewichtszunahme, wie sie bei gesunden Tieren zu erwarten wäre. Am Ende des Versuchs konnte das krankheitsfreie Überleben der transgenen Mäuse durch anle138b signifikant um durchschnittlich 70 Tage verlängert werden.

Anle138b behandelte Tiere zeigten in der retrospektiven Analyse signifikant weniger Fluktuationen in ihrer motorischen Leistung. Die Laufleistung wurde hierbei auch relativ zum Zeitpunkt des letztendlichen Todes untersucht. Dadurch konnte gezeigt werden, dass nicht nur das krankheitsfreie Überleben verlängert wurde, sondern auch der motorische Phänotyp zwei bis drei Monate vor dem Tod verbessert werden konnte.

4.2. Biochemie

4.2.1. Ultrazentrifugation

Um in einem Pilotprojekt nachzuweisen, dass die α S-Ablagerungen in den verwendeten Tieren die vorbeschriebenen Eigenschaften⁹¹ aufweisen, wurden zunächst Tiere aus der Zucht mit einem Aufreinigungsprotokoll mittels Ultrazentrifugation (vgl.: 3.6.1) bearbeitet und mittels Western-Blot (vgl.: 3.6.4) analysiert.

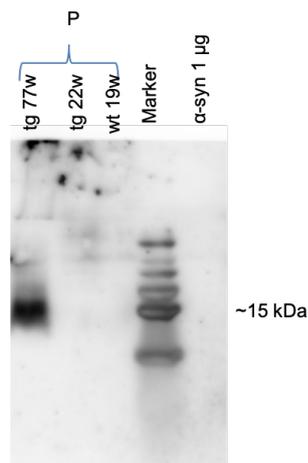


Abbildung 30: Western-Blot nach Ultrazentrifugation: Dargestellt sind die Pelletfraktionen von 2 transgenen Tiere (77 Wochen und 22 Wochen) und einer Wildtypmaus (19 Wochen) sowie rekombinantes α S. 1.AK: s129 (1:2000TBST). 2.AK: Rat anti Rabbit(AP) (1:2000 TBST)

In der Darstellung mittels AK S129, welcher an α S bindet, dass an Serin 129 phosphoryliert ist, zeigt sich in der Pelletfraktion mit unlöslichen Aggregaten der 77 Wochen alten transgenen Maus eine positive Bande bei etwa 15 kDa. In der 22 Wochen alten transgenen Maus, der Wildtypmaus und dem rekombinante α S kommt es zu keinem Signal. (Abbildung 30).

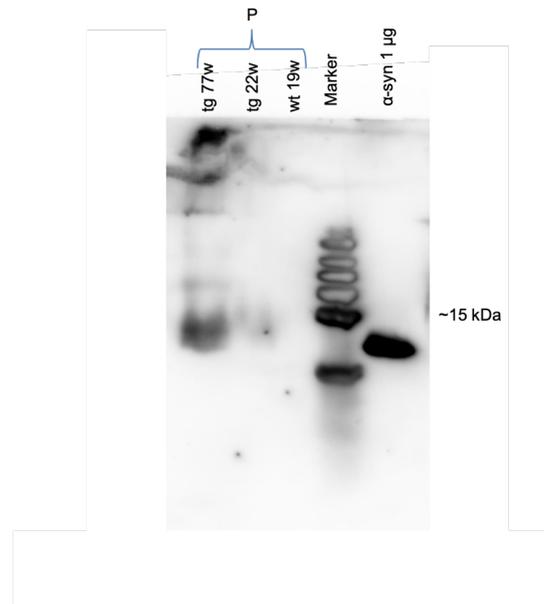


Abbildung 31: Western-Blot nach Ultrazentrifugation: Dargestellt sind die Pelletfraktionen von 2 transgenen Tiere (77 Wochen und 22 Wochen) und einer Wildtypmaus (19 Wochen) sowie rekombinantes α S. 1.AK: 15G7 (1:1000 TBST). 2.AK: Goat anti Rat (AP) (1:1000 TBST)

In der Darstellung mit dem 15G7-AK, welcher ausschließlich mit humanen α S und nicht mit murinem reagiert, konnte im Pellet der 77 Wochen alten Maus ein deutliches Signal in derselben Größe wie transgenes α S dargestellt werden. In der 22 Wochen alten transgenen Maus lässt sich hier ein schwaches Signal sehen. In der Wildtypmaus ist kein Protein darstellbar. (Abbildung 31)

Zusätzlich wurde die Gesamtmenge von α S mittels Western-Blot quantifiziert. Hierfür wurde Hirnhomogenat (10 μ l 10% Hirnhomogenat $\hat{=}$ 1mg Hirn) von 69 Wochen alten Mäusen aus der Verum- und Placebogruppe verwendet. Pro Gruppe wurden drei Tiere nach dem in Kapitel 3.6 beschriebenen Protokoll untersucht. Es konnte dabei kein Unterschied in der Gesamtmenge von α S gesehen werden. (Abbildung 32)

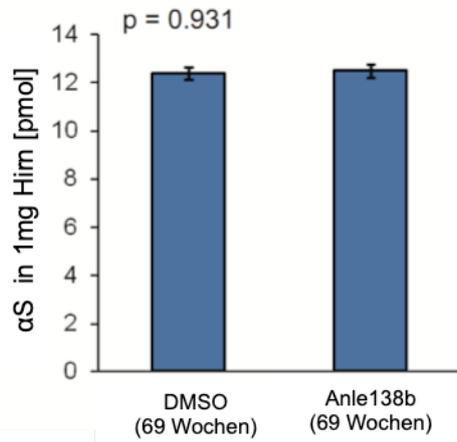


Abbildung 32: Gesamtmenge αS im Vergleich der beiden Gruppen. (p-Wert aus Student - T -Test), Fehlerbalken: SEM

4.2.2. Sucrosegradient

Mittels Sucrosegradienten-Zentrifugation wurde Hirnhomogenat von transgenen Mäusen der Größe nach aufgetrennt und anschließend durch Western-Blot dargestellt, um die Proteinablagerungen weiter zu charakterisieren.

Verglichen wurden jeweils vier junge, unbehandelte Tiere und 69 Wochen alte Tiere die mit Anle138b oder DMSO behandelt wurden. Zum Vergleich wurde außerdem monomeres und oligomeres rekombinantes αS aufgetragen (Abbildung 33 und Abbildung 34).

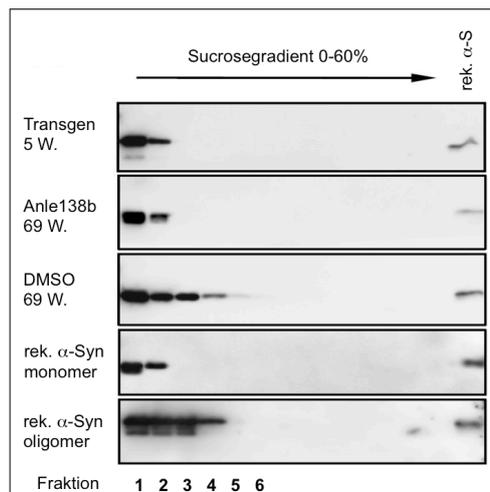


Abbildung 33: Beispiel eines Westernblots nach einem Sucrosegradient

Durch Ultrazentrifugation und Sucrosegradienten konnten aus den Hirnhomogenaten α S-Aggregate aufgereinigt und nach Größe aufgeteilt mittels Westernblot dargestellt werden (Abbildung 33).

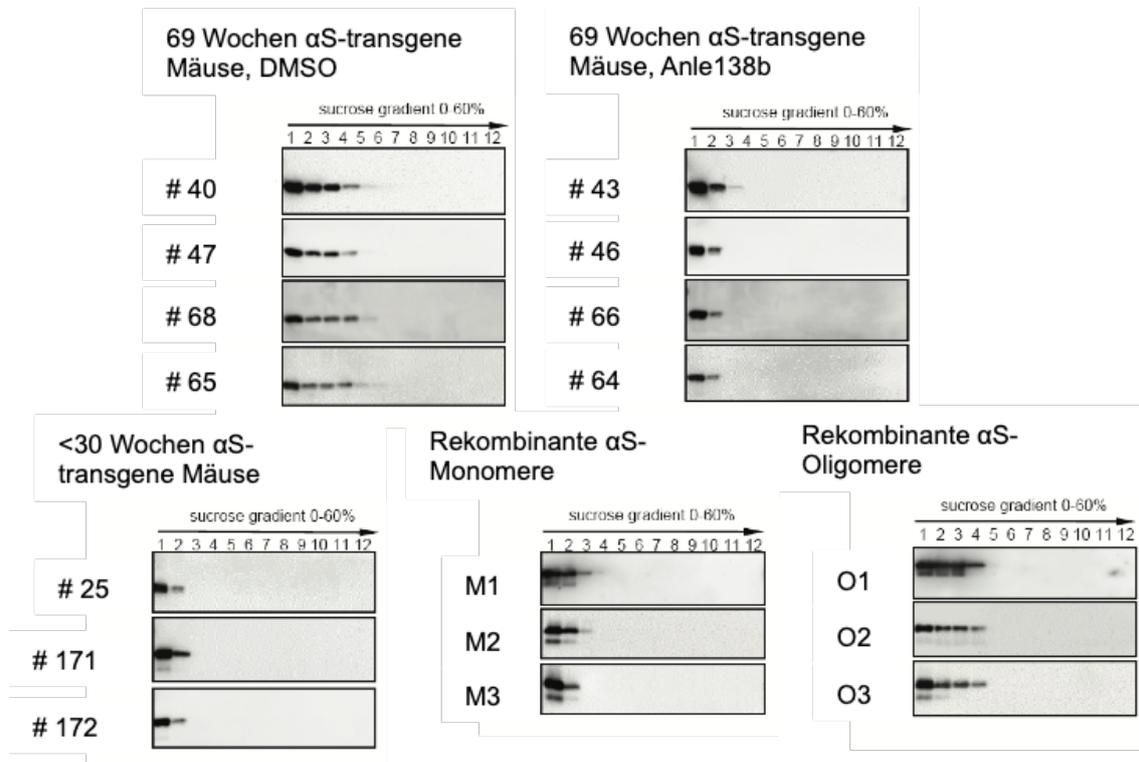


Abbildung 34: Gegenüberstellung der Westernblots, nach Gruppen aufgeteilt. Im Uhrzeigersinn: junge (<30-Wochen) unbehandelte α S-Mäuse, 69-Wochen alte Anle138b-behandelte α S-Mäuse, 69-Wochen alte DMSO-behandelte α S-Mäuse, rekombinante α S-Oligomere und rekombinante α S-Monomere.

Die einzelnen Banden im Westernblot wurden quantifiziert und statistisch analysiert. (Tabelle 31). Im Anschluss wurde eine Graphik mit den Mittelwerten der gemessenen Mengen der verschiedenen Fraktionen erstellt (Abbildung 35).

Ergebnisse

Junge transgene Mäuse, unbehandelt

Fraktion	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
#25	6,09	1,87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
#171	8,78	3,06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
#172	6,14	2,08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mittelwert	6,34	2,34										
Standardabweichung	2,35	0,64										
Standardfehler	0,78	0,21										

69-Wochen Anle138b transgen

Fraktion	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
#43	10,18	5,87	0,66	0	0	0	0	0	0	0	0	0
#46	7,16	3,12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
#64	6,77	3,26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
#66	9,26	4,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mittelwert	8,34	4,07	0,17									
Standardabweichung	1,64	1,26	0,33									
Standardfehler	0,55	0,42	0,11									

69-Wochen DMSO transgen

Fraktion	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
#40	7,92	3,51	2,53	0,43	0,09	0,02	0	0	0	0	0	0
#47	6,32	2,39	2,41	0,29	0,07	0	0	0	0	0	0	0
#65	6,45	2,56	1,87	1,63	0,36	0,19	0	0	0	0	0	0
#68	6,39	2,82	2,02	1,68	0,22	0,05	0	0	0	0	0	0
Mittelwert	6,77	2,82	2,21	1,01	0,19	0,07						
Standardabweichung	2,43	0,49	0,31	0,75	0,13	0,09						
Standardfehler	0,61	0,16	0,1	0,19	0,03	0,02						

Rekombinantes
α-Synuclein, monomer

Fraktion	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M1	6,55	3,34	0,45	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M2	6,29	3,97	0,15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M3	9,98	2,43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mittelwert	7,61	3,25	0,2									
Standardabweichung	2,06	0,77	0,23									
Standardfehler	0,69	0,26	0,07									

Rekombinantes
α-Synuclein, oligomerisiert

Fraktion	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
O1	5,15	3,55	3,19	0,89	0	0	0	0	0	0	0	0
O2	7,25	2,28	2,34	1,19	0	0	0	0	0	0	0	0
O3	9,15	2,16	1,83	0,69	0	0	0	0	0	0	0	0
Mittelwert	7,18	2,66	2,45	0,92								
Standardabweichung	2,00	0,77	0,69	0,25								
Standardfehler	0,67	0,26	0,23	0,08								

Tabelle 31: Messung der αS-Aggregate nach Fraktion im Sucrosegradient in pmol

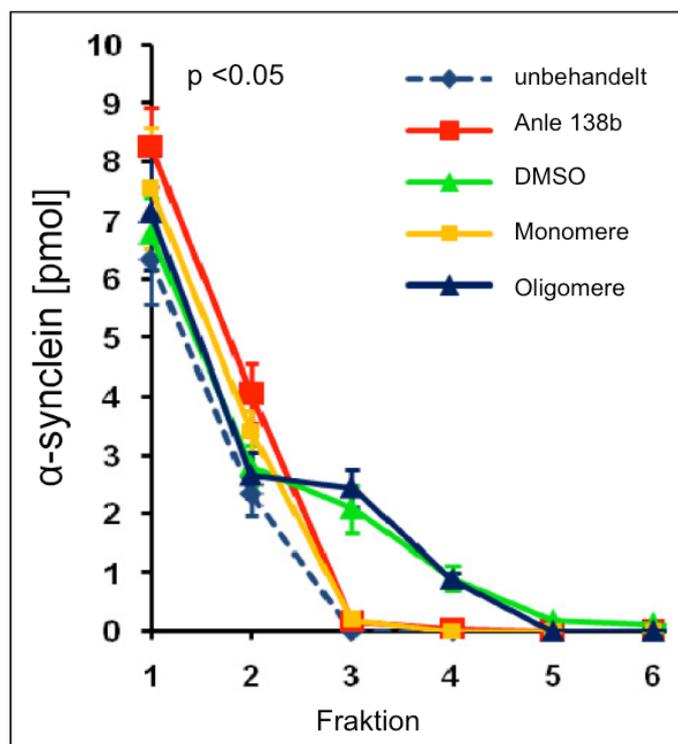


Abbildung 35: Graphische Darstellung der Fraktionen des Sucrosegradienten. Zusammenfassung aus vier Sucrosegradienten. $p < 0,05$.

