

Aus der
Neurologischen Klinik und Poliklinik
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Marianne Dieterich

**DJ-1 als Beispiel der zentralen Rolle von
Gen-Umwelt-Interaktionen in der
Pathogenese und Pathologie des Morbus Parkinson**

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

vorgelegt von
Victoire Joséphine Constance Jouin-Genton

aus
Wien

Jahr
2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Berichterstatter: Prof. Dr. Johannes Levin

Mitberichterstatter PD Dr. Georg Nübling

PD Dr. Rupert Egensperger

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Francisco Pan-Montojo

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 07.11.2024

Inhaltsverzeichnis

ABSTRACT	VII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
TABELLENVERZEICHNIS	X
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XI
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Neurodegenerative Erkrankungen	1
1.2 Der Morbus Parkinson.....	1
1.2.1 Epidemiologie.....	1
1.2.2 Klinische Symptomatik und Diagnosekriterien.....	3
1.2.3 Pathophysiologie der motorischen Symptome	8
1.2.4 Therapieansätze beim Morbus Parkinson.....	10
1.2.5 Pathologie	12
1.3 Ätiologie.....	18
1.3.1 Genetik.....	18
1.3.1.1 Autosomal-dominant vererbte Mutationen	21
1.3.1.2 Autosomal-rezessiv vererbte Mutationen	22
1.3.2 Umweltfaktoren	27
1.3.2.1 Paraquat.....	28
1.3.2.2 Rotenon	29
1.3.3 Immunsystem.....	30
1.3.4 Beeinträchtigung des proteasomalen und lysosomalen Abbaus	31
1.3.5 Mitochondrium und oxidativer Stress	31
1.4 Zielsetzung.....	33
2 MATERIAL UND METHODEN.....	35
2.1 Mausmodell und Tierhaltung.....	35
2.1.1 Ethical Statement	35
2.1.2 Genetische Abstammung.....	35
2.1.3 Tierhaltung.....	35

2.2	Paraquat Experiment	36
2.2.1	Versuchsgruppen	36
2.2.2	Behandlungsplan.....	37
2.2.2.1	Intraperitoneale Kochsalzlösung-Exposition	37
2.2.2.2	Intraperitoneale Paraquat-Exposition.....	37
2.2.2.3	Orale Glycolsäure- und D-Laktat-Behandlung	38
2.3	Rotenon Experiment.....	38
2.3.1	Versuchsgruppen	39
2.3.2	Behandlungsplan.....	39
2.3.2.1	Orale Vehikel-Exposition.....	39
2.3.2.2	Orale Rotenon-Exposition.....	39
2.4	RotaRod.....	40
2.5	Histologie	41
2.5.1	Perfusion	41
2.5.2	Schnittanfertigung.....	41
2.5.3	Immunhistochemie	41
2.5.3.1	Tyrosin-Hydroxylase.....	41
2.5.3.2	Färbung	42
2.6	Auswertung	43
2.7	Statistik.....	43
2.8	Material	44
3	ERGEBNISSE.....	51
3.1	Effekte von Paraquat, Glycolsäure und D-Laktat im <i>Dj-1^{-/-}</i>-Mausmodell..	51
3.1.1	Paraquat führt zu einem Zelltod der dopaminergen Neurone in der SNc.....	51
3.1.2	Glycolsäure und D-Laktat schützen Neurone der SNc vor dem Zelltod	52
3.2	Effekte von oral appliziertem Rotenon im <i>Dj-1^{-/-}</i>-Mausmodell.....	54
3.2.1	Rotenon führt nicht zum Zelltod dopaminergere Neurone der SNc.....	55
3.2.2	Der Vergleich mit unbehandelten Kontrollmäusen ergibt keinen weiteren Aufschluss.....	56
3.3	Effekte von Paraquat, Glycolsäure, D-Laktat und Rotenon auf die motorischen Fähigkeiten im <i>Dj-1^{-/-}</i>-Mausmodell	57
3.3.1	Eine Exposition gegenüber Paraquat, Glycolsäure und D-Laktat führt nicht zur Verschlechterung der Laufzeiten	58

3.3.2	Eine Exposition gegenüber oraler Vehikellösung oder oralem Rotenon führt zur Verlängerung der Laufzeiten.....	59
4	DISKUSSION.....	61
4.1	Das <i>Djl^{-/-}</i> -Mausmodell.....	61
4.2	Paraquat-Toxizität bei <i>DJ-1</i> -Funktionsverlustmutation	62
4.3	Neuroprotektive Eigenschaften von GS und DL bei <i>DJ-1</i> -Funktionsverlustmutation.....	65
4.4	Rotenon-Toxizität bei <i>DJ-1</i> -Funktionsverlustmutation.....	69
4.5	RotaRod.....	74
4.6	Ausblick.....	77
	LITERATURVERZEICHNIS	80
	DANKSAGUNG	96
	AFFIDAVIT	97
	LEBENS LAUF.....	98

Abstract

Der Morbus Parkinson (MP) ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung weltweit. In Deutschland sind ca. 400 000 Menschen an MP erkrankt. Aufgrund des demographischen Wandels ist eine Erhöhung dieser Zahl zu erwarten. Die zuerst durch James Parkinson beschriebene Krankheit ist charakterisiert durch die vier Kardinalsymptome Rigor, Tremor, Akinese und posturale Instabilität. Obwohl die Ätiologie noch nicht vollständig geklärt ist, scheinen Interaktionen aus oxidativem Stress, mitochondriale Dysfunktionen und Umweltfaktoren eine zentrale Rolle zu spielen. *DJ-1*, ein Gen welches sich in 1% der „early-onset“ MP-Fälle als mutiert zeigt, wurden verschiedene zellschützende und antioxidative Funktionen zugeschrieben. Unter anderem produziert DJ-1 als Glyoxalase zwei Säuren, Glycolsäure (GS) und D-Laktat (DL), die ihre Neuroprotektion gegenüber Paraquat (PQ) *in vitro* bewährt haben. Paraquat und Rotenon sind zwei Pestizide, die als Risikofaktor für die Entstehung eines MP bestätigt worden sind. Beide Pestizide entfalten ihre toxische Wirkung, indem sie durch erhöhten oxidativen Stress eine Dysfunktionalität des Mitochondriums begünstigen. Eine chronische PQ-Exposition führte im Tiermodell zu einem signifikanten dopaminergen Zellverlust, was sich klinisch in motorischen Einschränkungen im Sinne der vier Kardinalsymptome des MP sichtbar machte. Eine orale Rotenon-Exposition konnte bei Wildtyp-Mäusen die Pathophysiologie des MP erzeugen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde im Mausmodell einerseits die Auswirkung eines funktionslosen *Dj-1*-Gens auf die Toxizität von PQ und Rotenon untersucht, andererseits wurde untersucht, ob GS und DL der PQ-Toxizität entgegenwirken konnten. Die alleinige Exposition mit PQ führte zu einer Neurodegeneration der SNc bei den sechs bis acht Wochen alten *Dj-1*-knockout-Mäusen. Bei gleichzeitiger Zufuhr von DL oder GS konnte diese Neurodegeneration allerdings aufgehalten werden. Eine Exposition mit Rotenon erzeugte keine Neurodegeneration der SNc bei einjährigen *Dj-1*-knockout-Mäusen. Die Entdeckung der potenziell neuroprotektiven Eigenschaften von GS und DL würde somit bedeuten, dass eine krankheitsmodifizierende Therapie des MP möglich ist. In diesem Zusammenhang kann die weitere Erforschung der Parkinson-assoziierten Gene zur Entdeckung von weiteren Therapiemöglichkeiten eine zentrale Rolle einnehmen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Weltbevölkerung über 65 Jahre, 1990 – 2040 (übernommen von Dorsey et al.) [8]	2
Abbildung 2: Weltweite Prävalenz des MP, 1990 – 2040 (übernommen von Dorsey et al.) [8].....	3
Abbildung 3: Patient mit Morbus Parkinson (übernommen von Sir William R. Gowers aus „A manual of diseases oft the nervous system“) [23]	4
Abbildung 4: Klassisches Modell der Basalganglien (übernommen von Obeso et al.) [34]	9
Abbildung 5: Neues Konzept der Verschaltung der Basalganglien (übernommen von Obeso et al.) [23, 34]	10
Abbildung 6: Transversalschnitt des Hirnstammes eines von MP betroffenen (a) und eines gesunden (b) Patienten.....	13
Abbildung 7: HE-Färbung der SNc bei MP (übernommen von Dickson et al.)[30]	13
Abbildung 8: Immunofärbung einer SNc bei MP (übernommen von Spillantini et al.)[54]	14
Abbildung 9: Immunofärbung gegen α -Synuklein (übernommen von Wakabayashi et al. und Baba et al.)[59, 62]	15
Abbildung 10: Veranschaulichung der intrazerebralen Progression der MP-Pathologie nach Braak et al. [71].....	17
Abbildung 11: Progression der MP-Pathologie laut Braak et al.[81].....	17
Abbildung 12: Einflussfaktoren der MP-Pathogenese (frei angepasst nach Simon et al.)[6]	18
Abbildung 13: Die Funktionen von DJ-1	25
Abbildung 14: <i>PINK1</i> , <i>Parkin</i> und <i>DJ-1</i> unterstützen eine normale Mitochondrienfunktion (frei angepasst nach Corti et. al) [125].....	27
Abbildung 15: Paraquat und MPP ⁺ (übernommen von Cochemé et al.)[187]	28
Abbildung 16: chemische Struktur von Rotenon	30
Abbildung 17: Histopathologische Charakteristika nach Rotenon-Exposition (übernommen von Betarbet et al.) [198]	30

Abbildung 18: Folgen einer mitochondrialen Dysfunktion (frei angepasst nach Henchcliffe et al.)[207].....	32
Abbildung 19: Behandlungsplan im Paraquat-Versuch	37
Abbildung 20: Behandlungsplan im Rotenon-Versuch.....	39
Abbildung 21: RotaRod-Lauftest	40
Abbildung 22: Redox-Reaktion der Bildung von Dopamin aus der Aminosäure L-Tyrosin (übernommen von Tabrez et. al) [111].....	42
Abbildung 23: PQ-Versuch: Anzahl dopaminerger Neurone der SNc im <i>Dj-1^{-/-}</i> -Mausmodell	53
Abbildung 24: Schnittbilder der SNc von <i>Dj-1^{-/-}</i> -Mäusen	54
Abbildung 25 : Rotenon-Versuch: Anzahl dopaminerger Neurone der SNc im <i>Dj-1^{-/-}</i> -Mausmodell	56
Abbildung 26: Rotenon-Versuch: Vergleich mit nativer Kontrollgruppe der Zellzahl dopaminerger Neurone der SNc im <i>Dj-1^{-/-}</i> -Mausmodell.....	57
Abbildung 27: PQ-Versuch: Laufzeiten der Mäuse auf dem RotaRod	59
Abbildung 28: Rotenon-Versuch: Laufzeiten der Mäuse auf dem RotaRod.....	60
Abbildung 29: Vergleich der Anzahl dopaminerge Neurone der SNc zwischen Wildtyp (WT)- und <i>Dj-1^{-/-}</i> -Mäusen bei PQ-Exposition.	64
Abbildung 30: Vergleich der Anzahl dopaminerge Neurone der SNc zwischen Wildtyp (WT)- und <i>Dj-1^{-/-}</i> -Mäusen bei PQ-Exposition und Ko-Behandlung mit GS und DL	67
Abbildung 31: Anzahl der ausgewerteten SNc-Schnitte im Rotenon-Experiment	71
Abbildung 32: Festhalten der Maus an der Walze des RotaRod-Geräts	75
Abbildung 33: Festhalten der Maus an der Walze des RotaRod-Gerätes	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Vergleich der Kriterien für die Etablierung einer klinischen Diagnose eines MP im motorischen Stadium (erstellt nach den Leitlinien der DGN und Postuma et al.) [24, 26, 28].....	7
Tabelle 2: Bekannte prädiktive Marker des Morbus Parkinson (erstellt aus Postuma et al.) [29].....	7
Tabelle 3: Parkinson-verwandte Gene und ihre Mutationen	20
Tabelle 4: Benutzte Reagenzien im PQ-Versuch.	36
Tabelle 5: Benutzte Reagenzien im Rotenon-Versuch.....	38
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Tiere, Materialien, Reagenzien, Geräte und Programme.....	50
Tabelle 7: Vergleich der Zellzahlen zwischen der Vehikel- und der PQ-Gruppe.....	51
Tabelle 8: Vergleich der Zellzahlen zwischen den Gruppen K1, P2 und P3	52
Tabelle 9: Vergleich der Zellzahlen zwischen der Vehikel- und der Rotenon-Gruppe .	55
Tabelle 10: Vergleich der Zellzahlen zwischen der Vehikel-, der Rotenon- und der Kontrollgruppe.....	56
Tabelle 11: Vergleich der Zellzahlen vor und nach PQ-Exposition im WT und <i>Dj-1</i> ^{-/-} -Mausmodell	64
Tabelle 12: Serumkonzentrationen an GS und DL im WT-Mausmodell (übernommen von Dr. rer. nat. Oertel)	67

Abkürzungsverzeichnis

AGEs	engl. „Advanced glycation end-products“
asf	area sampling fraction
BHS	Blut-Hirn-Schranke
COMT	Catechol-O-Methyl-Transferase
DA	Dopamin
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
<i>DJ-1</i> -knockout	<i>DJ-1</i> ^{-/-}
DL	D-Laktat
ENS	enterisches Nervensystem
EU	europäische Union
EOPD	engl. „early-onset Parkinson’s Disease“
FELASA	engl. Federation of Laboratory Animal Science Associations
GS	Glycolsäure
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
HEPA	engl. high efficiency particulate air
i. p.	intraperitoneal
IVC	engl. individual ventilated cage
KG	Körpergewicht
L-Dopa	Levodopa
LB	engl. „Lewy-bodies“; Lewy-Körperchen
LN	Lewy-Neurite
LOPD	engl. „late-onset Parkinson’s Disease“
MAO	Monoaminoxidase
MCI	engl. „mild cognitive impairment“
MDS	Movement Disease Society

MP	Morbus Parkinson
MPP ⁺	1-methyl-4-phenylpyridinium
MPPP	1-methyl-4-phenyl-propion-oxypiperidine
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetra-hydropyridine
NADP	Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NMS	nicht-motorische Symptome
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PNS	peripheres autonomes Nervensystem
PQ	Paraquat
ROS	engl. „reactive oxygen species“
rpm	Rotationen pro Minute
SEM	engl. standard error of the mean
SNc	Substantia Nigra Pars compacta
SPF	spezifisch pathogen-frei
ssf	section sampling fraction
TH	Tyrosin-Hydroxylase
USA	engl. United States of America
WT	Wildtyp
\bar{x}	Mittelwert
ZNP	Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen sind durch einen kontinuierlichen, nicht zu stoppenden Verlust an Nervenzellen in unterschiedlichen Regionen des Gehirns gekennzeichnet. Unter diesem Begriff werden verschiedene neurologische Diagnosen vereinigt, unter anderem Morbus Alzheimer, die frontotemporale Demenz, die Lewy-Body-Demenz, der Morbus Parkinson oder atypische Parkinsonsyndrome wie zum Beispiel die progressive supranukleäre Blickparese.

Obwohl jede der oben genannten Erkrankung ihre eigenen spezifischen Eigenschaften hat, überschneiden sich die Krankheitsbilder oft in ihrer Symptomatik, was eine richtige Diagnosestellung deutlich erschweren kann. Beispielsweise sind oft ähnliche motorische und kognitive Beeinträchtigungen in allen neurodegenerativen Erkrankungen aufzufinden. Auch im pathologischen Befund gibt es eine Gemeinsamkeit: Man geht davon aus, dass sich sowohl extrazellulär als auch intrazellulär unlösliche, fehlgefaltete Proteine ansammeln, Aggregate bilden und als Auslöser der Krankheit wirken [1]. Beim Morbus Alzheimer bilden sich zum Beispiel extrazellulär β -Amyloid Plaques und intrazellulär Tau-Aggregate. Beim Morbus Parkinson bestehen die intrazellulären Aggregate aus α -Synuklein, sodass der Morbus Parkinson zu der Gruppe der Synukleopathien gezählt wird [2].

Weltweit sind neurodegenerative Erkrankungen, vor allem in der älteren Bevölkerung, eine häufige Ursache für Morbidität und Mortalität. Morbus Alzheimer ist die häufigste neurodegenerative Erkrankung, gefolgt an zweiter Stelle vom Morbus Parkinson [3].

1.2 Der Morbus Parkinson

1.2.1 Epidemiologie

Der Morbus Parkinson (MP) ist weltweit die häufigste Synukleopathie. Unabhängig vom Alter erkranken in Europa 11-19/100 000 Einwohner pro Jahr an MP, wobei diese Zahl auf 346/100 000 Einwohner steigt, wenn nur die ältere Bevölkerung (Alter > 60 Jahre) in Betracht gezogen wird. Gleiches gilt für die Prävalenz des MP: In der Gesamtbevölkerung liegt sie zwischen 0,1-0,3% und kann mit zunehmendem Alter bis um das 10-fache steigen [4-6]. Zudem trägt der demographische Wandel auch seinen Teil bei: Man geht davon aus, dass die Prävalenz des MP aufgrund des Alterns der

Bevölkerung weiterhin steigen und sich in den nächsten zwei Jahrzehnten sogar verdoppeln wird (Abbildung 1). Im Jahr 2040 wird auf eine Prävalenz von über 12 Millionen Erkrankten weltweit spekuliert, die sogar auf über 17 Millionen steigen könnte, wenn man Einflussgrößen wie eine verlängerte Lebensdauer, einen niedrigeren Nikotinkonsum und eine steigende Industrialisierung in Betracht zieht (Abbildung 2) [7, 8]. Die Mortalität des MP ist im Vergleich zur Normalbevölkerung erst nach zehn Jahren Krankheitsverlauf erhöht [9].

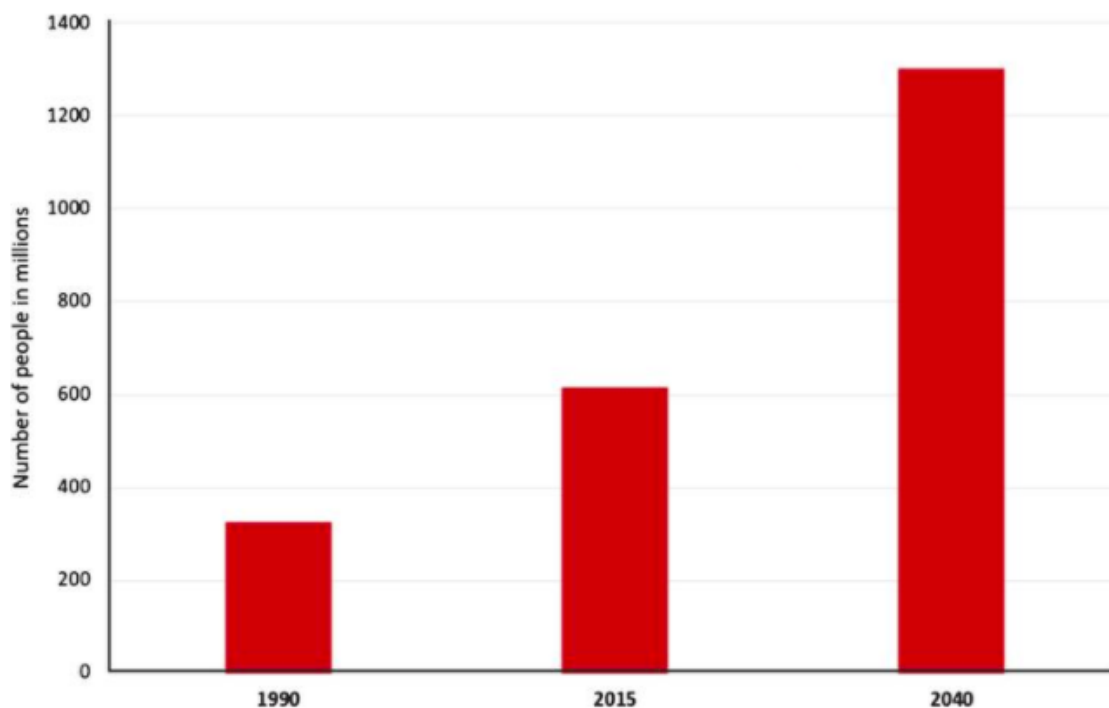


Abbildung 1: Weltbevölkerung über 65 Jahre, 1990 – 2040 (übernommen von Dorsey et al.) [8]
Obwohl es im Jahr 2015 erst 600 Millionen Menschen über 65 Jahren gab, wird davon ausgegangen, dass diese Zahl sich bis 2040 mehr als verdoppeln wird. [8]

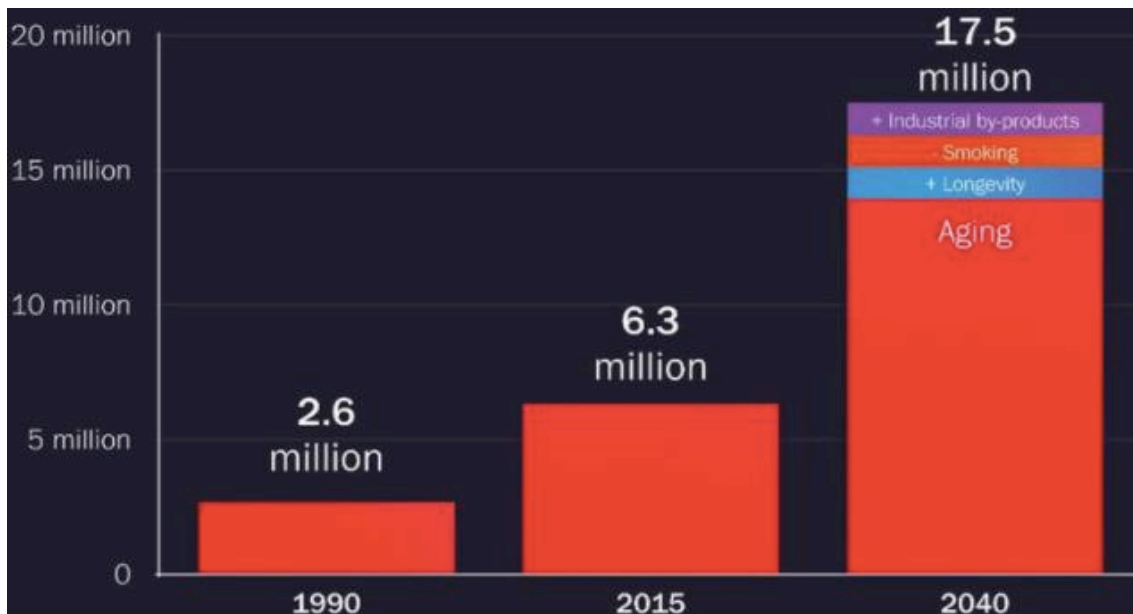


Abbildung 2: Weltweite Prävalenz des MP, 1990 – 2040 (übernommen von Dorsey et al.) [8]

Es ist eine deutliche Steigerung der Anzahl an Patienten zu erkennen. Diese Zahl wird, wenn weitere Faktoren wie die Verlängerung der Lebensdauer, die Verringerung des Nikotinkonsums oder die steigende Industrialisierung in Betracht gezogen werden, weiter steigen. [8]

1.2.2 Klinische Symptomatik und Diagnosekriterien

1817 beschrieb James Parkinson in seinem Buch „An Essay On The Shaking Palsy“ zum ersten Mal die typischen motorischen Symptome des MP und erörterte diese als unwillkürliche, zitternde Bewegungen, muskulären Kraftschwund und die Neigung, den Oberkörper nach vorne zu beugen, die sogenannte Kaptokormie (Abbildung 3) [10]. Heutzutage wird der MP anhand vier motorischer, sogenannter Kardinalsymptome: Rigor, Ruhetremor (4-6 Hz), Akinese und posturale Instabilität charakterisiert, wobei auch andere motorische Symptome wie Hypophonie, Hypomimie oder Dysphagie präsent sein können [11]. Mit der Jahrtausendwende traten die nicht-motorischen Symptome (NMS) des MP und ihre Häufigkeit immer mehr in den Vordergrund. Tatsächlich leiden über 90% der MP-Erkrankten an NMS [12]. Darunter werden verschiedene vegetative Symptome wie Sialorrhö, Hyperhidrose, orthostatische Hypotension, beeinträchtigt Temperaturempfinden, eine gestörte Blasenfunktion und gastrointestinale Störungen gezählt. Auch die Hyposmie, die Fatigue, der Schmerz, REM- und weitere Schlafstörungen können vorhanden sein. Weiterhin können kognitive Symptome wie z. B. ein „mild cognitive impairment“ (MCI) bis hin zur Demenz oder psychische Symptome, wie z. B. Depression, Teil der nicht-motorischen Symptomatik sein [13-16]. Die NMS sind im Rahmen des MP aufgrund mehrerer Ursachen in den Vordergrund geraten. Zunächst, wie oben schon beschrieben, zeigen die meisten der an MP erkrankten Menschen diese Symptome – sie sind also nicht selten. Außerdem ist belegt, dass die Anzahl der NMS

mit dem Krankheitsverlauf korreliert: Je mehr NMS ein Patient hat, desto schwerer ist das klinische Krankheitsbild, vor allem, weil die betroffenen Patienten oftmals an mehreren NMS gleichzeitig leiden [12, 17]. Des Weiteren können die NMS, vor allem REM-Schlaf-Störungen, gastrointestinale Störungen und Hyposmie, mehrere Jahre vor den ausschlaggebenden motorischen Symptomen auftreten und somit der Früherkennung eines MP dienen [18-22].



Abbildung 3: Patient mit Morbus Parkinson (übernommen von Sir William R. Gowers aus „A manual of diseases of the nervous system“) [23]

Man erkennt eine deutliche Kaptokormie, eine Hypomimie (als Folge der Akinesie) und gebeugte Ellbogen-, Hand-, Finger-, Hüft- und Kniegelenke. Bei Bewegung sind eine posturale Instabilität und ein kleinschrittiges Gangbild mit Fallneigung und fehlender Mitbewegung der Arme festzustellen.

Bis 2023 galten laut der Leitlinie „Idiopathisches Parkinson-Syndrom“ der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) die Kriterien der UK-Parkinson’s-Disease-Society-Brain-Bank als Goldstandard zur klinischen Diagnosestellung eines MP [24]. Hier nehmen vor allem die vier motorischen Kardinalsymptome und die motorische Verbesserung der Symptomatik durch eine Levodopa-Therapie, aber auch der sichere Ausschluss wichtiger Differentialdiagnosen eine große Rolle ein (Tabelle 1).

Im Jahre 2015 schlug die Movement Disorder Society (MDS) sowohl für die Diagnose im motorischen Stadium als auch im Prodromalstadium der Krankheit neue Diagnosekriterien vor, in denen die NMS eine wichtigere Rolle als zuvor einnehmen (Tabelle 1) [25, 26]. Nach drei Jahren klinischer Testung an acht verschiedenen Testorten haben Postuma et al. zeigen können, dass die Spezifität und Sensitivität der MDS-Kriterien für die Diagnose des MP im motorischen Stadium höher waren als die der bis

jetzt verwendeten Kriterien der UK Parkinson's Disease Society Brain Bank [27]. In der im November 2023 publizierten neuen Leitlinie „Parkinson-Krankheit“ der DGN wird empfohlen, die MDS-Kriterien zur Diagnosestellung anzuwenden [28].

Das Prodromalstadium des MP ist von der MDS als Stadium definiert, in dem schon erste Anzeichen einer Neurodegeneration im Sinne von frühen Symptomen aufzufinden sind, diese aber noch zu mild sind, um eine sichere Diagnose anhand der klassischen Kardinalsymptome des MP zu stellen. Die im Jahre 2015 von der MDS publizierten Kriterien ermöglichen mit 80 Prozent Wahrscheinlichkeit eine richtige Diagnosestellung des MP im Frühstadium. Die Prognose basiert auf einer Risikokalkulation, in der verschiedene individuelle Risikofaktoren wie Alter, Geschlecht, genetische Eigenschaften, Umweltfaktoren aber auch sogenannte „prodromale Marker“, wie z. B. Ergebnisse verschiedener diagnostischer Tests oder vorhandene NMS, miteinbezogen werden [25]. Obwohl diese Diagnosekriterien nur für wissenschaftliche Zwecke etabliert worden sind, haben sie das Interesse am Frühstadium des MP weiter geweckt. Tatsächlich wurde in den letzten zehn Jahren viel in dieser Richtung geforscht, sodass bis jetzt über 15 prodromale Marker entdeckt worden sind - im Jahre 2008 waren es noch sechs (Tabelle 2) [29].

UK Parkinson's Disease Society Brain Bank	Movement Disorder Society
<p><u>Schritt 1:</u> Diagnose eines Parkinson-Syndroms</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bradykinesie • + mindestens eines der folgenden Symptome : Rigor, Ruhetremor oder posturale Instabilität, die nicht auf eine visuelle, zerebelläre, vestibuläre oder propriozeptive Störung zurückzuführen ist. 	<p><u>Schritt1:</u> Diagnose eines Parkinson-Syndroms</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bradykinesie • + Ruhetremor und/oder Rigidität
<p><u>Schritt 2:</u> Ausschlusskriterien (Ausschnitt)</p> <p>Falls eines dieser Kriterien erfüllt ist, ist mindestens eine andere Diagnose genauso wahrscheinlich wie die eines MP.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Repetitive Schlaganfälle mit progressiver Parkinson-Symptomatik in der Anamnese • Repetitive Schädel-Hirn-Traumata in der Anamnese • Nachgewiesene Enzephalitis in der Anamnese • Okulogyre Krisen • Einnahme von Neuroleptika zu Beginn der Symptomatik • Zerebelläre Symptome • Babinski-Zeichen • Supranukleäre Blickparese • Frühe, schwere autonome Störungen • Frühe, schwere Demenz 	<p><u>Schritt 2:</u> Morbus Parkinson als Ursache für das Parkinson-Syndrom festlegen. (Ausschnitt)</p> <p>Dazu stehen drei verschiedene Merkmal-Kategorien zur Verfügung</p> <ul style="list-style-type: none"> • Abwesenheit absoluter Exklusionskriterien wie z.B. zerebelläre Anomalien, Zeichen einer frontotemporalen Demenz oder einer primären progressiven Aphasie innerhalb der ersten fünf Jahre der Erkrankung, keine Besserung der Symptomatik bei Levodopa-Gabe oder auf die untere Extremität begrenzte Symptomatik für mehr als drei Jahre • Mindestens zwei unterstützende Kriterien, wie z. B. eine deutliche Antwort auf eine Levodopa-Therapie, das Vorhandensein von Levodopa-induzierten Dyskinesien, Ruhetremor einer Extremität, ein Verlust des Geruchssinns oder der Nachweis einer kardialen, sympathischen Denervierung in der MiBG (Metaiodobenzylguanidin) Szintigraphie
<p>Schritt 3: weitere positive, die MP-Diagnose unterstützende Kriterien</p> <p>Mindestens drei dieser Kriterien sind erforderlich, um die klinische Diagnose eines Morbus Parkinson stellen zu können.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Einseitiger Beginn der Symptomatik • Ruhetremor vorhanden 	<ul style="list-style-type: none"> • Abwesenheit von sogenannten "Red Flags", wie z. B. eine schnelle Verschlechterung des Gangbildes,

- voranschreitende Symptomatik
- persistierende Asymmetrie der Symptomatik, wobei die erste symptomatische Seite schwerer betroffen ist.
- Exzellente Antwort auf eine Levodopa-Therapie
- Schwere Levodopa-induzierte Chorea
- Positive Levodopa-Antwort für ≥ 5 Jahre
- Krankheitsverlauf von ≥ 10 Jahren

die zur Nutzung eines Rollstuhls führt, eine komplette Abwesenheit einer Verschlechterung der Symptomatik, eine frühe bulbäre Dysfunktion, eine schwere Beeinträchtigung des autonomen Nervensystems oder eine bilaterale, symmetrische Parkinson-Symptomatik. „Red Flags“ sind Kriterien, die die Diagnose Morbus Parkinson unwahrscheinlich machen, aber nicht stark genug sind, um diese komplett auszuschließen

Tabelle 1 Vergleich der Kriterien für die Etablierung einer klinischen Diagnose eines MP im motorischen Stadium (erstellt nach den Leitlinien der DGN und Postuma et al.) [24, 26, 28]

In Deutschland wird seit 2023 empfohlen, die MDS-Kriterien zur Diagnosestellung zu benutzen, da diese eine höhere Sensitivität und Spezifität zeigen. Die Kriterien der UK-Parkinson's-Disease-Society-Brain-Bank werden im klinischen Alltag noch oft verwendet. Aus Übersichtsgründen ist für die Schritte 2 und 3 nur ein Ausschnitt der Kriterien eingefügt

<p>Prodromale Marker (Stand 2018)</p>

- REM-Schlaf-Störungen
- Depression/Angst
- Verstopfung
- Olfaktorische Beeinträchtigungen
- Erektile Dysfunktionen
- Somnolenz
- Orthostatische Hypotension
- Blasenfunktionsstörungen
- Beeinträchtigungen im Farbsehen
- Leichte kognitive Störung
- Prüfung der Motorik/Symptomatik
- Dopaminerge PET/SPECT

Tabelle 2: Bekannte prädiktive Marker des Morbus Parkinson (erstellt aus Postuma et al.) [29]

Ausschnitt aus denen im Jahr 2018 bekannten prädiktiven Markern. Um miteinbezogen zu werden, muss ein Marker einen genügend hohen Evidenzgrad erreicht haben.