Während alte, DMSO-behandelte Tiere aggregiertes αS aufweisen, das bezüglich Aggregatgrößen vergleichbar mit *in vitro* generierten Oligomeren ist, ist in jungen und Anle138b-behandelten Tieren v.a. monomeres αS nachweisbar.

4.3. Histopathologie

In den transgenen Tieren konnten pathologische, Proteinkinase K-resistente αS Ablagerungen mit dem Antikörper 15G7 nachgewiesen werden (Abbildung 36).

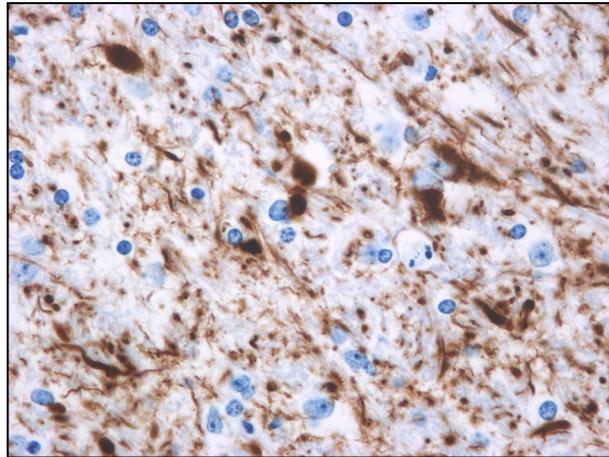


Abbildung 36: Beispielbild für die immunhistologische Färbung eines transgenen Tieres mit 15G7. Blau gefärbt zeigen sich die Zellkerne, α S-Ablagerungen werden braun dargestellt. (Objektiv: Olympus UPlanFI 10x/0,30; Vergrößerung: 10-fach)

Insgesamt konnte beobachtet werden, dass die α S-Ablagerungen sich zunächst im Hirnstamm manifestierten. Mit zunehmendem Alter breiteten sich die Ablagerungen nach supratentoriell in Kortex und Thalamus aus. Die zunehmende Ausbreitung korrelierte dabei mit der motorischen Leistungsfähigkeit, dem Gewichtsverlust oder dem Todesalter der transgenen Versuchstiere.

Die Ablagerungen zeigten dabei verschiedene Morphologien. Am häufigsten konnten α S-Ablagerungen entlang der Neuriten nachgewiesen werden. Entweder zeigten sich diese kompakt oder granulär perlschnurartig.

Die kompakten Aggregate imponierten zum Teil als längliche, unregelmäßig begrenzte Ablagerungen, welche einen aufgedunsenen Aspekt hatten und wahrscheinlich dystrophen Neuriten entsprachen. Weniger häufig zeigten sich in den Somata nahe dem Zellkern lokalisierte α S-Einschlüsse, welche aber wiederum entweder kompakt oder granulär dargestellt werden konnten. (Abbildung 37)

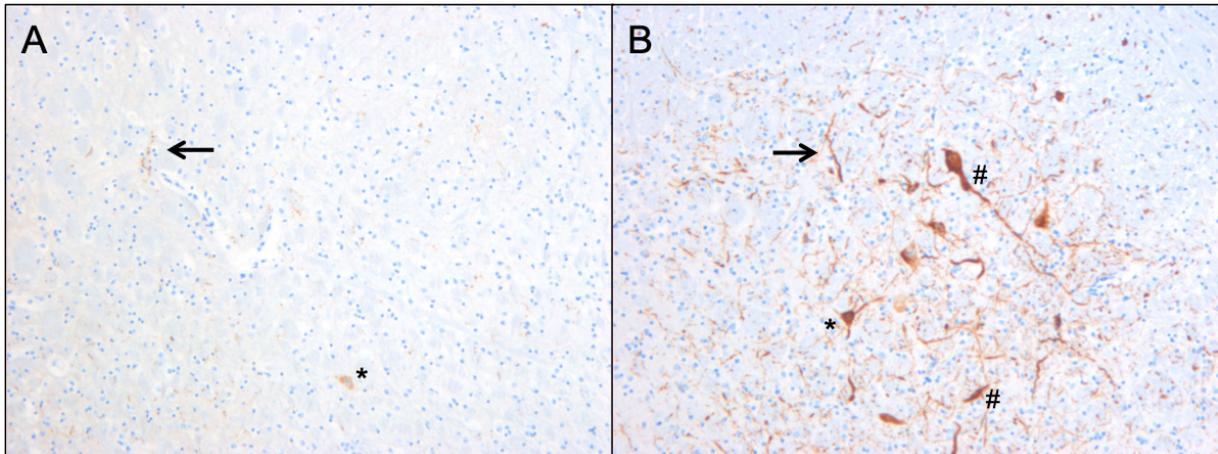


Abbildung 37: Beispiele der verschiedenen morphologischen α -S-Ablagerungen in transgenen Versuchstieren. Färbung: 15G7, Vergrößerung: 10-fach, Ausschnitt: Hirnstamm. Ablagerungen in den Neuriten (Pfeil) in A granulär perlchnurartig, in B kompakt. Dystrophe Neuriten (#). Ablagerungen im Soma (*) in A granulär, in B kompakt. Objektiv: Olympus UPlanFI 10x/0,30; Vergrößerung: 10-fach

4.3.1. Histologie in der Prodromalphase

Um einen direkten Vergleich zu ermöglichen wurde zum Zeitpunkt von 69 Wochen je vier Mäuse aus der Placebo- und Verumgruppe entnommen.

Zur Auswertung wurden einerseits ein semiquantitatives Verfahren und andererseits die quantitative Auswertung über eine Quantifizierung der gefärbten Fläche verwendet (vgl.:3.7.3.1 und 3.7.3.2). (Abbildung 38, Abbildung 39 und Tabelle 32)

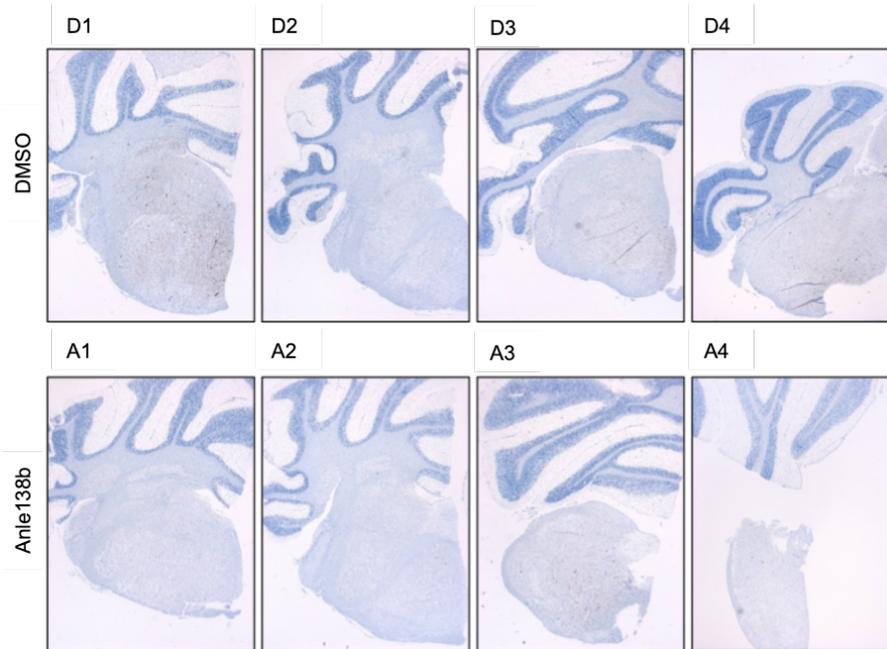


Abbildung 38: Übersichtsaufnahmen der histologischen Schnitte durch den Hirnstamm aller zur Kontrolle entnommenen Versuchstier in der 69. Wochen. Immunhistologische Färbung: 15G7, Objektiv: Olympus DF PLAPO 1.2x PF; Vergrößerung: 10-fach Vergrößerung: 1,2-fach

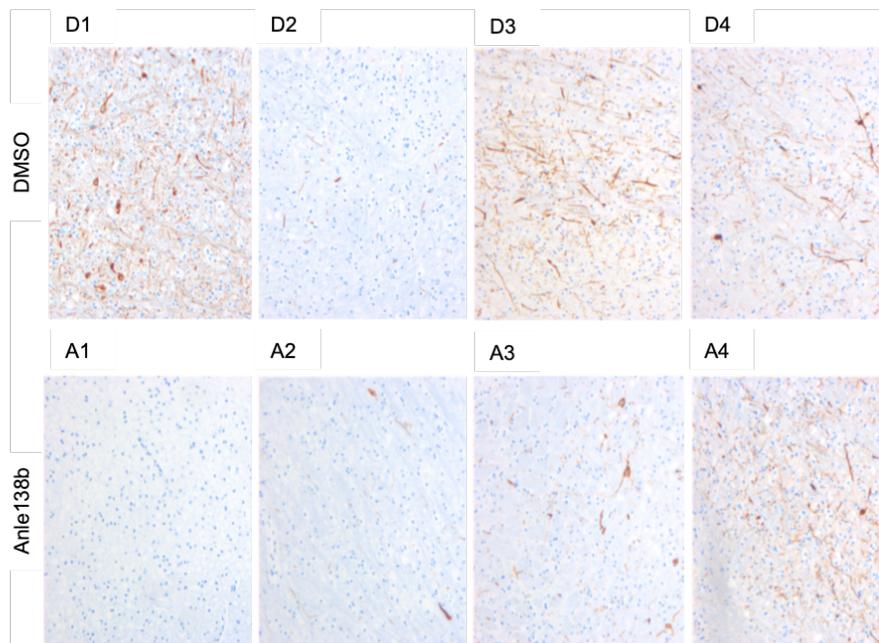


Abbildung 39: Detailaufnahmen der histologischen Schnitte aller zur Kontrolle entnommenen Versuchstier in der 69. Wochen. Immunhistologische Färbung: 15G7, Objektiv: Olympus UPlanFI 10x/0,30; Vergrößerung: 10-fach

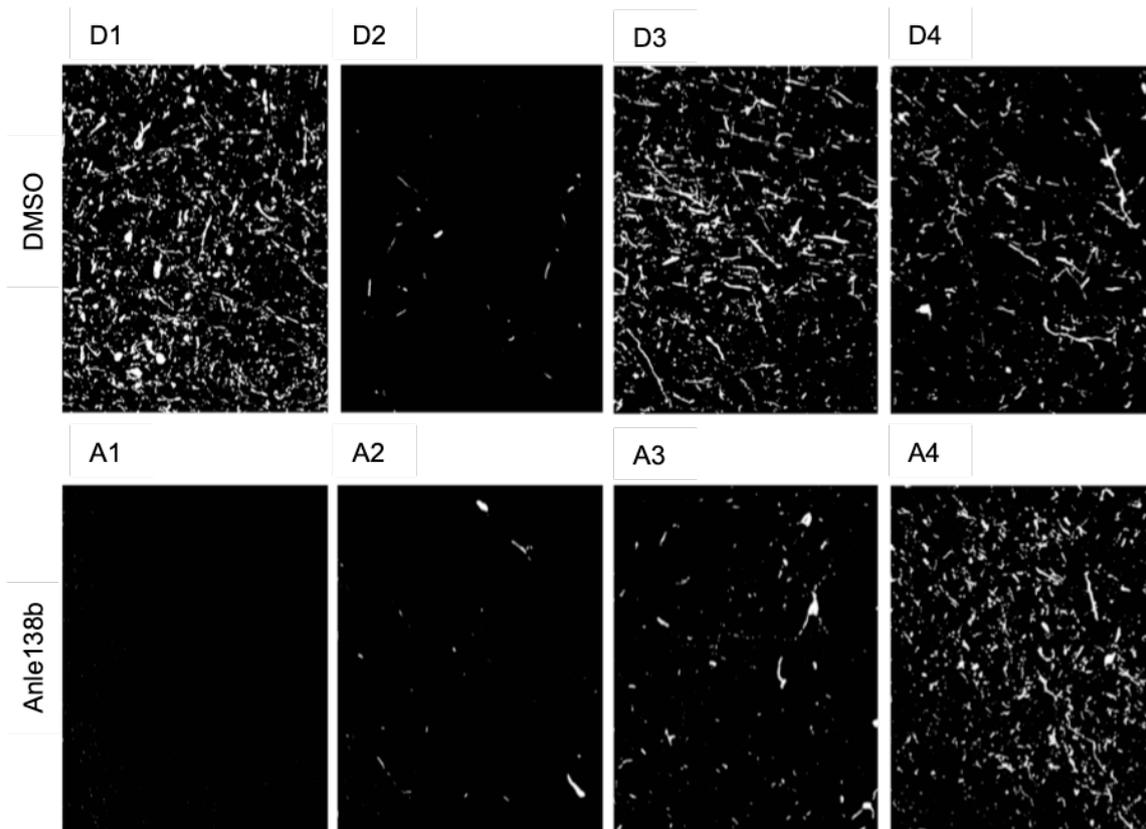


Abbildung 40: Binarisierung der Detailaufnahmen (vgl.: Abbildung 39)