1.2.3 Pathophysiologie der motorischen Symptome

Als neurophysiologische Ursache der motorischen Symptomatik des MP wird eine Störung in der Verschaltung der Basalganglien angenommen. Diese Dysfunktion in der Regulation der Motorik basiert hauptsächlich auf dem Zelluntergang der dopaminergen Neurone in der Substantia Nigra Pars Compacta (SNc) und dem daraus entstehenden Ausfall der nigrostriatalen Projektionen [30].

Die Basalganglien sind eine Gruppe funktionell zusammengehöriger subkortikaler Kerne, die im Telencephalon, Diencephalon und Mesencephalon lokalisiert sind. Zu den Basalganglien zählen das Striatum, der Globus Pallidus, der Nucleus Subthalamicus und die Substantia Nigra. Hier wird der genaue Ablauf, die Geschwindigkeit, die Kraft und die Präzision unserer Bewegungsimpulse gesteuert [31]. Nach dem klassischen Konzept gibt es einen direkten und einen indirekten Weg der Basalganglienverschaltung (Abbildung 4A) [32]. Die Neurone der Substantia Nigra hemmen physiologisch anhand des Neurotransmitters Dopamin (DA) den Anteil des Striatums, der motorische Bewegungen unterdrückt, und wirken somit fördernd auf motorische Impulse [33]. Beim MP fehlt aufgrund des Zelltodes und dem darauffolgenden Dopaminmangel die hemmende Wirkung der nigralen dopaminergen Neurone auf das Striatum, sodass in diesem Fall der hemmende Einfluss der glutamatergen Neurone des Striatums überwiegt und zur bekannten klinischen Symptomatik führt (Abbildung 4B).

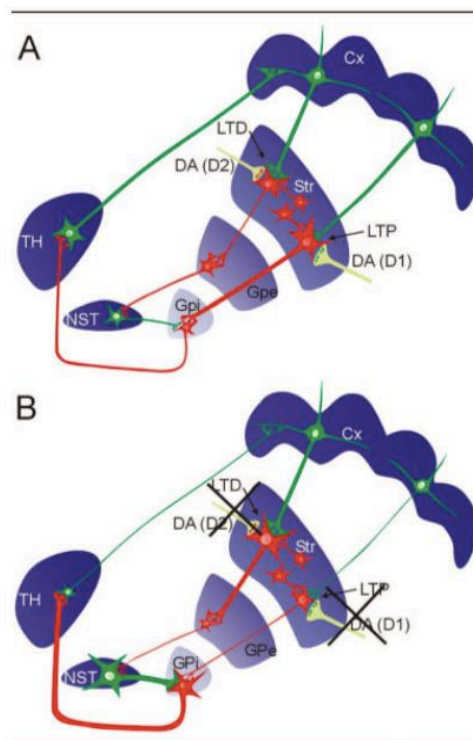


Abbildung 4: Klassisches Modell der Basalganglien (übernommen von Obeso et al.) [34]

(A) Physiologischer Zustand. Die vom Kortex zum Striatum ziehenden Efferenzen wirken erregend auf letzteren. Vom Striatum zeichnen sich zwei Wege ab, wobei beide durch den Neurotransmitter GABA auf ihre nachfolgende Station hemmend wirken. Der erste, sog. „direkte“ Weg führt über den Globus pallidus internus zum Thalamus. Auf diesem Weg werden die hemmenden Efferenzen des Gpi auf den TH gehemmt, was wiederum zu einer verstärkten Aktivierung der thalamokortikalen Efferenzen führt und somit bewegungsfördernd wirkt. Der zweite, sog. „indirekte“ Weg führt über den Globus pallidus externus zum Nucleus subthalamicus: Die Hemmung des NSTs durch den Gpe wird aufgehoben, sodass die erregenden Efferenzen zwischen NST und Gpi die hemmende Wirkung des Gpi auf den TH verstärken, was wiederum die thalamokortikalen Bahnen hemmt und somit bewegungshemmend wirkt. Die dopaminergen Afferenzen aus der SN können je nach Dopaminrezeptor bewegungsfördernd oder -hemmend wirken. D1-Rezeptoren unterstützen durch eine Langzeitpotenzierung den direkten Weg, wohingegen D2-Rezeptoren durch eine Langzeitdepression auf dem indirekten Weg ihre Wirkung entfalten.

(B) Zustand beim M. Parkinson. Der Dopaminmangel in der SN führt zu einer Aktivitätserhöhung des indirekten Weges und zu einem Aktivitätsverlust des direkten Weges, sodass die bewegungshemmende Wirkung überlegen ist. Erregende Bahnen sind grün, hemmende Bahnen sind rot gekennzeichnet. Cx = Cortex; Str = Striatum; Gpi = Globus pallidus internus; Gpe = Globus pallidus externus; NST = Nucleus subthalamicus; TH = Thalamus; SN = Substantia Nigra, DA = Dopamin, LTP = Langzeitpotenzierung, LTD = Langzeitdepression. [34]

Dieser Ansatz wurde aber in Frage gestellt, sodass weiterhin nach einer pathophysiologischen Erklärung für die typische Symptomatik des MP gesucht wurde. Derzeitige Konzepte betonen einerseits die möglichen Interaktionen zwischen den afferenten kortiko-striatalen und kortiko-subthalamischen Bahnen und andererseits das Vorhandensein von Rückkopplungsmechanismen innerhalb der Basalganglien, die für die engmaschige Kontrolle der Efferenzen dieser Kerne zuständig sind (Abbildung 5). Physiologisch unterstützen diese Mechanismen den Ablauf normaler Bewegungen. Beim MP geht man davon aus, dass dieser Filtermechanismus gestört ist und somit die Überprüfung der Präzision der Bewegungsabläufe fehlt [34].

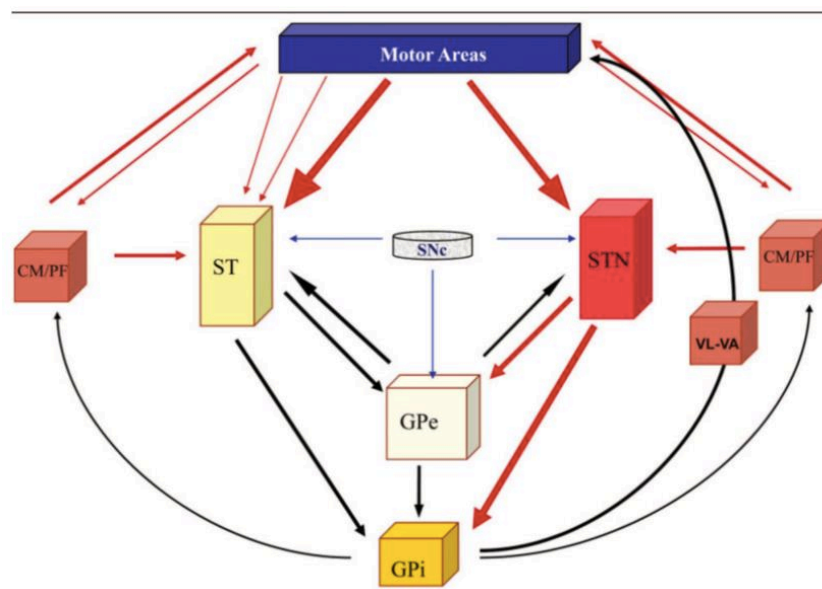


Abbildung 5: Neues Konzept der Verschaltung der Basalganglien (übernommen von Obeso et al.) [23, 34]

Es wird angenommen, dass die verschiedenen Kerne der Basalganglien in einem „internen“ Regelkreis verschaltet sind, wobei die SNe und ihre dopaminergen Projektionen eine zentrale Rolle spielen. Diese internen Verschaltungen sorgen für kontrolliertere und präzisere Projektionen der Kerne in höhergelegenen, zentralnervösen Zentren. SNe = Substantia Nigra Pars Compacta; ST = Striatum; STN = Nucleus subthalamicus; GPe = Globus pallidus externus; GPi = Globus pallidus internus; VL-VA = Nucleus ventralis anterolateralis des Thalamus, CM/PF = zentromediale/parafaszikuläre Projektionen des Thalamus. [34]

Heutzutage ist das Fortschreiten der Neurodegeneration im Rahmen eines MP noch nicht zu stoppen. So gehen im Krankheitsverlauf weitere dopaminerge Efferenzen zu Hirnregionen, welche höheren Funktionen dienen, verloren, insbesondere die zum limbischen System, zum präfrontalen Kortex oder zu den Hirnnervenkernen, was die verschiedenen Symptome im Krankheitsverlauf erklärt. [11, 35].

1.2.4 Therapieansätze beim Morbus Parkinson

Bis zum heutigen Tag ist keine kurative Therapie für den MP bekannt. Es ist dem Patienten lediglich eine symptomlindernde Therapie, bestehend aus Medikamenten, Physiotherapie, Logopädie und Ergotherapie anzubieten, die aber den Krankheitsfortschritt, also die progressive Neurodegeneration, nicht aufhält. Der Ansatz der medikamentösen Therapie des MP ist der Ausgleich des Dopaminmangels.

Wichtigster Wirkstoff ist an dieser Stelle Levodopa (L-Dopa). Diese Substanz kann im Gegensatz zu DA die Blut-Hirn-Schranke (BHS) überwinden und wird dann im Liquor zu DA metabolisiert. Heutzutage wird L-Dopa in Kombination mit einem peripheren Decarboxylasehemmer wie z.B. Carbidopa oder Benserazid angeboten, damit L-Dopa nicht außerhalb des zentralen Nervensystems (ZNS) zu DA verstoffwechselt wird. Somit wird erstens die zentrale Verfügbarkeit des DA erhöht, zweitens eine Dosisreduktion von

L-Dopa ermöglicht und drittens werden die peripheren Nebenwirkungen von DA wie z. B. Übelkeit und orthostatische Hypotension minimiert. L-Dopa lindert insbesondere in den ersten Jahren der Erkrankung bereits nach einigen Tagen die Kardinalsymptome des MP und ist gut verträglich. Ein Nachteil von L-Dopa ist der Wirkungsverlust der Substanz: Nach einigen Jahren Therapie wird eine höhere Dosis gebraucht, um dieselbe Wirkung auf die Motorik zu erzielen. Zusätzlich kommt es aufgrund der kurzen Halbwertszeit dieses Medikamentes zu Wirkungsfluktuationen, die bei über 40% der Patienten sogenannte End-of-Dose-Akinesien und teils schmerzhafte Dyskinesien nach sich ziehen, wobei das Dyskinesie-Risiko auch mit der im Krankheitsverlauf unvermeidbaren Dosiserhöhung steigt [36-38]. Um den Wirkungsfluktuationen vorzubeugen, werden Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT)-Hemmer wie z. B. Entacapon eingesetzt [39]. Diese Substanz hemmt den zentralen Abbau von DA und erhöht somit seine Bioverfügbarkeit im ZNS. COMT-Hemmer werden mit L-Dopa und einem Decarboxylase-Hemmer kombiniert.

Eine weitere Möglichkeit, die Wirkung von DA im ZNS zu imitieren, ist die Gabe von nicht-ergolinen Dopaminagonisten wie z. B. Ropirinol oder Pramipexol. Der Vorteil dieser Wirkstoffe ist, dass diese im Gegensatz zu L-Dopa weniger Wirkungsfluktuationen zeigen: Die postsynaptischen Neurone sind mit Dopaminagonisten kontinuierlich stimuliert und es entstehen weniger A- bzw. Dyskinesien. Aus diesem Grund wurden neue Darreichungsformen entwickelt, die eine kontinuierliche, gleichmäßige Freisetzung des Dopamin-Antagonisten ermöglichen, wie z. B. die subkutane Gabe von Apomorphin oder die transdermale Gabe von Rotigotin [40, 41]. Nicht-ergoline Dopaminagonisten können als Nebenwirkung psychische Symptome wie z. B. Verwirrtheit, Somnolenz, Halluzinationen oder Verhaltensänderungen bewirken [42]. Ergoline Dopaminagonisten werden heutzutage aufgrund ihrer schweren Nebenwirkungen nicht mehr eingesetzt.

Der Glaube, dass man bei jüngeren Patienten (< 60 Jahren) aufgrund eines angenommenen längeren Krankheits- und somit auch Komplikationsverlaufs Dopaminagonisten bevorzugen müsste, wurde in der LEAP-Studie revidiert [43]. Sowohl L-Dopa als auch Dopaminagonisten sind Mittel der ersten Wahl. Die Entscheidung für diese Medikamente muss je nach persönlicher Lebenssituation bzw. Präferenz des Patienten getroffen werden: So wird bei jüngeren Patienten auf den Erhalt der Erwerbstätigkeit und das Vermeiden von Spätkomplikationen, bei geriatrischen Patienten eher auf den Erhalt von Alltagskompetenzen und, wenn möglich, der Autonomie Wert gelegt.

Im Frühstadium der Krankheit oder bei jüngeren Patienten sind Monoaminoxidase-B (MAO-B) -Hemmer auch Mittel der ersten Wahl. MAO-B-Hemmer wie z. B. Rasagilin oder Selegilin hemmen zentral den Dopamin- und Katecholaminabbau und verlängern somit die Dopaminwirkung. Beide Wirkstoffe haben in mehreren Studien eine neuroprotektive Wirkung bewiesen: Patienten, die mit einem MAO-B-Hemmer im Frühstadium der Krankheit therapiert worden sind, konnten den Beginn der L-Dopa Therapie um mehrere Monate hinauszögern. Bei hoher Dosierung wirkt der MAO-B-Hemmer nicht mehr selektiv und hemmt auch die MAO-A, was amphetaminerge Nebenwirkungen auslösen kann [42].

Chirurgisch ist die tiefe Hirnstimulation bei manchen Patientenkollektiven möglich. Bei dieser Methode werden in bestimmten Hirnregionen Elektroden eingesetzt, die mit einem sogenannten Impulsgenerator verbunden sind. Dieser sendet elektrische Impulse zur Elektrode, die in der angezielten Region die Neuronen inhibiert und somit Signalwege unterbricht bzw. reguliert. Am häufigsten werden die Elektroden im Nucleus Subthalamicus oder im Globus Pallidus Internus eingesetzt. Bei der tiefen Hirnstimulation kann keine Medikamentenfreiheit erreicht werden, sie wird lediglich als additive Therapie bei Nebenwirkungen einer langjährigen L-Dopa Therapie angeboten. Früher wurde dieses Angebot eher im späteren Krankheitsverlauf gemacht, in letzter Zeit stellt man sich die Frage, ob ein früherer Einsatz der tiefen Hirnstimulation auch vorteilhaft für den Patienten sein könnte [44, 45].

1.2.5 Pathologie

Neuropathologisch kennzeichnend für den MP ist der Verlust an dopaminergen Neuronen in der SNc, der Verlust an noradrenergen Neuronen im Locus coeruleus und das Vorliegen von Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten im ZNS [30, 46-48]. Der Zelltod und der daraus folgende Melaninverlust der Neurone der SNc ist makroskopisch schon sichtbar (Abbildung 6A).

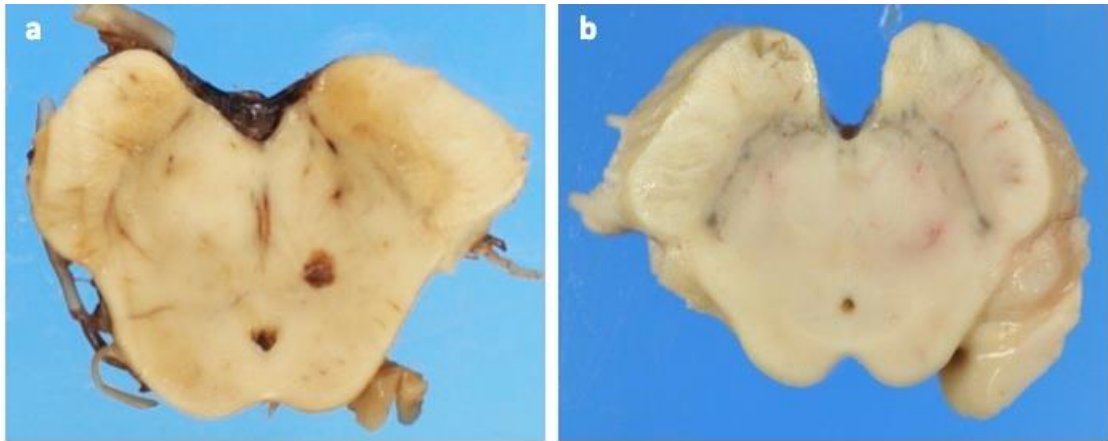


Abbildung 6: Transversalschnitt des Hirnstammes eines von MP betroffenen (a) und eines gesunden (b) Patienten

Die SN des Gesunden ist im Vergleich zum Erkrankten noch deutlich zu erkennen.

Herzlichen Dank an Frau Dr. med. Viktoria Ruf (ZNP München) für die Zurverfügungstellung der Bilder [49]

Lewy-Körperchen (engl. Lewy Bodies, LB) sind zytoplasmatische Einschlusskörperchen, die sich mittels einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung eosinophil färben lassen und meistens aus einem stark gefärbten Zentrum, umgeben von einem helleren Hof, bestehen (Abbildung 7) [50]. Mithilfe immunohistochemischer Färbungen wurde gezeigt, dass LB hauptsächlich aus α -Synuklein, Neurofilamenten und Ubiquitin bestehen (Abbildung 8A) [50-52]. LB sammeln sich im Perikaryon an [53].

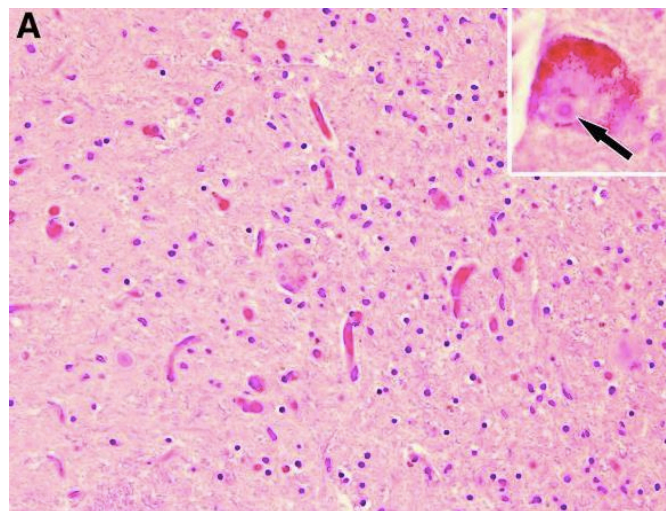


Abbildung 7: HE-Färbung der SNc bei MP (übernommen von Dickson et al.)[30]

Die Anzahl der Nervenzellen ist reduziert. In der Vergrößerung ist ein Neuron mit Lewy-Körperchen (Pfeil) zu sehen. Man erkennt das stärker gefärbte Zentrum und den helleren Hof.

Die Ansammlung von LB in Axonen wird als Lewy-Neurite (LN) bezeichnet. LN sind dystrophe Neuronenfortsätze und beinhalten wie LB Neurofilamente, Ubiquitin und α -Synuklein (Abbildung 8B) [54]. LB und LN sind im ZNS in der SNc, in den Raphe-Kernen, im Nucleus Basalis Meynert, im Hypothalamus, im Nucleus Dorsalis Nervi Vagi,

in den Seitenhörnern des Rückenmarks, aber auch im peripheren autonomen Nervensystem (PNS), wie z. B. im Grenzstrang, im Ganglion coeliacum, im enterischen Nervensystem, im Plexus cardiacus, in der Glandula submandibularis und im Nebennierenmark aufzufinden [55-58].

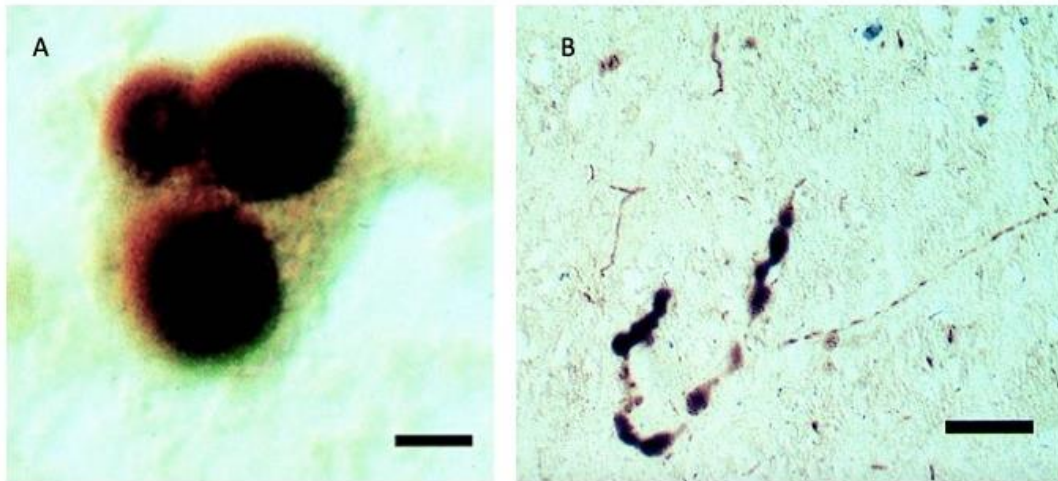


Abbildung 8: Immunofärbung einer SNc bei MP (übernommen von Spillantini et al.)[54]
(A) zeigt eine Nervenzelle mit 3 Lewy-Körperchen (Maßstab 10 µm). (B) zeigt ein Lewy-Neurit (Maßstab 90 µm). Beide sind deutlich gegen Alpha-Synuklein und Ubiquitin gefärbt.

α -Synuklein-positive Einschlusskörperchen konnten auch in Gliazellen, insbesondere Astrozyten und Oligodendrozyten, von MP-Patienten nachgewiesen werden (Abbildung 9A) [59, 60].

Da α -Synuklein physiologisch als entfaltetes Protein in präsynaptischen Vesikeln aufzufinden ist und eine entscheidende Rolle im synaptischen Transport spielt, ist sein Auffinden in zytoplasmatischen Einschlusskörperchen pathologisch [61]. Außerdem kann α -Synuklein in den LB im aggregierten Zustand, aber auch mit pathologischen post-translationalen Modifikationen, wie z. B. Kürzungen, Phosphorylierungen, Glykierungen oder Oxidationen vorkommen, was wiederum die Aggregation von fehlerhaftem α -Synuklein und somit die Bildung von LB fördert [62-65].

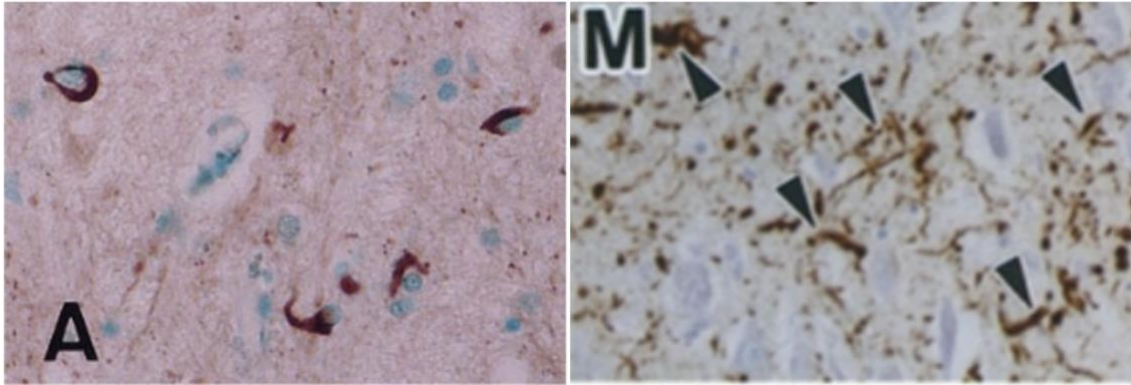


Abbildung 9: Immunofärbung gegen α -Synuklein (übernommen von Wakabayashi et al. und Baba et al.) [59, 62]

Eine Immunofärbung gegen α -Synuklein zeigt α -Synuklein-positive, zytoplasmatische Einschlusskörperchen, im Sinne von Lewy-Bodies, im Mittelhirn von MP-Patienten (A). Eine weitere Immunofärbung gegen α -Synuklein zeigt α -Synuklein-positive, abnormale Neurite in der CA2/3 Region des Hippocampus von Patienten mit Lewy-Body-Demenz (M).

Außerdem ist in der SN von MP-Patienten eine Entzündungsreaktion im Sinne einer Erhöhung der HLA-DR-positiven Mikrogliazellen und einer erhöhten Zytokinproduktion nachweisbar [66, 67]. Weiterhin sind bei MP-Patienten, im Vergleich zu gesunden Gleichaltrigen, erhöhte Werte an AGEs (advanced glycation end products) im Frontalkortex und erhöhte Eisen-Konzentrationen in der SN nachweisbar [68]. AGEs sind Proteine oder Lipide, die bei Kontakt zu Zucker glykiert werden. Sie sind eine Folge oxidativen Stresses und können selber für solchen zuständig sein [69]. Weiterhin wird behauptet, dass AGEs die Aggregation von α -Synuklein und die Bildung von LB fördern könnten und so zur Pathogenese des MP beitragen würden [70].

Aufgrund histopathologischer Untersuchungen an MP-Patienten wurde vorgeschlagen, dass das Auftreten von LB und LN einem bestimmten zeitlichen und topographischen Muster folgt. Braak et al. haben dafür die pathologischen Befunde in sechs Stadien eingeteilt, wobei LB und LN im ersten Stadium im Bulbus olfactorius und im enterischen Nervensystem (ENS) aufzufinden sind, bevor sympathische Ganglien, der Nucleus Dorsalis Nervi Vagi, die Raphe-Kerne, die SNc und übergeordnete kortikale Strukturen betroffen werden (Abbildung 10; Abbildung 11) [71, 72]. Somit wären der Bulbus olfactorius und das ENS die ersten anatomischen Strukturen, die von der Krankheit betroffen sind. Dies könnte wiederum erklären, warum einige NMS wie die Hyposmie oder die gastrointestinalen Störungen vor dem Eintreten der Kardinalsymptome erscheinen. Um dieses fortschreitende Muster zu erklären, wurden zwei Hypothesen formuliert.

Die erste Annahme behauptet, dass das Anfälligkeitspotenzial gegenüber einer α -Synuklein-Aggregation in Neuronen unterschiedlich ist. Tatsächlich sollen Projektionsneurone mit un- bzw. wenig myelinisiertem, langem Axon empfindlicher gegenüber α -Synuklein sein als Neurone mit stark myelinisiertem oder kurzem Axon [73].

Die zweite Annahme behauptet, dass ein über die Riech- und Darmschleimhaut aufgenommenes, externes Pathogen primär im Bulbus olfactorius und im ENS Schäden anrichten könnte, bevor es retrograd, über Synapsen, bis zum Gehirn weitertransportiert wird [74].

Weitere Studien, die die Hypothese des Transports eines Pathogens über das Nervensystem unterstützen, wurden nach der Veröffentlichung von Hawkes' et al. „dual-hit hypothesis“ durchgeführt. In zwei verschiedenen Studien wurden bei mehreren Patienten, bei denen eine Nervenzell-Transplantation stattgefunden hatte, in denselben transplantierten Neuronen mehrere Jahre danach typische LB und LN aufgefunden [75, 76]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Neurone α -Synuklein mittels Endo- und Exozytose jeweils aufnehmen und sekretieren können [77, 78]. Diese Entdeckungen bewiesen somit, dass α -Synuklein sowohl in enteralen als auch in kortikalen Neuronen von Neuron zu Neuron direkt übertragen wird und somit zum Zelltod der betroffenen Nervenzellen führen kann [79, 80].

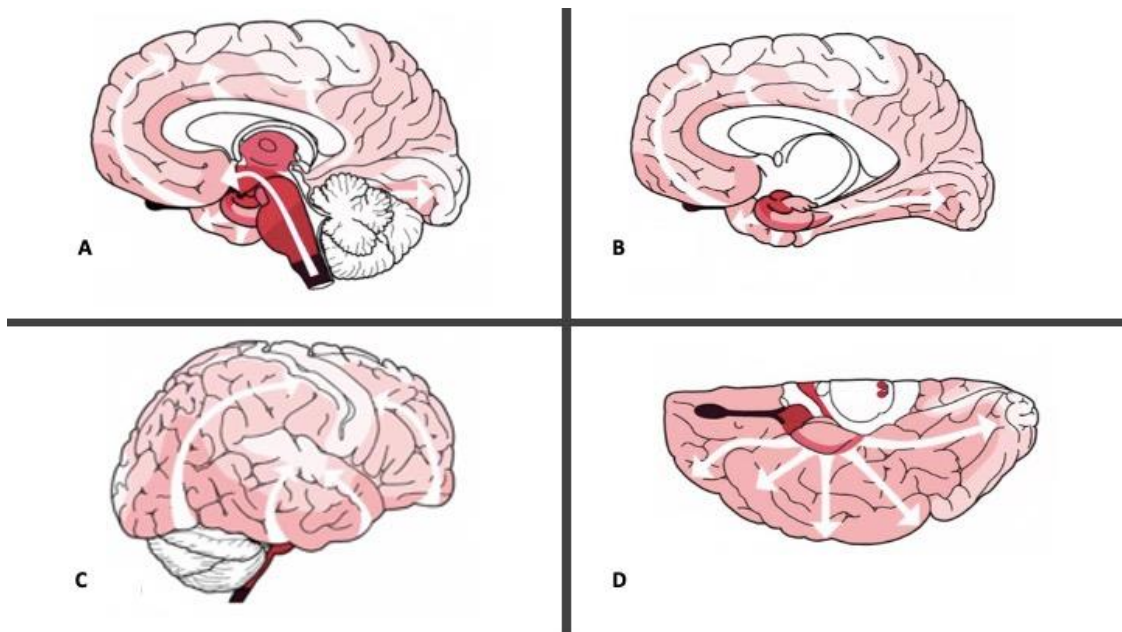


Abbildung 10: Veranschaulichung der intrazerebralen Progression der MP-Pathologie nach Braak et al. [71]

Die in der Medulla oblongata (A) beginnende Pathologie überträgt sich auf die Pons (B), bevor sie die SNC im Mittelhirn (C) und letztlich den Neokortex (D) erreicht.