Nummer	Gruppe		Alter	Semiquantitativ			Quantitativ (positive Pixel %)		
				HS 1	HS 2	Mittelwert	HS 1	HS 2	Mittelwert
A1	Anle138b	♀	69	1	0	0,5	0,16	0,03	0,10
A2	Anle138b	♂	69	1	2	1,5	0,11	0,28	0,19
A3	Anle138b	♀	69	3	3	3	1,43	0,91	1,17
A4	Anle138b	♂	69	3	3	3	1,44	6,59	4,02
D1	DMSO	♀	69	3	4	3,5	5,37	11,47	8,42
D2	DMSO	♂	69	2	2	2	0,15	0,17	0,16
D3	DMSO	♀	69	3	3	3	2,16	6,88	4,52
D4	DMSO	♂	69	3	3	3	3,56	14,09	8,82

Tabelle 32: Semiquantitative und Quantitative Auswertungen der zur Kontrolle entnommenen Versuchstier in der 69. Wochen

In der Prodromalphase konnte in den Anle138b-behandelten Tieren eine Reduktion der pathologischen α S -Ablagerungen beobachtet werden. (Abbildung 41)

α -Synucleinablagerungen

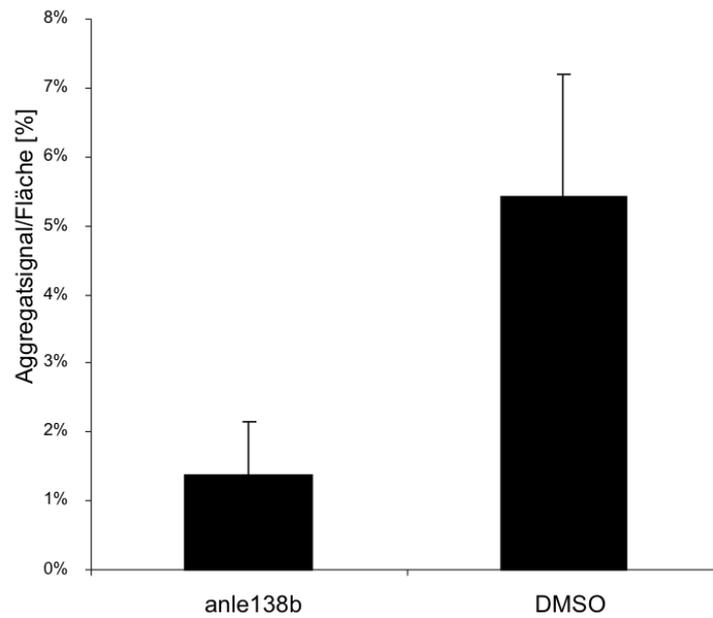


Abbildung 41: Prozentualer Flächen-Anteil 15G7-gefärbter Ablagerungen im Hirnstamm der zum Zeitpunkt 69 Wochen entnommenen Tiere. Fehlerbalken: SEM

4.3.2. Terminal erkrankte Tiere

Die Auswertungen der histologischen Schnitte der terminal erkrankten Mäuse erfolgte analog zu der Analyse der vorzeitig entnommenen Tiere aus der 69. Woche. (vgl.:4.3.1)

Gruppe		Alter	Semiquantitativ			Quantitativ (positive Pixel %)		
			HS 1	HS 2	Mittelwert	HS 2	HS 1	Mittelwert
Anle138b	♀	71	4	4	4	40,06	44,72	42,39
Anle138b	♀	71	3	4	3,5	6,23	29,23	17,73
Anle138b	♀	75	4	4	4	37,92	41,95	39,93
Anle138b	♀	77	3	3	3	3,53	9,46	6,49
Anle138b	♀	78	4	4	4	54,06	68,57	61,31
Anle138b	♀	84	3	4	3,5	9,89	22,26	16,08
Anle138b	♀	85	4	4	4	53,79	40,34	47,07
Anle138b	♀	85	4	4	4	45,50	76,73	61,12
Anle138b	♂	67	3	4	3,5	6,78	25,98	16,38
Anle138b	♂	73	3	3	3	1,12	1,75	1,43
Anle138b	♂	95	4	4	4	46,97	62,69	54,83
Anle138b	♂	96	4	4	4	70,71	68,88	69,79
DMSO	♀	72	4	4	4	17,48	54,81	36,14
DMSO	♀	78	4	4	4	20,64	18,38	19,51
DMSO	♀	79	4	4	4	23,60	36,37	29,99
DMSO	♂	70	4	4	4	65,17	57,46	61,31
DMSO	♂	77	3	3	3	3,79	12,31	8,05
DMSO	♂	85	3	3	3	2,05	6,32	4,18
DMSO	♂	85	4	4	4	64,72	67,02	65,87
DMSO	♂	97	4	4	4	29,69	30,01	29,85

Tabelle 33: Semiquantitative und Quantitative Auswertungen der terminal erkrankten Tier

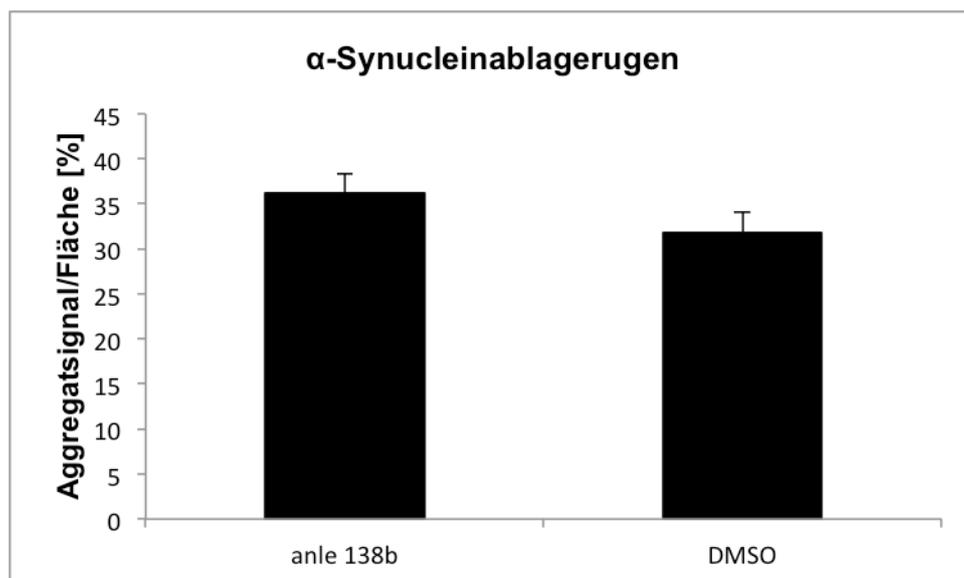


Abbildung 42: Prozentualer Flächen-Anteil 15G7-gefärbter Ablagerungen im immunhistologischen Schnitt bei terminal erkrankten Tieren. Fehlerbalken: SEM

Die Darstellung der Ablagerungen in den terminal erkrankten Tieren zeigten einen vielfach höheren Wert im Vergleich die Tiere aus der Prodromalphase. Hier konnte kein signifikanter Unterschied in den Gruppen festgestellt werden. (Abbildung 42 und Tabelle 33)

4.3.3. Andere Tiere

Einige gestorbene Tiere wurden nicht in die Auswertung der terminal erkrankten Tiere aufgenommen. Die folgende Tabelle zeigt deren histologische Auswertung, sowie die Gründe, warum sie nicht in die Analyse aufgenommen wurden. (Tabelle 34)

Gruppe		Alter	Grund	Semiquantitativ			Quantitativ (positive Pixel %)		
				HS 1	HS 2	Mittelwert	HS 1	HS 2	Mittelwert
Anle138b	♀	82	Hautveränderungen	3	3	3	3,85	3,77	3,81
DMSO	♀	77	töt gefunden	1	2	1,5	0,31	0,33	0,32
DMSO	♂	77	töt gefunden	2	1	1,5	0,15	0,13	0,14
DMSO	♂	83	töt gefunden	3	3	3	5,26	3,56	4,41

Tabelle 34: Semiquantitative und Quantitative Auswertungen der von der Analyse ausgenommenen Tiere

4.3.4. Kontrollgruppe

Auch die Wildtypmäuse aus der Kontrollgruppe wurden histologisch untersucht und zum Vergleich ebenso wie die Tiere aus der Placebo- und Verumgruppe aufgearbeitet,

Gruppe		Alter	Semiquantitativ			Quantitativ (positive Pixel %)		
			HS 1	HS 2	Mittelwert	HS 1	HS 2	Mittelwert
WT	♀	69	0	0	0	0,00	0,00	0,00
WT	♀	69	0	0	0	0,01	0,01	0,01
WT	♀	69	0	0	0	0,01	0,02	0,01
WT	♀	69	0	0	0	0,01	0,01	0,01
WT	♀	91	0	0	0	0,03	0,08	0,06
WT	♀	91	0	0	0	0,06	0,06	0,06
WT	♀	91	0	0	0	0,09	0,03	0,06
WT	♀	91	0	0	0	0,04	0,03	0,04
WT	♀	93	0	0	0	0,04	0,02	0,03
WT	♀	93	0	0	0	0,02	0,02	0,02
WT	♀	93	0	0	0	0,04	0,04	0,04
WT	♀	96	0	0	0	0,01	0,01	0,01
WT	♀	96	0	0	0	0,02	0,01	0,01
WT	♀	97	0	0	0	0,00	0,00	0,00
WT	♀	97	0	0	0	0,01	0,01	0,01

Tabelle 35: Semiquantitative und Quantitative Auswertungen der Wildtypmäuse aus der Kontrollgruppe

In der Auswertung zeigten sich bei den Wildtypmäusen in der semiquantitativen Auswertung keine Ablagerungen, in der Quantitativen Auswertung zeigt sich lediglich ein „Grundrauschen“, welches immer unter einem Wert von 0,1% blieb. (Tabelle 35)

4.3.5. Zusammenfassung

In allen transgenen Tieren konnten altersabhängig α S-Ablagerungen nachwiesen werden. Diese Ablagerungen manifestierten sich zunächst im Hirnstamm. Bei placebobehandelten Tieren war dies etwa in einem Alter von einem Jahr der Fall. Mit zunehmendem Alter breiteten sich die Ablagerungen nach supertentoriell in Kortex und Thalamus aus.

In der Prodromalphase konnte bei den Anle138b-behandelten Tieren eine Reduktion der pathologischen α S-Ablagerungen beobachtet werden. Die Beobachtungen decken sich zeitlich gut mit den vorherig beschriebenen Anzeichen einer reduzierten

Krankheitsprogredienz bezüglich Gewichtsabnahme und zunehmender motorischer Defizite (vgl.: 4.1.1 und 4.1.4).

Die quantitative Auswertung mittels Binarisierung der immunhistochemischen Färbung erfasst die pathologischen Ablagerungen gut, ohne eine relevante Menge an Hintergrundfärbung zu erfassen.

Bei den terminal erkrankten Tieren konnten wir keinen Unterschied in der Anzahl und Ausbreitung der pathologischen α S -Ablagerungen feststellen.

5. Diskussion

Bis heute ist lediglich eine symptomatische Therapie für neurodegenerative Erkrankungen, wie zum Beispiel PD und DLB verfügbar. Auf der Suche nach einem Therapeutikum zur Verlaufsmodifikation von Synucleinopathien wurde Anle138b entwickelt.⁵⁷ Bestandteil dieser Arbeit war die ausführliche Untersuchung des Wirkstoffes in einem transgenen Mausmodell für PD.

5.1. Relevanz der vorliegenden Arbeit

In Deutschland leben nach einer Schätzung etwa 200.000 Menschen mit PD.⁹² Aktuell werden zur Symptomlinderung MAO-B-Hemmer, Amantadin, COMT-Hemmer, Dopaminagonisten oder Levodopa bei der Behandlung von Patienten mit PD eingesetzt.^{93–96} Unter Umständen ist im Krankheitsverlauf auch eine tiefe Hirnstimulation (DBS) vor allem im Nucleus subthalamicus (STN) möglich.^{97–100} Darüber hinaus sind physiotherapeutische Behandlungen, logopädische Therapie und Ergotherapie als unterstützende Maßnahmen wichtiger Bestandteil der symptomlindernden Therapie.^{101,102}

Bei DLB oder PDD wird Rivastigmin und „*off-label*“ Donepezil verwendet.^{103,104} All diese verfügbaren Therapien stellen lediglich einen symptommodulierenden Ansatz dar. Die Suche nach einer Substanz, die in die Krankheitsursache eingreift erscheint in Angesicht der steigenden Inzidenz¹⁰⁵ wichtiger denn je.

Neben dem in dieser Arbeit untersuchten Ansatz einer Oligomermodulation gibt es einige weitere Ansätze für krankheitsmodifizierende Therapien von PD und anderen neurodegenerativen Erkrankungen.