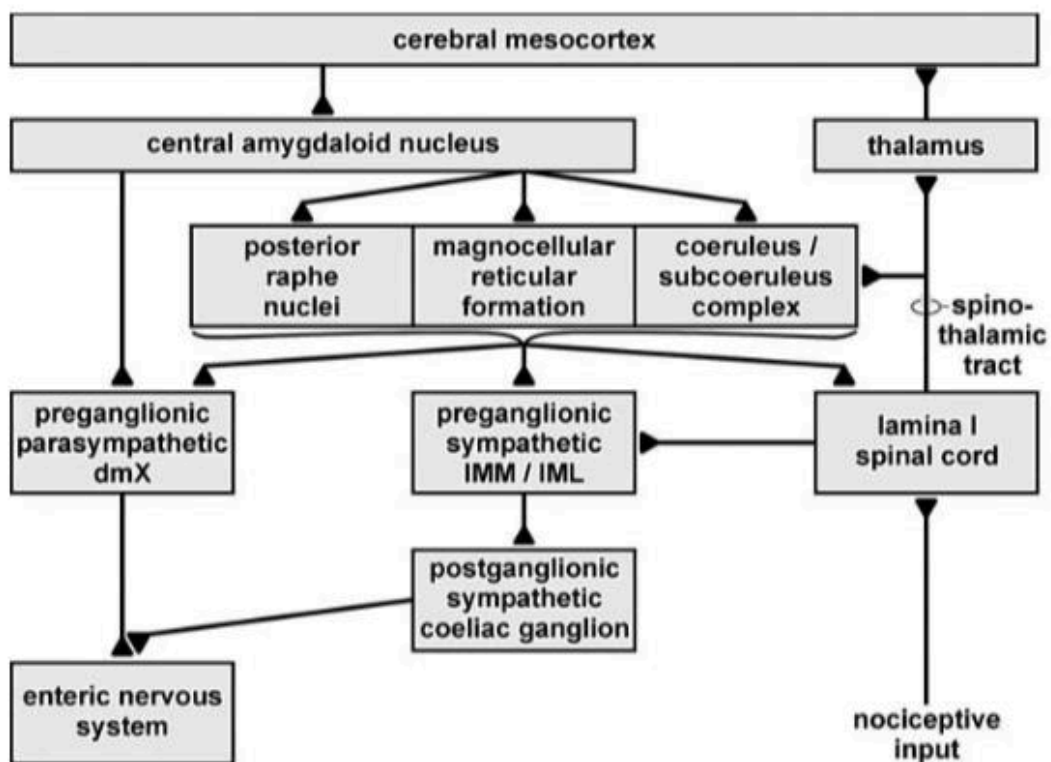


Abbildung 11: Progression der MP-Pathologie laut Braak et al. [81]

Braak et al. teilten die Progression der MP-Pathologie nach dem zeitlichen und topographischen Auftreten von LB und LNs in sechs Stadien auf. Gemäß dieser Aufteilung sind die histopathologischen Kennzeichen des MP zuerst im ENS, bevor sie in sympathische und parasympathische Kerne des Rückenmarks, in den Raphe-Kernen, im Thalamus, in der Amygdala und letztlich im Kortex aufzufinden sind. In dieser Abbildung werden mögliche synaptische Verbindungen gezeigt, die den Transport eines Pathogens vom ENS zum ZNS ermöglichen. Abkürzungen auf Englisch: dmX = dorsal motorvagal nucleus; IMM/IML = intermediomedial/intermediolateral nuclei of the spinal cord.

1.3 Ätiologie

Die genaue Ätiologie des Morbus Parkinson ist zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht ganz geklärt, sodass in den meisten Fällen von einem idiopathischen MP gesprochen wird. Man geht davon aus, dass die Krankheit aus einem Zusammenspiel von multiplen Einflussgrößen wie z. B. genetischen, Umwelt-, mitochondrialen und immunologischen Faktoren entsteht (Abbildung 12). Im Folgenden werden die verschiedenen möglichen Parameter genauer erklärt.

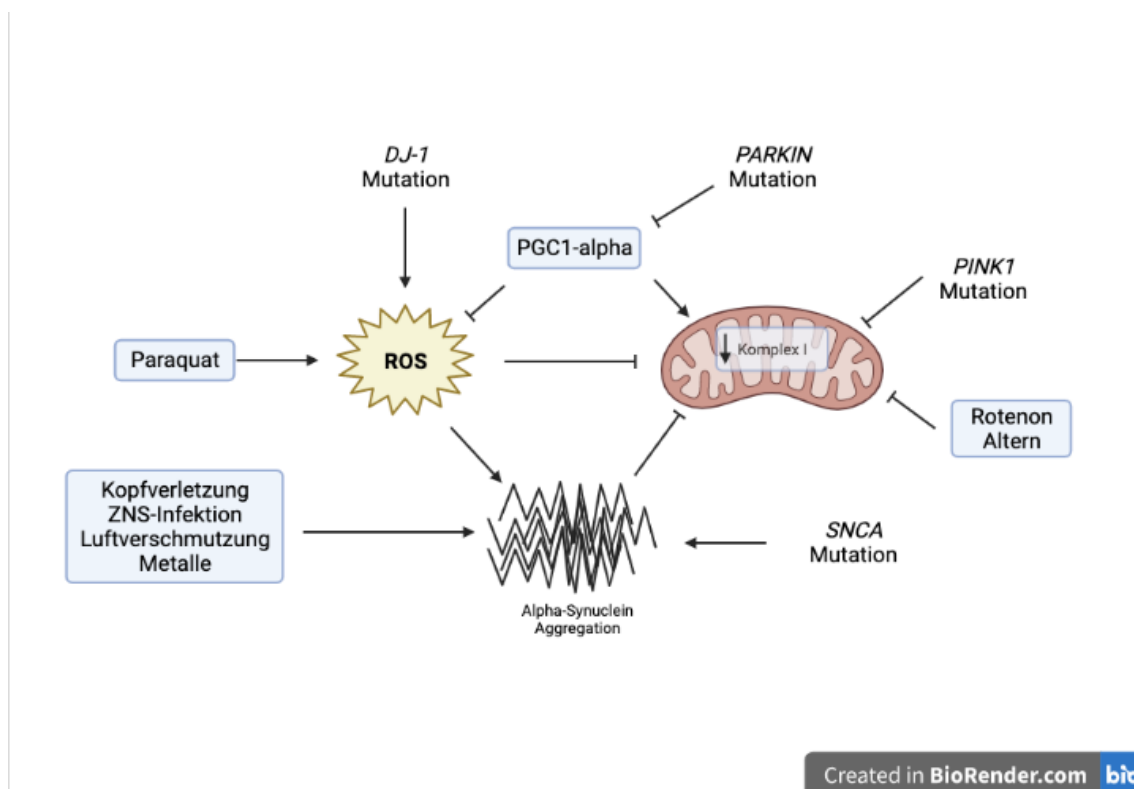


Abbildung 12: Einflussfaktoren der MP-Pathogenese (frei angepasst nach Simon et al.)[6]

Multiple Umwelt- aber auch genetische Faktoren können bei der Entstehung eines MP eine zentrale Rolle spielen. Diese Faktoren haben größtenteils auf ähnliche Signalwege Auswirkungen, die unter anderem zu einer erhöhten ROS-Bildung, Alpha-Synuclein-Aggregation und mitochondrialen Dysfunktion führen.

1.3.1 Genetik

Bei bis zu 10 Prozent der Patienten mit Morbus Parkinson kann eine genetische Ursache im Sinne einer vererbten Gen-Mutation diagnostiziert werden [6]. Tatsächlich ist das Risiko, an einem MP zu erkranken, zwei- bis dreimal höher als in der Gesamtpopulation, wenn ein Verwandter betroffen ist [82]. Somit ist die positive Familienanamnese der stärkste Risikofaktor, vor allem bei der Diagnose einer sogenannten „early-onset Parkinson’s Disease“ (EOPD) in der Familie: EOPD ist ein vor dem 40. Lebensjahr festgestellter Morbus Parkinson [83-85]. Inzwischen sind über 15 Gen-Loci, die

ursächlich für einen familiären MP sein könnten, bekannt (Tabelle 3). Die meisten dieser Mutationen zeigen einen autosomalen Erbgang. Im Anschluss werden die bekanntesten und meisteerforschten Mutationen dargestellt.

	Gen	Chromosom	Erbgang	Referenzen
<i>PARK1</i> und <i>PARK4</i>	<i>SNCA</i>	4q22.1 und 4q21	AD	[86, 87]
<i>PARK2</i>	<i>PARKIN</i>	6q25.2-27	AR	[88]
<i>PARK3</i>	<i>unbekannt</i>	2p13	unklar	[89]
<i>PARK5</i>	<i>UCH-L1</i>	4p14-15	AD	[90]
<i>PARK6</i>	<i>PINK1</i>	1p35-36	AR	[91]
<i>PARK7</i>	<i>DJ-1</i>	1p36	AR	[92]
<i>PARK8</i>	<i>LRRK2</i>	12q12	AD	[93, 94]
<i>PARK9</i>	<i>ATP13A 2</i>	1p36	AR	
<i>PARK10</i>	<i>unbekannt</i>	1p32	unklar	[95]
<i>PARK11</i>	<i>GIGYF2</i>	2q36-37	AD	[96, 97]
<i>PARK13</i>	<i>HTRA2</i>	2p13.1	unklar	[98]
<i>PARK17</i>	<i>VPS35</i>	16q11.2	AD	[99]
<i>PARK18</i>	<i>EIF4G1</i>	3q27.1	AD	[100]

<i>PARK19</i>	<i>DNAJC6</i>	1p32	AR	[101, 102]
<i>PARK20</i>	<i>SYNJ1</i>	21q22	AR	[103]
<i>PARK21</i>	<i>DNAJC13</i> <i>TMEM230</i>	3q22	AD	[104, 105]
<i>PARK23</i>	<i>VPS13C</i>	15q22	AR	[106]

Tabelle 3: Parkinson-verwandte Gene und ihre Mutationen

Abkürzungen: AD = autosomal dominant; AR = autosomal rezessiv

1.3.1.1 Autosomal-dominant vererbte Mutationen

- *SNCA (PARK 1 und PARK 4)*

Als Mutationsformen kann das *SNCA*-Gen verschiedene Punktmutationen wie z. B. A30P, A53T, E46K aber auch Duplikationen oder Triplikationen vorweisen [87, 107]. Je nach Mutation kann das auf dem Gen kodierte Protein, α -Synuklein, defekt und somit wirkungslos oder in zu hohen Mengen vorhanden sein, wobei alle Mutationen zu einer Anhäufung von α -Synuklein führen. Wie oben schon beschrieben ist α -Synuklein im Rahmen eines MP vor allem in LB und LN angehäuft aufzufinden. Die Aggregation von α -Synuklein hat mehrere pathologische Folgen. Erstens kann es auf mitochondrialer Ebene zu Beeinträchtigungen der Atmungskette, vor allem im Komplex I, zur Erhöhung der Anzahl an freien Radikalen und somit zu oxidativem Stress führen [108, 109]. α -Synuklein inhibiert auch die Autophagozytose von Mitochondrien und trägt somit zur Anhäufung dysfunktioneller Mitochondrien bei [110]. Zweitens wird behauptet, dass α -Synuklein eine regulierende Funktion im Dopaminstoffwechsel haben könnte. Ein funktionsloses bzw. aufgrund einer Aggregation fehlendes Protein könnte zu einer Dysregulation des Stoffwechsels führen und somit einen negativen Einfluss auf das Überleben von dopaminergen Neuronen haben [111]. Bei transgenen Mäusen mit hohen α -Synuklein Mengen wurde auch ein Neurotransmitter-Defizit aufgrund einer dysfunktionalen Vesikelfreisetzung und -wiederverwertung festgestellt [112]. Weiterhin wurde gezeigt, dass α -Synuklein-Aggregate *in vitro* eine Entzündungsantwort auslösen [113].

- *LRRK2 (PARK8)*

Mutationen im *Leucine-Rich-Repeat-Kinase 2 (LRRK2)* -Gen machen bis zu 10% der autosomal-dominant vererbten MP-Fälle aus [114]. Auch bei idiopathischem MP zeigen bis zu 2% der Patienten eine *LRRK2*-Mutation [115]. Das klinische Bild ähnelt dem eines klassischen MP [114]. Die häufigste Mutation im *LRRK2*-Gen ist die G2019S Mutation in der Kinase-Domäne des Proteins und wirkt, wie die meisten anderen identifizierten Mutationen im *LRRK2*-Gen als „gain-of-function“ Mutation pathogen [115, 116]. *In vitro* und *in vivo* zeigten *LRRK2*-Mutanten eine disinhibierte Kinase-Aktivität und führten zu einem progressivem Struktur- und Längenverlustes des Dendritenbaums [117]. Außerdem konnten Auffälligkeiten in der mitochondrialen Morphologie festgestellt werden [118]. *In vitro* konnte durch eine Überexpression an humanem *LRRK2* ein durch

oxidativen Stress bedingter Zelltod begrenzt werden, was zusätzlich für eine protektive Funktion von *LRRK2* gegenüber oxidativem Stress spricht [119].

1.3.1.2 Autosomal-rezessiv vererbte Mutationen

- *PARKIN (PARK2)*

Mutationen im *PARKIN*-Gen verursachen ein autosomal-rezessiv vererbtes EOPD: Die Patienten sind bei Diagnose unter 40 Jahre alt, zeigen eine gute Antwort auf L-Dopa und haben einen milden Krankheitsverlauf [88, 120]. Knapp 50% der Patienten mit autosomal-rezessiv vererbtem EOPD und 15% der Patienten mit idiopathischem EOPD haben eine *parkin*-Mutation [121, 122]. Das Parkin-Protein gehört zur Familie der E3-Ubiquitin-Ligasen und spielt damit in der Ubiquitinierung von Proteinen, also im proteasomalen Proteinabbau, eine Rolle [123]. Zum heutigen Tag sind über 170 *parkin*-Mutationen bekannt. Ursprünglich dachte man, dass eine Mutation im *parkin*-Gen zu einem Funktionsverlust der Ubiquitin-Ligase führen würde, was zu einer Beeinträchtigung des Abbaus defekter oder mutierter Proteine und somit deren Aggregation zur Folge hätte [116, 123, 124]. Heute wird angenommen, dass Mutationen im *parkin*-Gen die Löslichkeit vom Parkin-Protein vermindern und es somit zu Aggregaten kommt [125]. Außerdem wird Parkin zum proteasomalen Abbau von geschädigten Mitochondrien rekrutiert, was wiederum heißen würde, dass bei funktionslosem Protein beschädigte Mitochondrien nicht abgebaut werden könnten, akkumulieren würden und eine mögliche Rolle in der Pathogenese des MP spielen könnten [126]. Auf indirektem Wege reguliert Parkin auch einen für die mitochondriale Biogenese und antioxidative Zellabwehr wichtigen Transkriptionsregulator, PGC-1 α [127].

- *PINK-1 (PARK6)*

PINK-1 Mutationen sind die zweithäufigste genetische Ursache für EOPD. Klinisch ist der Phänotyp eines Patienten mit *PINK-1*-Mutation ähnlich dem eines Patienten mit *parkin*-Mutation [128]. Das Protein PINK-1, PTEN-induced putative kinase 1, ist eine mitochondriale Serin-Threonin Kinase und schützt Neurone vor Stress induzierten mitochondrialen Dysfunktionen. Die meisten Mutationen sind in der Kinase-Domäne von *PINK-1* lokalisiert [129]. Mutationen könnten also in einer Beeinträchtigung der Kinase-Funktion oder Substrat-Erkennung resultieren. In *pink-1* knock-out Fliegen konnten Defekte in der Morphologie von Mitochondrien und eine erhöhte Sensitivität dieser

Zellorganellen gegenüber multiplen Stressoren, inklusive oxidativen Stresses, festgestellt werden [130].

- *DJ-1 (PARK7)*

Mutationen im *DJ-1* Gen kommen bei autosomal-rezessiv vererbtem MP am seltensten vor. Sie werden in ca. 1% der EOPD-Fälle festgestellt [131]. Das klinische Bild einer *DJ-1*-Mutation ähnelt dem eines Patienten mit einer *PINK1*- oder *parkin*-Mutation: Die Patienten sind bei der Erstdiagnose jung und haben eine langsame Krankheitsprogression [132].

Die ersten beschriebenen Mutationen sind eine homozygote Deletion und eine homozygote Punktmutation, L166P, in zwei blutsverwandten Familien aus den Niederlanden und Italien [133-135]. Eine weitere bekannte homozygote Punktmutation ist die E163K Mutation im Exon 7 des Gens [136]. Auch heterozygote Punkt- und „compound“-heterozygote Mutationen wurden beschrieben [137, 138].

Physiologisch hat das Protein DJ-1 verschiedene Funktionen und wird im ZNS stark exprimiert [139]. DJ-1 wurde anfänglich eine Funktion als Onkogen und Regulator des Androgen-Rezeptors zugeschrieben, bevor seine Rolle im Schutz gegen oxidativen Stress entdeckt wurde (Abbildung 13) [140, 141]. Bei erhöhter ROS-Produktion (reaktive Sauerstoffspezies, engl. reactive oxygen species) steigt die endogene Konzentration an DJ-1 [142, 143]. Außerdem wandert das physiologisch im Zytosol lokalisierte Protein bei oxidativem Stress zur äußeren Membran des Mitochondriums, wo es ROS wie z. B. H₂O₂ eliminiert, indem es sich selbst am Cystein 106 oxidiert [144, 145]. Weiterhin reguliert DJ-1 weitere zellschützende Proteine, wie z. B. das 20S-Proteasom oder den Transkriptionsfaktor Nrf2. Bei oxidativem Stress wird Nrf2 aktiviert und induziert eine Hochregulierung der Transkription antioxidativ wirkender Proteine, wie z. B. die Thioredoxin-Reduktase 1 und die Gluthation-S-Transferase [146]. Außerdem reguliert DJ-1 auch die Transkription von VMAT2, dem einzigen Transporter, der DA vom Zytoplasma in synaptische Vesikel transportieren kann [147]. Tatsächlich wird zytosolisches DA bei oxidativem Stress oxidiert, was für die Zelle schädlich sein kann, sodass die Lagerung von DA in Vesikeln ein weiterer Schutz vor Neurotoxizität und folglich Zelltod ist [148].

Weiterhin wurde DJ-1 eine Glyoxalase-Funktion zugeschrieben. Glyoxalasen wandeln Glyoxal und Methylglyoxal jeweils in Glycolsäure (GS) und D-Laktat (DL) um [149]. Die Substrate der Glyoxalasen entstehen bei der Oxidation von Glucose (Glyoxal) und

bei der Peroxidation von Fettsäuren (Methylglyoxal) und sind aggressive Aldehyde. Sie sind in der Bildung von AGEs (advanced glycation end-products), die selbst als oxidative Stressoren fungieren, beteiligt. Im Stadium der Dauerlarve führen Konditionen der Vertrocknung bei der *Caenorhabditis elegans* zur erhöhten ROS-Produktion. Der Begriff Dauerlarve beschreibt ein Stadium, in dem die Larve eine Art Stase eingeht, um unter rauen Bedingungen überleben zu können. In diesem Stadium wurde festgestellt, dass *C. elegans* die Fähigkeit hat, das Glyoxalase-Gen *djr-1.2* und *glod-4* hochzuregulieren, um die Austrocknung zu überleben [150]. Bei *djr-1.2* knockout Mutanten der *C. elegans* Dauerlarve überlebten nur ein Fünftel die Austrocknung, was wiederum eine protektive Rolle von DJ-1 gegenüber oxidativem Stress zeigt [151]. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Glyoxal und Methylglyoxal eine Oligomerisierung von α -Synuklein induzieren [152]. In einem anderen Versuch konnte weiterhin gezeigt werden, dass sich unter oxidativem Stress DJ-1 direkt mit α -Synuklein verknüpft und einer Aggregation von α -Synuklein entgegenwirkt [153].

DJ-1 übt seine neuroprotektive Wirkung hauptsächlich am Mitochondrium aus, wo es gegen oxidativen Stress schützt [154, 155]. Auch die Produkte der Glyoxalase DJ-1 scheinen eine protektive Wirkung auf die Struktur, das Membranpotential und die Funktionen des Mitochondriums zu haben. Tatsächlich konnte *in vitro* gezeigt werden, dass bei funktionslosen DJ-1 Mitochondrien aus HeLa-Zellen ein niedrigeres Membranpotential und eine, bei durch Paraquat ausgelöstem oxidativem Stress, veränderte Struktur haben. Beides konnte durch Addition von GS und DL gerettet werden. Außerdem konnten GS und DL dopaminerge Neurone vor einer Paraquat-Toxizität schützen [151]. Dementsprechend können der Glyoxalase zwei Aufgaben zugeschrieben werden: Einerseits detoxifiziert sie aggressive Substanzen, andererseits produziert sie zwei Substanzen, die eine normale mitochondriale Funktion unterstützen und aufrechterhalten.

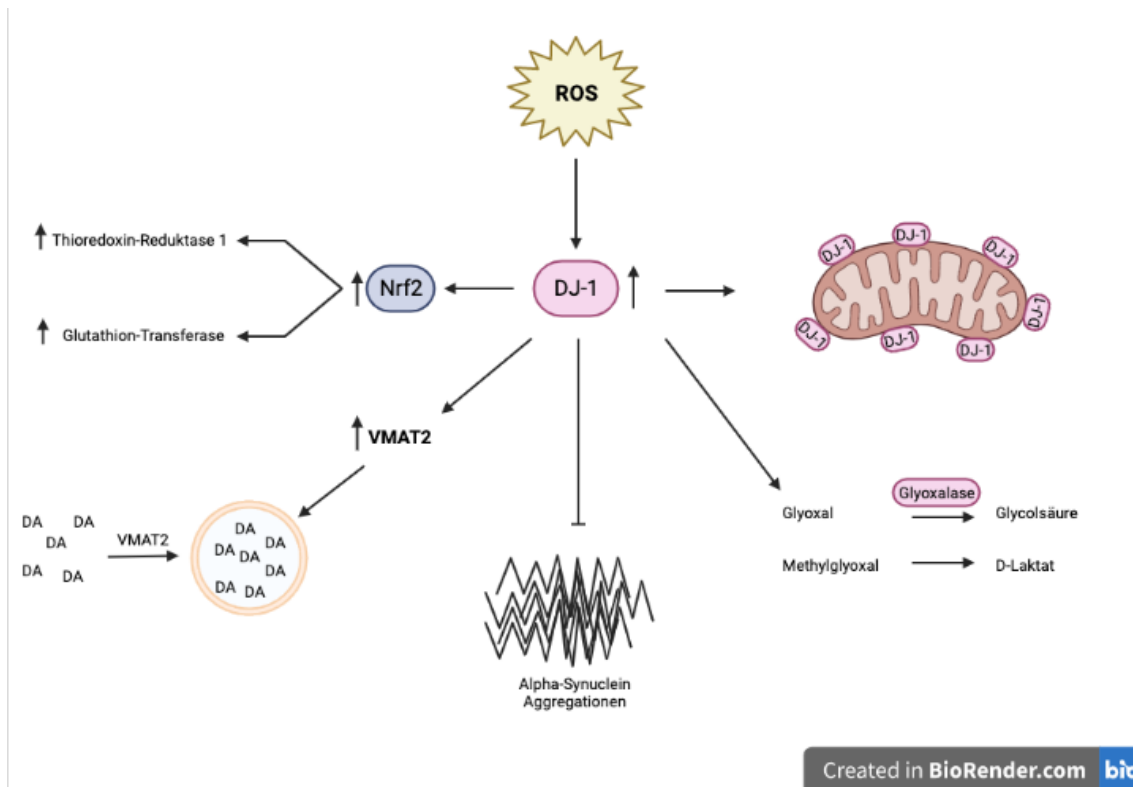


Abbildung 13: Die Funktionen von DJ-1

Eine erhöhte ROS-Produktion führt zur Hochregulierung des *DJ-1* Gens und somit zur erhöhten Transkription des Proteins DJ-1. DJ-1 kann seine Schutzfunktionen vor oxidativem Stress auf verschiedene Weisen ausüben, indem es z.B. die Funktionstüchtigkeit des Mitochondriums schützt, die Transkription von Nrf2 und VMAT2 erhöht, der Aggregation von Alpha-Synuclein entgegenwirkt und vor allem als Glyoxalase Glycolaldehyd und D-Laktat produziert.

Demgegenüber können Mutationen, die die Funktion von DJ-1 beeinträchtigen, verschiedene antioxidative Schutzmechanismen gefährden. Während die E163K Mutation die antioxidative Wirkung von DJ-1 beeinträchtigt, führt die L166P Mutation zu einem erhöhten Abbau des Proteins durch das Proteasom, sodass die Menge an DJ-1 in der Zelle reduziert ist [156, 157]. *In vitro* Versuche zeigten, dass bei funktionslosem DJ-1 die ATP-Produktion und das Membranpotential des Mitochondriums vermindert sind, während die ROS-Produktion gesteigert ist [158]. Zusätzlich sind die Mitochondrien fragmentiert und zeigen eine Akkumulation von Autophagozytose-Markern [159]. Eine weitere Studie zeigte zusätzlich, dass die Autophagozytose der Mitochondrien bei *DJ-1* Mutation auch beeinträchtigt ist, sodass es in der Zelle zur Akkumulation defekter Mitochondrien kommt [160]. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Versuche zeigten, dass Zellen mit dysfunktionalem DJ-1 sensitiver gegenüber oxidativem Stress sind und leichter in Apoptose gehen [161, 162]. In *Drosophila melanogaster* mit *DJ-1* Mutation konnte eine dopaminerge Neurodegeneration festgestellt werden [163]. Weitere Studien konnten bei *DJ-1*-knockout (*DJ-1*^{-/-})-Mäusen eine verringerte nigrostriatale dopaminerge Neurotransmission feststellen, die phänotypisch zu

motorischen Defiziten führte, die wiederum mit steigendem Alter der Maus und wachsendem Schwierigkeitsgrad der Aufgabe zunahmen [164, 165].

PINK1, *PARKIN* und *DJ-1* haben eine Gemeinsamkeit: Alle drei Gene spielen in der Unterstützung einer normalen Mitochondrienfunktion eine wichtige Rolle. Sie markieren fehlerhafte Mitochondrien zum Abbau, gewährleisten eine für die Funktion des Mitochondriums wichtige physiologische Morphologie und beschützen sie vor oxidativem Stress [110, 166]. Tatsächlich zeigten *parkin*, *PINK1* und *DJ-1 Drosophila melanogaster* Mutanten in verschiedenen Studien einen ähnlichen Phänotyp: Es war eine frühe Mitochondrienpathologie (Dysmorphie, geschwollene Organellen und wenige Cristae), gefolgt von Muskeldegenerationen mit fehlerhaften Flügelpositionen festzustellen, was zu Flug- und Kletterschwierigkeiten führte. Eine Überproduktion an Parkin konnte den *PINK1* -/- Phänotyp deutlich verbessern, aber nicht umgekehrt: Eine Überexpression an PINK1 brachte keine Verbesserung des mutierten *parkin*-Phänotyps. Eine DJ-1 Überexpression konnte den mutierten *PINK1*-, aber nicht den mutierten *parkin*-Phänotyp verbessern. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass PINK1, Parkin und DJ-1 in einem gemeinsamen Reaktionsweg für den Schutz der mitochondrialen Funktion und Integrität arbeiten, wobei PINK1 Parkin vorgeschaltet ist und DJ-1 parallel zum PINK1/Parkin-Weg arbeitet (Abbildung 14) [167, 168]. Außerdem bilden Parkin, PINK1 und DJ-1 einen Ubiquitin-E3-Ligase-Komplex, der den Abbau dysfunktioneller bzw. falsch gefalteter Proteine fördert [169].

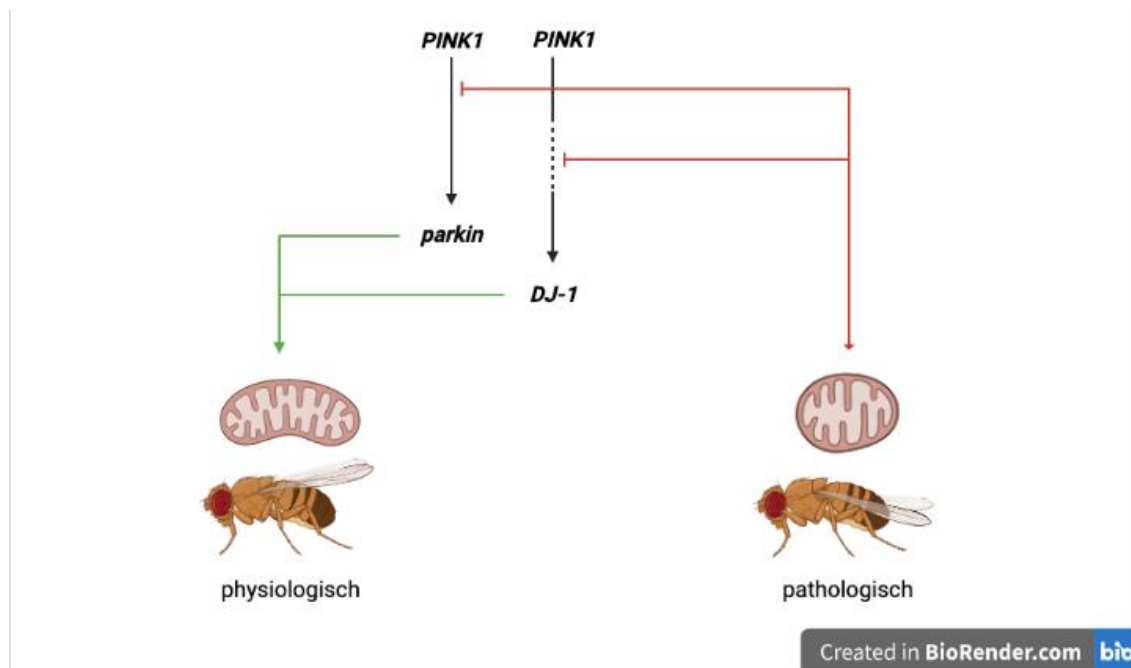


Abbildung 14: *PINK1*, *Parkin* und *DJ-1* unterstützen eine normale Mitochondrienfunktion (frei angepasst nach Corti et. al) [125]

PINK1, *parkin* und *DJ-1* sind an Signalwegen beteiligt, die die Funktionstüchtigkeit des Mitochondriums im *Drosophila*-Modell unterstützen. Mutationen von *parkin* oder *PINK1* im *Drosophila*-Modell führen zu einer frühen mitochondrialen Pathologie (rundlich, wenig Cristae) in Muskelzellen, die mit einer Muskeldegeneration und einem eigenartigen Flügelphänotyp (nach unten gedrehtem Flügel) einhergeht. Ähnliche Phänotypen wurden bei mutierten *DJ-1*-Fliegen beobachtet. Eine Überexpression an *parkin* konnte den mutierten *PINK1*-Phänotyp verbessern. Weiterhin konnte eine Überexpression an *DJ-1* den mutierten *PINK1*-Phänotyp, aber nicht den mutierten *parkin*-Phänotyp, verbessern. Die Gene *PINK1*, *parkin* und *DJ-1* arbeiten durch verschiedene Signalwege gemeinsam an der Integrität und reibungslosen Funktion des Mitochondriums, wobei *PINK1* *parkin* vorgeschaltet ist und *DJ-1* parallel zu diesem Signalweg arbeitet.

1.3.2 Umweltfaktoren

Sowohl protektive als auch schädliche Umweltfaktoren wurden mit einer MP-Erkrankung assoziiert. Einerseits reduzieren Nikotinkonsum, erhöhte Urat-Werte im Plasma, Kaffeekonsum, Alkoholkonsum und sportliche Tätigkeit das Risiko, an einem MP zu erkranken [83, 170-172]. Besonders wenn diese Faktoren gleichzeitig vorkommen und somit additive Effekte zeigen, haben Patienten eine sehr niedriges Erkrankungsrisiko [173]. Andererseits erhöhen Kopfverletzungen, ZNS-Infektionen, eine erhöhter Milchkonsum, eine unregelmäßige Darmmotilität, Luftverschmutzung, Metalle wie z. B. Aluminium, Kupfer oder Zink und Pestizide, vor allem Paraquat (PQ) und Rotenon, das Risiko einer MP-Erkrankung [170, 174-179]. Die ersten Andeutungen einer möglichen Neurotoxizität von Pestiziden gab es Anfang der 1980er Jahre, als junge Erwachsene nach einer intravenösen Injektion eines synthetischen Heroins einen Parkinsonismus entwickelten. Ursächlich dafür war 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), ein bei der Synthese vom Meperidin-Analogen 1-methyl-4-phenyl-propion-oxypiperidine (MPPP) entstandenes Nebenprodukt [180]. Nachdem

MPTP die BHS überwunden hat, wird es durch die Monoaminoxidase B zu 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) metabolisiert und durch den Dopamin-Transporter in Neurone der SNc eingeschleust. Hier blockiert es den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette und führt somit zum selektiven Zelltod von dopaminergen Neuronen der SNc [181, 182]. Das Interesse an PQ wurde durch die strukturelle Ähnlichkeit von MPP⁺ und dem Pestizid geweckt (Abbildung 15) [183]. Folglich zeigten mehrere epidemiologische Studien, dass Menschen mit einer chronischen Exposition gegenüber Pestiziden, vor allem PQ und Rotenon, ein erhöhtes Risiko haben, an MP zu erkranken [178, 184, 185].

1.3.2.1 Paraquat

Paraquat (PQ) ist ein weitverbreitetes Herbizid. Seit 2007 ist es aufgrund einer nachgewiesenen Neurotoxizität in der europäischen Union (EU) verboten. In den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) ist die Nutzung von PQ noch erlaubt. PQ provoziert auf Zellebene einen massiven oxidativen Stress, indem es erstens Sauerstoff zu Superoxid-Radikalen reduziert und somit reaktive Sauerstoffspezies erzeugt und zweitens die Reduktion von oxidiertem Glutathion, ein wichtiges Antioxidans, stark einschränkt [186, 187]. Weiterhin beschädigt PQ die Mitochondrien-Morphologie, entkoppelt die oxidative Phosphorylierung und schränkt somit die ATP-Produktion stark ein [188, 189]. Im Tiermodell bewirkt eine chronische PQ-Exposition einen signifikanten dopaminergen Zellverlust in der SNc mit Aktivierung der Microglia und Astrozyten [190]. Zusätzlich wird in der SN und im Frontalkortex eine Hochregulierung von α -Synuklein und folglich eine α -Synuklein Aggregation bemerkt [191]. Klinisch zeigen die Tiere verschiedene motorische Einschränkungen [192].

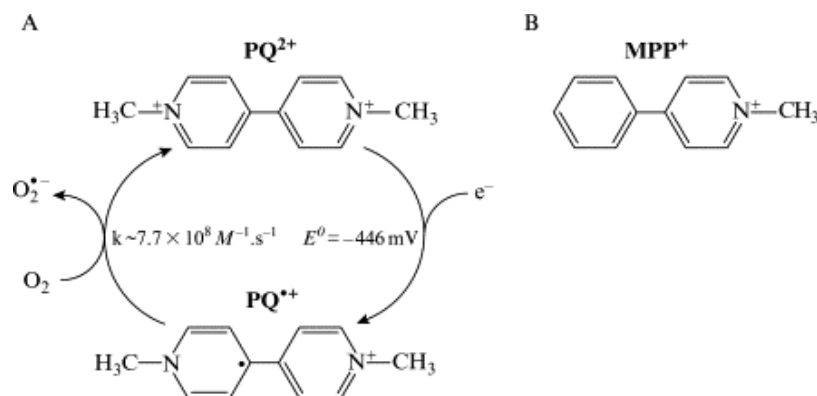


Abbildung 15: Paraquat und MPP⁺ (übernommen von Cochemé et al.) [187]

(A) zeigt die Redox-Reaktion von Paraquat. Als Nebenprodukte entstehen für die Zelle toxische Superoxid-Radikale. (B) zeigt die chemische Struktur von MPP⁺. Man beachte die strukturelle Ähnlichkeit von PQ und MPP⁺.

1.3.2.2 Rotenon

Rotenon ist eine natürlich auftretende Verbindung und stammt aus Pflanzenwurzeln. Es wird seit mehreren Jahrhunderten als Pestizid, Insektizid und zum Fischen benutzt. Wie PQ ist Rotenon in der EU, aber nicht in den USA, verboten [193]. Aufgrund seiner starken Lipophilie kann das Pestizid leicht in alle Organe eindringen und die BHS passieren (Abbildung 16).

Auf biochemischer Ebene blockiert Rotenon spezifisch den Komplex I der Atmungskette und verhindert somit den aufrechten Verlauf der oxidativen Phosphorylierung [194]. Es wird angenommen, dass die aus der Blockade des Komplexes I resultierende oxidative Schädigung, und nicht der ATP-Mangel, der Grund der Toxizität von Rotenon ist [195]. Weil Rotenon keinen Transporter braucht, um die Zellenmembran zu passieren, kann es die Atmungskette jeder Zelle beeinträchtigen. Trotzdem führt im Tiermodell eine chronische systemische Infusion von Rotenon zu einer selektiven nigrostriatalen Degeneration der dopaminergen Neurone und zu LB-erinnernde Einschlusskörperchen, die α -Synuklein und Ubiquitin enthalten (Abbildung 17) [196, 197]. Klinisch zeigen die Tiere Kardinalsymptome eines MP [198].

Auch bei einer chronischen oralen Gabe einer hohen Dosis an Rotenon, was einen natürlichen Expositionsweg gegenüber dem Pestizid nachahmt, zeigen Mäuse motorische Defizite, eine nigrostriatale dopaminerge Neurodegeneration und eine Hochregulation von α -Synuklein in den überlebenden dopaminergen Neuronen [199]. Außerdem kann durch eine intragastrale Rotenon-Gabe die zeitliche und topographische Progression der pathologischen Kennzeichen des MP reproduziert werden. Bei täglicher intragastraler Gabe von Rotenon über einen Zeitraum von 1,5 Monaten zeigten sich Akkumulationen und Aggregationen von Alpha-Synuklein im ENS sowie in der SN. Nach drei Monaten war zusätzlich eine Neurodegeneration in der SNc festzustellen [200].

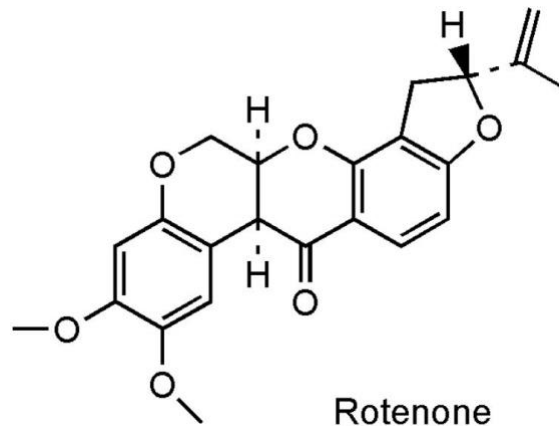


Abbildung 16: chemische Struktur von Rotenon
 engl. Rotenone; [194]

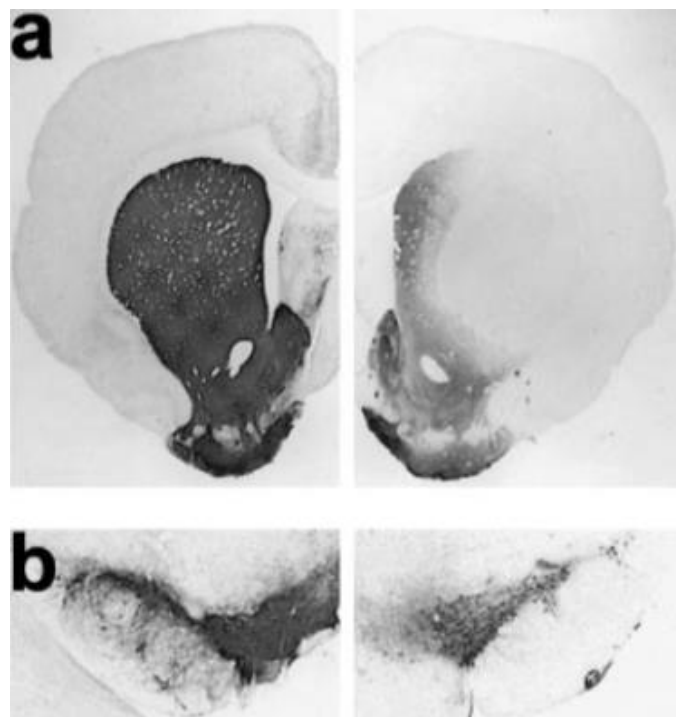


Abbildung 17: Histopathologische Charakteristika nach Rotenon-Exposition (übernommen von Betarbet et al.) [198]

Mikroskopisch fotografierte Gehirnschnitte von Ratten. Schnitte von Striatum (A) und SN (B) zeigen eine deutlich reduzierte Färbung der Neurone gegen Tyrosin-Hydroxylase bei der mit Rotenon behandelten Gruppe (rechts) im Vergleich zur Kontrollgruppe (links).

1.3.3 Immunsystem

Wie in 1.2.5 schon beschrieben sind bei MP-Patienten Zeichen einer Entzündung im Sinne einer Aktivierung der Mikroglia und Astrozyten aufzufinden. Außerdem haben epidemiologische Studien eine Assoziation zwischen peripheren Entzündungsreaktionen, z. B. Diabetes mellitus Typ 2 oder chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, und ein erhöhtes MP-Risiko feststellen können [6]. Obwohl die genaue Rolle dieser chronisch-entzündlichen Antwort in der Pathophysiologie des MP noch unbekannt ist, wird stark

davon ausgegangen, dass sie die Progression bzw. Aufrechterhaltung der Neurodegeneration unterstützt [201].

1.3.4 Beeinträchtigung des proteasomalen und lysosomalen Abbaus

Es wird angenommen, dass aggregiertes α -Synuklein das Proteasom bindet und es somit inaktivieren könnte. Da das Proteasom beschädigte bzw. zum Abbau markierte Proteine nicht mehr abbauen könnte, würden sich diese anhäufen. Diese anormale Anhäufung würde Neurone anfälliger gegenüber exogenem Stress machen und den Zelltod fördern [202, 203].

1.3.5 Mitochondrium und oxidativer Stress

Das Mitochondrium ist für viele Stoffwechselfvorgänge in der Zelle, wie z. B. die ATP-Produktion über die Atmungskette, zuständig. Auch im intrinsischen Weg der Apoptose oder in der zellulären Signaltransduktion spielt die Organelle eine wichtige Rolle [204]. In Neuronen sind Mitochondrien besonders wichtig: Aufgrund ihrer Mobilität können sie sich bis zur Synapse bewegen, um sie mit der benötigten Energie zu versorgen und die hohen Kalziumkonzentrationsänderungen zu puffern [205, 206]. So ist auch verständlich, dass ein dysfunktionelles Mitochondrium zu erheblichen Funktionsstörungen in der Zelle führen kann (Abbildung 18).

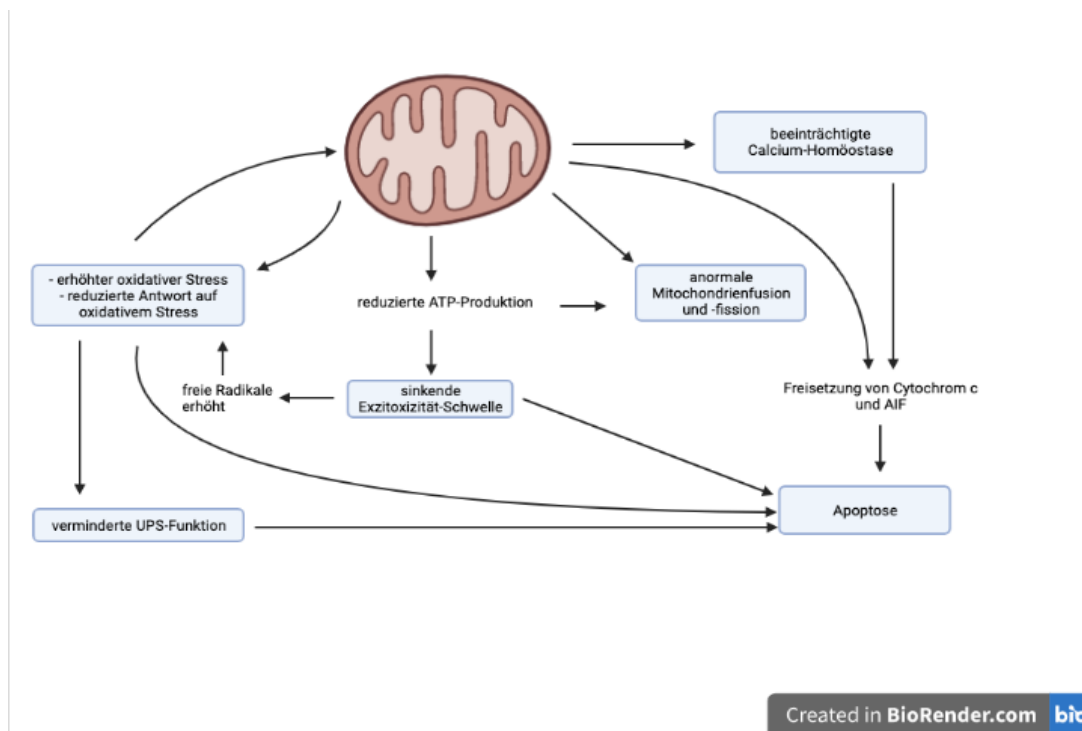


Abbildung 18: Folgen einer mitochondrialen Dysfunktion (frei angepasst nach Henchcliffe et al.)[207]

Ein dysfunktionelles Mitochondrium, hier als rundlich und mit wenig Cristae dargestellt, kann erhebliche Konsequenzen für die Zelle haben. Eine reduzierte ATP-Produktion, eine gestörte Kalzium-Homöostase oder eine Erhöhung des oxidativen Stresses sind unter anderem einige dieser Auswirkungen und können schließlich bis zur Apoptose führen. Abkürzungen: UPS = Ubiquitin-proteasomales-System; AIF = engl. „apoptosis-initiatingfactor“. Abbildung frei angepasst von Henchcliffe et al.

Schon Ende der 1980er Jahren bemerkte man ein Funktionsdefizit im Komplex I der Atmungskette in Neuronen der SN und des Frontalkortex von MP-Patienten [208-210]. Auch in Skelettmuskelzellen und Thrombozyten von MP-Patienten konnten Komplex I Defizite festgestellt werden [211, 212]. Diese Defizite zeigten sich als oxidative Schäden und verringerte Elektronentransportraten durch den Komplex [213]. Im Vergleich zu gleichaltrigen, gesunden Erwachsenen zeigen MP-Patienten einen Aktivitätsverlust des Komplexes I von 35 % [214]. Dieser Unterschied reicht schon aus, um die ATP-Produktion zu reduzieren und ROS zu generieren, sodass die betroffenen Zellen bzw. Neurone sensitiver auf proapoptotische Proteine reagieren und leichter zugrunde gehen [215]. Da ROS oxidativen Stress bewirken, bildet sich so ein Teufelskreis: Oxidativer Stress beeinträchtigt den Komplex I, ein eingeschränkter Komplex I führt zu erhöhter ROS-Produktion, was wiederum den Komplex I weiter beschädigt [216, 217]. Auch die Mitochondrien-Dynamik wird durch oxidativen Stress beeinträchtigt: Die Fission der Organellen wird erhöht und gefährdet das Zellüberleben [110]. Außerdem bewirken ROS weitere Zellschäden. Bei MP-Patienten konnten erhebliche Anzeichen beschädigter Lipide, Proteine und DNA in der SN festgestellt werden [218, 219]. Interessanterweise konnten auch oxidativ-beschädigte DJ-1 Proteine in Liquor, Blutplasma und im ZNS bei

Patienten mit idiopathischem MP festgestellt werden [220, 221]. Auch die proteasomale Ubiquitinierung, der Proteinabbau und das Glutathion, ein wichtiges Antioxidans, werden durch oxidativen Stress in ihrer Wirksamkeit beeinträchtigt [222, 223]. Da dopaminerge Neurone der SN bekannt dafür sind, eingeschränkte antioxidative Kapazitäten zu haben, sind sie dementsprechend auch anfälliger gegenüber oxidativem Stress, was die Schwelle zum Zelltod deutlich verringert [224].

1.4 Zielsetzung

Die oben genannten multiplen ätiologischen Ansätze zeigen, dass der MP vermutlich keine klar definierte, einseitige Ätiologie hat, sondern eher aus dem Zusammenspiel verschiedener Faktoren resultiert. Aus diesen komplexen Interaktionen leiten sich mehrere pathogene Reaktionen her, einschließlich oxidativen Stresses, Proteinaggregationen, Neuroinflammation, Beeinträchtigung des Proteasoms bzw. des lysosomalen Proteinabbaus und mitochondrialer Dysfunktionen. Eine zentrale Rolle scheinen jedoch der oxidative Stress und ein Funktionsdefizit im Komplex I des Mitochondriums zu spielen. PQ und Rotenon sind zwei weit verbreitete Pestizide, die ihre toxischen Eigenschaften entfalten, indem sie jeweils zu einer ROS-Produktion und einer Komplex-I-Inhibition führen. Darüber hinaus sind diese zwei Pestizide als Risikofaktor für die Entwicklung eines MP identifiziert worden.

Wie weiter oben beschrieben haben Parkin, PINK1 und DJ-1 u.a. die Aufgabe, die Zelle und insbesondere das Mitochondrium vor oxidativem Stress zu schützen. Diese wichtige Aufgabe spiegelt sich in den genetischen Formen des MP wider: Mutationen in den mit MP-verknüpften Genen führen alle zu einer Dysfunktionalität des Mitochondriums.

DJ-1 nimmt hierbei eine ganz besondere Rolle ein. Einerseits schützt es selbst vor oxidativem Stress, andererseits produziert das Protein als Glyoxalase zwei Säuren, die *in vitro* ihre neuroprotektive Wirkung bewährt haben.

Um die Rolle von DJ-1 und die neuroprotektive Wirkung von GS und DL weiter zu erforschen sind weitere Experimente *in vivo* erforderlich. Es stellt sich die Frage, welche Folgen die Abwesenheit von DJ-1 gegenüber einer PQ und Rotenon Exposition, die intrazellulär zu oxidativem Stress durch erhöhte ROS-Produktion und Komplex-I-Inhibition im Mitochondrium führen, haben kann. Weiterhin stellt sich die Frage, ob und wie GS und DL bei der Abwesenheit von DJ-1 einer PQ-Exposition entgegenwirken.

Das Ziel dieser Arbeit ist es im *Djl^{-/-}*-Mausmodell

1. Die Toxizität der Pestizide PQ und Rotenon auf die SNc

und

2. Die neuroprotektive Wirkung von Glycolsäure und D-Laktat auf die SNc

zu testen.

Zur Beurteilung der Toxizität bzw. der Neuroprotektion der Substanzen sind histologische Auswertungen der SNc und die Erfassung der motorischen Fähigkeiten der Tiere von Bedeutung.

2 Material und Methoden

2.1 Mausmodell und Tierhaltung

2.1.1 Ethical Statement

Alle Tierexperimente wurden gemäß den Vorgaben des §11 des Tierschutzgesetzes durchgeführt und von der Regierung Oberbayern genehmigt. (Az: 55.2-1-54-2532-5-16)

2.1.2 Genetische Abstammung

Bei den Tieren handelt es sich um *Dj-1/Park7*-knockout Mäuse vom Typ B6.Cg-Park7tm1Shn/J mit C57BL/6 Hintergrund. Das Mausmodell basiert auf einer Arbeit von Goldberg et al. [164].

Um das *Dj-1*-Gen zu deaktivieren, wurde ein Vektor mittels einer PGK-Neomycin Kassette erstellt. Dieser Vektor hat zum Ziel, das Exon 2 im *Dj-1*-Gen zu löschen und es somit inaktiv zu machen. Das Konstrukt wurde dann mittels der Methode der Elektroporation, die Zellmembranen vorübergehend permeabel macht, in B6/129 F1-abgeleitete MKV6.5 embryonale Stammzellen eingeführt. Erfolgreich klonierte embryonale Stammzellen wurden dann in Blastozysten injiziert. Die hergestellten transgenen Mäuse wurden dann mindestens zwölfmal rückgekreuzt. Nach Lieferung der Mäuse aus dem Jackson Laboratory wurde die Züchtung im Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung (ZNP, Ludwig-Maximilian-Universität München, Deutschland) fortgesetzt.

Diese Mauslinie ist als *in vivo* Modell für Untersuchungen hinsichtlich der Ätiopathogenese der Parkinsonerkrankung gut etabliert.

2.1.3 Tierhaltung

Die Haltung und Züchtung der Mäuse fand im ZNP unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen statt. Die Mausekäfige wurden einmal wöchentlich gewechselt, bei 80°C gereinigt, getrocknet und mit einem Maushaus, frischer Einstreu-, Nest- und Höhlenbaumaterial sowie Nestlets aufbereitet. Nach Sterilisation in einer auf 121 °C erhitzten Autoklave wurden die Käfige wieder in den Tierhaltungsbereich verbracht. Die Haltung der Mäuse erfolgte in THKB-M2V-M Polysulfonkäfigen mit einer Gruppengröße von zwei bis fünf Tieren pro Käfig. Die Käfige hatten eine Bodenfläche von 528 cm² und einen Luftfilter. Die Fütterung der Tiere erfolgte *ad libitum* mit Standardfutter. Mit Schnittwasser (zusammengesetzt aus Leitungswasser und

vollentsalztem Wasser) befüllte, sterilisierte Trinkflaschen standen den Tieren ebenfalls unbegrenzt zur Verfügung. Die Raumtemperatur betrug 21°C und die Luftfeuchtigkeit durchschnittlich ca. 55%. Ein 12h-Zeitschalter für die Beleuchtung im Tag-Nacht-Rhythmus mit Dämmerungsphasen war vorhanden. Der SPF-Status der Tiere wurde vierteljährlich mit Einstreu-Sentinels nach den aktuellen FELASA-Kriterien (Federation of Laboratory Animal Science Associations) geprüft. Die Tiere unterlagen ab der Geburt einem täglichen Monitoring durch entsprechend geschultes Fachpersonal. Die SPF-Tierhaltung in den Tierbarrieren erfolgte ausnahmslos in geschlossenen IVC (individual ventilated cage) Barriersystemen. Personen war der Zutritt nur über Personenschleusen mit geeignetem Gesundheitsnachweis, Nass-Duschen und vollständigem Kleidungswechsel mit Overall, Haube, Mundschutz, Handschuhen und Schuhwechsel gestattet. Versorgungsmaterialien wurden über Durchreichautoklaven oder H2O2-Gasschleusen in die Barrieren geschleust. Ein zentrales, redundantes Lüftungssystem versorgte sowohl die Haltungsräume als auch die IVC-Volumenstromregler mit HEPA-gefilterter (high efficiency particulate air), angewärmter und befeuchteter Zuluft im Überdruck.

2.2 Paraquat Experiment

Verabreichte Chemikalien	Produktbezeichnung/ Katalognummer	Hersteller/Lieferant
Paraquat	36541	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Glycolsäure	124737	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
D-Laktat	71716	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
0,9-prozentige Kochsalzlösung	R8875	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 4: Benutzte Reagenzien im PQ-Versuch.

2.2.1 Versuchsgruppen

In vier Gruppen (n=8 in K1, n=7 in P1, P2 und P3) wurden die Substanzen Paraquat (PQ), Glycolsäure (GS) und D-Laktat (DL) im Vergleich zu einer Vehikellösung getestet

Paraquat	36541	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Glycolsäure	124737	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
D-Laktat	71716	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
0,9-prozentige Kochsalzlösung	R8875	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 4). Um die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit des Experimentes zu gewährleisten, wurden nur Männchen verwendet. Beim Beginn der Behandlung waren die Mäuse zwischen sechs und acht Wochen alt.

2.2.2 Behandlungsplan

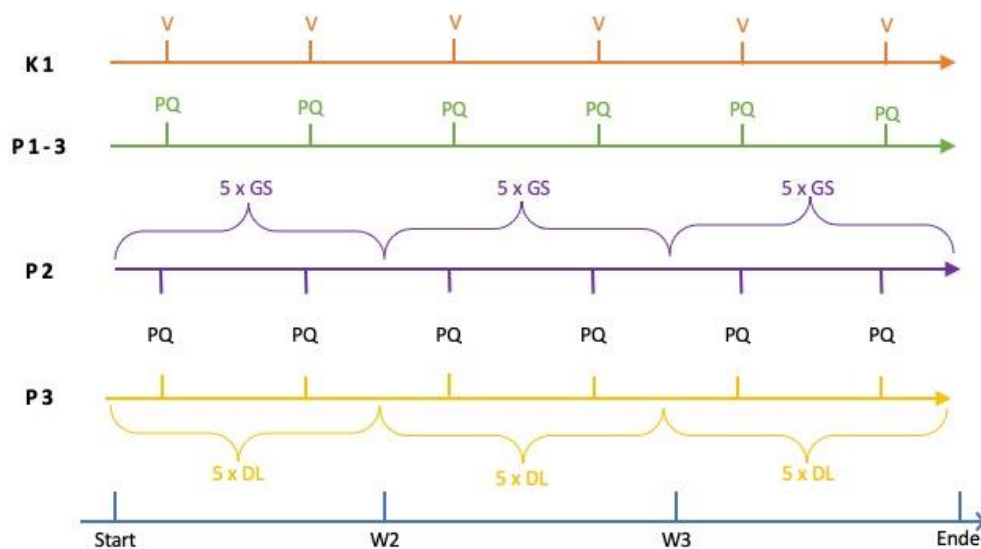


Abbildung 19: Behandlungsplan im Paraquat-Versuch

V = Vehikel; PQ = Paraquat; GS = Glycolsäure; DL = D-Laktat; W = Woche

2.2.2.1 Intraperitoneale Kochsalzlösung-Exposition

Die Vehikelgruppe, hier Gruppe K1, bekam drei Wochen lang zweimal wöchentlich 12,5 μ l einer 0,9-prozentigen isotonischen Kochsalzlösung intraperitoneal (i.p.) gespritzt.

2.2.2.2 Intraperitoneale Paraquat-Exposition

Der Behandlungsplan beruht auf der Arbeit von Jiao et al. [225].

Es wurde eine steril filtrierte Lösung mit einer Endkonzentration von 20 mg PQ pro ml Kochsalzlösung angefertigt. Pro Sitzung wurde den Tieren 10 mg PQ pro kg Körpergewicht (KG) verabreicht, was bei einem geschätzten Gewicht von 25 g 12,5 µl der Lösung entspricht.

Die Gruppen P1, P2 und P3 bekamen im selben Zeitintervall wie die Gruppe K1 die Lösung i.p. gespritzt. Am Ende der dreiwöchigen Exposition hatten die Tiere somit insgesamt 60 mg/kg KG der Substanz injiziert bekommen.

2.2.2.3 Orale Glycolsäure- und D-Laktat-Behandlung

Parallel zur PQ-Exposition bekam Gruppe P2 fünfmal pro Woche GS, Gruppe P3 fünfmal pro Woche DL oral verabreicht. 1,5 mg der jeweiligen Säure wurden in 100 µl destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit 5M NaOH auf 7 neutralisiert. Mittels einer Schlundsonde wurde den Mäusen beider Gruppen 100 µl der jeweiligen Lösung verabreicht. Die Behandlung dauerte vier Wochen und endete einen Tag vor der Perfusion. Bei einem geschätzten Gewicht von 25 g ergab sich ein täglich gegebenes Volumen von 46 mg Säure pro kg KG. Die Tiere der Gruppen K1 und P1 wurden mit 100 µl isotonischer Kochsalzlösung analog behandelt.

2.3 Rotenon Experiment

Verabreichte Chemikalien	Produktbezeichnung/ Katalognummer	Hersteller/Lieferant
4% Carboxymethylcellulose	419273-1KG	Sigma-Aldrich Darmstadt, Deutschland
1,25% Chloroform	C2432-1L	Sigma-Aldrich Darmstadt, Deutschland
Rotenon	R8875	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 5: Benutzte Reagenzien im Rotenon-Versuch

2.3.1 Versuchsgruppen

In zwei Gruppen (n=10) wurde Rotenon im Vergleich zu einer Vehikellösung getestet (Tabelle 5). Für dieses Experiment wurden aus denselben Gründen wie im PQ-Experiment nur männliche Tiere selektiert. Bei Beginn der Exposition waren die Mäuse zwischen 12 und 14 Monate alt.

2.3.2 Behandlungsplan

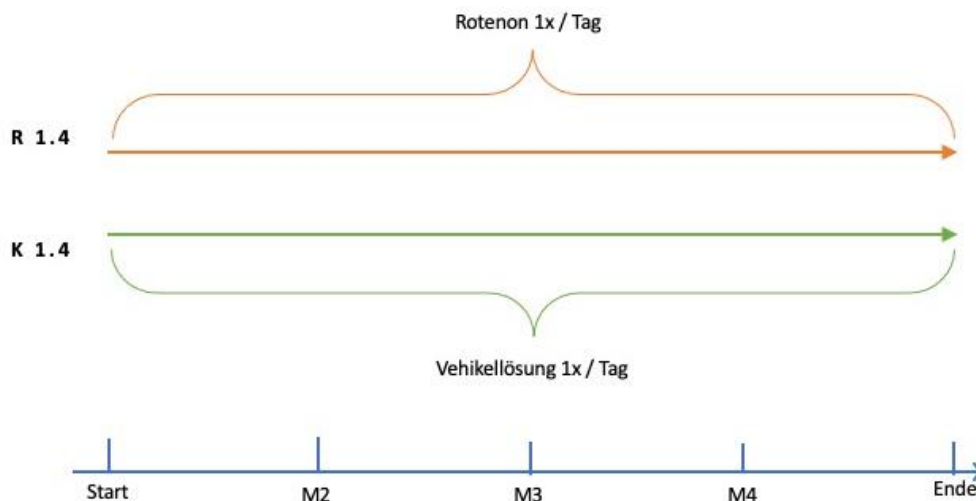


Abbildung 20: Behandlungsplan im Rotenon-Versuch
(M = Monat)

2.3.2.1 Orale Vehikel-Exposition

Jeder Maus der Vehikelgruppe K1.4 wurde täglich über einen Zeitraum von 120 Tagen oral mittels Schlundsonde 0,2 ml Vehikellösung (4% Carboxymethylcellulose, 1,5% Chloroform in Wasser gelöst) verabreicht.

2.3.2.2 Orale Rotenon-Exposition

Der Behandlungsplan beruht auf der Arbeit von Pan-Montojo et al. [226]. Die intragastrale Rotenon-Gabe soll einen natürlichen Expositionsweg nachahmen.

200 µl einer 50 mg/ml Rotenon in Chloroform verdünnten Lösung (Chloroform verhindert die Präzipitation von Rotenon und ermöglicht so eine gleichmäßige Rotenon-Verteilung) wurden in 8 ml 2-prozentiger Carboxymethylcellulose gelöst. 100 µl dieser Lösung wurde den Tieren täglich oral mit einer Schlundsonde über einen Zeitraum von 120 Tage verabreicht, bis einen Tag vor der Perfusion. Somit erhielten die Mäuse 0,125 mg Rotenon pro Tag. Bei einem angenommenen KG von 25 Gramm entspricht die zugeführte Tagesdosis an Rotenon 5mg/kg KG. Am Ende der Exposition hatten die Tiere somit insgesamt 600mg/kg KG der Substanz bekommen.

2.4 RotaRod

Der RotaRod-Lauftest hat sich zur Überprüfung der Korrelation von motorischen Defiziten mit der Größe der neuronalen Schädigungen etabliert [227].

Das RotaRod ist ein Messgerät, welches die motorischen Fähigkeiten und die Koordination der Mäuse untersuchen und quantifizieren kann. Es besteht aus einer rotierenden Walze, auf der die Maus platziert wird. Das Gerät ist mit einem Computer verbunden, mit dessen Hilfe die Geschwindigkeit und die Beschleunigung in Rotationen pro Minute (rpm) der Walze eingestellt werden kann. Mittels einer Lichtschranke wird die Zeit bis zum ersten Herunterfallen der Maus von der rotierenden Walze gemessen (Abbildung 21). Es gibt zwei verschiedene Möglichkeiten, den Lauftest durchzuführen. Entweder werden die Mäuse in separaten Versuchen in einer Reihe an festen Geschwindigkeiten getestet, oder es können Geschwindigkeitserhöhungen in einen einzigen Versuch eingebaut werden. Für diese Arbeit entschieden wir uns für die zweite Möglichkeit.