1. Es gibt therapeutische Versuche mit sogenannten Antisense-Oligonucleotiden (ASO). ASOs sind kurze, synthetisch hergestellte Einzelstrang-DNS. Die Sequenz der ASO sind komplementär (oder „*antisense*“) zu der Ziel-RNA (prä- oder mRNA). Die ASOs binden dabei die RNA über Watson-Crick-Paarungen, wodurch die Translation über verschiedene Mechanismen moduliert wird.¹⁰⁶ Durch die *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) ist dieser Therapieansatz

bereits für die spinale Muskelatrophie (SMA) und für Muskeldystrophie Typ Duchenne (DMD) zugelassen.^{107–109} Für PD gibt es zwei Zielgene, welche aktuell in präklinischen Studien näher untersucht werden. Einerseits soll die Expression von LRRK2 und andererseits die von α S moduliert werden.^{110,111} Problematisch ist, dass ASOs keine gute Bioverfügbarkeit haben. Als Therapeutikum für Erkrankung des ZNS muss die Applikation intrathekal erfolgen. In unmodifizierter Form können die ASOs schnell degenerieren und haben eine schlechte Gewebegängigkeit, sie bedürfen daher aufwendiger chemischer Modifikationen.^{112,113} Zudem ist diesem Therapieansatz inhärent, dass die physiologische Funktion beeinträchtigt wird.

2. Ein weiterer Therapieansatz liegt in der Zellersatztherapie (CRT). Hierbei sollen die degenerierten dopaminergen Zellen des ZNS durch die Transplantation von Stammzellen, also Zellen die sich selbst erneuern und sich in verschiedene Zelllinien entwickeln können, ersetzt werden.¹¹⁴ Es werden embryonale Stammzellen (ESCs), neuronale Stammzellen (NSCs), induzierte neuronale Stammzellen (iNSCs), mesenchymale Stammzellen (MSCs) und induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs) unterschieden. Obwohl sich sowohl in Tierversuchen, als auch in klinischen Versuchen erste vielversprechende Ergebnisse gezeigt haben^{115–117}, ergeben sich bei diesem Therapieansatz noch sehr viele Probleme. Einerseits scheinen die Zellen nur lokal ersetzt zu werden, die komplexen Netzwerke könne nicht einfach ersetzt werden: Andererseits entwickelten sich nach Transplantation Tumoren aus den Stammzellen, es kam zu überschießenden Immunreaktionen oder es zeigte sich ein schlechtes Überleben der Stammzellen nach Transplantation, sodass eine CRT aktuell noch weit von einem breitem klinischen Einsatz entfernt zu sein scheint.¹¹⁸
3. Darüber hinaus gibt es bereits klinische Versuche zur Immuntherapie bei PD. Das Ziel ist dabei die "*prion-like*" Ausbreitung von α S zwischen den Zellen aufzuhalten.¹¹⁹ Unterschieden wird dabei zwischen der aktiven Immunisierung, hierbei wird das körpereigene Immunsystem zu Bildung von Antikörpern angeregt, und der passiven Immunisierung, bei der direkt Antikörper gegen α S verabreicht werden.¹²⁰ Einige Tierversuche haben bereits gezeigt, dass durch eine gegen α S gerichtete Immuntherapie α S aus dem extrazellulären Raum

entfernt werden kann und somit eine Ausbreitung der pathologischen Ablagerungen reduziert wurde.^{121–124} Zum Teil konnte auch eine Verbesserung der Kognition und der Motorik nachgewiesen werden.¹²³ Nach ersten Phase 1 Studien zur Sicherheit und Toleranz (Passiv: Prasinezumab, Aktiv: AFFITOPE PD01, PD02, PD01A, PD03A)¹²⁵ laufen aktuell erste Phase 2 Studien (Prasinezumab). Eine Limitation dieser Therapie liegt dabei in der Tatsache, dass zur Behandlung wahrscheinlich alle vier Wochen intravenöse Gaben nötig sind, um einen ausreichenden Serumspeigel zu erlangen. Zudem ist nicht davon auszugehen, dass eine Immuntherapie wirksam die wesentlichen intrazellulären Aggregate erreichen kann.

5.2. Anle138b

Anle138b [3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(3-bromophenyl)-1H-pyrazole], ist ein neuartiger Oligomermodulator. (vgl.: 1.4). In vorherigen Studien zeigten sich folgende Eigenschaften:

- 1) Anle138b ist gut oral bioverfügbar und überwindet die Blut-Hirnschranke.
- 2) Die Halbwertszeit ist ausreichend lange, um einen guten Medikamentenspiegel aufrecht zu erhalten
- 3) In therapeutischen Dosen konnte bis jetzt keine Toxizität nachgewiesen werden.
- 4) Die physiologisch vorkommenden α S-Moleküle werden von anle138b nicht reduziert, es scheint also direkt an den pathologischen Oligomeren des α S anzugreifen^{57,126}

Auf diesen Grundlagen aufbauend entschieden wir, dass eine tiefergehende Untersuchung dieses potentiellen Wirkstoffes im PD-Mausmodell lohnend ist.

5.3. Überleben und motorischer Phänotyp des Synukleopathie-Mausmodells

Bei dem für die durchgeführten Versuche gewähltem Mausmodell handelt es sich um ein gut etabliertes Tiermodell zur Untersuchung von Synucleinopathien.^{64,65,72} (vgl.: 1.5). Ausschlaggebend für die Wahl dieses Modells war die Tatsache, dass wir Anle138b als krankheitsmodifizierende Substanz untersuchen wollten. Es wurde daher einerseits ein Modell benötigt, welches die molekularen Mechanismen der Pathogenese von PD widerspiegelt. Andererseits sollte es möglichst genau den humanen Krankheitsverlauf einer neurodegenerativen Erkrankung abbilden, also einen altersabhängigen Phänotyp, sowie charakteristische pathologische Ablagerungen im ZNS aufweisen. Aus diesen Gründen konnte beispielsweise kein toxisches Modell, welche zum Beispiel durch Einsatz von MPTP oder 6-OHDA einen Parkinsonphänotyp induzieren¹²⁷, gewählt werden. Aufgrund einer Literaturrecherche fiel die Wahl auf das {(Thy1)-h[A30P] α -syn}Mausmodell, welches klinisch Tremor, Ataxie, hypokinetischen Bewegungsstörungen und einen kognitiven Leistungsabbau zeigte, wobei die regionale α S -Verteilung von Ablagerungen im ZNS mit dem Auftreten der klinischen Zeichen korrelierten.^{62,64} Als Parameter zur Auswertung der Versuche wurde die Differenz zwischen dem Überleben der Tiere aus der Placebo- vs. der Verumgruppe gewählt.

Zur Untersuchung des motorischen Phänotyps wählten wir die RotaRod-Methodik (vgl.: 3.4). Diese Untersuchungsmethode ist gut etabliert für quantitative Analysen und spielt eine wichtige Rolle in der Untersuchung von genetisch veränderten Tieren, sowie im frühen Stadium der Medikamentenentwicklung.^{128–130}

Der Vorteil dieser Untersuchungsmethode liegt darin, dass reproduzierbare, metrische Daten, welche statistisch analysiert werden können, erstellt werden. Diese unterliegen deutlich weniger Fehlern durch subjektives Entscheiden oder Interrater-Reliabilität.¹³¹ Des Weiteren besteht eine Vergleichbarkeit (bei gleich gewählten Parametern) zwischen verschiedenen Forschungseinrichtungen. Verschiedene Parameter wie der Durchmesser der rotierenden Laufstange, deren Oberfläche, Geschwindigkeit des

Zylinders, konstante vs. ansteigende Geschwindigkeit und Menge des Trainings der Tiere sind frei wählbar.^{131,132}

Bei der Auswahl der Parameter orientierten wir uns an der Literatur und übernahmen die Testbedingungen von Masliah et al (Science, 2000), da hier verlässliche Ergebnisse in der Gegenüberstellung von transgenen Mäusen mit einer Überexpression von humanem α S und Wildtypmäusen gezeigt werden konnten.⁶⁷ Fokus bei der hier gewählten ansteigenden Geschwindigkeit ist es, die maximal mögliche Geschwindigkeit zu erfassen, um einen möglichst geringen Einfluss durch mangelnde Ausdauer zu haben. Außerdem wurden vor jedem Testtag zwei Trainingstage absolviert, sodass die Tiere den Bewegungsablauf verinnerlichen. Darüber hinaus wurde die Wertung der Versuche erst nach zehn Wochen Testablauf begonnen, da ab diesem Zeitpunkt keine Steigerung in der Leistung mehr beobachtet werden konnte.¹³³ Diese Testparameter zeigten sich auch in unserem Versuchsaufbau als sensitiv für die Veränderung der motorischen Leistungen und waren darüber hinaus gut durchführbar. Als Zielparameter wurde die Verbesserung der motorischen Leistung sowie ein verbessertes krankheitsfreies Überleben der Verumgruppe im Vergleich zur Placebogruppe definiert.

Durch die Behandlung mit Anle138b konnte ein längeres krankheitsfreies, sprich motorisch weniger affektiertes, Leben erreicht werden. Bei unbehandelten Tieren zeigten sich erste Zeichen der Prodromalphase etwa mit 300 Tagen in Form von Fluktuationen der motorischen Leistungen auf dem RotaRod. Durch die Behandlung mit Anle138b konnten wir das krankheitsfreie Überleben signifikant ($p < 0.05$) verlängern, im Durchschnitt um 66 Tage (557 vs 491 Tage).⁵⁷ Dabei zeigten die Mäuse eine bessere stabilere Leistung auf dem RotaRod mit weniger Fluktuationen, wodurch die motorischen Leistungen transgener Mäuse in der Prodromalphase auf das Niveau von Wildtypmäusen gesteigert werden konnte. Fluktuationen in der motorischen Leistung scheinen auch ein typisches Merkmal in Synukleopathien des Menschen zu sein.¹³⁴ Gestützt werden diese Erkenntnisse durch die retrospektive Analyse. Auch hier zeigten wir, dass der motorische Phänotyp zwei bis drei Monate vor dem Tod verbessert werden konnte. (vgl.: 4.1)

Des Weiteren konnte für diese Phase die Entwicklung des Körpergewichts für die Anle138b-behandelten Tiere normalisiert werden, sie zeigten einen weiteren Anstieg, während placebobehandelte Tiere bereits einen signifikanten Gewichtsverlust erlitten. Somit führt die Behandlung mit dem Oligomermodulator Anle138b nicht nur zu einem verlängerten krankheitsfreien Überleben, sondern auch zu einer besseren motorischen Leistung und einer stabilisierten Gewichtszunahme. (vgl.: 4.1.4)

5.4. Biochemische Untersuchungen

Um die pathologischen α S-Ablagerungen im Gehirn nachzuweisen und näher zu spezifizieren wählten wir einen mehrschrittigen Nachweis (vgl.: 3.6). Ein charakteristisches Merkmal von Synukleopathien ist die Ablagerung von detergentenunlöslichem α S.¹³⁵⁻¹³⁸, für das von uns gewählte Mausmodell sind diese Ablagerungen ebenfalls vorbeschrieben.⁹¹ Daher erfolgte zunächst eine Aufreinigung der Hirnhomogenate mittels Ultrazentrifugation (vgl.: 3.6.1) mit verschiedenen Detergenzien. Um die Aggregatgrößen der so aufgereinigten unlöslichen α S-Ablagerungen näher zu bestimmen wurde ein kontinuierlicher Sucrosegradient durchgeführt. (vgl.: 3.6.2).

Das Protokoll wurde hier aus dem Prionnachweis früherer Studien übernommen und leicht modifiziert.⁷³ Zur endgültigen Darstellung mittels Gelelektrophorese, WesternBlot und Färbung (vgl.: 3.6.3, 3.6.4 und 3.6.5) wurde einerseits der Antikörper 15G7 verwendet, da dieser spezifisch für humanes α S ist und nicht mit β S und γ S kreuzreagiert.⁶⁵ Zusätzlich verwendeten wir den Antikörper S129, welcher an α S bindet, das an Serin 129 phosphoryliert ist. Hintergrund dessen ist, dass nahezu alle in LB und LD vorkommende α S-Moleküle diese Merkmale aufweisen, allerdings liegen auch im gesunden Gehirn ein gewisser Anteil dieser α S-Spezies vor und der Antikörper ist nicht human spezifisch, sondern bindet ebenfalls an murinem phosphorylierten α S S129.¹³⁹ Aus der Kombination beider Antikörper sollte die Aussagekraft erhöht werden.

Analog zu den vorbeschriebenen Beobachtungen^{64,65,72,91} konnten auch wir altersabhängig unlösliches α S in den Gehirnen der transgenen Tiere nachweisen.

Dieses scheint im großen Maße an Serin 129 phosphoryliert zu sein. Der Antikörper S129 hat allerdings den Nachteil, dass er eine hohe Hintergrundfärbung verursacht und nicht sicher zwischen „pathologischem“ und natürlich vorkommenden Spezies zu unterscheiden vermag, daher wurde auf weitere S129-Färbungen nach Sucrosegradienten verzichtet.