Der RotaRod-Test wurde jeweils einmal vor und nach den Behandlungen durchgeführt, an drei aufeinanderfolgenden Tagen, drei Mal pro Tag. Die Anfangsgeschwindigkeit des RotaRod betrug 4 rpm. Die Geschwindigkeit wurde um 0,3 rpm pro Sekunde gesteigert, bis die Maus herunterfiel.

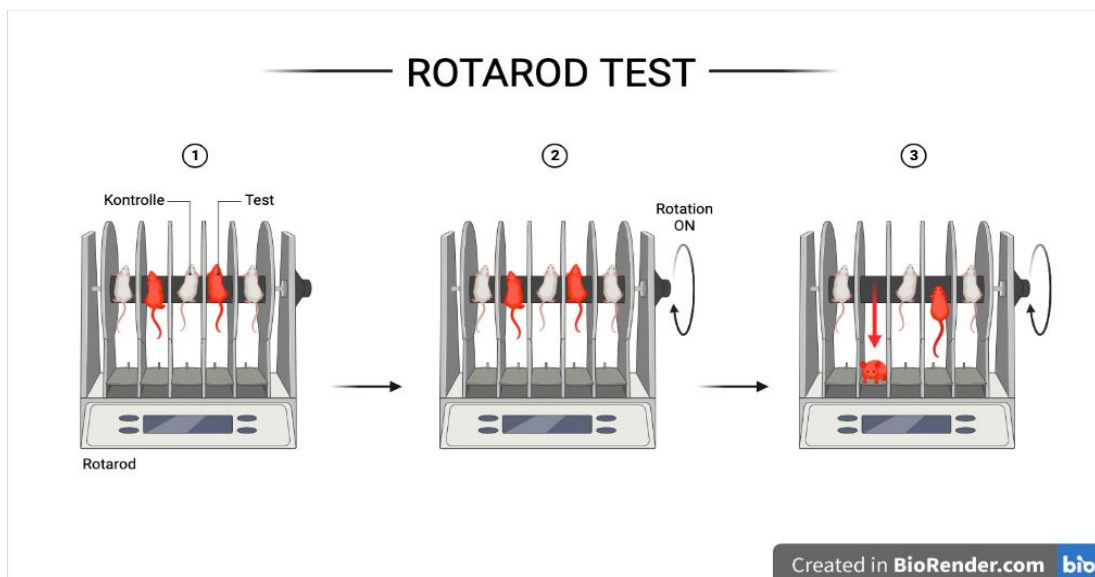


Abbildung 21: RotaRod-Lauftest

Der RotaRod-Lauftest dient der Beurteilung der motorischen Fähigkeiten der Mäuse. Die Tiere werden auf einer rotierenden Walze platziert und es wird die Zeit gemessen, bis die Mäuse von dieser Walze herunterfallen. Das Gerät ist mit einem Computer verbunden, der die Geschwindigkeit der rotierenden Walze erhöhen kann. Der Lauftest wird entweder mit festen Geschwindigkeiten, die in separaten Versuchen gesteigert werden, oder in einem Durchlauf mit integrierten Geschwindigkeitserhöhungen durchgeführt. Die Laufzeiten der behandelten Mäuse werden dann mit denen der Kontrollgruppe verglichen.

2.5 Histologie

Die Präparierung und Färbung der Schnitte erfolgten für beide Experimente in gleicher Art und Weise.

2.5.1 Perfusion

Für die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurden die Tiere einen Tag nach der letzten Behandlung mit Ketamin (100mg/kg KG) und Xylazin (10mg/kg KG) i.p. tief narkotisiert. Bei Verlust des Korneal- und Muskelsehnenreflexes galt die Anästhesie als wirksam und tief genug. Die Tiere wurden anschließend transkardial nach Spülung mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, 0,01M) mit Paraformaldehyd (PFA, 4% in 0,1M PBS) perfundiert. Zuletzt wurden das Gehirn, das Rückenmark und der Darm vorsichtig herauspräpariert und in PFA eingelegt.

2.5.2 Schnittanfertigung

Nachdem die Gehirne 24 Stunden lang in PFA gelagert wurden, verbrachten sie jeweils nacheinander 24 Stunden in PBS, in 15-prozentiger Sucrose-Lösung und zuletzt in 30-prozentiger Sucrose-Lösung bei 4°C, um sie auf die Einfrierung vorzubereiten.

Die Gehirne wurden anschließend mittels flüssigen Stickstoffes schockgefroren und in Kühlschränken bei -80°C gelagert.

Die Schnittanfertigung erfolgte mit einem Schlittenmikrotom. Die 40 µm breiten Schnitte wurden in ein mit selbstgemachtem Freezing Medium (50% PBS, 25% Ethylenglycol, 25% Glycerol) gefüllten 96er Well Plate transferiert und im Kühlschrank bei -20°C gelagert.

2.5.3 Immunhistochemie

2.5.3.1 Tyrosin-Hydroxylase

Das Ziel der Färbung war, die dopaminergen Neurone der SNc darzustellen. In dieser Arbeit wurde dafür die intraneuronale Tyrosin-Hydroxylase (TH) mittels Immunofärbung dargestellt. Die TH katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionsschritt bei der Biosynthese von Katecholaminen: die Umwandlung von Tyrosin in L-Dopa [228]. Das Enzym ist somit direkt mit der Entstehung des Dopaminmangels in der SNc beim MP in Beziehung zu setzen (Abbildung 22). Bei Säugetieren ist die TH im zentralen Nervensystem weit verbreitet [229, 230].

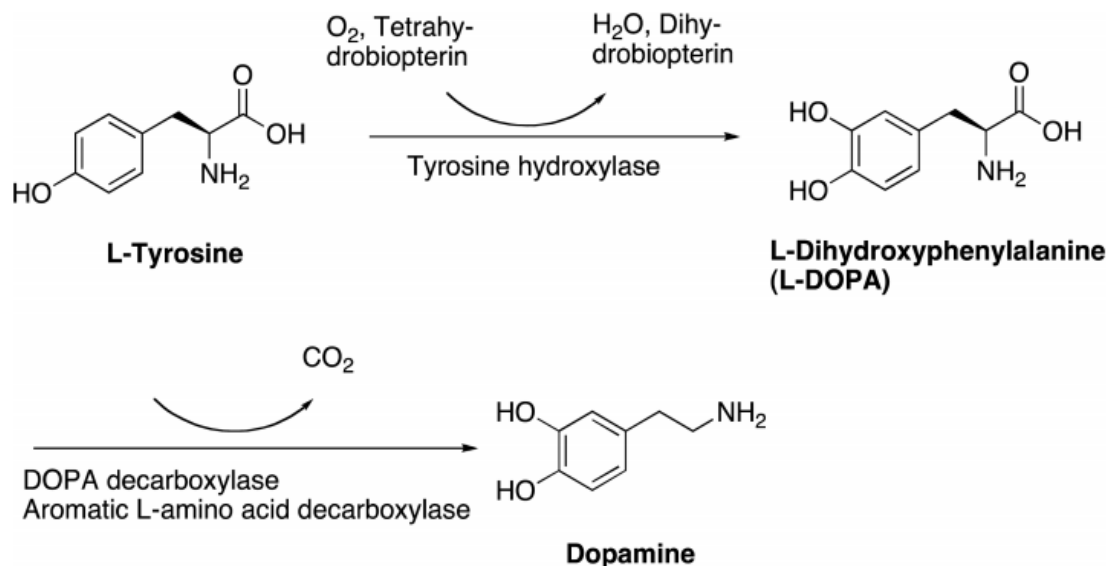


Abbildung 22: Redox-Reaktion der Bildung von Dopamin aus der Aminosäure L-Tyrosin (übernommen von Tabrez et. al) [111]

2.5.3.2 Färbung

Es wurde jeder sechste Gehirnschnitt gefärbt. Zuerst wurden die Schnitte dreimal für jeweils zehn Minuten in PBS gereinigt und anschließend weiterhin für eine Stunde in Blocking Solution (5% Donkey Serum, 0,05% Triton, in PBS gelöst) auf die Färbung vorbereitet. Triton wirkt hier als Detergens und hilft, Membranproteine in ihrer nativen Konformation aus der Zellmembran herauszulösen. Das Donkey-Serum blockiert die Fc-Rezeptoren von unspezifisch bindenden Antikörpern in beliebigen Geweben, die gefärbt werden sollen. Somit kommt der Primär-Antikörper leichter an die TH und kann ihn spezifischer binden. Währenddessen wurde das Primär-Antikörper, Sheep-anti-TH, in einer Lösung mit Blocking Solution zu 1:1500 verdünnt. In dieser Lösung verbrachten die Schnitte eine Stunde bei Raumtemperatur und mindestens zwölf Stunden bei 4°C . Am nächsten Tag wurden die Schnitte nach demselben Protokoll wieder in PBS gereinigt und für drei Stunden in einer Lösung aus Blocking Solution und Sekundär-Antikörper, Donkey-anti-sheep IgG, mit einer Verdünnung von 1:500 eingebettet. Dabei wurden die Well-Plates in Aluminiumfolie eingepackt, da der Sekundär-Antikörper lichtempfindlich ist. Zum Abschluss wurden die Schnitte ein letztes Mal wie bekannt mit PBS gereinigt. Während der ganzen Färbung waren die Schnitte auf einem Schüttelgerät immer in Bewegung.

Zuletzt wurden die Schnitte in anatomischer Reihenfolge auf Objektträger montiert, im Dunkeln luftgetrocknet, mit Polyvinylalkohol (Mowiol®) fixiert und anschließend kühl gelagert.

2.6 Auswertung

Die mikroskopische Auswertung beider Experimente erfolgte nach schon bekanntem und etabliertem Prinzip [200, 231, 232]. Die Auswertung wurde verblindet durchgeführt. Für die Auswertung wurde ein Fluoreszenz-Mikroskop mit integrierter Kamera verwendet. Die Zellzählung erfolgte bei 10-facher Vergrößerung mit einem speziellen Computerprogramm (Stereo Investigator®). Es wurden für jedes Gehirn jeweils alle sichtbaren dopaminergen Neurone der SNc gezählt, was ungefähr bei fünf bis sechs Schnitten je nach Gehirngröße der Fall war. Nachdem man die SNc markiert hatte, die Schnittdicke und das Schnittintervall (hier jeder 6. Schnitt des Gehirns) angegeben hatte, gab das Programm bestimmte quadratische Areale vor, in denen man alle sichtbar gefärbten, dopaminergen Neurone manuell markieren musste. Nachdem man alle Schnitte mit sichtbarer SNc gezählt hatte, berechnete das Programm die Anzahl an dopaminergen Neuronen für das gesamte Gehirn mit der Formel:

$$N = \sum Q \cdot \frac{t}{h} \cdot \frac{1}{asf} \cdot \frac{1}{ssf}$$

Wobei N die geschätzte Summe an Neuronen, Q die Anzahl an gezählten Abschnitten, t die Schnittdicke, h die Höhe des optischen Dissektors, asf (area sampling fraction) der Anteil der Flächenstichprobe und ssf (section sampling fraction) der Anteil der Schnittstichprobe ist.

2.7 Statistik

Alle statistischen Tests sowie das Erstellen der Diagramme wurden mit dem Programm Prism 5.0 (Graph Pad, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Mit Hilfe des „Shapiro Wilk Tests“ wurden die Daten auf Normalverteilung überprüft und anschließend eine Varianzanalyse mittels „One-way ANOVA“ und „Dunn’s multiple comparisonstest“ oder „Two-way ANOVA“ durchgeführt. Die Daten wurden immer mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes (engl. Standard Error of the Mean; \pm S.E.M) präsentiert. Das Signifikanzniveau wurde folgendermaßen angegeben: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; n. s.= nicht signifikant.

2.8 Material

	Produktbezeichnung/ Katalognummer	Hersteller/Lieferant
Tiere		
<i>Dj-1/Park7</i> knockout Maus	006577	The Jackson Laboratory Bar Harbor, USA
Chemikalien		
Paraquat	36541	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Glycolsäure	124737	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
D-Laktat	71716	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Rotenon	R8875	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Normal Donkey Serum	017-000-121	Jackson Immunoresearch Labs Inc. Baltimore, USA
Triton X-100	X100-100ml	Sigma-Aldrich Darmstadt, Deutschland
Sucrose	84100-1KG	Sigma-Aldrich Darmstadt, Deutschland
PBS (10x, pH 7,4)	P5493-4L	Sigma-Aldrich Darmstadt, Deutschland
Mowiol 4-88	81381-250G	Sigma-Aldrich Darmstadt, Deutschland
2-Methylbutan	M32631-1L	Sigma-Aldrich

ReagentPlus		Darmstadt, Deutschland
Flüssiger Stickstoff		Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung
Carboxymethylcellulose	419273-1KG	Sigma-Aldrich Darmstadt, Deutschland
Chloroform	C2432-1L	Sigma-Aldrich Darmstadt, Deutschland
Trockeneis		Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung
Ethylenglykol	324558-1L	Sigma-Aldrich Darmstadt, Deutschland
Glycerol	G5516-1L	Sigma-Aldrich Darmstadt, Deutschland
Roti-Histofix 4% (phosphatgepufferte Formaldehydlösung, PFA)	P087.3	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Antikörper		
Anti-Tyrosinhydroxylase Antikörper	P60-101-150	Pel-Freez Rogers, USA
Alexa Fluor 488 Donkey anti-sheep IgG	A-11015	Thermo Fisher Scientific Waltham, USA
Materialien		
Schlundsonde	A3	Unimed, Lausanne, Schweiz

Multiwellplatte CELLSTAR□ 12 Well	665102	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Multischalen CELLSTAR□ 24 Well	MU24	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Netwell-Inserts 15 mm	3478	Corning Inc. Corning, USA
Nunc 96-Well Mikro- Titerplatten	163320	Thermo Fisher Scientific Waltham, USA
Serologische Pipetten 10 ml CELLSTAR	607180	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Microliter Pipetten 0,5-10 µl	3125663	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Microliter Pipetten 20-200 µl	1687215	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Microliter Pipetten 100- 1000 µl	3219153	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 100-1000 µl	PSBI	A. Hartenstein GmbH Würzburg, Deutschland
Pipettenspitzen 5-200 µl	PSGI	A. Hartenstein GmbH Würzburg, Deutschland
Pipettenspitzen 0,5-10 µl	PSK	A. Hartenstein GmbH Würzburg, Deutschland

Reaktionsgefäß mit Deckel 2,0 ml	RK2G	A. Hartenstein GmbH Würzburg, Deutschland
Pinsel da Vinci	1570	Da Vinci GmbH Nürnberg, Deutschland
Aluminiumfolie	AF30	A. Hartenstein GmbH Würzburg, Deutschland
Objektträger	OTMM	A. Hartenstein GmbH Würzburg, Deutschland
Deckgläser	DK50	A. Hartenstein GmbH Würzburg, Deutschland
Röhrchen CELLSTAR 15 ml	188261	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Röhrchen CELLSTAR 50 ml	227270	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Skalpellklinge Größe 23	1110923	Heinz Herenz Hamburg, Deutschland
Tissue-Tek O.C.T Compound	4583	Sakura Finetek Europe B.V. Alphenaan den Rijn, Niederlande
Vernichtungsbeutel	VB20	A. Hartenstein GmbH Würzburg, Deutschland
Parafilm	PF10	A. Hartenstein GmbH Würzburg, Deutschland

Geräte

Schüttelgerät Unimax 1010	543-12310-00	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG Schwabach, Deutschland
Magnetrührer Hei-Standard	505-20000-00	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG Schwabach, Deutschland
Timer	TR118	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Kühlschrank	FKU 1800	Liebherr GmbH Biberach an der Riß, Deutschland
Laborschüttler Vortex Genie 2	SI-0236	Scientific Industries Inc. New-York, USA
Waage	CP2202S-0CE	Sartorius AG Göttingen, Deutschland
Thermometer ThermoJack PRO	5020-0552	Dostmann Electronic GmbH Wertheim-Reicholzheim, Deutschland
Millipore Anlage	Milli-Q IQ 700	Merck Millipore Darmstadt, Deutschland
Schlittenmikrotom SM2010 R	14050842258	Leica Microsystems CMS GmbH Wetzlar, Deutschland
Messer 22cm Profil c Stahl	14021607116	Leica Microsystems CMS GmbH Wetzlar, Deutschland

Messerhalter SN	14050844670	Leica Microsystems CMS GmbH Wetzlar, Deutschland
Trockeneiswanne	14050842641	Leica Microsystems CMS GmbH Wetzlar, Deutschland
Zentrifuge 5804 R	5805000017	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Fluoreszenzstereomikroskop MZ10 F	10450588	Leica Microsystems CMS GmbH Wetzlar, Deutschland
Inverted System Mikroskop	IX50	Olympus Corporation Tokyo, Japan
Fluoreszenzmikroskop DM6000 FS	11888928	Leica Microsystems CMS GmbH Wetzlar, Deutschland
Perfusionsmaschine Perfusion Two Automated Perfusion Inst.	39471005	Leica Microsystems CMS GmbH Wetzlar, Deutschland
RotaRod (aufgrund von Defekt ersetzt)	3375-0	TSE Systems GmbH Bad Homburg, Deutschland
Neues RotaRod	3375-5	TSE Systems GmbH Bad Homburg, Deutschland

Computerprogramme

Prism 5.0	GraphPad Software Inc. La Jolla, USA
Microsoft Office 365	Microsoft Redmont, USA
EndNote X8	Alfasoft Limited

	Luton Bedfordshire, Großbritannien
Cell^F	Olympus Soft Imaging GmbH Münster, Deutschland
Stereo Investigator 10.52	MBF Bioscience Williston, USA
Adobe Photoshop	Adobe Inc. San Jose, USA
Fiji/ ImageJ	Nationale Institute of Health Bethesda, USA

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Tiere, Materialien, Reagenzien, Geräte und Programme

3 Ergebnisse

3.1 Effekte von Paraquat, Glycolsäure und D-Laktat im *Dj-1^{-/-}*-Mausmodell

In dieser Versuchsreihe wurden einerseits die Toxizität von Paraquat und andererseits die neuroprotektiven Eigenschaften von Glycolsäure und D-Laktat im *Dj-1^{-/-}*-Mausmodell untersucht.

Verglichen wurden vier Versuchsgruppen mit jeweils verschiedenen Behandlungsschemata (siehe 2.2.2). Die intraperitoneale Exposition mit der Vehikellösung und Paraquat erfolgte drei Wochen lang, zweimal pro Woche. Gleichzeitig erfolgte in den Gruppen P2 und P3 die orale Behandlung mit jeweils GS und DL fünfmal pro Woche. Um die Auswirkung der Substanzen auf die dopaminergen Neurone der SNc beurteilen zu können, wurden histologische Schnitte der SNc angefertigt und anschließend anhand einer Immunofärbung gegen TH gefärbt, sodass eine stereotaktische Auswertung am Mikroskop erfolgen konnte.

3.1.1 Paraquat führt zu einem Zelltod der dopaminergen Neurone in der SNc

Der signifikante Abfall der Anzahl an dopaminergen Neuronen in der Gruppe P1 im Vergleich zur Gruppe K1 bestätigt die Toxizität von PQ auf dopaminerge Neurone der SNc (Abbildung 23).

Auch bei Begutachtung der Zellzahlen, beziehungsweise ihrer normierten Werte, ist der Unterschied an TH-positiven Neuronen eindeutig: Die Differenz beträgt ca. 22 Prozent (Tabelle 7).

	$\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$ der Zellzahl Gruppe K1	$\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$ der Zellzahl Gruppe P1
	10993,7 \pm 810,3	8563,7 \pm 352
Prozentualer Anteil	100%	77,9%

Tabelle 7: Vergleich der Zellzahlen zwischen der Vehikel- und der PQ-Gruppe

Zudem ist die Toxizität von PQ gegenüber dopaminergen Neuronen der SNc durch die am Fluoreszenzmikroskop aufgenommenen Bilder zu sehen (Abbildung 24): Im

Vergleich zur Gruppe K1 (a) zeigt die SNc der Gruppe P1 (b) weniger TH-positive Neurone.

3.1.2 Glycolsäure und D-Laktat schützen Neurone der SNc vor dem Zelltod

Im Vergleich zur Gruppe K1 zeigten die Tiere der Gruppen P2 und P3, die neben einer PQ-Exposition mit GS und DL mitbehandelt wurden, statistisch keinen signifikanten Unterschied in der dopaminergen Zellzahl der SNc (Abbildung 23). Diese Ergebnisse bekräftigen die Behauptung, dass GS und DL vor einer Neurotoxizität gegenüber PQ schützen könnten. Statistisch gesehen konnte kein signifikanter Unterschied in der Zellzahl zwischen einer Behandlung mit GS und einer Behandlung mit DL festgestellt werden, sodass behauptet werden könnte, dass beide Substanzen denselben „Rettungseffekt“ auf die Neurone der SNc haben. Im prozentualen Vergleich der Gruppen-Mittelwerte zeigte sich ein deutlicher, jedoch statistisch nicht signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen: Die Differenz zwischen der Gruppe K1 und der Gruppe P2 lag bei 12, wobei die Gruppe P3 nur einen Unterschied von 3 % zur Gruppe K1 zeigte (Tabelle 8).

	Gruppe K1	Gruppe P2 (PQ + GS)	Gruppe P3 (PQ + DL)
$\bar{x} \pm \text{S.E.M. Zellzahl}$	10993,7 \pm 810,3	9757,7 \pm 1074,2	10683 \pm 652,5
Prozentualer Anteil	100%	88,7%	97,1%

Tabelle 8: Vergleich der Zellzahlen zwischen den Gruppen K1, P2 und P3

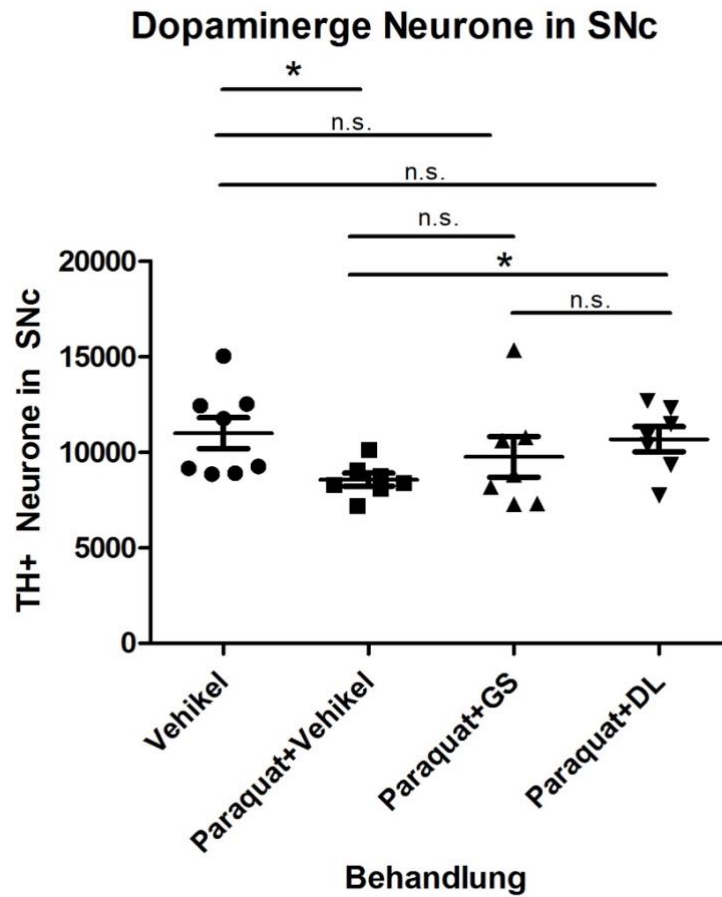


Abbildung 23: PQ-Versuch: Anzahl dopaminerge Neurone der SNc im *Dj-1^{-/-}*-Mausmodell
 Darstellung der Auswirkung einer PQ-Toxizität und der neuroprotektiven Wirkung von GS und DL auf die Anzahl dopaminerge Neurone der SNc im *Dj-1^{-/-}*-Mausmodell. (* = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant, Darstellung mit Mittelwert und S.E.M.)

Auch in den mikroskopischen Aufnahmen ist zu sehen, dass die abgebildeten Schnitte der SNc der mit GS und DL mitbehandelten Gruppen sich im Vergleich zur Gruppe K1 nicht unterscheiden, obwohl der Unterschied zur Gruppe P1 markant ist (Abbildung 24).

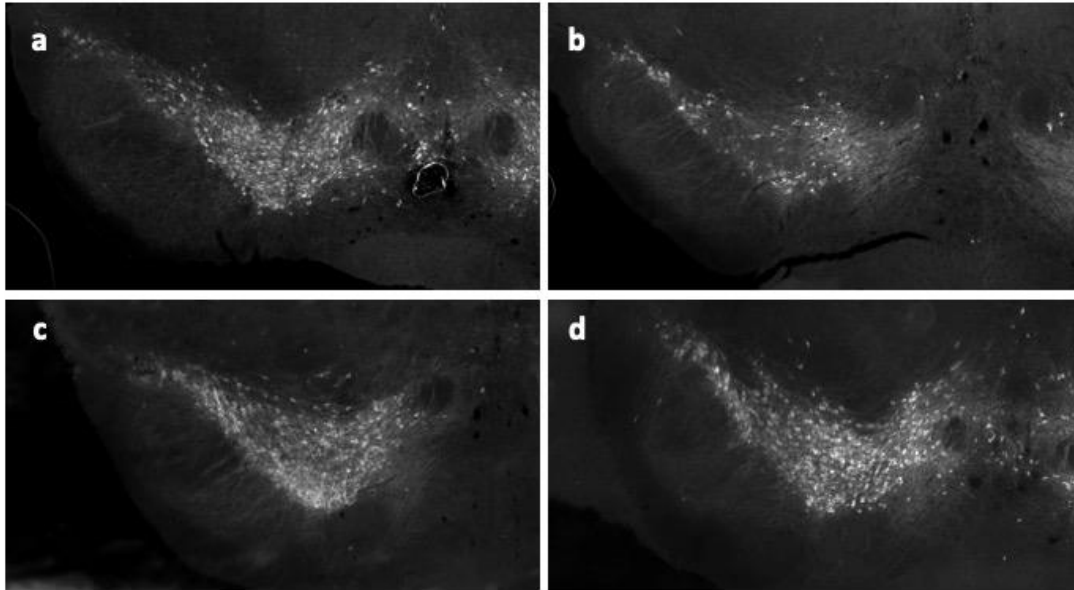


Abbildung 24: Schnittbilder der SNc von *Dj-1^{-/-}*-Mäusen

Mikroskopische Aufnahmen der SNc von der Vehikel- (a), PQ- (b), PQ+GS- (c) und PQ+DL-Gruppe (d). Immunofärbung gegen TH.

Zusammengefasst führt PQ zu einer Neurodegeneration der SNc im *Dj-1^{-/-}*-Mausmodell. Eine Ko-Behandlung mit GS oder DL scheint einer durch PQ ausgelösten Neurodegeneration entgegenzuwirken.

3.2 Effekte von oral appliziertem Rotenon im *Dj-1^{-/-}*-Mausmodell

Pan-Montojo et al. zeigten, dass eine viermonatige orale Rotenon-Exposition bei Wildtyp-Mäusen die topographische Progression des MP nachahmen konnte. In diesem Versuch wurde die Wirkung von oral appliziertem Rotenon auf die dopaminergen Neurone der SNc im *Dj-1^{-/-}* Mausmodell untersucht.

Zuerst wurde eine Vehikelgruppe (K1.4) mit einer mit Rotenon (R1.4) behandelten Gruppe verglichen. Über einen Zeitraum von vier Monaten bekamen die Tiere, je nach ihrer Gruppenangehörigkeit, täglich entweder eine Rotenon-Lösung (mit Chloroform und Carboxymethylcellulose gelöst, siehe 2.3.2.2) oder eine auf Carboxymethylcellulose und Chloroform basierende Vehikellösung verabreicht. Analog zum PQ-Versuch wurden hier histologische Schnitte angefertigt, die Neurone der SNc mittels Immunofärbung gegen TH gefärbt und stereotaktisch ausgezählt.

Im Laufe der Exposition starben in der Gruppe K1.4 eine und in der Gruppe R1.4 drei Mäuse, sodass für die stereotaktische Auszählung der Neurone insgesamt 16 anstatt 20 geplante Mäuse zur Verfügung standen.

3.2.1 Rotenon führt nicht zum Zelltod dopaminerger Neurone der SNc

Statistisch konnte kein signifikanter Unterschied in der Neuronenzahl zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (Abbildung 25).

Prozentual zeigten die mit Rotenon behandelten Mäuse sogar eine höhere Anzahl an dopaminergen Neuronen in der SNc (ca. 35 % mehr), als die Mäuse der Vehikelgruppe (Tabelle 9).

Bei genauerer Betrachtung der Daten fiel auf, dass im Vergleich zu vorausgegangenen Experimenten mit oraler Rotenon-Verabreichung die Zellzahl der dopaminergen Neurone der SNc nicht in der erwarteten Spannbreite lag [200, 226]. Aus vorausgegangenen Experimenten und aus diesem PQ-Experiment (Abbildung 23) ist bekannt, dass die erwartete Zellzahl an dopaminergen Neuronen in der SNc von unbehandelten Mäusen bei ungefähr 10000-12000 liegen sollte. In diesem Experiment lag der Mittelwert der Neuronen in der SNc bei den Mäusen der Gruppe K1.4 bei circa 8000 (Tabelle 9; Abbildung 25), was einem Unterschied von mindestens 20 Prozent zur erwarteten „normalen“ Zellzahl entspricht.

	Gruppe K1.4	Gruppe R1.4
$\bar{x} \pm \text{S.E.M. Zellzahl}$	8035,4 \pm 877,3	10877,6 \pm 820,9
Prozentualer Anteil	100 %	135,3%

Tabelle 9: Vergleich der Zellzahlen zwischen der Vehikel- und der Rotenon-Gruppe

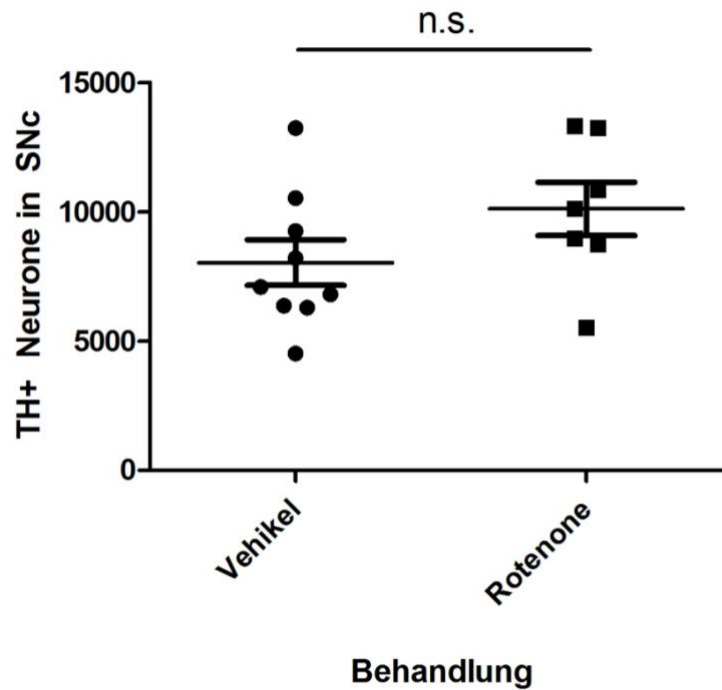


Abbildung 25 : Rotenon-Versuch: Anzahl dopaminerger Neurone der SNc im *Dj-1^{-/-}*-Mausmodell
 Darstellung der Auswirkung einer Rotenon-Toxizität auf die Anzahl dopaminerger Neurone der SNc im *Dj-1^{-/-}*-Mausmodell. (n.s. = nicht signifikant, Darstellung mit Mittelwert und S.E.M.)

3.2.2 Der Vergleich mit unbehandelten Kontrollmäusen ergibt keinen weiteren Aufschluss.

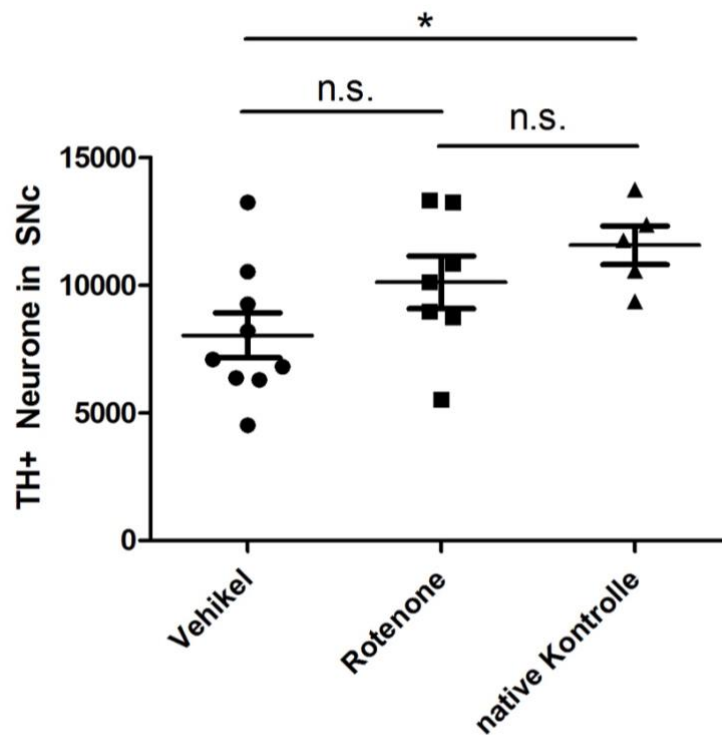
Zum weiteren Verständnis dieser unerwarteten Ergebnisse wurde sich für das Einschleusen einer Kontrollgruppe ohne Behandlungseingriff entschieden. Diese sogenannte K0 Kontrollgruppe bestand aus fünf nicht behandelten, gleichaltrigen *Dj-1^{-/-}*-Mäusen.

	Gruppe K1.4	Gruppe R1.4	Gruppe K0
$\bar{x} \pm \text{S.E.M. Zellzahl}$	8035,4 \pm 877,3	10877,6 \pm 820,9	11562,6 \pm 750,8
Prozentualer Anteil	100 %	135,3 %	143,8 %

Tabelle 10: Vergleich der Zellzahlen zwischen der Vehikel-, der Rotenon- und der Kontrollgruppe

Die mittlere Zellzahl an TH-positiven Neuronen der SNc in der K0-Kontrollgruppe zeigte sich im Normbereich. Mit einem statistisch signifikanten Unterschied von ca. 43 Prozent zur Gruppe K1 bestätigte dieses Ergebnis die stark abweichende, unerwartete Zellzahl dieser Gruppe (Tabelle 10).

Bemerkenswert ist zusätzlich der Fakt, dass die unbehandelten Tiere im Vergleich zu den mit oralem Rotenon behandelten Mäusen keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl an TH-positiven Neuronen zeigten (Abbildung 26).



Behandlung

Abbildung 26: Rotenon-Versuch: Vergleich mit nativer Kontrollgruppe der Zellzahl dopaminerger Neurone der SNc im *Dj-1^{-/-}*-Mausmodell

Darstellung der Auswirkung einer Rotenon-Toxizität auf die Anzahl dopaminerger Neurone der SNc im *Dj-1^{-/-}*-Mausmodell mit Vergleich einer nativen Kontrollgruppe. (* = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant, Darstellung mit Mittelwert und S.E.M.)

Zusammengefasst zeigte sich bei *Dj-1^{-/-}*-Mäusen keine signifikante Neurodegeneration nach einer vier-monatigen Exposition gegenüber oralem Rotenon. Die Einschleusung einer Kontrollgruppe ergab keinen weiteren Aufschluss darüber, warum die Zellzahl an dopaminergen Neuronen der SNc in der Vehikelgruppe sich unerwartet niedrig zeigte.

3.3 Effekte von Paraquat, Glycolsäure, D-Laktat und Rotenon auf die motorischen Fähigkeiten im *Dj-1^{-/-}*-Mausmodell

Der Verlust an dopaminergen Neuronen im Rahmen eines MP führt beim Menschen und beim Tier zu einer Beeinträchtigung der motorischen und koordinativen Fähigkeiten [30]. Um festzustellen, ob die histologisch beobachtete Neurodegeneration der SNc mit einer

motorischen Beeinträchtigung korreliert, wurde bei den Tieren ein RotaRod-Lauftest durchgeführt.

Aufgrund eines Defekts der Maschine musste diese während der laufenden Behandlungszeit des Rotenon-Experiments mit einem neuen RotaRod ersetzt werden. Die Aufzeichnung der Laufzeiten vor und nach der Exposition gegenüber Rotenon musste mit zwei verschiedenen Geräten erfolgen. Die Laufzeiten der Mäuse des Versuches mit PQ, GS und DL wurden vor und nach der Behandlung mit dem neuen Gerät aufgezeichnet.

3.3.1 Eine Exposition gegenüber Paraquat, Glycolsäure und D-Laktat führt nicht zur Verschlechterung der Laufzeiten

In keiner der vier Behandlungsgruppen konnte ein signifikanter Unterschied in den Laufzeiten vor und nach der Exposition beobachtet werden (Abbildung 27).

Ein erster Überblick zeigt keinen signifikanten Unterschied der Laufzeiten in den Gruppen K1, P2 und P3. Eine Verschlechterung der Laufzeiten in der Gruppe P1, korrelierend zur histologisch festgestellten Neurodegeneration der SNc, konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.

Bei genauer Betrachtung der Laufzeiten zeigte sich außerdem in allen Gruppen, unabhängig der Aufnahmezeit, ein Mittelwert von über 100 Sekunden, was im Vergleich zu unter ähnlichen Bedingungen erhobenen Laufzeiten als länger eingestuft werden kann (Abbildung 27). Die in vorangegangenen Experimenten beschriebene durchschnittliche Laufzeit bei gesunden Mäusen lag bei etwa 50 Sekunden.

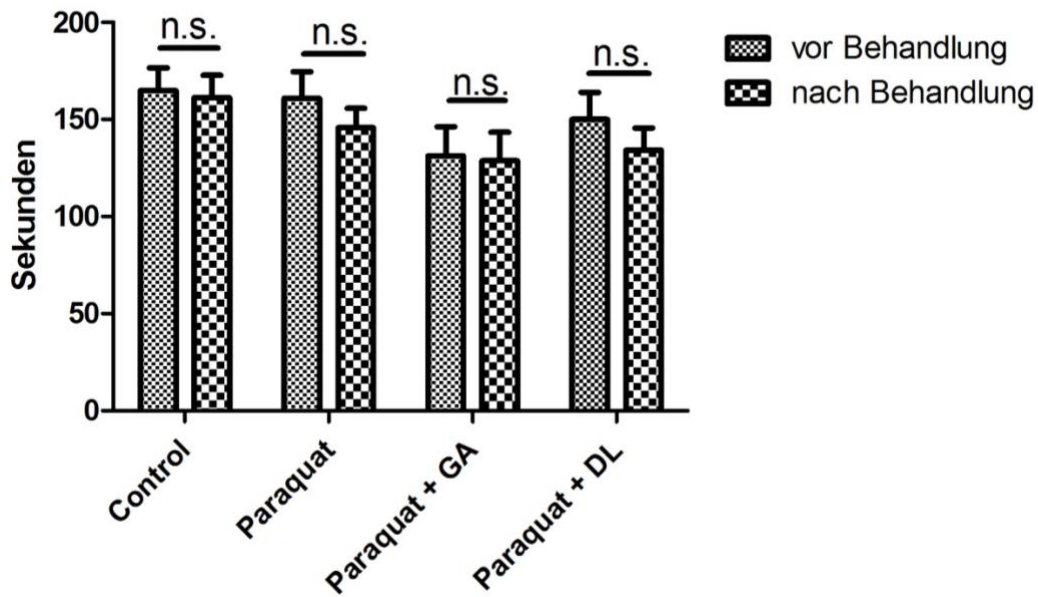


Abbildung 27: PQ-Versuch: Laufzeiten der Mäuse auf dem RotaRod

Es ist kein Unterschied in den Laufzeiten der Mäuse vor und nach der Behandlung zu erkennen. Zudem sind die mittleren Zeiten alle auf über 100 Sekunden erhöht. (n.s. = nicht signifikant)

3.3.2 Eine Exposition gegenüber oraler Vehikellösung oder oralem Rotenon führt zur Verlängerung der Laufzeiten

Im Rotenon-Experiment erfolgte die Aufzeichnung der Laufzeiten vor und nach der Exposition, aufgrund eines Defektes im ersten Gerät, mit zwei verschiedenen RotaRod-Systemen.

Unabhängig von der Gruppenangehörigkeit fielen die Laufzeiten nach der Exposition signifikant länger aus als jene vor der Exposition (Abbildung 28).

Im Gegensatz zum Versuch mit PQ, GS und DL (Abbildung 27) entsprachen die Laufzeiten vor der Exposition, die mit dem ersten RotaRod aufgezeichnet wurden, mit circa 50 Sekunden in beiden Gruppen der Erwartung.

Wie in Abbildung 28 zu sehen, waren die Werte nach der Exposition deutlich höher als zuvor. Auch hier ist im Vergleich zu Vorexperimenten eine Laufzeit von fast 100 Sekunden nicht normal.

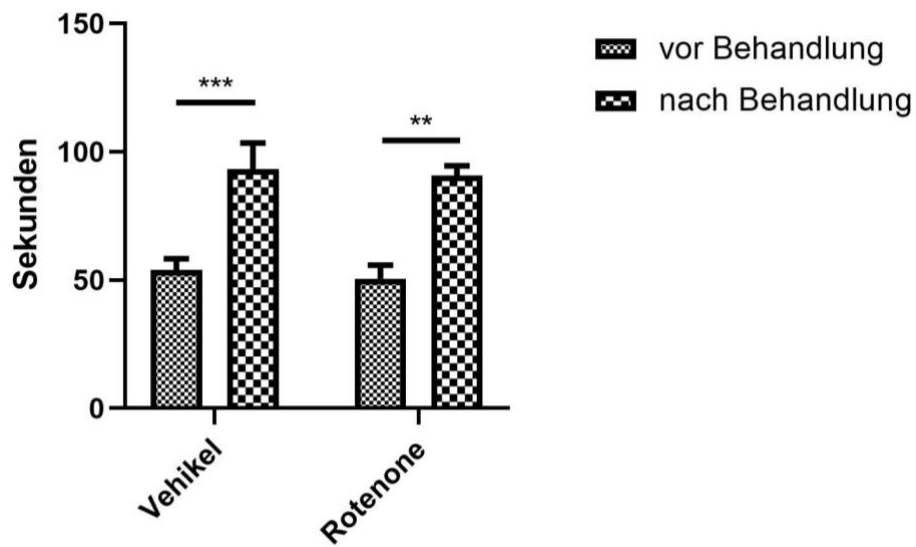


Abbildung 28: Rotenon-Versuch: Laufzeiten der Mäuse auf dem RotaRod

Es zeigt sich, unabhängig der Gruppenangehörigkeit, eine deutlich erhöhte Laufzeit nach der Exposition als davor. (** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$)

4 Diskussion

Ein zentraler Ansatz in der Forschung der noch unzureichend geklärten Ätiologie des MP ist die des oxidativen Stresses als mitwirkender Faktor der Neurodegeneration. Das Protein DJ-1, das bei ca. 1 Prozent der EOPD-Fälle als mutiert beschrieben wurde, übt neuroprotektive Funktionen im Mitochondrium aus, indem es einerseits selbst gegen oxidativen Stress schützt und andererseits als Glyoxalase zwei Säuren produziert, welche *in vitro* ihren Schutz gegen eine PQ-Toxizität bewährt haben [131, 144, 151, 155]. Ziel dieser Arbeit war, zum einen die Neurotoxizität von Paraquat und Rotenon, die auf zellulärer Ebene durch erhöhte ROS-Produktion und Komplex-I-Inhibition oxidativen Stress verursachen, zum anderen die neuroprotektive Wirkung von Glycolsäure und D-Laktat, den beiden Produkten der Glyoxalase, in Abwesenheit von DJ-1 *in vivo* zu untersuchen. Hierfür wurden *Dj-1^{-/-}*-Mäuse nach verschiedenen Protokollen mit PQ, Rotenon, GS und DL behandelt. Anschließend wurden Schnittbilder der SNc angefertigt und histologisch untersucht. Zudem wurden zur Beurteilung der motorischen Fähigkeiten der Tiere deren Laufzeiten mittels RotaRod aufgenommen. Es zeigte sich bei alleiniger Exposition gegenüber PQ eine signifikante Zellzahlminderung im Vergleich zur Vehikelgruppe. Eine gleichzeitige Behandlung mit GS oder DL konnte den Zelluntergang jedoch minimieren, sodass kein signifikanter Unterschied der Zellzahl mit der der Vehikelgruppe festzustellen war. Im Rotenon-Experiment zeigten die mit Rotenon behandelten *D-1^{-/-}*-Mäuse eine tendenziell höhere Zellzahl als die Mäuse der Vehikelgruppe, die jedoch kein Signifikanzniveau erreichte. Bei der histologischen Auswertung einer Kontrollgruppe, bestehend aus gleichaltrigen *Dj-1^{-/-}*-Mäusen, wurde kein signifikanter Unterschied zu den mit Rotenon behandelten Tieren, dafür aber eine signifikant höhere Zellzahl als in der Vehikelgruppe festgestellt. Im PQ-Experiment konnte bei den mit dem RotaRod aufgezeichneten Laufzeiten kein signifikanter Unterschied vor und nach den Behandlungen beobachtet werden. Im Rotenon-Experiment fielen die Laufzeiten nach der Exposition für beide Gruppen signifikant länger aus als vor der Exposition.

4.1 Das *Dj1^{-/-}*-Mausmodell

Bei der benutzten Mauslinie handelt es sich um *Dj-1/Park7*-knockout-Mäuse vom Typ B6.Cg-Park7tm1Shn/J mit C57BL/6 Hintergrund. Das transgene Mausmodell basiert auf einer Arbeit von Goldberg et al. [164]. Ferner ist es als *in vivo* Modell für Untersuchungen hinsichtlich der Ätiopathogenese des MP gut etabliert, sodass eine Vergleichbarkeit

dieser Experimente mit vorangegangenen und parallellaufenden Studien gegeben war. Um die Reliabilität der Experimente zu gewährleisten, wurden nur Mäuse männlichen Geschlechts und innerhalb der Versuchsreihe gleichen Alters selektiert.

Der *Dj-1*^{-/-}-Genotyp zeigt im *in vivo*-Modell bekanntlich weder eine dopaminerge Neurodegeneration, noch motorische Defizite, und dies unabhängig vom Alter des Tieres [233]. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass das Alter der Mäuse bei Beginn des Versuches keinen Einfluss auf die Ergebnisse hat. Die Wahl des unterschiedlichen Alters der Mäuse des Paraquat- und des Rotenon-Experiments wurde aus Praktikabilitätsgründen getroffen. Beide Versuche waren Teil einer größeren Versuchsreihe, in der parallel, unter exakt denselben Bedingungen, andere Genotypen getestet wurden.

Da dieses Mausmodell keine nigrostriatale Pathologie zeigt, ist es für die Erforschung von möglicherweise auf molekularer Ebene ablaufenden, frühen pathologischen Veränderungen vorteilhaft. Die fehlende nigrostriatale Degeneration kann aber auch als nachteilig gesehen werden: So eignet sich dieses Mausmodell allein nicht zur Testung potenziell erkrankungsmodifizierender Therapien [233].

Oxidativer Stress spielt, wie oben schon beschrieben, in der Ätiopathogenese des MP möglicherweise eine wichtige Rolle. Kim et al. zeigten, dass DJ-1 *in vivo* vor oxidativem Stress schützt. Zusätzlich zeigte die Forschungsgruppe, dass die Sensibilität gegenüber oxidativem Stress, in dem Fall mit MPTP ausgelöst, bei Neuronen von *Dj-1*^{-/-}-Mäusen gesteigert ist [234].

Des Weiteren spielt auch die Glyoxalase-Funktion von DJ-1 eine wichtige Rolle in diesem *in vivo* Modell. So konnte im Rahmen dieser Dissertation gleichzeitig getestet werden, ob eine exogene Zufuhr von GS und DL, zwei Säuren, die in geringen Mengen auch endogen produziert werden, verstärkt gegen oxidativen Stress schützt.

4.2 Paraquat-Toxizität bei *DJ-1*-Funktionsverlustmutation

Paraquat ist ein weit verbreitetes Herbizid, welches aufgrund seiner Fähigkeiten, durch massiven oxidativen Stress sowohl eine lokale, dopaminerge Neurodegeneration der SNc, als auch α -Synuklein-Aggregationen und entsprechende motorische Beeinträchtigungen auszulösen, als Toxin-Modell in der MP-Forschung eingesetzt wird [186]. Zusätzlich wurde eine signifikante Korrelation zwischen einer Exposition mit PQ und dem Auftreten eines MP beschrieben [178], sodass die Nutzung des Pestizids als Toxin-Modell in der

MP-Forschung umso empfehlenswerter ist, weil eine PQ-Exposition unter natürlichen Bedingungen plausibel ist.

Ferner ist PQ für das Mitochondrium schädlich: Es vermindert das Membranpotential, entkoppelt die oxidative Phosphorylierung und führt somit zu einer erhöhten ROS-Bildung und einer drastischen Senkung der ATP-Produktion [188]. Ferner stimuliert PQ die NADPH-Oxidase-Aktivität. Dieses Enzym katalysiert die Produktion von Superoxidanionen, eine Form von ROS, indem es ein Elektron von NADPH auf Sauerstoff überträgt. Einerseits wird somit die Menge der Energiequelle NADPH vermindert, andererseits trägt dies zur Auslösung und Erhaltung einer chronischen, neuroinflammatorischen Antwort bei, und somit auch zu oxidativem Stress [235].

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass PQ im *Dj-1^{-/-}*-Mausmodell eine Degeneration dopaminerger Neurone in der SNc auslöst.

Wie weiter oben beschrieben sind DJ-1 verschiedene Schutzfunktionen gegenüber oxidativem Stress zugeschrieben. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass ein Verlust von DJ-1 zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber oxidativem Stress und folglich zum Zelltod führte [161, 162]. Somit liegt die Überlegung nahe, dass Mäuse mit funktionslosem Gen empfindlicher gegenüber oxidativem Stress reagieren würden und bei einer PQ-Exposition eine stärkere Neurodegeneration als WT-Mäuse zeigen würden.

Tatsächlich zeigt der Vergleich dieser Ergebnisse mit den Ergebnissen, die Frau Theresa Straßl im Laufe ihrer Dissertation die unter denselben Bedingungen die Toxizität von PQ in der SNc von WT-Mäusen untersuchte, erzielt hat, dass in beiden Fällen der Verlust an Neuronen, im Vergleich zur entsprechenden Vehikelgruppe, ca. 25 % betrug und somit keinen signifikanten Unterschied ergab (Abbildung 29; Tabelle 11).

Ein Vergleich der Zellzahlen der Vehikelgruppen, bei denen auch kein signifikanter Unterschied auftrat, bestätigt außerdem die Aussage, dass eine *DJ-1*-Mutation allein, wie in 4.1 besprochen, keine Neurodegeneration bewirkt (Abbildung 29). Ein funktionsloses DJ-1 scheint somit keine signifikant stärkere Neurodegeneration zu bewirken. Somit lässt sich weiter behaupten, dass das Fehlen eines funktionstüchtigen DJ-1-Protein keine Verschlechterung der Neurodegeneration bedeutet. Daraus ergibt sich jedoch die Frage der Rolle von DJ-1 im Schutz gegen oxidativen Stress. Diese Ergebnisse legen nahe, dass DJ-1 im „nativen“ Zustand keine große Rolle spielt (Tabelle 11, Abbildung 29).

	WT-Mäuse	<i>Dj-1^{-/-}</i> -Mäuse
\bar{x} Zellzahlen K1 Gruppe	9444,67 100 %	10993,75 100 %
\bar{x} Zellzahlen P1 Gruppe	7024,5 74,4 %	8563,71429 77,9 %

Tabelle 11: Vergleich der Zellzahlen vor und nach PQ-Exposition im WT und *Dj-1^{-/-}*-Mausmodell

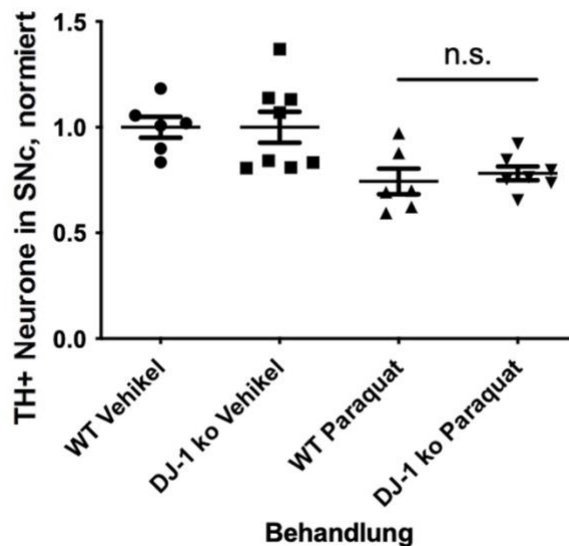


Abbildung 29: Vergleich der Anzahl dopaminerge Neurone der SNc zwischen Wildtyp (WT)- und *Dj-1^{-/-}*-Mäusen bei PQ-Exposition.

Zum besseren Verständnis und Vergleich wurden die Zellzahlen der SNc normiert. Es ist kein signifikanter Unterschied in der Zellzahl zwischen beider Genotypen nach PQ Exposition zu erkennen. Daraus lässt sich schließen, dass eine *DJ-1* Mutation allein weder zu einer Neurodegeneration führt noch bei PQ-Exposition eine stärkere Neurodegeneration auslöst. (n.s. = nicht signifikant, Darstellung mit Mittelwert und S.E.M., statistische Verfahren siehe Abschnitt 2.7)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde PQ intraperitoneal verabreicht, jedoch spiegelt dieser Applikationsweg nicht den häufigsten Expositionsweg wider. Da PQ als Pestizid benutzt wird, wird es am ehesten inhaliert oder versehentlich verschluckt. Eine orale Gabe von PQ bei WT-Mäusen zeigte einen Verlust dopaminerge Neurone in der SNc, motorische Beeinträchtigungen sowie verminderte Dopaminspiegel im Striatum [236]. In Anbetracht der Annahme, dass die für einen MP typische Pathologie zuerst im PNS, genauer gesagt im ENS und im Bulbus olfactorius beginnt, und möglicherweise als Folge einer oralen oder nasalen Exposition gegenüber einer neurotoxischen Substanz, wie zum Beispiel PQ,

ihren Lauf nimmt, hätte die orale Applikation von PQ einem natürlicheren Expositionsweg entsprochen.

4.3 Neuroprotektive Eigenschaften von GS und DL bei *DJ-1*-Funktionsverlustmutation

DJ-1 wird unter anderem eine Funktion als Glyoxalase zugeschrieben, welche Glyoxal und Methylglyoxal, zwei an der Bildung von ROS beteiligte Oxalate, in Glycolsäure und D-Laktat umwandelt [149]. Toyoda et al. konnten zeigen, dass GS und DL *in vitro* einerseits für die Aufrechterhaltung der Struktur, Funktion und des Membranpotentials des Mitochondriums bei Stress durch Austrocknung erforderlich sind, und andererseits dopaminerge Neurone vor einer PQ-Toxizität schützen können [151]. Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass auch *in vivo* die orale Zugabe von GS und DL eine durch PQ ausgelöste Neurotoxizität entgegenwirken konnte. Interessanterweise zeigte sich nur in der mit DL ko-behandelten Gruppe P3 ein signifikanter Unterschied zur PQ-Gruppe, was sich auch beim Vergleich der mittleren Zellzahlen zwischen mit GS und DL behandelten und unbehandelten Tieren widerspiegelt: Die Gruppe P3 zeigte einen Abfall von 3 % im Vergleich zur Gruppe K1 - im Gegensatz zur mit GS ko-behandelten Gruppe P2, die einen Verlust von mehr als 10 % aufwies (Tabelle 8).

Auch im WT-Versuch erzielten die mit DL behandelten Mäuse bessere Ergebnisse ($p < 0,001$) als die mit GS-behandelten Mäuse ($p < 0,01$). (Die Versuche wurden durch Frau Theresa Straßl im Rahmen ihrer Promotion durchgeführt, die Ergebnisse werden hier nicht dargestellt.)

Im Vergleich zu den WT-Mäusen ist die Rettung von dopaminergen Neuronen durch GS und DL bei *Dj-1*^{-/-}-Mäusen schlechter und bei DL sogar signifikant schlechter gewesen (Abbildung 30). Anhand dieses Vergleiches könnte man behaupten, dass nicht nur die zwei produzierten Säuren allein für die Neuroprotektion verantwortlich sind, sondern auch andere Funktionen von DJ-1, wie z. B. die Eliminierung von ROS an der äußeren Membran des Mitochondriums oder die Regulation von verschiedenen zellschützenden Transkriptionsfaktoren.

Es ist bekannt, dass ein DJ-1-Funktionsverlust zu einer veränderten Kalzium-Homöostase führt [237]. Dopaminerge Neurone der SNc zeigen, im Gegensatz zu den meisten anderen Neuronen des ZNS, eine geregelte, autonome Schrittmacher-Aktivität, die neben anderen Ionen auch mit Kalzium gesteuert wird [238]. Aufgrund der Beteiligung von Kalzium an

zahlreichen zellulären Prozessen ist der Elektrolyt unter strenger homöostatischer Kontrolle: Mit einer intrazellulären Konzentration von 100 nM ist diese 10000-mal niedriger als die extrazelluläre Kalzium-Konzentration [239, 240]. Beim Eindringen von Kalzium in das Neuron wird Kalzium entweder durch die Plasmamembran rücktransportiert oder schnell in das Mitochondrium oder endoplasmatische Retikulum aufgenommen. Beide Prozesse erfordern einen hohen energetischen Aufwand in Form von ATP, was zu einer hohen Belastung für das Mitochondrium führt [241]. Es konnte gezeigt werden, dass diese erhöhte mitochondriale Aktivität sogar zu einer gesteigerten Bildung oxidativer Stressoren für das Mitochondrium dopaminergener Neurone der SNc führte [242].

So scheint es also, dass eine erhöhte intrazelluläre Kalzium-Konzentration eine weitere Ursache für die Beeinträchtigung einer normalen Mitochondrienfunktion sein könnte, was wiederum bekanntermaßen mit dem Zelltod dopaminergener Neurone einhergeht. Die Auswirkungen von GS und DL auf das intrazelluläre Kalzium könnten so, zumindest zum Teil, ihre neuroprotektive Eigenschaft erklären.

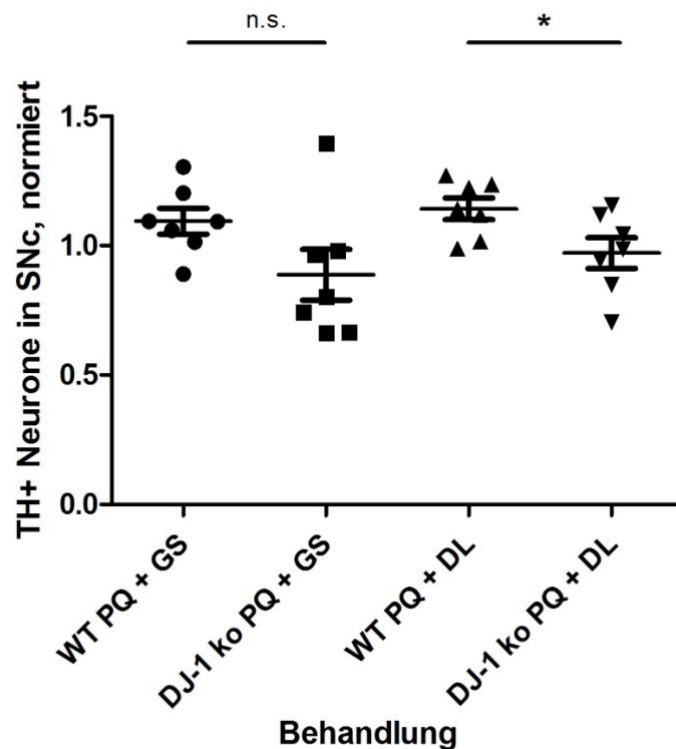


Abbildung 30: Vergleich der Anzahl dopaminerge Neurone der SNc zwischen Wildtyp (WT)- und *Dj-1*^{-/-}-Mäusen bei PQ-Exposition und Ko-Behandlung mit GS und DL

Darstellung der normierten Zellzahlen der SNc. Es ist bei der Ko-Behandlung mit GS kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen zu erkennen. Dagegen ist bei Ko-Behandlung mit DL die Zellzahl der SNc im WT-Mausmodell signifikant höher. (* = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant, Darstellung mit Mittelwert und S.E.M., statistische Auswertung siehe Abschnitt 2.7)

Obwohl GS und DL offensichtlich durch die Glyoxalase gebildet werden können, scheint die endogene Konzentration nicht ausreichend zu sein, um neuroprotektiv zu wirken. In der Tat zeigte eine Studie, dass *in vitro* DJ-1 eine nur geringe Aktivität der Glyoxalase zeigt und die Menge an produziertem GS und DL so gering war, dass sie nicht nachweisbar waren [243].

Dr. rer. nat. Reinhard Oertel (TU Dresden) konnte auch bei WT-Mäusen keine nachweisbare Konzentration an GS und DL feststellen (Tabelle 12), was ein weiterer Hinweis darauf ist, dass die gegenwärtigen endogenen Konzentrationen an GS und DL nicht genügen, um allein eine Neuroprotektion zu gewährleisten.

	Serumkonzentration GS	Serumkonzentration DL
Wildtyp-Maus	<1,0 µg/ml	<2,0 µg/ml

Tabelle 12: Serumkonzentrationen an GS und DL im WT-Mausmodell (übernommen von Dr. rer. nat. Oertel)

Herzlichen Dank an Dr. rer. nat. Reinhard Oertel für die Zuverfügungstellung der Daten.

Daraus ergibt sich die Fragestellung, warum derart potente Wirkstoffe, die nachweislich gegen einen Zelltod dopaminerger Neurone in der SNc schützen, bei Säugetieren nicht in größeren Mengen gebildet werden.

Caenorhabditis elegans ist ein Fadenwurm aus der Gruppe der Rhabditiden. Dieser Wurm wird in der Forschung vor allem im Stadium der Dauerlarve benutzt, ein festgefahrenes Stadium, welches bekanntlich unter ungünstigen Bedingungen überleben kann. Erkut et al. zeigten, dass die *C. elegans* Dauerlarve resistent gegen starke Austrocknung ist [244]. Unter den observierten Schutzmechanismen, die für das Überleben der Dauerlarve unter einer starken Austrocknung nötig waren, zeigte sich die Hochregulierung der Glyoxalase-Gene *djr-1.2* und *glod-4* [150]. Interessanterweise konnte bei der *C. elegans* unter Austrocknungsstress keine messbare Konzentration an GS und DL nachgewiesen werden, obwohl bei mutierten *C. elegans* Dauerlarven, welchen das *djr1.1/djr1.2* und *glod.4* Gen fehlte, die Überlebensfähigkeit einer schweren Austrocknung oder einer Paraquat-Toxizität, durch Gabe von GS und DL, verbessert werden konnte [151].