Im Sucrosegradienten konnten die unlöslichen α S-Aggregate noch weiter in verschieden große Fraktionen aufgeteilt werden. Hierbei konnten wir zeigen, dass bei Tieren in der Prodromalphase der Erkrankung ein Unterschied zwischen der placebo- und verumbehandelten Gruppe besteht. In 69 Wochen alten, placebobehandelten Tieren zeigten sich u.a. Oligomere in derselben Größe wie bei rekombinaten α S-Oligomeren, welche durch DMSO/ Fe^{3+} -Behandlung hergestellt wurden. Diese Oligomerbildung konnte bei den transgenen Mäusen durch die Behandlung mit Anle138b verhindert werden. Sie zeigten eine Größenverteilung wie junge transgene Mäuse oder rekombinate α Syn-Monomere. Die Gesamtlevel von α S blieben dabei zwischen den Gruppen unverändert. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass Anle138b weder die Expression noch den Abbau beeinflusst, sondern als Aggregationsinhibitor wirkt. Dass es sich bei den Oligomeren um die potentiell toxische Spezies handelt, konnte *in vitro* gezeigt werden. Es wurde die Theorie aufgestellt, dass toxische α S-Oligomere in der Lage sind eine Art Pore in einem Zellwandmodell zu bilden und somit möglicherweise zum Zelltod führen.⁵ (vgl.: 4.2.2)

5.5. Immunhistologische Untersuchungen

Um auch die regionale Verteilung im Gehirn darstellen zu können, fertigten wir immunhistologische Färbungen an (Vgl.: 3.7). Um eine kumulierte Aussage treffen zu können, verwendeten wir hier ebenfalls den Antikörper 15G7 mit dem im Absatz 5.4 diskutierten Vorteilen. Auf den zusätzlichen Nachweis mit dem Antikörper S129 wurde verzichtet, da dieser im „laboralltäglichen“ Gebrauch eine sehr hohe Hintergrundfärbung verursachte und daher vor allem für die quantitative Analyse ungeeignet erschien.

Im Anschluss wurden jeweils zwei Aufnahmen histopathologischer Färbungen semiquantitativ und quantitativ ausgewertet. Der Vorteil bei diesem dualen Vorgehen liegt darin, dass einerseits das Vorkommen verschiedener Arten der Ablagerungen (granuläre, oder perlschnurartig) und deren Lage (Entlang von Neuriten, entlang dystropher Neuriten oder zellkörpernahe) erfasst werden und andererseits eine quantitative Analyse der Ablagerungen ohne Unterscheidung der einzelnen Qualitäten bietet. Dieses Vorgehen hat sich bewährt, um eine verlässliche Auswertung zu erzielen.¹⁴⁰

In den immunhistologischen Färbungen der transgenen Tiere konnten wir altersabhängig α S-Ablagerungen nachweisen. Es zeigte sich eine zunehmende Verbreitung der Ablagerungen, beginnend im Hirnstamm bis nach supratentoriell in Kortex und Thalamus.¹⁴¹ Es ist beschrieben, dass diese Verbreitung der immunhistologisch nachweisbaren Läsionen mit einem Voranschreiten der Klinik korreliert.¹⁴² Auch für das verwendete Tiermodell ist dies vorbeschrieben.^{64,65,72,91}

Morphologisch konnten dabei vor allem granuläre α S-Aggregate beobachtet werden. Aber auch Ablagerungen in Neuriten, im Somata und in dystrophen Neuriten konnten nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen decken sich mit anderen Beschreibungen dieses Tiermodells.^{65,72,121}

In der quantitativen Bestimmung der Aggregate konnten wir im Prodromalstadium mit Anle138b eine signifikante Reduzierung der Aggregatlast erreichen. Diese deckt sich mit der für diesen Zeitraum beobachteten besseren Motorperformance und verbesserter Gewichtsentwicklung in den therapierten Tieren.

6. Zusammenfassung

Ziel der hier vorliegenden Doktorarbeit war es die *in vivo* Wirksamkeit des Oligomer-Modulators Anle138b in einem Mausmodell der familiären Parkinsonerkrankung zu untersuchen.

Das hierzu gewählte {(Thy1)-h[A30P] α -syn}-Mausmodell ist bereits gut etabliert und zeigt eine altersabhängige α -Synuclein Pathologie im Gehirn assoziiert mit einem motorischen Phänotyp. Zusammengefasst begann die Placebo-kontrollierte Behandlung der Mäuse (pro Gruppe zwölf Tiere) im Alter von acht Wochen und wurde kontinuierlich bis zum Lebensende durchgeführt. Die Behandlung mit Anle138b erfolgte dabei nach einer Aufdosierungsphase in der Dosierung von zweimal täglich 5 mg in Erdnussbutter gemischt.

Der primäre Zielpunkt der Studie mit Anle138b war der motorische Phänotyp der Versuchstiere. Die Bewegungsfähigkeit wurde mittels RotaRod untersucht, einer bereits gut etablierten Methodik. Das RotaRod ist ein Gerät zur Testung der motorischen Leistungsfähigkeit von Nagern. Die Leistungsfähigkeit wird anhand der Fähigkeit auf einer rotierenden Walze zu laufen erfasst. Die Tiere wurden ab dem Lebensalter von 32 Wochen alle 14 Tage mit dem RotaRod untersucht. Neben den Placebo- und den Verum-behandelten transgenen Tieren wurden auch Wildtypmäuse als Kontrollgruppe untersucht. Analysiert wurde die Veränderung der Laufleistung der Einzeltiere im Verlauf der Krankheit. Hierfür wurde die Laufleistung über den Krankheitsverlauf auf die Leistung in den Lebenswochen 42 bis 51 individuell normiert. Als erkrankt wurden die Mäuse definiert, die in ihrer Leistung unter der normierten Leistung altersentsprechender Wildtypmäuse minus drei Standardabweichungen blieben. Als terminal erkrankt wurden die Tiere bezeichnet, die nicht in der Lage waren, 20 Sekunden auf dem RotaRod zu bleiben. Dies war zeitgleich das Entnahmekriterium aus der motorischen Untersuchung. Parallel zur motorischen Untersuchung erfolgte ein klinisches Monitoring der Gewichtsentwicklung.

Der sekundäre Zielparameter war die Menge an pathologischen Proteinablagerungen im Gehirn der Versuchstiere. Diese untersuchten wir durch biochemische,

histopathologische und immunhistochemische Methoden. Für die biochemischen Untersuchungen erfolgte zunächst eine mehrschrittige Aufreinigung der Proteinaggregation mittels Sucrosegradienten-Ultrazentrifugation. Die einzelnen Fraktionen des Sucrose-Gradienten wurde im Anschluss mittels Western-Blot mit dem Antikörper 15G7 dargestellt.

Die histopathologischen Untersuchungen erfolgte mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung zur Darstellung der zellulären Strukturen und der krankhaften Veränderungen. Die Detektion der pathologischen α -Synuclein-Ablagerungen erfolgte durch Immunhistochemie mit dem Antikörper 15G7. Die Histopathologie wurde mit Hilfe zweier Verfahren analysiert. Einerseits semi-quantitativ durch drei verblindete Untersucher, welche die Schnitte anhand von standardisierten Beispielen nach Menge und Qualität der Pathologie in fünf Gruppen ordneten. Andererseits quantitativ indem der Anteil der immunhistochemisch angefärbten Fläche der pathologischen α -Synuclein-Ablagerungen mittels Histogramms in Prozent analysiert wurde.

Zusammenfassend zeigten die Experimente, dass mit Anle138b behandelte Tiere ein verlängertes krankheitsfreies Überleben mit einer stabileren motorischen Leistung und einer stabilisierten Gewichtszunahme zeigten. In einer auf den Todeszeitpunkt referenzierten Analyse konnte unter Behandlung mit Anle138b eine verringerte Fluktuation der motorischen Leistungsfähigkeit in der Prodromalphase der Erkrankung beobachtet werden.

In den biochemischen Untersuchungen zeigte sich, dass Anle138b die Bildung von krankheitsassoziierte α -Synuclein-Oligomeren hemmt. In den immunhistochemischen Färbungen stellte sich eine Reduktion in der Gesamtmenge der pathologischen α -Synuclein-Aggregate dar. Dies zeigt, dass die Behandlung mit Anle138b nicht nur die Klinik der Tiere verbessert, sondern auch der Fortschritt der Neurodegeneration auf molekularer Ebene gehemmt wird. Die Ergebnisse stützen die These, dass oligomere, pathologische Proteinaggregate eine große Rolle in der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen spielen und ein vielversprechendes Ziel zur Therapieentwicklung sind.

Als wichtige Nebenbeobachtung ist zu berichten, dass auch bei einer Langzeitbehandlung von 1,5 Jahren in der o.g. Dosis keine toxischen Nebenwirkungen beobachtet wurden.

Untersuchungen mit Anle138b in anderen α -Synuclein-Tiermodellen zeigen ähnliche Ergebnisse. Dafür wurden z.B. die transgene Mauslinie MI2, in der humanes α -Synuclein in dopaminergen Neuronen exprimiert wird, oder PLP-h α Syn, in der als Modell für MSA humanes α S in Oligodendrozyten exprimiert wird, untersucht. In beiden Modellen zeigten sich ebenfalls positive Effekte auf motorischen Phänotyp und Überleben.^{143–145} Somit kann die These aufgestellt werden, dass Anle138b nicht nur für in der speziellen Situation der familiären Parkinsonerkrankung mit der Punktmutation A30P in *SNCA*, sondern sich auch auf andere α -Synuclein-Modelle auswirkt. Viel mehr noch zeigten sich auch in Tiermodellen anderer neurodegenerativer Erkrankungen wie Tauopathien und Amyloiderkrankungen vielversprechende Ergebnisse.^{146,147}

In den letzten Jahren konnte Anle138b im Rahmen der Firma MODAG weiterentwickelt werden und die präklinischen Testungen erfolgreich abgeschlossen werden. Seit dem 06.12.2019 läuft die Phase 1 Studie zur Untersuchung der Sicherheit, Tolerabilität und Pharmakokinetik in gesunden Probanden.

Die Schlussfolgerung der Arbeit ist daher, dass in Hinsicht auf eine mögliche Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen im Menschen DPP-Derivate, insbesondere Anle138b, eine zukunftssträchtige Option darstellen.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

3-NP	3-nitropropionic acid
6-OHDA	6-Hydroxydopamine hydrochloride
AADC	Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase
AD	Alzheimerkrankheit
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AP	alkalische Phosphatase
APD	atypische Parkinsonerkrankungen
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid-Precursor-Protein,
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASO	Antisense-Oligonucleotiden
A β	Beta-Amyloid
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
bp	Basenpaare
CBD	Corticobasale Degeneration
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (Disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetane-3,2'- (5-chlorotricyclo[3.3.1.13.7]decan])-4-yl]-1-phenyl phosphate)
Cl ₂ Mg x 6 H ₂ O	Magnesium chloride hexahydrate
CRT	Zellersatztherapie
CSP α	Cystein-string-protein α
D1-Rezeptor	Dopamin1-Rezeptor
DAB	Diaminobenzidin
DAT	Dopamintransporter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DLB	Demenz mit Lewy-Körperchen
DMD	Muskeldystrophie Typ Duchenne

DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (für engl. deoxyribonucleic acid)
DOC	Natriumdesoxycholat
DPP	3,5-Diphenyl-Pyrazol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EOAD	früh beginnenden Alzheimererkrankung
ESCs	embryonale Stammzellen
EtOH	Ethanol
EU	Europäische Union
FDA	U.S. Food and Drug Administration
Fe ³⁺	Dreiwertiges Eisen
FTLD	Frontotemporale Lobärdegeneration
FUS	Fused in Sarcoma
g	g-Kraft
GCI	glial cytoplasmic inclusions
H ₂ O	Wasser
HS1	Hirnschnitt 1
HS2	Hirnschnitt 2
HTT	Huntingtin
iNSCs	induzierte neuronale Stammzellen
iPSCs	induzierte pluripotente Stammzellen
IVC	Individuell ventilierte Käfige
kD	Kilodalton
LB	Lewy-Körperchen
LC-MSMS	Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie
LD	Lewy-Dentriten
LRRK2	Leucin Rich repeat kinase 2
M	Mol
mA	Milliampere
mg	Milligramm

Mg ²⁺	Zweiwertiges Magnesium
min	Minuten
mM	Millimol
mm	Millimeter
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
MSA	Multiplen Systematrophie
MSA-C	Zerebellärer Typ der Multisystematrophie
MSA-P	Parkinson-Typ der Multiystematrophie
MSCs	mesenchymale Stammzellen
NAC	Nicht-A β -Komponente des Morbus Alzheimers Amyloid
NaCl	Natriumchlorid
NBB	N-Benzyliden-Benzohydrazid
NBIA I	Neurodegeneration mit zentraler Eisenablagerung Typ I
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NEM	N-Ethylmaleinimid
nm	Nanometer
NP40	Nonidet P40 Substitute
NSCs	neuronale Stammzellen
OD	Optische Dichte
P1	Pellet 1
P2	Pellet 2
P3	Pellet 3
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD	Parkinsonkrankheit
PDD	Parkinson-Krankheit mit Demenz
PK	Proteinkinase K
PMCA	Protein misfolding cyclic amplification
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Prä-mRNA	<i>precursor messenger ribonucleic acid</i>
PrP	Prionprotein

PSP	progressive supranukleären Blickparese
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (für engl. revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
SAR	Struktur-Aktivitäts-Analyse
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (für engl. standard error of the mean)
SDS	Natriumdodecylsulfat (für engl. sodium dodecyl sulfate)
sek	Sekunde
SIFT	Scanning for Intensely fluorescent Targets
SMA	spinale Muskelatrophie
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
SNCA	Humanes Gen für Alpha-Synuclein
SOD1	superoxide dismutase 1
SOD1	Superoxiddismutase 1
SPF	spezifisch pathogenfreien
TAF15	TATA-Box Binding Protein Associated Factor 15
Tau	Tau-Protein
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TDP43	TAR DNA-binding protein 43
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tg	transgen
TH	Tyrosinhydroxylase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
Ü1	Überstand 1
Ü2	Überstand 2
Ü3	Überstand 3
UCHL 1	Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1

UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifugation
V	Volt
v/v	Volumenprozent
VMAT2	Vesikulärer Monoamintransporter 2
w/v	Massenkonzentration
ZNS	Zentralnervensystem
α S	Alpha-Synuclein
β S	Beta-Synuclein
γ S	Gamma-Synuclein
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromol

Tabelle 36: Abkürzungsverzeichnis

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des SNCA Gens. Nach Venda et al (2010)	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Primärstruktur von α S. Nach Venda et al (2010)	9
Abbildung 3: (A) Lewy-Körperchen (HE-Färbung). (B) Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten (Antikörper 15G7) (Bilder: Prof. Dr. Manuela Neumann, DZNE Tübingen und Dr. med. T. Högen, Neurologische Klinik und Poliklinik der LMU München).	11
Abbildung 4: Front- und Seitenansicht eines Mannes, der unter PD leidet. Das Bild ist eine Reproduktion eines Holzschnittes von Paul de Saint-Leger's, welchen er 1879 in seiner Doktorarbeit "Paralysie agitante" zeigte. Veröffentlicht wurde es 1886 von W.R. Gowers.	14
Abbildung 5: Strukturformel Anle138 b	16
Abbildung 6: Entwicklung von Anle138b; in rot dargestellt Inhalt dieser Dissertation	17
Abbildung 7: α S-Abblagerungen in prioninfizierten Mäusen mit und ohne Behandlung	18
Abbildung 8: Effekt von Anle138b auf die Bildung von α S-Oligomere in der SIFT-Analyse. *p < 0.05; ***p < 0.001. Aus Wagner et al (2013)	18
Abbildung 9: Pharmakokinetische Analyse von Anle138b. Aus Wagner et al (2013)	19
Abbildung 10: Schema des molekularen Wirkprinzips von Anle138b. (Aus: Matthes, et al., Resolving the Atomistic Modes of Anle138b Inhibitory Action on Peptide Oligomer Formation, ACS Chem., Neurosci. 2017)	20
Abbildung 11: (A) C57Bl/6 Maus (B) Genkonstrukt des α -Synucleinopathie{(Thy1)-h[A30P] α -syn}Mausmodels. Nach Kahle et al (2000)	21
Abbildung 12: Links: Histologie einer jungen und alten transgenen Maus. Rechts: Nachweis unlöslicher α S Aggregate im WesternBlot. (Bilder: PD Dr. Johannes Levin, Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung, LMU München)	22
Abbildung 13: Behandlungs- und Versuchsprotokoll	29
Abbildung 14: Links: Rotarod advanced (TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Bildquelle: www.tse-systems.com), Rechts: Schema des Untersuchungsprinzips	32
Abbildung 15: Schematische Darstellung der Proteinaufreinigung durch Ultrazentrifugation	40
Abbildung 16: Schemazeichnung des Prinzipes des Sucrosegradienten	41
Abbildung 17: Prinzip des Sucrosegradienten	44
Abbildung 18: Legende zur semiquantitaven Auswertung	53

- Abbildung 19: Schnitt durch den Hirnstamm mit Darstellung des Cerebellums. Der Kasten bezeichnet den Bereich, der als HS1 vergrößert und ausgewertet wurde. Immunhistologische Färbung: 15G7, Objektiv: Olympus DF PLAPO 1.2x PF; Vergrößerung: 1,2-fach _____ 54
- Abbildung 20: Schnitt durch den oberen Hirnstamm und das angrenzende Großhirn. Der Kasten bezeichnet den Bereich, der als HS2 vergrößert und ausgewertet wurde. Immunhistologische Färbung: 15G7, Objektiv: Olympus DF PLAPO 1.2x PF; Vergrößerung: 1,2-fach _____ 54
- Abbildung 21: Beispiel für die Binarisierung eines Histoschnittes (hier #65). Links: Immunhistologische Färbung: 15G7, Objektiv: Olympus UPlanFI 10x/0,30; Vergrößerung: 10-fach. Rechts binarisierte Form des Schnittes. _____ 55
- Abbildung 22: Normierte Laufleistung der Verum - behandelten Tiere auf dem RotaRod in Sekunden. Eine Linie entspricht der Laufleistung eines einzelnen Tieres. Die rote Linie entspricht dem Mittelwert der gesamten Gruppe _____ 58
- Abbildung 23: Normierte Laufleistung der placebo-behandelten Tiere auf dem RotaRod in Sekunden. Eine Linie entspricht der Laufleistung eines einzelnen Tieres. Die rote Linie entspricht dem Mittelwert der gesamten Gruppe _____ 59
- Abbildung 24: Normierte Laufleistung der Kontrollgruppe auf dem RotaRod in Sekunden. Eine Linie entspricht der Laufleistung eines einzelnen Tieres. Die rote Linie entspricht dem Mittelwert der gesamten Gruppe _____ 59
- Abbildung 25: Zusammenfassung der normierten Laufleistung. Abgebildet sind die Mittelwerte der einzelnen Gruppen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an _____ 60
- Abbildung 26: Fluktuation der Laufleistung. (** $p < 0.01$, Student - T -Test) _____ 61
- Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurve krankheitsfreies Überleben. _____ 63
- Abbildung 28: Motorische Leistung in der Prodromalphase, retrospektiv betrachtet, (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, Student - T -Test), Fehlerbalken: SEM _____ 64
- Abbildung 29: Gewichtsentwicklung in der Prodromalphase _____ 65
- Abbildung 30: Western-Blot nach Ultrazentrifugation: Dargestellt sind die Pelletfraktionen von 2 transgenen Tiere (77 Wochen und 22 Wochen) und einer Wildtypmaus (19 Wochen) sowie rekombinantes α S. 1.AK: s129 (1:2000TBST). 2.AK: Rat anti Rabbit(AP) (1:2000 TBST) _____ 66
- Abbildung 31: Western-Blot nach Ultrazentrifugation: Dargestellt sind die Pelletfraktionen von 2 transgenen Tiere (77 Wochen und 22 Wochen) und einer Wildtypmaus (19 Wochen) sowie rekombinantes α S. 1.AK: 15G7 (1:1000 TBST). 2.AK: Goat anti Rat (AP) (1:1000 TBST) _____ 67
- Abbildung 32: Gesamtmenge α S im Vergleich der beiden Gruppen. (p-Wert aus Student - T -Test), Fehlerbalken: SEM _____ 68

Abbildung 33: Beispiel eines Westernblots nach einem Sucrosegradient	68
Abbildung 34: Gegenüberstellung der Westernblots, nach Gruppen aufgeteilt. Im Uhrzeigersinn: junge (<30-Wochen) unbehandelte α S-Mäuse, 69-Wochen alte Anle138b-behandelte α S-Mäuse, 69-Wochen alte DMSO-behandelte α S-Mäuse, rekombinate α S-Oligomere und rekombinate α S-Monomere.	69
Abbildung 35: Graphische Darstellung der Fraktionen des Sucrosegradienten. Zusammenfassung aus 4 Sucrosegradienten. $p < 0,05$.	71
Abbildung 36: Beispielbild für die immunhistologische Färbung eines transgenen Tieres mit 15G7. Blau gefärbt zeigen sich die Zellkerne, α S-Ablagerungen werden braun dargestellt. (Objektiv: Olympus UPlanFI 10x/0,30; Vergrößerung: 10-fach)	72
Abbildung 38: Beispiele der verschiedenen morphologischen α S-Ablagerungen in transgenen Versuchstieren. Färbung: 15G7, Vergrößerung: 10-fach, Ausschnitt: Hirnstamm. Ablagerungen in den Neuriten (Pfeil) in A granulär perlschnurartig, in B kompakt. Dystrophe Neuriten (#). Ablagerungen im Soma (*) in A granulär, in B kompakt. Objektiv: Olympus UPlanFI 10x/0,30; Vergrößerung: 10-fach	73
Abbildung 39: Übersichtsaufnahmen der histologischen Schnitte durch den Hirnstamm aller zur Kontrolle entnommenen Versuchstier in der 69. Wochen. Immunhistologische Färbung: 15G7, Objektiv: Olympus DF PLAPO 1.2x PF; Vergrößerung: 10-fach Vergrößerung: 1,2-fach	74
Abbildung 40: Detailaufnahmen der histologischen Schnitte aller zur Kontrolle entnommenen Versuchstier in der 69. Wochen. Immunhistologische Färbung: 15G7, Objektiv: Olympus UPlanFI 10x/0,30; Vergrößerung: 10-fach	74
Abbildung 41: Binarisierung der Detailaufnahmen (vgl.: Abbildung 40)	75
Abbildung 42: Prozentualer Flächen-Anteil 15G7-gefärbter Ablagerungen im Hirnstamm der zum Zeitpunkt 69 Wochen entnommenen Tiere. Fehlerbalken: SEM	76
Abbildung 43: Prozentualer Flächen-Anteil 15G7-gefärbter Ablagerungen im immunhistologischen Schnitt bei terminal erkrankten Tieren. Fehlerbalken: SEM	77

7.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Merkmale von neurodegenerativen Erkrankungen, die durch Protein-Aggregation und Ablagerung abnormaler Proteine charakterisiert sind. Nach Kumar et al (2016) ³ Abkürzungen: Beta-Amyloid (A β), Tau-Protein (Tau), α -Synuclein (α S), Huntingtin (HTT), Prionprotein (PrP), Superoxiddismutase 1 (SOD1), TAR DNA-binding protein 43 (TDP43), Fused in Sarcoma (FUS), TATA-Box Binding Protein Associated Factor 15 (TAF15)	6
Tabelle 2: Materialliste, Versuchstiere	24
Tabelle 3: Materialliste, Geräte	24
Tabelle 4: Materialliste, Chemikalien	27
Tabelle 5: Materialliste, Verbrauchsmaterial	28
Tabelle 6: Materialliste, Sonstiges	28
Tabelle 7: Behandlungs- und Aufdosierungsschema der Kernversuchsgruppe	31
Tabelle 8: Versuchsparameter der Trainingstage	33
Tabelle 9: Versuchsparameter des Testtages	33
Tabelle 10: PCR Master Mix (für eine Probe)	36
Tabelle 11: PCR Programm	37
Tabelle 12: 2% Agarosegel	37
Tabelle 13: TBS +/- Puffer	39
Tabelle 14: TBS +	39
Tabelle 15: Probenpuffer Sucrosegradient	42
Tabelle 16: Gradientenpuffer A	42
Tabelle 17: Gradientenpuffer B	42
Tabelle 18: Bestandteile der Schichten im Sucrosegradienten	43
Tabelle 19: 15% Gel; Lower Tris = 36,33g Tris ad 200 ml Aqua Dest; pH 8,8 \pm 1,5 M Tris; Upper Tris= 12,11 g Tris ad 200 ml Aqua Dest; pH 6,8 \pm 0,5 M Tris	45
Tabelle 20: 5x Lämmli pH 6,8	45
Tabelle 21: 10x Laufpuffer	46
Tabelle 22: Blotting Puffer	46
Tabelle 23: 5% Milchpulver-TBST	47
Tabelle 24: 10x TBST	47
Tabelle 25: Alkalische Phosphatase (AP) - Puffer pH 9,5	48
Tabelle 26: NBT-Stammlösung	49

Tabelle 27: BCIP-Stammlösungn _____	49
Tabelle 28: Verdauungspuffer _____	52
Tabelle 29: Exemplarische Darstellung eines Histogramms am Beispiel von #65 _	55
Tabelle 30: Alter der Versuchstiere (Lebenstage) bei Erfüllung der Erkrankungskriterien. Mit Stern markierte Tiere wurden vor Erreichen der Kriterien aus dem Versuch entnommen, um die Pathologie zum Zeitpunkt 69 Wochen zu analysieren. _____	62
Tabelle 31: Messung der α S-Aggregate nach Fraktion im Sucrosegradient in pmol	71
Tabelle 32: Semiquantitative und Quantitative Auswertungen der zur Kontrolle entnommenen Versuchstier in der 69. Wochen _____	75
Tabelle 33: Semiquantitative und Quantitative Auswertungen der terminal erkrankten Tiere _____	77
Tabelle 34: Semiquantitative und Quantitative Auswertungen der von der Analyse ausgenommenen Tiere _____	78
Tabelle 35: Semiquantitative und Quantitative Auswertungen der Wildtypmäuse aus der Kontrollgruppe _____	79
Tabelle 36: Abkürzungsverzeichnis _____	96

7.4. Literaturverzeichnis

1. Jellinger, K. A. Neurodegenerative Erkrankungen (ZNS)-Eine aktuelle Übersicht. *J. Für Neurol. Neurochir. Psychiatr.* **6**, 9–18 (2005).
2. Gerlach, M., Reichmann, H. & Riederer, P. *Die Parkinson-Krankheit Grundlagen, Klinik, Therapie.* (Springer-Verlag/Wien, 2007).
3. Protein aggregation and neurodegenerative diseases: From theory to therapy. *Eur. J. Med. Chem.* **124**, 1105–1120 (2016).
4. Irvine, G. B., El-Agnaf, O. M., Shankar, G. M. & Walsh, D. M. Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Mol. Med.* **14**, 451 (2008).
5. Schmidt, F. *et al.* Single-Channel Electrophysiology Reveals a Distinct and Uniform Pore Complex Formed by α -Synuclein Oligomers in Lipid Membranes. *PLoS ONE* **7**, e42545 (2012).
6. Dehay, B. *et al.* Lysosomal impairment in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **28**, 725–732 (2013).
7. Jellinger, K. A. Neuropathological spectrum of synucleinopathies. *Mov. Disord.* **18**, 2–12 (2003).
8. Venda, L. L., Cragg, S. J., Buchman, V. L. & Wade-Martins, R. α -Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* **33**, 559–568 (2010).
9. Giasson, B. I., Murray, I. V. J., Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M.-Y. A Hydrophobic Stretch of 12 Amino Acid Residues in the Middle of α -Synuclein Is Essential for Filament Assembly. *J. Biol. Chem.* **276**, 2380–2386 (2001).
10. Kiely, A. P. *et al.* α -Synucleinopathy associated with G51D SNCA mutation: a link between Parkinson's disease and multiple system atrophy? *Acta Neuropathol. (Berl.)* **125**, 753–769 (2013).
11. Venda, L. L., Cragg, S. J., Buchman, V. L. & Wade-Martins, R. α -Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* **33**, 559–568 (2010).
12. Buchner, J. Introduction: the cellular protein folding machinery. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **59**, 1587–1588 (2002).
13. Hashimoto, M. *et al.* Oxidative stress induces amyloid-like aggregate formation of NACP/alpha-synuclein in vitro. *Neuroreport* **10**, 717–721 (1999).
14. Giasson, B. I. *et al.* Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* **290**, 985–989 (2000).
15. Uversky, V. N. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J. Neurochem.* **103**, 17–37 (2007).
16. Crowther, R. A., Jakes, R., Spillantini, M. G. & Goedert, M. Synthetic filaments assembled from C-terminally truncated alpha-synuclein. *FEBS Lett.* **436**, 309–312 (1998).
17. Murray, I. V. J. *et al.* Role of alpha-synuclein carboxy-terminus on fibril formation in vitro. *Biochemistry* **42**, 8530–8540 (2003).
18. Baba, M. *et al.* Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am. J. Pathol.* **152**, 879–884 (1998).