Im Gegensatz zur *C. elegans* wurde keine Hochregulierung von *DJ-1* im Säugetier-Modell beobachtet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass im Laufe der Evolution die Fähigkeit, dieses Gen hochzuregulieren, verloren wurde. Trotz der Unfähigkeit, *DJ-1* hochzuregulieren, zeigen uns sowohl die Ergebnisse dieser Dissertation als auch bei *in vitro*-Versuchen und bei Schlaganfall-Mausmodellen beobachtete Ergebnisse, dass GS und DL ihre neuroprotektiven Eigenschaften beibehalten haben [151, 245].

Der Wirkungsmechanismus von GS und DL ist jedoch nach wie vor nicht einheitlich geklärt. Toyoda et al. zeigten *in vitro*, dass GS und DL für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials des Mitochondriums erforderlich ist [151]. Bour et al. zeigten weiterhin, dass GS und DL auch durch die Verringerung der intrazellulären Kalzium-Konzentration ihre Wirkung ausüben. Interessanterweise ließ sich für GS ein weiterer Wirkungsmechanismus beobachten: eine erhöhte, wahrscheinlich mitochondriale NAD(P)H-Produktion [246]. NAD(P)H ist der Hauptregulator des zellulären Redoxpotentials und spielt eine entscheidende Rolle in der Wirkung verschiedener antioxidativer Systeme, wie z. B. als Kofaktor bei der Reduktion von Glutathiondisulfid (GSSG) zu Glutathion (GSH) und somit bei der GSH-Regeneration, welche für den Schutz der Zelle gegen oxidativen Stress unerlässlich ist. Auch eine andere Studie konnte die Auswirkung von GS auf NAD(P)H und GSH beobachten: Bei der Gabe von GS

konnten die schädlichen Auswirkungen von Wasserstoffperoxid, welches unter anderem auch durch PQ gebildet wird, vollständig unterdrückt werden, indem es die Verhältnisse des verringerten NAD(P)H/NADP⁺ und GSH/GSSG verbesserte [247].

Auch in einem Schlaganfall-Mausmodell zeigten Chovsepian et al., dass GS einem Zelltod entgegenwirkte, indem es hier auch die intrazelluläre Kalzium-Konzentration niedrig hielt [245].

Abschließend, in Anbetracht aller Ergebnisse, liegt der Schluss nahe, dass GS und DL ihre neuroprotektive Aktivität vor allem zum Schutz der Funktionalität des Mitochondriums ausüben. Weitere Studien zum Verständnis der genauen Wirkmechanismen dieser Säuren, mit Fokus sowohl auf die Kalzium-Homöostase als auch auf die Verbesserung der Verhältnisse von NAD(P)H/NADP⁺ und GSH/GSSG bei dopaminergen Neuronen der SNc, sind zum besseren Verständnis der Funktion von DJ-1 und der Ätiopathogenese des MP notwendig.

4.4 Rotenon-Toxizität bei *DJ-1*-Funktionsverlustmutation

Das Pestizid Rotenon wurde zuerst von Betarbet et al. als neues *in vivo*, auf einem Toxin basierenden Parkinson-Modell beschrieben [197]. Neben der in anderen toxischen Modellen auch vorhandenen selektiven Degeneration dopaminergener Neurone der SNc und der klassischen motorischen Symptomatik zeigte das Rotenon-Modell als erstes an LB erinnernde zytoplasmatische Einschlüsse. Rotenon übt seine toxische Wirkung aus, indem es im Mitochondrium den Komplex I der Atmungskette blockiert und folglich zu einem massiven oxidativen Stress für die Zelle führt. Weiterhin ist Rotenon - wie PQ - als Pestizid ein für die Begünstigung der Entstehung von MP bekannter Risikofaktor, was seine Nutzung als Toxin-Modell, vor allem bei einer den natürlichen Intoxikationsweg nachahmenden oralen Zufuhr des Pestizids, sinnvoll macht.

Das im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Rotenon-Experiment im *Dj-1*^{-/-}-Mausmodell führte nicht zu den erwarteten Ergebnissen. Tatsächlich zeigten die mit Rotenon behandelten Tiere eine im Durchschnitt höhere Zellzahl als die mit einer Vehikellösung behandelten Tiere. Im Vergleich zu den Zellzahlen der SNc aus anderen Versuchen, die ebenfalls mit dieser Vehikellösung durchgeführt wurden, fiel die Neuronenzahl der Vehikelgruppe sogar niedriger aus.

Aufgrund dieser unerwarteten Ergebnisse wurde sich für die Einschleusung einer Kontrollgruppe, die aus gleichaltrigen, männlichen *Dj-1*^{-/-}-Mäuse bestand, entschieden.

Hier zeigte sich die mittlere Zellzahl der SNc in der erwarteten Norm und somit signifikant höher als die der Vehikelgruppe, was weiterhin überraschend war. Für diese unerwarteten Ergebnisse können verschiedene Ursachen verantwortlich sein.

Zunächst stellt sich die Frage, warum die durchschnittliche Neuronenzahl in der Vehikelgruppe niedriger als erwartet war. Die Mäuse dieser Gruppe wurden täglich mit einer Vehikellösung, zusammengesetzt aus Carboxymethylcellulose und in Wasser gelöstem Chloroform, über einen Zeitraum von 120 Tagen behandelt.

Einerseits könnte die stereologische Zählung der dopaminergen Neurone der SNc aufgrund einer fehlgeschlagenen Färbung falsch niedrig ausgefallen sein: Bei einer geschwächten, aber noch funktionierenden Aktivität der TH ist die Wahrscheinlichkeit, dass das Neuron durch die entsprechende Immunofärbung angefärbt wird, niedriger. Somit könnte eine Anzahl an dopaminergen Neuronen der SNc, obwohl sie noch funktionstüchtig sind und Dopamin produzieren, nicht angefärbt worden sein.

Weiterhin könnte das Ergebnis der Zählung aufgrund einer verminderten Anzahl an Schnitten der SNc in der Gruppe K1.4 im Vergleich zu den Gruppen R1.4 und K0 niedrig ausgefallen sein. Jede Anfertigung und Auswertung der Schnitte erfolgte nach einer standardisierten Methode (siehe 2.5). Bei jedem Tier wurden fünf bis sechs Schnitte der SNc ausgewertet (siehe Abb. 31), sodass die Ergebnisse innerhalb der Gruppen vergleichbar waren. Eine verminderte Anzahl an Neuronen der SNc pro Schnitt kann somit aber nicht sicher ausgeschlossen werden. Dieser unvorhersehbare Zufall könnte auch erklären, warum die Kontrollgruppe K0 eine signifikant höhere Zellzahl im Vergleich zur Vehikelgruppe zeigt. Ferner zeigt die Kontrollgruppe K0 eine höhere Zellzahl, auch wenn nicht signifikant, als die mit Rotenon behandelte Gruppe K1.4. Dieses Ergebnis könnte zu der Hypothese führen, dass die geringe Anzahl an Neuronen dazu beigetragen haben könnte, den vollständigen Effekt von Rotenon zu beeinträchtigen.

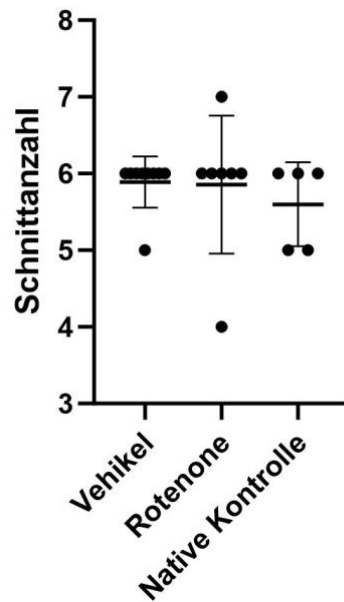


Abbildung 31: Anzahl der ausgewerteten SNc-Schnitte im Rotenon-Experiment

Der Mittelwert liegt in allen drei Gruppen zwischen fünf und sechs Schnitten pro Maus. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in den Mittelwerten der drei Gruppen.

Andererseits könnte das Lösungsmittel Chloroform für die reduzierte Zellzahl verantwortlich sein. Vom im 19. Jahrhundert erstmalig in der Medizin zur „schmerzfreien“ Geburt angewendeten Chloroform wurde schnell aufgrund eines hohen hepato- und zentralnervös-toxischen Potenzials wieder Abstand genommen [248]. Dazu ist eine kanzerogene Wirkung von Chloroform bei Mäusen und Ratten nachgewiesen, sodass man folglich an eine, zum Teil auch tödlich endende, Intoxikation der Mäuse mit Chloroform denken kann [249, 250]. Allerdings wurde Chloroform als Lösungsmittel in anderen Rotenon-Versuchsreihen, z. B. von Frau Magdalena Fischer bei *Lrrk2*^{-/-}-Mäusen und bei Herrn Constantinos Hadjistyllis und Herrn Francisco Pan-Montojo bei WT-Mäusen, benutzt und erzielte normwertige Zellzahlen in den Vehikelgruppen. Der einzige nennenswerte Unterschied zwischen diesen und den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen ist somit der Genotyp der untersuchten Tiere, sodass die Überlegung nahe liegt, dass ein DJ-1-Funktionsverlust einen Einfluss auf die Wirkung der Vehikellösung haben könnte. Eine Literaturrecherche über eine mögliche veränderte Wirkung von Chloroform bei *Dj-1*^{-/-} *in vivo* oder *in vitro* Modellen blieb erfolglos. Eine Versuchsreihe zur Bestätigung oder Widerlegung dieser Hypothese wäre angebracht.

Darüber hinaus stellt sich die Frage, warum die gewünschte Neurodegeneration in der SNc der mit Rotenon behandelten *Dj-1*^{-/-}-Mäuse fehlgeschlagen ist.

Zum einen könnte eine zu geringe Konzentration an Rotenon in Bezug auf das Gewicht der Mäuse ursächlich gewesen sein. In unserem Versuch basierte die tägliche Konzentration von 5 mg/kg KG an Rotenon-Lösung auf einem Gewicht von 25 g, sodass die Tiere, bei einer Versuchsdauer von 120 Tagen, eine Gesamtdosis von 600 mg/kg KG erhielten. Dennoch wurde in vorausgegangenen Experimenten bei einer Rotenon-Konzentration von 5 oder 10 mg/kg KG eine Gewichtszunahme der Mäuse beschrieben [199]. Wenn man eine Gewichtszunahme über den Zeitraum der Behandlung annimmt, verringert sich die Gesamtkonzentration pro kg KG deutlich: Bei einem Unterschied im KG von 5 g ändert sich die Gesamtkonzentration von 600 auf 500 mg/kg KG, was einem Unterschied von ca. 17 Prozent entspricht. Bei einer Maus mit einem Gewicht von 32 g sinkt die Gesamtkonzentration sogar um über 20 Prozent. Somit ist die tägliche Dosis von 5 mg/kg KG bei einer auch nur geringen Gewichtszunahme nicht mehr gewährleistet. Miyazaki et al. zeigten, dass auch eine Konzentration von < 5 mg/kg KG zu einem Abfall der dopaminergen Neurone in der SNc und motorischen Defiziten führen kann, allerdings bei subkutaner Applikation des Pestizids [251]. Diese Erkenntnisse lassen den möglichen Schluss zu, dass bei oraler Applikation des Pestizids, aufgrund einer erschwerten Resorption über die Darmschleimhaut, höhere Dosen als bei subkutaner oder intraperitonealer Verabreichung benötigt werden, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

Zum anderen könnte also der gewählte Applikationsweg für die fehlgeschlagene Neurodegeneration ursächlich sein. Eine Forschungsgruppe erzielte eine signifikante Verringerung der Anzahl an dopaminergen Neuronen der SNc bei oraler Applikation von Rotenon, allerdings war die gewählte Konzentration an Rotenon von 30 mg/kg KG wesentlich höher als in dieser Arbeit [199]. Interessanterweise zeigte sich in dieser Studie bei einer täglichen Rotenon-Konzentration von 10 mg/kg KG der Verlust an TH-positiven Neuronen in der SNc unter den behandelten Mäusen hoch variabel, sodass nahe liegt, dass dies bei einer noch geringeren Konzentration, wie z. B. 5mg/kg KG, auch der Fall sein könnte.

Auch im Rahmen dieser Arbeit war die Variabilität hoch: In der Rotenon-Gruppe zeigte sich eine Standardabweichung von ca. 10 %. Diese Variabilität der Neurodegeneration als Antwort auf eine Exposition gegenüber Rotenon wurde schon mehrmals dokumentiert [197, 198, 252-256]. Auch eine Variabilität in der anatomischen Lage der Neurodegeneration wurde festgestellt: So zeigten manche Tiere einen Zellverlust im Striatum und keinen in der SNc [197, 257]. Für diese Arbeit wurde nur die SNc

ausgewertet, sodass eine mögliche lokale Degeneration der Neuronen des Striatums übersehen wurde.

Ein Vorteil des Rotenon-Toxinmodells ist die Bildung von LB, welche α -Synuklein und Ubiquitin beinhalten. Pan-Montojo et al. zeigten, dass nach einer dreimonatigen oralen Rotenon-Exposition eine Akkumulierung an α -Synuklein in der SNc festzustellen war [200]. Da im Rahmen dieser Dissertation die histologischen Schnitte der SNc nur gegen TH-positive Neuronen gefärbt wurden, wurden mögliche α -Synuklein Akkumulierungen übersehen.

Zusammenfassend hätte eine Erhöhung der Rotenon-Dosis, eine Vergrößerung der Stichprobe, eine histologische Auswertung weiterer anatomischer Regionen oder eine Durchführung einer α -Synuklein-Immunofärbung der SNc gegebenenfalls bessere Ergebnisse im Sinne einer nachweisbaren Neurodegeneration oder Zeichen einer beginnenden MP-Pathologie erzielen können.

Jedoch wurde durch Pan-Montojo et al. gezeigt, dass eine intragastrale Rotenon-Gabe bei WT-Mäusen in einer Konzentration von 5 mg/kg KG eine Nachahmung der pathologischen Stadien des MP bewirkt. Es zeigte sich nach einer dreimonatigen oralen Exposition gegenüber Rotenon eine Degeneration dopaminerger Neurone in der SNc [200]. Auch bei einem parallellaufenden Experiment, in Kooperation mit der Masaryk-Universität in Brünn (Tschechien), hat Herr Constantinos Hadjistyllis zeigen können, dass eine viermonatige orale Exposition gegenüber Rotenon in derselben Konzentration zu einem signifikanten Zelluntergang ($p = 0,02$; Ergebnisse nicht gezeigt) bei WT-Mäusen führte. Es lässt sich also daraus schließen, dass die Methodik, also der Applikationsweg und die Konzentration, ihre Wirkung bei WT-Mäusen bewiesen haben [226]. Erneut ist der einzige charakteristische Unterschied zwischen diesen und dem vorliegenden Versuch der gewählte Genotyp der Mäuse. Schlussfolgernd lässt sich daraus sagen, dass eine *DJ-1*-Mutation einen Einfluss auf die Wirkung von Rotenon haben könnte. Es ist bekannt, dass ein DJ-1-Funktionsverlust zur erhöhten Fragmentierung von Mitochondrien, zur Verminderung des Membranpotentials sowie zur Akkumulation defekter Mitochondrien führt [158, 159, 162]. Diese Pathologien sind, bei einjährigen *DJ-1*^{-/-}-Mäusen, denkbar. Da Rotenon seine Wirkung entfaltet, indem es den Komplex I der Atmungskette blockiert, kann die Hypothese gestellt werden, dass Rotenon, aufgrund einer vorgeschädigten Mitochondrienmembran beziehungsweise defekter Mitochondrien, nicht seine vollständige Wirkkraft entfalten konnte, um folglich

von Neuron zu Neuron weitertransportiert zu werden und letztlich im ZNS, spezifisch in der SNc, destruktiv aktiv werden zu können.

Abschließend lässt sich sagen, dass die erwarteten Ergebnisse im Rotenon-Versuch nicht erzielt werden konnten. Obwohl verschiedene Kritikpunkte an der Methodik dieser Dissertation besprochen wurden, scheint die gleiche Methodik in früheren und parallellaufenden Versuchen ihre Validität bewährt zu haben, sodass in diesem Fall von einer protektiven Auswirkung einer Genmutation gegenüber einer potenziell toxischen Umwelt-Exposition oder einem Zufall auszugehen ist. Zur Bestätigung oder Widerlegung dieser Hypothese sind weitere Studien erforderlich.

4.5 RotaRod

Die für den MP pathognomonische Neurodegeneration der SNc äußert sich primär durch das Auftreten der sogenannten Kardinalsymptome Tremor, Rigor, Akinese und posturale Instabilität. Auch im MP-Mausmodell ist eine solche Beeinträchtigung der Motorik beobachtbar. Um diese motorischen Einschränkungen zu erheben, hat sich der RotaRod etabliert, der auch im Rahmen dieser Arbeit angewandt wurde.

WT-Mäuse erzielten im PQ-Experiment die zu erwartende Ergebnisse auf dem Rotarod: die Gruppe mit alleiniger PQ-Exposition zeigte eine signifikante Verschlechterung der Laufzeiten vor und nach der Exposition. (Die Versuche wurden durch Frau Theresa Straßl im Rahmen ihrer Promotion durchgeführt, die Ergebnisse werden hier nicht dargestellt.)

Aufgrund eines Defekts des RotaRods musste das Gerät im Laufe des Rotenon-Versuches ausgetauscht werden, sodass die Laufzeiten vor und nach dem Versuch mit zwei verschiedenen Geräten erfasst werden mussten. Im Rotenon-Versuch zeigten sich nach der Exposition, unabhängig der Gruppenangehörigkeit, stark verlängerte Laufzeiten im Vergleich zu vor der Exposition. Im PQ-Versuch, der nach Ankunft des neuen RotaRod-Modells durchgeführt wurde, zeigte sich kein Unterschied in den Laufzeiten vor und nach den Behandlungen.

In keinem der beiden Experimentreihen konnte ein plausibles Ergebnis in der RotaRod-Leistung der Tiere erzielt werden. Grundsätzlich fielen die Laufzeiten der Mäuse, im Vergleich zu den aus vorausgehenden Versuchen bekannten Zeiten, länger aus. Grund dafür war die Nutzung eines neuen RotaRods. Die verschiedenen RotaRod-Systeme können sich in Bezug auf Stabdurchmesser, Oberflächenbeschaffenheit und minimale/maximale Geschwindigkeit unterscheiden. In unserem Fall besaß das neue

Modell, um den Halt der Mäuse zu erleichtern, eine gerillte Walze. Diese Rillen ermöglichten es aber den Tieren, sich bei zu hoher Geschwindigkeit daran zu klammern, anstatt herunterzufallen, was zur Erzeugung längerer und somit nicht verwertbarer Laufzeiten führte (Abbildung 32; Abbildung 33). Dieses Klammerverhalten der Mäuse wurde in der Regel zur Gewohnheit, sodass eine Wiederholung des Versuches keinen Sinn ergab. Dieser Störfaktor wurde in anderen Studien auch festgestellt [258].

Die Beschaffenheit der neuen Walze, gefolgt vom Klammern der Tiere an jene, führte zusammenfassend zu folgenden Problematiken: Es ist weder eine Reliabilität der Versuche noch eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse gegeben, sodass die beobachteten Laufzeiten als Einschätzung der motorischen Einschränkung der Tiere in Bezug auf die Exposition gegenüber Behandlung mit PQ, GS, DL und Rotenon nicht interpretierbar sind.

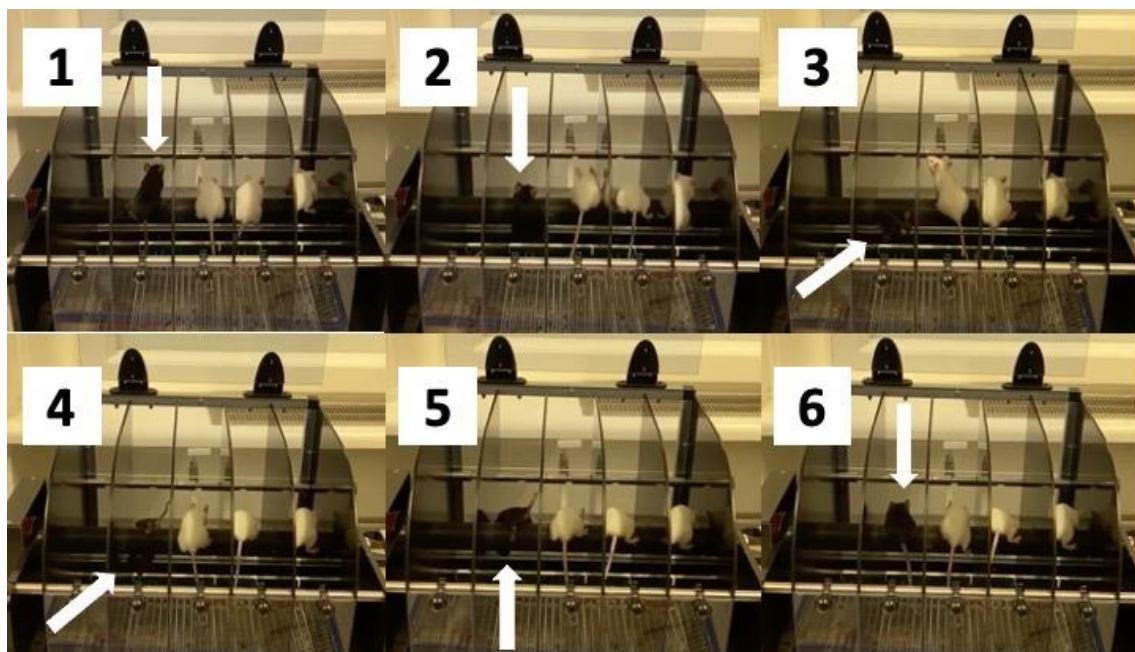


Abbildung 32: Festhalten der Maus an der Walze des RotaRod-Geräts

Die graue Maus (weißer Pfeil) dreht sich mit der Walze des Gerätes mit. Die Beschaffenheit der Walze im neuen Gerät ermöglicht es den Tieren, sich daran festzuhalten und somit eine längere Laufzeit vorzutäuschen.

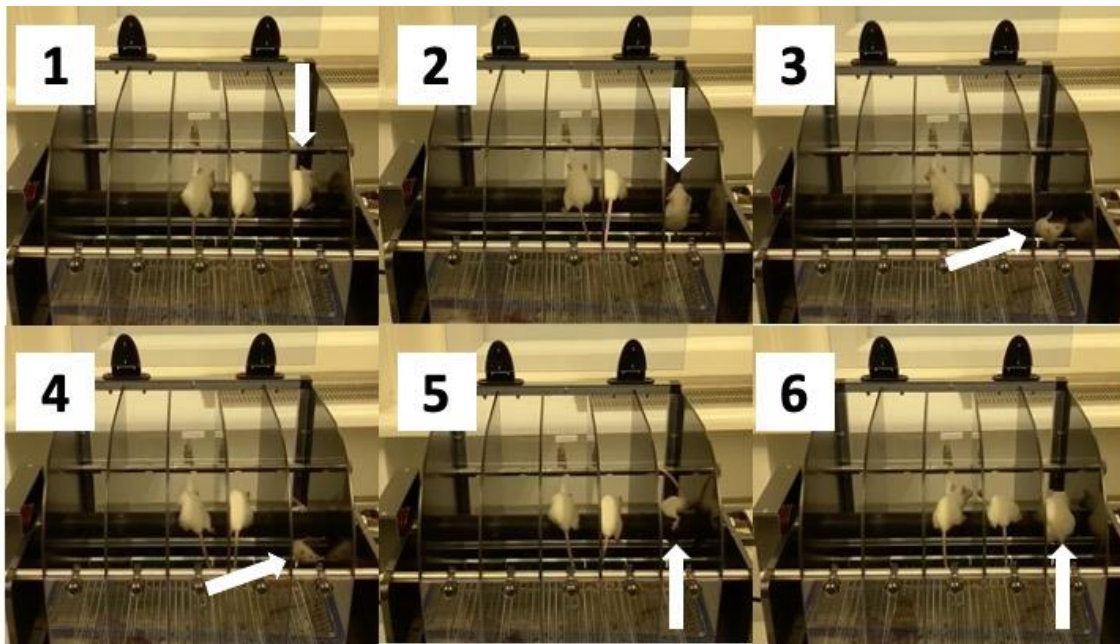


Abbildung 33: Festhalten der Maus an der Walze des RotaRod-Gerätes

Das Festhalten der Maus führt zu verfälschten und somit nicht interpretierbaren Laufzeiten. Eine Beurteilung der Motorik war sowohl im PQ- als auch im Rotenon-Versuch folglich nicht möglich. Zur Erleichterung der Foto-Dokumentation wurden Mäuse mit weißem Fell (ohne Zugehörigkeit zu einer Versuchsreihe) ausgewählt.

Eine Beurteilung der motorischen und koordinativen Fähigkeiten der Mäuse durch einen sensibleren Test wie der Schwebebalken hätte eventuell weitere Erkenntnisse ermöglicht [259]. Häufig untersuchen verschiedene Tests unterschiedliche Aspekte der motorischen Leistung der Versuchstiere. Je nachdem, ob man das Verhalten der Maus aufgrund ihres Phänotyps oder aufgrund einer bestimmten Behandlung zur Heilung einer Krankheit analysieren möchte, sind die Anforderungen an die Tests unterschiedlich. Um den Zustand der Maus vollständig zu erfassen, ist daher eine Reihe von Tests, die sich bestenfalls ergänzen, erforderlich, um das realitätsnächste Versuchsergebnis zu erzielen. Eine Ergänzung der RotaRod-Testung, z.B. mit Schwebebalken, Ganganalyse oder dem Gitterschritt hätte bessere, vollständigere Ergebnisse erzielt.

Auch die Erfassung nicht-motorischer Symptome hätte Hinweise auf eine möglicherweise beginnende Symptomatik, die noch nicht im RotaRod-Test sichtbar gewesen wäre, offenbaren können. NMS können ein früher Indikator für eine MP-Erkrankung sein. Sie können anhand einfacher Tests, wie z. B. der 1h-Stool-Collection bei Magen-Darm-Passage-Störungen oder einer Riechprüfung bei Riechstörungen erfasst werden.

4.6 Ausblick

Das Morbus Parkinson ist eine führende Alterskrankheit. Mit dem aktuell stattfindenden demographischen Wandel wird das durchschnittliche Alter der Bevölkerung weiterhin zunehmen, was für die Prävalenz des MP auch von Bedeutung ist: Es wird prognostiziert, dass diese sich in den nächsten zwei Jahrzehnten verdoppeln wird [7, 8]. Aufgrund des „silbernen Tsunamis“, der uns in den nächsten drei Jahrzehnten erwartet, wird vorhergesagt, dass neurodegenerative Krankheiten wie MP aufgrund mangelnder Pflegekräfte, mangelnder spezialisierter Ärzte, fehlender Heilungsmöglichkeiten sowie höherer Kosten für die Krankenkassen sowohl zu einer Belastung der Gesellschaft als auch der Wirtschaft führen werden [260, 261]. Aktuelle Therapieansätze bestehen nur aus symptomatischen Therapien, die die fortschreitende Neurodegeneration, die für den Krankheitsfortschritt ursächlich ist, nicht bremsen können. Dazu kommt, dass die nicht zu vernachlässigenden Nebenwirkungen den langfristigen Nutzen der medikamentösen Therapie limitieren. Es ist also notwendig, zu einem besseren Verständnis der Krankheit und vor allem seiner Ätiologie und Pathogenese zu gelangen, um folglich krankheitsmodifizierende Therapien und präventive Maßnahmen zu etablieren. Erste Schritte in diese Richtung wurden schon gemacht, wie zum Beispiel der Versuch, die Erkrankung anhand der neuen MDS-Kriterien früher zu erkennen, indem nicht-motorische Symptome und prodromale Marker vor der typischen motorischen Symptomatik identifiziert werden [27, 29]. Somit ermöglicht diese Strategie zumindest einen früheren Therapiebeginn.

Ein weiterer Schritt in das bessere Verständnis der Erkrankung ist die Entdeckung der Erscheinung der histopathologischen Kennzeichen des MP in zeitlicher und topographischer Reihenfolge: LB scheinen erst im ENS und im Bulbus olfactorius aufzutreten, bevor sie retrograd bis in das ZNS hochwandern und dort einige Zeit später festzustellen sind [71, 72]. Somit konnten auch die nicht-motorischen Symptome Hyposmie und gastrointestinale Störungen erklärt werden.

Bedauerlicherweise bleibt die Ätiologie des MP noch weitgehend unbekannt. In Anbetracht aller aktuellen Forschungsansätze wird angenommen, dass die Ätiologie des MP multifaktoriell ist und aus den Interaktionen verschiedener Faktoren resultiert. Oxidativer Stress und die mitochondriale Funktionsbeeinträchtigung scheinen entscheidende Faktoren in diesem komplexen Zusammenspiel zu sein [208, 216]. PQ und Rotenon, zwei Pestizide, die mit einem erhöhten MP-Risiko verknüpft sind, entfalten ihre

toxische Wirkung, indem sie die Funktionstüchtigkeit des Mitochondriums beeinträchtigen [185, 188, 194].

Die im Rahmen dieser Arbeit erforschten Ergebnisse zeigen erneut, dass PQ und Rotenon die Entwicklung eines MP beeinflussen können. Obwohl PQ und Rotenon in der EU aufgrund ihrer Toxizität verboten sind, sind diese Pestizide in anderen Regionen der Welt noch erlaubt. Zwar sind sie sicherlich nicht allein, sondern eher im Zusammenspiel mit genetischen und anderen Umweltfaktoren für die Entstehung eines MP verantwortlich. Dennoch könnte eine strengere Regelung der Nutzung von PQ und Rotenon in der Lebensmittelproduktion das Risiko für die Gesamtbevölkerung reduzieren.

Das Protein DJ-1 spielt eine zentrale Rolle im Schutz gegen oxidativen Stress, indem es unter anderem als Glyoxalase zwei Säuren, Glycolsäure und D-Laktat, bildet. Der Nachweis, dass die Neurodegeneration der SNc nach Exposition mit PQ im *Dj-1^{-/-}*-Mausmodell nicht signifikant stärker ist als im WT-Mausmodell, bekräftigt die Aussage, dass eine Mutation im *DJ-1*-Gen kein Nachteil bezüglich der Progression der Krankheit zu sein scheint.

Bedeutender ist die Erkenntnis, dass GS und DL dieser Neurodegeneration der SNc entgegenwirken können. Obwohl GS und DL endogen produziert werden können, scheinen Säugetiere die Fähigkeit verloren zu haben, diese in ausreichend hohem Maße zu produzieren. Das Vorkommen der Säuren in vielen natürlichen Lebensmitteln und der Fakt, dass die zwei Produkte der Glyoxalase ihre Wirkung bei oraler Gabe entfalten, spielen zu ihren Gunsten [151]. Diese Entdeckung bietet somit erstmals die Möglichkeit eines krankheitsmodifizierenden Therapieansatzes. Eine mögliche Prävention, sei es der Erkrankung oder des Fortschritts der Neurodegeneration bei präsentem MP, wäre somit bei möglichst leichtem Applikationsweg zum ersten Mal gegeben.

Die genaue Wirkungsweise dieser zwei Säuren ist nicht eindeutig geklärt. Jedoch scheinen die Theorien des Eingriffes in den Kalzium-Haushalt und der Schutz gegen oxidativen Stress zwei valide Ansätze zu sein. Dies führte zur Erforschung weiterer möglicher Therapieansätze. Vielversprechende präklinische Studien zeigten in verschiedenen Tiermodellen eine Neuroprotektion durch Kalziumkanal-Blocker, jedoch ließen sich diese Ergebnisse in klinischen Studien nicht bestätigen [262]. Auch wurden verschiedene antioxidative Substanzen wie zum Beispiel N-Acetylcystein, Glutathion, Koenzym Q10 oder grüner Tee Polyphenol in klinischen Studien getestet, ohne schlüssige Ergebnisse zu erzielen [263]. GS und DL geben somit eine neue,

erfolgsversprechende Grundlage für eine Neuroprotektion, unter anderem durch die Aufrechterhaltung des Kalzium-Haushaltes und den Schutz gegen oxidativen Stress.