19. Anderson, J. P. *et al.* Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. *J. Biol. Chem.* **281**, 29739–29752 (2006).
20. Kallhoff, V., Peethumnongsin, E. & Zheng, H. Lack of α -synuclein increases amyloid plaque accumulation in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* **2**, 6 (2007).
21. Polymeropoulos, M. H. *et al.* Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* **276**, 2045–2047 (1997).
22. Takeda, A. *et al.* Abnormal accumulation of NACP/alpha-synuclein in neurodegenerative disorders. *Am. J. Pathol.* **152**, 367–372 (1998).
23. Kostka, M. *et al.* Single Particle Characterization of Iron-induced Pore-forming α -Synuclein Oligomers. *J. Biol. Chem.* **283**, 10992–11003 (2008).
24. Karpinar, D. P. *et al.* Pre-fibrillar α -synuclein variants with impaired β -structure increase neurotoxicity in Parkinson's disease models. *EMBO J.* **28**, 3256–3268 (2009).
25. Lippa, C. F. *et al.* Lewy bodies contain altered α -synuclein in brains of many familial Alzheimer's disease patients with mutations in presenilin and amyloid precursor protein genes. *Am. J. Pathol.* **153**, 1365–1370 (1998).
26. Spillantini, M. G. *et al.* Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**, 839–840.
27. Lesage, S. *et al.* G51D α -synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. *Ann. Neurol.* **73**, 459–471 (2013).
28. Proukakis, C. *et al.* A novel α -synuclein missense mutation in Parkinson disease. *Neurology* **80**, 1062–1064 (2013).
29. Athanassiadou, A. *et al.* Genetic analysis of families with Parkinson disease that carry the Ala53Thr mutation in the gene encoding alpha-synuclein. *Am. J. Hum. Genet.* **65**, 555–558 (1999).
30. Zarranz, J. J. *et al.* The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.* **55**, 164–173 (2004).
31. Farrer, M. *et al.* Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications. *Ann. Neurol.* **55**, 174–179 (2004).
32. Ruf, V. C. *et al.* Different Effects of α -Synuclein Mutants on Lipid Binding and Aggregation Detected by Single Molecule Fluorescence Spectroscopy and ThT Fluorescence-Based Measurements. *ACS Chem. Neurosci.* **10**, 1649–1659 (2019).
33. Bruggemann, N. *et al.* α -Synuclein gene duplication is present in sporadic Parkinson disease. *Neurology* **71**, 1294–1294 (2008).
34. Chartier-Harlin, M.-C. *et al.* Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet Lond. Engl.* **364**, 1167–1169 (2004).
35. Goedert, M., Spillantini, M. G., Del Tredici, K. & Braak, H. 100 years of Lewy pathology. *Nat Rev Neurol* **9**, 13–24 (2013).
36. Goedert, M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 492–501 (2001).
37. Goedert, M., Jakes, R. & Spillantini, M. G. The Synucleinopathies: Twenty Years On. *J. Park. Dis.* **7**, S51–S69 (2017).
38. Fischer, A. F. & Matera, K. M. Stabilization of Alpha-Synuclein Oligomers In Vitro by the Neurotransmitters, Dopamine and Norepinephrine: The Effect of Oxidized Catecholamines. *Neurochem. Res.* **40**, 1341–1349 (2015).

39. Hasegawa, T. *et al.* Accelerated α -synuclein aggregation after differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Res.* **1013**, 51–59 (2004).
40. Masliah, E. *et al.* beta-amyloid peptides enhance alpha-synuclein accumulation and neuronal deficits in a transgenic mouse model linking Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 12245–12250 (2001).
41. Feany, M. B. & Bender, W. W. A Drosophila model of Parkinson's disease. *Nature* **404**, 394–398 (2000).
42. Duda, J. E. *et al.* Widespread nitration of pathological inclusions in neurodegenerative synucleinopathies. *Am. J. Pathol.* **157**, 1439–1445 (2000).
43. Ubhi, K. *et al.* Alpha-synuclein deficient mice are resistant to toxin-induced multiple system atrophy. *Neuroreport* **21**, 457–462 (2010).
44. Parkinson, J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **14**, 223–236; discussion 222 (2002).
45. Borsche, M. & Klein, C. Morbus Parkinson. *Med. Genet.* **30**, 267–273 (2018).
46. Nussbaum, R. L. & Ellis, C. E. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1356–1364 (2003).
47. Berlit, P. *Klinische Neurologie: mit 363 Tabellen.* (Springer Medizin, 2011).
48. Wenning, G. K. & Geser, F. Multiple system atrophy. *Rev. Neurol. (Paris)* **159**, 3S31-38 (2003).
49. Hamilton, R. L. Lewy bodies in Alzheimer's disease: a neuropathological review of 145 cases using alpha-synuclein immunohistochemistry. *Brain Pathol. Zurich Switz.* **10**, 378–384 (2000).
50. Uchikado, H., Lin, W.-L., DeLucia, M. W. & Dickson, D. W. Alzheimer disease with amygdala Lewy bodies: a distinct form of alpha-synucleinopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **65**, 685–697 (2006).
51. Leverenz, J. B. *et al.* Lewy body pathology in familial Alzheimer disease: evidence for disease- and mutation-specific pathologic phenotype. *Arch. Neurol.* **63**, 370–376 (2006).
52. Giese, A., Bieschke, J., Eigen, M. & Kretzschmar, H. A. Putting prions into focus: application of single molecule detection to the diagnosis of prion diseases. *Arch. Virol. Suppl.* 161–171 (2000).
53. Bertsch, U. *et al.* Systematic Identification of Antiprion Drugs by High-Throughput Screening Based on Scanning for Intensely Fluorescent Targets. *J. Virol.* **79**, 7785–7791 (2005).
54. Schiffer, N. W. *et al.* Identification of Anti-prion Compounds as Efficient Inhibitors of Polyglutamine Protein Aggregation in a Zebrafish Model. *J. Biol. Chem.* **282**, 9195–9203 (2007).
55. Gauci, A. J., Caruana, M., Giese, A., Scerri, C. & Vassallo, N. Identification of polyphenolic compounds and black tea extract as potent inhibitors of lipid membrane destabilization by A β 42 aggregates. *J. Alzheimers Dis.* **27**, 767–779 (2011).
56. Hillmer, A. S. *et al.* Converse modulation of toxic α -synuclein oligomers in living cells by N'-benzylidene-benzohydrazide derivatives and ferric iron. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 461–466 (2010).
57. Wagner, J. *et al.* Anle138b: a novel oligomer modulator for disease-modifying therapy of neurodegenerative diseases such as prion and Parkinson's disease.

- Acta Neuropathol. (Berl.)* **125**, 795–813 (2013).
58. Matthes, D., Gapsys, V., Griesinger, C. & de Groot, B. L. Resolving the Atomistic Modes of Anle138b Inhibitory Action on Peptide Oligomer Formation. *ACS Chem. Neurosci.* **8**, 2791–2808 (2017).
 59. Krüger, R. *et al.* Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.* **18**, 106–108 (1998).
 60. George, J. M. The synucleins. *Genome Biol* **3**, 3002–1 (2002).
 61. Kahle, P. J. *et al.* Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha -synuclein in human and transgenic mouse brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **20**, 6365–6373 (2000).
 62. Neumann, M. *et al.* Misfolded proteinase K-resistant hyperphosphorylated α -synuclein in aged transgenic mice with locomotor deterioration and in human α -synucleinopathies. *J. Clin. Invest.* **110**, 1429–1439 (2002).
 63. Denenberg, V. H. Open-Field Behavior in the Rat: What Does It Mean?*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **159**, 852–859 (1969).
 64. Freichel, C. *et al.* Age-dependent cognitive decline and amygdala pathology in α -synuclein transgenic mice. *Neurobiol. Aging* **28**, 1421–1435 (2007).
 65. Kahle, P. J. *et al.* Selective Insolubility of α -Synuclein in Human Lewy Body Diseases Is Recapitulated in a Transgenic Mouse Model. *Am. J. Pathol.* **159**, 2215–2225 (2001).
 66. Monville, C., Torres, E. M. & Dunnett, S. B. Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model. *J. Neurosci. Methods* **158**, 219–223 (2006).
 67. Masliah, E. *et al.* Dopaminergic Loss and Inclusion Body Formation in α -Synuclein Mice: Implications for Neurodegenerative Disorders. *Science* **287**, 1265–1269 (2000).
 68. Hankenson, F. C., Garzel, L. M., Fischer, D. D., Nolan, B. & Hankenson, K. D. Evaluation of Tail Biopsy Collection in Laboratory Mice (*Mus musculus*): Vertebral Ossification, DNA Quantity, and Acute Behavioral Responses. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. JAALAS* **47**, 10–18 (2008).
 69. Hauk, A. Quantifizierung von DNA durch Absorptionsmessung. *Biol. Unserer Zeit* **43**, 278–278 (2013).
 70. Mullis, K. *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51 Pt 1**, 263–273 (1986).
 71. Adkins, S. & Burmeister, M. Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations. *Anal. Biochem.* **240**, 17–23 (1996).
 72. Neumann, M. *et al.* Misfolded proteinase K-resistant hyperphosphorylated α -synuclein in aged transgenic mice with locomotor deterioration and in human α -synucleinopathies. *J. Clin. Invest.* **110**, 1429–1439 (2002).
 73. Tzaban, S. *et al.* Protease-sensitive scrapie prion protein in aggregates of heterogeneous sizes. *Biochemistry* **41**, 12868–12875 (2002).
 74. Friedlander, G. *et al.* Protease-Sensitive Scrapie Prion Protein in Aggregates of Heterogeneous Sizes †. *Biochemistry* **41**, 12868–12875 (2002).
 75. Brakke, M. K. Zonal separations by density-gradient centrifugation. *Arch. Biochem. Biophys.* **45**, 275–290 (1953).
 76. Kryndushkin, D. S., Alexandrov, I. M., Ter-Avanesyan, M. D. & Kushnirov, V. V.

- Yeast [PSI⁺] Prion Aggregates Are Formed by Small Sup35 Polymers Fragmented by Hsp104. *J. Biol. Chem.* **278**, 49636–49643 (2003).
77. Burnette, W. N. 'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195–203 (1981).
 78. Renart, J., Reiser, J. & Stark, G. R. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 3116–3120 (1979).
 79. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4350–4354 (1979).
 80. Lequin, R. M. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clin. Chem.* **51**, 2415–2418 (2005).
 81. Huang, Y. *et al.* Macroautophagy in sporadic and the genetic form of Parkinson's disease with the A53T α -synuclein mutation. *Transl. Neurodegener.* **1**, 2 (2012).
 82. Ziolkowska, B. *et al.* Regulation of alpha-synuclein expression in limbic and motor brain regions of morphine-treated mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **25**, 4996–5003 (2005).
 83. Lindersson, E. *et al.* Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers. *J. Biol. Chem.* **279**, 12924–12934 (2004).
 84. Sommer, B. *et al.* Mouse models of alpha-synucleinopathy and Lewy pathology. *Exp. Gerontol.* **35**, 1389–1403 (2000).
 85. CDP-StarTM Substrate (0.25 mM Ready-To-Use). <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/T2147#/T2147>.
 86. Avwioro, G. Histochemical uses of haematoxylin—a review. *JPCS* **1**, 24–34 (2011).
 87. Lang, G. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik.* (Springer-Verlag, 2013).
 88. Zwiener, I., Blettner, M. & Hommel, G. Survival analysis: part 15 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch. Arzteblatt Int.* **108**, 163–169 (2011).
 89. du Prel, J.-B., Röhrig, B., Hommel, G. & Blettner, M. Choosing statistical tests: part 12 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch. Arzteblatt Int.* **107**, 343–348 (2010).
 90. Schneider, A., Hommel, G. & Blettner, M. Linear regression analysis: part 14 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch. Arzteblatt Int.* **107**, 776–782 (2010).
 91. Kahle, P. J. *et al.* Hyperphosphorylation and insolubility of α -synuclein in transgenic mouse oligodendrocytes. *EMBO Rep.* **3**, 583 (2002).
 92. Gustavsson, A. *et al.* Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **21**, 718–779 (2011).
 93. Hart, R. G., Pearce, L. A., Ravina, B. M., Yaltho, T. C. & Marler, J. R. Neuroprotection trials in Parkinson's disease: Systematic review. *Mov. Disord.* **24**, 647–654 (2008).
 94. Stowe, R. *et al.* Meta-analysis of the comparative efficacy and safety of adjuvant treatment to levodopa in later Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **26**, 587–598

- (2011).
95. Stowe, R. L. *et al.* Dopamine agonist therapy in early Parkinson's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD006564 (2008)
doi:10.1002/14651858.CD006564.pub2.
 96. Crosby, N. J., Deane, K. H. O. & Clarke, C. E. Amantadine for dyskinesia in Parkinson's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD003467 (2003)
doi:10.1002/14651858.CD003467.
 97. Moro, E. *et al.* Long-term results of a multicenter study on subthalamic and pallidal stimulation in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **25**, 578–586 (2010).
 98. Pinto, S. *et al.* Stimulation of the pedunculopontine nucleus area in Parkinson's disease: effects on speech and intelligibility. *Brain* **137**, 2759–2772 (2014).
 99. Follett, K. A. *et al.* Pallidal versus subthalamic deep-brain stimulation for Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* **362**, 2077–2091 (2010).
 100. Weaver, F., Follett, K., Hur, K., Ippolito, D. & Stern, M. Deep brain stimulation in Parkinson disease: a metaanalysis of patient outcomes. *J. Neurosurg.* **103**, 956–967 (2005).
 101. Craig, L. H., Svircev, A., Haber, M. & Juncos, J. L. Controlled pilot study of the effects of neuromuscular therapy in patients with Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **21**, 2127–2133 (2006).
 102. Dreu, M. J. de, Wilk, A. S. D. van der, Poppe, E., Kwakkel, G. & Wegen, E. E. H. van. Rehabilitation, exercise therapy and music in patients with Parkinson's disease: a meta-analysis of the effects of music-based movement therapy on walking ability, balance and quality of life. *Parkinsonism Relat. Disord.* **18**, S114–S119 (2012).
 103. Dubois, B. *et al.* Donepezil in Parkinson's disease dementia: A randomized, double-blind efficacy and safety study. *Mov. Disord.* **27**, 1230–1238 (2012).
 104. Emre, M., Cummings, J. L. & Lane, R. M. Rivastigmine in dementia associated with Parkinson's disease and Alzheimer's disease: similarities and differences. *J. Alzheimers Dis. JAD* **11**, 509–519 (2007).
 105. Savica, R., Grossardt, B. R., Bower, J. H., Ahlskog, J. E. & Rocca, W. A. Time Trends in the Incidence of Parkinson Disease. *JAMA Neurol.* **73**, 981–989 (2016).
 106. Scoles, D. R. & Pulst, S. M. Antisense therapies for movement disorders. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **34**, 1112–1119 (2019).
 107. Finkel, R. S. *et al.* Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *Lancet Lond. Engl.* **388**, 3017–3026 (2016).
 108. Mercuri, E. *et al.* Nusinersen versus Sham Control in Later-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N. Engl. J. Med.* **378**, 625–635 (2018).
 109. Mendell, J. R. *et al.* Longitudinal effect of eteplirsen versus historical control on ambulation in Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* **79**, 257–271 (2016).
 110. Uehara, T. *et al.* Amido-bridged nucleic acid (AmNA)-modified antisense oligonucleotides targeting α -synuclein as a novel therapy for Parkinson's disease. *Sci. Rep.* **9**, 7567 (2019).
 111. Volta, M. *et al.* Chronic and acute LRRK2 silencing has no long-term behavioral effects, whereas wild-type and mutant LRRK2 overexpression induce motor and cognitive deficits and altered regulation of dopamine release.

- Parkinsonism Relat. Disord.* **21**, 1156–1163 (2015).
112. Bennett, C. F. & Swayze, E. E. RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **50**, 259–293 (2010).
113. Bennett, C. F., Baker, B. F., Pham, N., Swayze, E. & Geary, R. S. Pharmacology of Antisense Drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **57**, 81–105 (2017).
114. Lunn, J. S., Sakowski, S. A., Hur, J. & Feldman, E. L. Stem cell technology for neurodegenerative diseases. *Ann. Neurol.* **70**, 353–361 (2011).
115. Wernig, M. *et al.* Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 5856–5861 (2008).
116. Yan, Y. *et al.* Directed differentiation of dopaminergic neuronal subtypes from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **23**, 781–790 (2005).
117. Yang, D., Zhang, Z.-J., Oldenburg, M., Ayala, M. & Zhang, S.-C. Human embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons reverse functional deficit in parkinsonian rats. *Stem Cells Dayt. Ohio* **26**, 55–63 (2008).
118. Shen, Y. *et al.* A Compendium of Preparation and Application of Stem Cells in Parkinson's Disease: Current Status and Future Prospects. *Front. Aging Neurosci.* **8**, (2016).
119. Lindström, V. *et al.* Immunotherapy targeting α -synuclein, with relevance for future treatment of Parkinson's disease and other Lewy body disorders. *Immunotherapy* **6**, 141–153 (2014).
120. George, S. & Brundin, P. Immunotherapy in Parkinson's Disease: Micromanaging Alpha-Synuclein Aggregation. *J. Park. Dis.* **5**, 413–424 (2015).
121. Masliah, E. *et al.* Effects of alpha-synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuron* **46**, 857–868 (2005).
122. Sanchez-Guajardo, V., Annibali, A., Jensen, P. H. & Romero-Ramos, M. α -Synuclein vaccination prevents the accumulation of parkinson disease-like pathologic inclusions in striatum in association with regulatory T cell recruitment in a rat model. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **72**, 624–645 (2013).
123. Mandler, M. *et al.* Next-generation active immunization approach for synucleinopathies: implications for Parkinson's disease clinical trials. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **127**, 861–879 (2014).
124. Mandler, M. *et al.* Active immunization against alpha-synuclein ameliorates the degenerative pathology and prevents demyelination in a model of multiple system atrophy. *Mol. Neurodegener.* **10**, 10 (2015).
125. Jankovic, J. *et al.* Safety and Tolerability of Multiple Ascending Doses of PRX002/RG7935, an Anti- α -Synuclein Monoclonal Antibody, in Patients With Parkinson Disease: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol.* **75**, 1206–1214 (2018).
126. Giese, A. *et al.* New drug for inhibiting aggregation of proteins involved in diseases linked to protein aggregation and/or neurodegenerative diseases. (2011).
127. Alvarez-Fischer, D. *et al.* Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and alpha-synuclein-deleted mice. *Exp. Neurol.* **210**, 182–193 (2008).

128. Vestibular dysfunction in vitamin D receptor mutant mice. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **114**, 161–166 (2009).
129. Long-term evaluation of sensorimotor and mnemonic behaviour following striatal NMDA-induced unilateral excitotoxic lesion in the mouse. *Behav. Brain Res.* **178**, 235–243 (2007).
130. Stemmelin, J. *et al.* Stimulation of the β_3 -Adrenoceptor as a Novel Treatment Strategy for Anxiety and Depressive Disorders. *Neuropsychopharmacology* **33**, 574 (2008).
131. Rustay, N. R., Wahlsten, D. & Crabbe, J. C. Assessment of genetic susceptibility to ethanol intoxication in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 2917 (2003).
132. Influence of task parameters on rotarod performance and sensitivity to ethanol in mice. *Behav. Brain Res.* **141**, 237–249 (2003).
133. Estimating age-related changes in psychomotor function: influence of practice and of level of caloric intake in different genotypes☆. *Neurobiol. Aging* **20**, 167–176 (1999).
134. Tolosa, E., Wenning, G. & Poewe, W. The diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* **5**, 75–86 (2006).
135. Tu, P. *et al.* Glial cytoplasmic inclusions in white matter oligodendrocytes of multiple system atrophy brains contain insoluble α -synuclein. *Ann. Neurol.* **44**, 415–422 (2004).
136. Dickson, D. W. *et al.* Widespread Alterations of α -Synuclein in Multiple System Atrophy. *Am. J. Pathol.* **155**, 1241 (1999).
137. Duda, J. E. *et al.* Immunohistochemical and Biochemical Studies Demonstrate a Distinct Profile of α -Synuclein Permutations in Multiple System Atrophy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **59**, 830–841 (2000).
138. Campbell, B. C. V. *et al.* The solubility of α -synuclein in multiple system atrophy differs from that of dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **76**, 87–96 (2008).
139. Samuel, F. *et al.* Effects of Serine 129 Phosphorylation on α -Synuclein Aggregation, Membrane Association, and Internalization. *J. Biol. Chem.* **291**, 4374–4385 (2016).
140. Sundstrom, A., Grabocka, E., Bar-Sagi, D. & Mishra, B. Histological Image Processing Features Induce a Quantitative Characterization of Chronic Tumor Hypoxia. *PLoS ONE* **11**, (2016).
141. Braak, H. *et al.* Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* **24**, 197–211 (2003).
142. Braak, H., Rüb, U., Steur, E. N. H. J., Tredici, K. D. & Vos, R. A. I. de. Cognitive status correlates with neuropathologic stage in Parkinson disease. *Neurology* **64**, 1404–1410 (2005).
143. Fellner, L. *et al.* Anle138b Partly Ameliorates Motor Deficits Despite Failure of Neuroprotection in a Model of Advanced Multiple System Atrophy. *Front. Neurosci.* **10**, (2016).
144. Heras-Garvin, A. *et al.* Anle138b modulates α -synuclein oligomerization and prevents motor decline and neurodegeneration in a mouse model of multiple system atrophy. *Mov. Disord.* **34**, 255–263 (2019).
145. Wegrzynowicz, M. *et al.* Depopulation of dense α -synuclein aggregates is

- associated with rescue of dopamine neuron dysfunction and death in a new Parkinson's disease model. *Acta Neuropathol. (Berl.)* (2019) doi:10.1007/s00401-019-02023-x.
146. Martinez Hernandez, A. *et al.* The diphenylpyrazole compound anle138b blocks A β channels and rescues disease phenotypes in a mouse model for amyloid pathology. *EMBO Mol. Med.* **10**, 32–47 (2018).
147. Wagner, J. *et al.* Reducing tau aggregates with anle138b delays disease progression in a mouse model of tauopathies. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **130**, 619–631 (2015).

7.5. Danksagungen

Ich möchte mich zunächst bei Prof. Dr. med Armin Giese und Prof. Dr. med Johannes Levin bedanken für ihr Vertrauen und die Möglichkeit diese Doktorarbeit durchzuführen. Beide waren mir Mentoren und haben mich an Ihrem umfassenden Wissen teilhaben lassen. Sie hatten immer ein offenes Ohr für Probleme und Ideen. An zweiter Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mir alles Handwerkliche in Bezug auf meine Doktorarbeit beigebracht haben, insbesondere Janina Mielke und Felix Schmidt, die mir mit viel Geduld, Mühe und Zeit den richtigen Umgang im Labor und Experimenten beigebracht haben. Michael Schmidt möchte ich für seine unermüdliche Arbeit in der Histologie bedanken, er hat mit viel Hingabe qualitativ hochwertige „Histoschnitte“ fabriziert. Sandra Paluch möchte ich für die Einweisungen in die Genetik danken. Song Shi möchte ich ganz herzlich für die handwerklich großartige Durchführung des Sucrosegradienten danken. Dem Team aus dem Tierstall um Dr. Gerda Mitteregger-Kretzschmar möchte ich einen riesen Dank aussprechen, dass sie so zuverlässige, tolle Arbeit in der Pflege der Mäuse geleistet haben. Karin Schinke und Cathrin Böhm, meinen beiden „Mitdotorandinnen“, möchte ich für das kollegiale Miteinander danken, sodass wir alle unsere Experimente zusammen „durchziehen“ konnten. Bei Markus Priller, Julia Ahlfeld, Martin Bartels und Felix Schmidt möchte ich mich für die besondere „Laborkameradschaft“ bedanken, die auch häufig über das Institut hinweggereicht hat und mir die Arbeit versüßt hat. Meinen Eltern Heike und Rainer und meiner Schwester Christina möchte ich danken, dass sie mich immer wieder angespornt haben meine Träume und Ziele zu verwirklichen. Ein ganz besonderer Dank gebührt meinen Schwiegereltern, Esther und Norbert Prix, sowie meiner Schwägerin Liesa-Marie Behrouzi, die mir bei der Erstellung des Schriftstückes unter die Arme gegriffen haben, in dem sie auf meine Kinder aufgepasst haben. Ohne euch wäre ich nie fertig geworden. Zuletzt möchte ich mich bei meiner kleinen Familie bedanken. Mein Mann Niclas Prix hat mir immer den Rücken gestärkt und mich ermutigt weiter zu machen. Danke, dass ich dich an meiner Seite haben darf. Meinen Kindern Linus, Carlotta und Josephine möchte ich dafür danken, dass sie mir jeden Tag ein kleines bisschen Glück ins Leben zaubern.

7.6. Eidesstattliche Versicherung

Ich, Catharina Prix, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

„CHARAKTERISIERUNG EINES WIRKSTOFFES
ZUR HEMMUNG PATHOLOGISCHER PROTEIN-AGGREGATION
IN EINEM SYNUCLEINOPATHIE-MAUSMODELL“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Wolfratshausen, den 20.02.2022

Ort, Datum

Catharina Prix

Unterschrift Doktorandin