Die Entdeckung von GS und DL war das Ergebnis der Erforschung der verschiedenen Funktionen des Proteins DJ-1. In Anbetracht der Tatsache, dass genetische Mutationen auch beim sporadischen MP eine größere Rolle spielen könnten als bisher angenommen [125], zeigt diese Entdeckung die Wichtigkeit, andere Parkinson- verwandte Gene intensiver zu erkunden. Die Erstellung von neuen *in vitro*, aber auch *in vivo* knockout-Modellen wäre zum besseren Verständnis der verschiedenen Pathomechanismen und zur Entdeckung potenzieller Therapieansätze wichtig. Weil die symptomatischen Therapiemöglichkeiten ihre Grenze erreicht haben, sind Therapieansätze, die in die Pathomechanismen der Erkrankung eingreifen, notwendig. Dabei kann die Erforschung der Parkinson-assoziierten Gene einen großen Teil beitragen.

Literaturverzeichnis

1. Glabe, C.G. and R. Kaye, *Common structure and toxic function of amyloid oligomers implies a common mechanism of pathogenesis*. *Neurology*, 2006. **66**(2 Suppl 1): p. S74-8.
2. Trojanowski, J.Q. and V.M. Lee, *Parkinson's disease and related synucleinopathies are a new class of nervous system amyloidoses*. *Neurotoxicology*, 2002. **23**(4-5): p. 457-60.
3. Erkinen, M.G., M.O. Kim, and M.D. Geschwind, *Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018. **10**(4).
4. von Campenhausen, S., et al., *Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe*. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2005. **15**(4): p. 473-90.
5. Lee, A. and R.M. Gilbert, *Epidemiology of Parkinson Disease*. *Neurol Clin*, 2016. **34**(4): p. 955-965.
6. Simon, D.K., C.M. Tanner, and P. Brundin, *Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology*. *Clin Geriatr Med*, 2020. **36**(1): p. 1-12.
7. Dorsey, E.R., et al., *Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030*. *Neurology*, 2007. **68**(5): p. 384-6.
8. Dorsey, E.R., et al., *The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic*. *J Parkinsons Dis*, 2018. **8**(s1): p. S3-S8.
9. Pinter, B., et al., *Mortality in Parkinson's disease: a 38-year follow-up study*. *Mov Disord*, 2015. **30**(2): p. 266-9.
10. Parkinson, J., *An essay on the shaking palsy*. 1817, London: Sheerwood, Neely and Jones.
11. Pan-Montojo, F. and H. Reichmann, *Considerations on the role of environmental toxins in idiopathic Parkinson's disease pathophysiology*. *Transl Neurodegener*, 2014. **3**: p. 10.
12. Shulman, L.M., et al., *Comorbidity of the nonmotor symptoms of Parkinson's disease*. *Mov Disord*, 2001. **16**(3): p. 507-10.
13. Garcia-Ruiz, P.J., K.R. Chaudhuri, and P. Martinez-Martin, *Non-motor symptoms of Parkinson's disease A review...from the past*. *J Neurol Sci*, 2014. **338**(1-2): p. 30-3.
14. Pfeiffer, R.F., *Non-motor symptoms in Parkinson's disease*. *Parkinsonism Relat Disord*, 2016. **22 Suppl 1**: p. S119-22.
15. Sung, V.W. and A.P. Nicholas, *Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: expanding the view of Parkinson's disease beyond a pure motor, pure dopaminergic problem*. *Neurol Clin*, 2013. **31**(3 Suppl): p. S1-16.

16. Kurtis, M.M., et al., *Relationship between sleep disorders and other non-motor symptoms in Parkinson's disease*. *Parkinsonism Relat Disord*, 2013. **19**(12): p. 1152-5.
17. Duncan, G.W., et al., *Health-related quality of life in early Parkinson's disease: the impact of nonmotor symptoms*. *Mov Disord*, 2014. **29**(2): p. 195-202.
18. Ponsen, M.M., et al., *Olfactory testing combined with dopamine transporter imaging as a method to detect prodromal Parkinson's disease*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2010. **81**(4): p. 396-9.
19. Pont-Sunyer, C., et al., *The onset of nonmotor symptoms in Parkinson's disease (the ONSET PD study)*. *Mov Disord*, 2015. **30**(2): p. 229-37.
20. Claassen, D.O., et al., *REM sleep behavior disorder preceding other aspects of synucleinopathies by up to half a century*. *Neurology*, 2010. **75**(6): p. 494-9.
21. Jennings, D., et al., *Conversion to Parkinson Disease in the PARS HypoSMic and Dopamine Transporter-Deficit Prodromal Cohort*. *JAMA Neurol*, 2017. **74**(8): p. 933-940.
22. Haehner, A., et al., *Olfactory loss may be a first sign of idiopathic Parkinson's disease*. *Mov Disord*, 2007. **22**(6): p. 839-42.
23. Gowers, W.R., *A manual of diseases of the central nervous system*. Vol. II. 1886, London: J&A Churchill.
24. *Leitlinie „Idiopathisches Parkinson-Syndrom“*, D.G.f. Neurologie, Editor. 2016.
25. Berg, D., et al., *MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease*. *Mov Disord*, 2015. **30**(12): p. 1600-11.
26. Postuma, R.B., et al., *MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease*. *Mov Disord*, 2015. **30**(12): p. 1591-601.
27. Postuma, R.B., et al., *Validation of the MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease*. *Mov Disord*, 2018. **33**(10): p. 1601-1608.
28. *Leitlinie „Parkinson-Krankheit“*, D.G.f. Neurologie, Editor. 2023.
29. Postuma, R.B. and D. Berg, *Prodromal Parkinson's Disease: The Decade Past, the Decade to Come*. *Mov Disord*, 2019. **34**(5): p. 665-675.
30. Dickson, D.W., *Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(8).
31. Trepel, M., *Neuroanatomie: Struktur und Funktion*. 7. Auflage ed.: Elsevier. 419.
32. Albin, R.L., A.B. Young, and J.B. Penney, *The functional anatomy of basal ganglia disorders*. *Trends Neurosci*, 1989. **12**(10): p. 366-75.
33. Moore, R.Y., R.K. Bhatnagar, and A. Heller, *Anatomical and chemical studies of a nigro-neostriatal projection in the cat*. *Brain Res*, 1971. **30**(1): p. 119-35.
34. Obeso, J.A., et al., *The basal ganglia in Parkinson's disease: current concepts and unexplained observations*. *Ann Neurol*, 2008. **64 Suppl 2**: p. S30-46.

35. Braak, H., et al., *Parkinson's disease: affection of brain stem nuclei controlling premotor and motor neurons of the somatomotor system*. Acta Neuropathol, 2000. **99**(5): p. 489-95.
36. Schrag, A., Y. Ben-Shlomo, and N. Quinn, *How common are complications of Parkinson's disease?* J Neurol, 2002. **249**(4): p. 419-23.
37. Ahlskog, J.E. and M.D. Muentert, *Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature*. Mov Disord, 2001. **16**(3): p. 448-58.
38. Fahn, S. and G. Parkinson Study, *Does levodopa slow or hasten the rate of progression of Parkinson's disease?* J Neurol, 2005. **252 Suppl 4**: p. IV37-IV42.
39. Brooks, D.J., H. Sagar, and U.K.-I.E.S. Group, *Entacapone is beneficial in both fluctuating and non-fluctuating patients with Parkinson's disease: a randomised, placebo controlled, double blind, six month study*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2003. **74**(8): p. 1071-9.
40. Katzenschlager, R., et al., *Continuous subcutaneous apomorphine therapy improves dyskinesias in Parkinson's disease: a prospective study using single-dose challenges*. Mov Disord, 2005. **20**(2): p. 151-7.
41. Watts, R.L., et al., *Randomized, blind, controlled trial of transdermal rotigotine in early Parkinson disease*. Neurology, 2007. **68**(4): p. 272-6.
42. Schapira, A.H., et al., *Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(10): p. 845-54.
43. Verschuur, C.V.M., et al., *Randomized Delayed-Start Trial of Levodopa in Parkinson's Disease*. N Engl J Med, 2019. **380**(4): p. 315-324.
44. Okun, M.S., *Deep-brain stimulation for Parkinson's disease*. N Engl J Med, 2012. **367**(16): p. 1529-38.
45. Fox, S.H., et al., *International Parkinson and movement disorder society evidence-based medicine review: Update on treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease*. Mov Disord, 2018. **33**(8): p. 1248-1266.
46. Damier, P., et al., *The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease*. Brain, 1999. **122** (Pt 8): p. 1437-48.
47. Gibb, W.R. and A.J. Lees, *Anatomy, pigmentation, ventral and dorsal subpopulations of the substantia nigra, and differential cell death in Parkinson's disease*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1991. **54**(5): p. 388-96.
48. Greenfield, J.G. and F.D. Bosanquet, *The brain-stem lesions in Parkinsonism*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1953. **16**(4): p. 213-26.
49. Ruf, D.m.V., *Transversalschnitt des Hirnstammes eines von MP betroffenen und eines gesunden Patienten*. 2020: Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung München.
50. Forno, L.S., *Neuropathology of Parkinson's disease*. J Neuropathol Exp Neurol, 1996. **55**(3): p. 259-72.
51. Spillantini, M.G., et al., *Alpha-synuclein in Lewy bodies*. Nature, 1997. **388**(6645): p. 839-40.

52. Lowe, J., et al., *Ubiquitin is a common factor in intermediate filament inclusion bodies of diverse type in man, including those of Parkinson's disease, Pick's disease, and Alzheimer's disease, as well as Rosenthal fibres in cerebellar astrocytomas, cytoplasmic bodies in muscle, and Mallory bodies in alcoholic liver disease.* J Pathol, 1988. **155**(1): p. 9-15.
53. Wakabayashi, K., et al., *Immunocytochemical localization of synaptic vesicle-specific protein in Lewy body-containing neurons in Parkinson's disease.* Neurosci Lett, 1992. **138**(2): p. 237-40.
54. Spillantini, M.G., et al., *alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6469-73.
55. Den, H.J.W. and J. Bethlem, *The distribution of Lewy bodies in the central and autonomic nervous systems in idiopathic paralysis agitans.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1960. **23**: p. 283-90.
56. Wakabayashi, K., et al., *Parkinson's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses.* Acta Neuropathol, 1988. **76**(3): p. 217-221.
57. Wakabayashi, K. and H. Takahashi, *Neuropathology of autonomic nervous system in Parkinson's disease.* Eur Neurol, 1997. **38 Suppl 2**: p. 2-7.
58. Del Tredici, K., et al., *Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease.* Acta Neuropathol, 2010. **119**(6): p. 703-13.
59. Wakabayashi, K., et al., *NACP/alpha-synuclein-positive filamentous inclusions in astrocytes and oligodendrocytes of Parkinson's disease brains.* Acta Neuropathol, 2000. **99**(1): p. 14-20.
60. Arai, T., et al., *Argyrophilic glial inclusions in the midbrain of patients with Parkinson's disease and diffuse Lewy body disease are immunopositive for NACP/alpha-synuclein.* Neurosci Lett, 1999. **259**(2): p. 83-6.
61. Burre, J., et al., *Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro.* Science, 2010. **329**(5999): p. 1663-7.
62. Baba, M., et al., *Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies.* Am J Pathol, 1998. **152**(4): p. 879-84.
63. Fujiwara, H., et al., *alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions.* Nat Cell Biol, 2002. **4**(2): p. 160-4.
64. Muntane, G., et al., *Phosphorylation of tau and alpha-synuclein in synaptic-enriched fractions of the frontal cortex in Alzheimer's disease, and in Parkinson's disease and related alpha-synucleinopathies.* Neuroscience, 2008. **152**(4): p. 913-23.
65. Dickson, D.W., *Alpha-synuclein and the Lewy body disorders.* Curr Opin Neurol, 2001. **14**(4): p. 423-32.
66. McGeer, P.L., et al., *Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains.* Neurology, 1988. **38**(8): p. 1285-91.

67. Hunot, S., et al., *FcepsilonR2B/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells*. J Neurosci, 1999. **19**(9): p. 3440-7.
68. Dexter, D.T., et al., *Alterations in levels of iron, ferritin, and other trace metals in neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia*. The Royal Kings and Queens Parkinson's Disease Research Group. Ann Neurol, 1992. **32 Suppl**: p. S94-100.
69. Vicente Miranda, H. and T.F. Outeiro, *The sour side of neurodegenerative disorders: the effects of protein glycation*. J Pathol, 2010. **221**(1): p. 13-25.
70. Li, J., et al., *Advanced glycation end products and neurodegenerative diseases: mechanisms and perspective*. J Neurol Sci, 2012. **317**(1-2): p. 1-5.
71. Braak, H., et al., *Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease*. Neurobiol Aging, 2003. **24**(2): p. 197-211.
72. Braak, H., et al., *Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology*. Neurosci Lett, 2006. **396**(1): p. 67-72.
73. Braak, H., et al., *Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology*. Cell Tissue Res, 2004. **318**(1): p. 121-34.
74. Hawkes, C.H., K. Del Tredici, and H. Braak, *Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2007. **33**(6): p. 599-614.
75. Li, J.Y., et al., *Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation*. Nat Med, 2008. **14**(5): p. 501-3.
76. Kordower, J.H., et al., *Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease*. Nat Med, 2008. **14**(5): p. 504-6.
77. Lee, H.J., S. Patel, and S.J. Lee, *Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates*. J Neurosci, 2005. **25**(25): p. 6016-24.
78. Lee, H.J., et al., *Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular alpha-synuclein*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(9): p. 1835-49.
79. Desplats, P., et al., *Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(31): p. 13010-5.
80. Braidy, N., et al., *Alpha-synuclein transmission and mitochondrial toxicity in primary human foetal enteric neurons in vitro*. Neurotox Res, 2014. **25**(2): p. 170-82.
81. Braak, H., et al., *Parkinson's disease: lesions in dorsal horn layer I, involvement of parasympathetic and sympathetic pre- and postganglionic neurons*. Acta Neuropathol, 2007. **113**(4): p. 421-9.
82. Marder, K., et al., *Risk of Parkinson's disease among first-degree relatives: A community-based study*. Neurology, 1996. **47**(1): p. 155-60.
83. Noyce, A.J., et al., *Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease*. Ann Neurol, 2012. **72**(6): p. 893-901.

84. Payami, H., et al., *Familial aggregation of Parkinson disease: a comparative study of early-onset and late-onset disease*. Arch Neurol, 2002. **59**(5): p. 848-50.
85. Quinn, N., P. Critchley, and C.D. Marsden, *Young onset Parkinson's disease*. Mov Disord, 1987. **2**(2): p. 73-91.
86. Polymeropoulos, M.H., et al., *Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease*. Science, 1997. **276**(5321): p. 2045-7.
87. Singleton, A.B., et al., *alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease*. Science, 2003. **302**(5646): p. 841.
88. Kitada, T., et al., *Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism*. Nature, 1998. **392**(6676): p. 605-8.
89. Gasser, T., et al., *A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13*. Nat Genet, 1998. **18**(3): p. 262-5.
90. Leroy, E., et al., *The ubiquitin pathway in Parkinson's disease*. Nature, 1998. **395**(6701): p. 451-2.
91. Valente, E.M., et al., *Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1*. Science, 2004. **304**(5674): p. 1158-60.
92. Bonifati, V., et al., *DJ-1 (PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism*. Neurol Sci, 2003. **24**(3): p. 159-60.
93. Paisan-Ruiz, C., et al., *Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease*. Neuron, 2004. **44**(4): p. 595-600.
94. Zimprich, A., et al., *Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology*. Neuron, 2004. **44**(4): p. 601-7.
95. Hicks, A.A., et al., *A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease*. Ann Neurol, 2002. **52**(5): p. 549-55.
96. Pankratz, N., et al., *Significant linkage of Parkinson disease to chromosome 2q36-37*. Am J Hum Genet, 2003. **72**(4): p. 1053-7.
97. Lautier, C., et al., *Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease*. Am J Hum Genet, 2008. **82**(4): p. 822-33.
98. Strauss, K.M., et al., *Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(15): p. 2099-111.
99. Wider, C., et al., *Autosomal dominant dopa-responsive parkinsonism in a multigenerational Swiss family*. Parkinsonism Relat Disord, 2008. **14**(6): p. 465-70.
100. Chartier-Harlin, M.C., et al., *Translation initiator EIF4G1 mutations in familial Parkinson disease*. Am J Hum Genet, 2011. **89**(3): p. 398-406.
101. Edvardson, S., et al., *A deleterious mutation in DNAJC6 encoding the neuronal-specific clathrin-uncoating co-chaperone auxilin, is associated with juvenile parkinsonism*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e36458.
102. Koroglu, C., et al., *DNAJC6 is responsible for juvenile parkinsonism with phenotypic variability*. Parkinsonism Relat Disord, 2013. **19**(3): p. 320-4.

103. Krebs, C.E., et al., *The Sac1 domain of SYNJ1 identified mutated in a family with early-onset progressive Parkinsonism with generalized seizures*. Hum Mutat, 2013. **34**(9): p. 1200-7.
104. Vilarino-Guell, C., et al., *DNAJC13 mutations in Parkinson disease*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(7): p. 1794-801.
105. Deng, H.X., et al., *Identification of TMEM230 mutations in familial Parkinson's disease*. Nat Genet, 2016. **48**(7): p. 733-9.
106. Lesage, S., et al., *Loss of VPS13C Function in Autosomal-Recessive Parkinsonism Causes Mitochondrial Dysfunction and Increases PINK1/Parkin-Dependent Mitophagy*. Am J Hum Genet, 2016. **98**(3): p. 500-513.
107. Singleton, A.B., M.J. Farrer, and V. Bonifati, *The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications*. Mov Disord, 2013. **28**(1): p. 14-23.
108. Devi, L., et al., *Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain*. J Biol Chem, 2008. **283**(14): p. 9089-100.
109. Hsu, L.J., et al., *alpha-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress*. Am J Pathol, 2000. **157**(2): p. 401-10.
110. McCoy, M.K. and M.R. Cookson, *Mitochondrial quality control and dynamics in Parkinson's disease*. Antioxid Redox Signal, 2012. **16**(9): p. 869-82.
111. Tabrez, S., et al., *A synopsis on the role of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2012. **11**(4): p. 395-409.
112. Nemani, V.M., et al., *Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle recluster after endocytosis*. Neuron, 2010. **65**(1): p. 66-79.
113. McGeer, P.L. and E.G. McGeer, *The alpha-synuclein burden hypothesis of Parkinson disease and its relationship to Alzheimer disease*. Exp Neurol, 2008. **212**(2): p. 235-8.
114. Di Fonzo, A., et al., *Comprehensive analysis of the LRRK2 gene in sixty families with Parkinson's disease*. Eur J Hum Genet, 2006. **14**(3): p. 322-31.
115. Gilks, W.P., et al., *A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease*. Lancet, 2005. **365**(9457): p. 415-6.
116. Nuytemans, K., et al., *Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update*. Hum Mutat, 2010. **31**(7): p. 763-80.
117. MacLeod, D., et al., *The familial Parkinsonism gene LRRK2 regulates neurite process morphology*. Neuron, 2006. **52**(4): p. 587-93.
118. Ramonet, D., et al., *Dopaminergic neuronal loss, reduced neurite complexity and autophagic abnormalities in transgenic mice expressing G2019S mutant LRRK2*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18568.
119. Liou, A.K., et al., *Wild-type LRRK2 but not its mutant attenuates stress-induced cell death via ERK pathway*. Neurobiol Dis, 2008. **32**(1): p. 116-24.
120. Lohmann, E., et al., *How much phenotypic variation can be attributed to parkin genotype?* Ann Neurol, 2003. **54**(2): p. 176-85.

121. Lucking, C.B., et al., *Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene*. N Engl J Med, 2000. **342**(21): p. 1560-7.
122. Periquet, M., et al., *Parkin mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism*. Brain, 2003. **126**(Pt 6): p. 1271-8.
123. Shimura, H., et al., *Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase*. Nat Genet, 2000. **25**(3): p. 302-5.
124. Abbas, N., et al., *A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease*. Hum Mol Genet, 1999. **8**(4): p. 567-74.
125. Corti, O., S. Lesage, and A. Brice, *What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease*. Physiol Rev, 2011. **91**(4): p. 1161-218.
126. Narendra, D., et al., *Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy*. J Cell Biol, 2008. **183**(5): p. 795-803.
127. Shin, J.H., et al., *PARIS (ZNF746) repression of PGC-1alpha contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease*. Cell, 2011. **144**(5): p. 689-702.
128. Ibanez, P., et al., *Mutational analysis of the PINK1 gene in early-onset parkinsonism in Europe and North Africa*. Brain, 2006. **129**(Pt 3): p. 686-94.
129. Valente, E.M., et al., *PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism*. Ann Neurol, 2004. **56**(3): p. 336-41.
130. Clark, I.E., et al., *Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin*. Nature, 2006. **441**(7097): p. 1162-6.
131. Abou-Sleiman, P.M., et al., *The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease*. Ann Neurol, 2003. **54**(3): p. 283-6.
132. Dekker, M., et al., *Clinical features and neuroimaging of PARK7-linked parkinsonism*. Mov Disord, 2003. **18**(7): p. 751-7.
133. van Duijn, C.M., et al., *Park7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36*. Am J Hum Genet, 2001. **69**(3): p. 629-34.
134. Bonifati, V., et al., *Localization of autosomal recessive early-onset parkinsonism to chromosome 1p36 (PARK7) in an independent dataset*. Ann Neurol, 2002. **51**(2): p. 253-6.
135. Bonifati, V., et al., *Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism*. Science, 2003. **299**(5604): p. 256-9.
136. Annesi, G., et al., *DJ-1 mutations and parkinsonism-dementia-amyotrophic lateral sclerosis complex*. Ann Neurol, 2005. **58**(5): p. 803-7.
137. Clark, L.N., et al., *Analysis of an early-onset Parkinson's disease cohort for DJ-1 mutations*. Mov Disord, 2004. **19**(7): p. 796-800.
138. Hague, S., et al., *Early-onset Parkinson's disease caused by a compound heterozygous DJ-1 mutation*. Ann Neurol, 2003. **54**(2): p. 271-4.

139. Zhang, L., et al., *Mitochondrial localization of the Parkinson's disease related protein DJ-1: implications for pathogenesis*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(14): p. 2063-73.
140. Nagakubo, D., et al., *DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **231**(2): p. 509-13.
141. Takahashi, K., et al., *DJ-1 positively regulates the androgen receptor by impairing the binding of PIASx alpha to the receptor*. J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 37556-63.
142. Mitumoto, A. and Y. Nakagawa, *DJ-1 is an indicator for endogenous reactive oxygen species elicited by endotoxin*. Free Radic Res, 2001. **35**(6): p. 885-93.
143. Mitumoto, A., et al., *Oxidized forms of peroxiredoxins and DJ-1 on two-dimensional gels increased in response to sublethal levels of paraquat*. Free Radic Res, 2001. **35**(3): p. 301-10.
144. Canet-Aviles, R.M., et al., *The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(24): p. 9103-8.
145. Taira, T., et al., *DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death*. EMBO Rep, 2004. **5**(2): p. 213-8.
146. Raninga, P.V., G. Di Trapani, and K.F. Tonissen, *The Multifaceted Roles of DJ-1 as an Antioxidant*. Adv Exp Med Biol, 2017. **1037**: p. 67-87.
147. Lev, N., et al., *DJ-1 protects against dopamine toxicity: implications for Parkinson's disease and aging*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2013. **68**(3): p. 215-25.
148. Caudle, W.M., et al., *Reduced vesicular storage of dopamine causes progressive nigrostriatal neurodegeneration*. J Neurosci, 2007. **27**(30): p. 8138-48.
149. Lee, J.Y., et al., *Human DJ-1 and its homologs are novel glyoxalases*. Hum Mol Genet, 2012. **21**(14): p. 3215-25.
150. Erkut, C., et al., *Molecular strategies of the Caenorhabditis elegans dauer larva to survive extreme desiccation*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e82473.
151. Toyoda, Y., et al., *Products of the Parkinson's disease-related glyoxalase DJ-1, D-lactate and glycolate, support mitochondrial membrane potential and neuronal survival*. Biol Open, 2014. **3**(8): p. 777-84.
152. Lee, D., et al., *The modification of alpha-synuclein by dicarbonyl compounds inhibits its fibril-forming process*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1794**(3): p. 421-30.
153. Shendelman, S., et al., *DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation*. PLoS Biol, 2004. **2**(11): p. e362.
154. Park, J., et al., *Drosophila DJ-1 mutants show oxidative stress-sensitive locomotive dysfunction*. Gene, 2005. **361**: p. 133-9.

155. Junn, E., et al., *Mitochondrial localization of DJ-1 leads to enhanced neuroprotection*. J Neurosci Res, 2009. **87**(1): p. 123-9.
156. Ramsey, C.P. and B.I. Giasson, *The E163K DJ-1 mutant shows specific antioxidant deficiency*. Brain Res, 2008. **1239**: p. 1-11.
157. Miller, D.W., et al., *L166P mutant DJ-1, causative for recessive Parkinson's disease, is degraded through the ubiquitin-proteasome system*. J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 36588-95.
158. Giaime, E., et al., *Loss of DJ-1 does not affect mitochondrial respiration but increases ROS production and mitochondrial permeability transition pore opening*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e40501.
159. Thomas, K.J., et al., *DJ-1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway to control mitochondrial function and autophagy*. Hum Mol Genet, 2011. **20**(1): p. 40-50.
160. Krebiehl, G., et al., *Reduced basal autophagy and impaired mitochondrial dynamics due to loss of Parkinson's disease-associated protein DJ-1*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9367.
161. Yokota, T., et al., *Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **312**(4): p. 1342-8.
162. Irrcher, I., et al., *Loss of the Parkinson's disease-linked gene DJ-1 perturbs mitochondrial dynamics*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(19): p. 3734-46.
163. Yang, Y., et al., *Inactivation of Drosophila DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(38): p. 13670-5.
164. Goldberg, M.S., et al., *Nigrostriatal dopaminergic deficits and hypokinesia caused by inactivation of the familial Parkinsonism-linked gene DJ-1*. Neuron, 2005. **45**(4): p. 489-96.
165. Chen, L., et al., *Age-dependent motor deficits and dopaminergic dysfunction in DJ-1 null mice*. J Biol Chem, 2005. **280**(22): p. 21418-26.
166. Kamp, F., et al., *Inhibition of mitochondrial fusion by alpha-synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1*. EMBO J, 2010. **29**(20): p. 3571-89.
167. Park, J., et al., *Mitochondrial dysfunction in Drosophila PINK1 mutants is complemented by parkin*. Nature, 2006. **441**(7097): p. 1157-61.
168. Hao, L.Y., B.I. Giasson, and N.M. Bonini, *DJ-1 is critical for mitochondrial function and rescues PINK1 loss of function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(21): p. 9747-52.
169. Xiong, H., et al., *Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation*. J Clin Invest, 2009. **119**(3): p. 650-60.
170. Ascherio, A. and M.A. Schwarzschild, *The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention*. Lancet Neurol, 2016. **15**(12): p. 1257-1272.
171. Weisskopf, M.G., et al., *Plasma urate and risk of Parkinson's disease*. Am J Epidemiol, 2007. **166**(5): p. 561-7.

172. Yang, F., et al., *Physical activity and risk of Parkinson's disease in the Swedish National March Cohort*. Brain, 2015. **138**(Pt 2): p. 269-75.
173. Kim, I.Y., et al., *Integration of risk factors for Parkinson disease in 2 large longitudinal cohorts*. Neurology, 2018. **90**(19): p. e1646-e1653.
174. Jafari, S., et al., *Head injury and risk of Parkinson disease: a systematic review and meta-analysis*. Mov Disord, 2013. **28**(9): p. 1222-9.
175. Liu, B. and J.S. Hong, *Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **304**(1): p. 1-7.
176. Abbott, R.D., et al., *Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease*. Neurology, 2001. **57**(3): p. 456-62.
177. Lee, P.C., et al., *Traffic-related air pollution increased the risk of Parkinson's disease in Taiwan: A nationwide study*. Environ Int, 2016. **96**: p. 75-81.
178. Tanner, C.M., et al., *Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease*. Environ Health Perspect, 2011. **119**(6): p. 866-72.
179. Bjorklund, G., et al., *Metals and Parkinson's Disease: Mechanisms and Biochemical Processes*. Curr Med Chem, 2018. **25**(19): p. 2198-2214.
180. Langston, J.W., et al., *Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis*. Science, 1983. **219**(4587): p. 979-80.
181. Langston, J.W., et al., *Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey*. Brain Res, 1984. **292**(2): p. 390-4.
182. Langston, J.W., et al., *1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺): identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra*. Neurosci Lett, 1984. **48**(1): p. 87-92.
183. Przedborski, S. and H. Ischiropoulos, *Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease*. Antioxid Redox Signal, 2005. **7**(5-6): p. 685-93.
184. Baldi, I., et al., *Association between Parkinson's disease and exposure to pesticides in southwestern France*. Neuroepidemiology, 2003. **22**(5): p. 305-10.
185. Freire, C. and S. Koifman, *Pesticide exposure and Parkinson's disease: epidemiological evidence of association*. Neurotoxicology, 2012. **33**(5): p. 947-71.
186. Blandini, F. and M.T. Armentero, *Animal models of Parkinson's disease*. FEBS J, 2012. **279**(7): p. 1156-66.
187. Cocheme, H.M. and M.P. Murphy, *Chapter 22 The uptake and interactions of the redox cyler paraquat with mitochondria*. Methods Enzymol, 2009. **456**: p. 395-417.
188. Palmeira, C.M., A.J. Moreno, and V.M. Madeira, *Mitochondrial bioenergetics is affected by the herbicide paraquat*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1229**(2): p. 187-92.

189. Ueda, T., K. Hirai, and K. Ogawa, *Effects of paraquat on the mitochondrial structure and Ca-ATPase activity in rat hepatocytes*. J Electron Microsc (Tokyo), 1985. **34**(2): p. 85-91.
190. McCormack, A.L., et al., *Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat*. Neurobiol Dis, 2002. **10**(2): p. 119-27.
191. Manning-Bog, A.B., et al., *The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein*. J Biol Chem, 2002. **277**(3): p. 1641-4.
192. Cicchetti, F., et al., *Systemic exposure to paraquat and maneb models early Parkinson's disease in young adult rats*. Neurobiol Dis, 2005. **20**(2): p. 360-71.
193. Schapira, A.H., *Complex I: inhibitors, inhibition and neurodegeneration*. Exp Neurol, 2010. **224**(2): p. 331-5.
194. Bove, J., et al., *Toxin-induced models of Parkinson's disease*. NeuroRx, 2005. **2**(3): p. 484-94.
195. Sherer, T.B., et al., *Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease*. J Neurosci, 2003. **23**(34): p. 10756-64.
196. Jenner, P., *Parkinson's disease, pesticides and mitochondrial dysfunction*. Trends Neurosci, 2001. **24**(5): p. 245-7.
197. Betarbet, R., et al., *Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease*. Nat Neurosci, 2000. **3**(12): p. 1301-6.
198. Betarbet, R., T.B. Sherer, and J.T. Greenamyre, *Animal models of Parkinson's disease*. Bioessays, 2002. **24**(4): p. 308-18.
199. Inden, M., et al., *Neurodegeneration of mouse nigrostriatal dopaminergic system induced by repeated oral administration of rotenone is prevented by 4-phenylbutyrate, a chemical chaperone*. J Neurochem, 2007. **101**(6): p. 1491-1504.
200. Pan-Montojo, F., et al., *Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8762.
201. Kannarkat, G.T., J.M. Boss, and M.G. Tansey, *The role of innate and adaptive immunity in Parkinson's disease*. J Parkinsons Dis, 2013. **3**(4): p. 493-514.
202. Dawson, T.M. and V.L. Dawson, *Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease*. Science, 2003. **302**(5646): p. 819-22.
203. Eriksen, J.L., et al., *Caught in the act: alpha-synuclein is the culprit in Parkinson's disease*. Neuron, 2003. **40**(3): p. 453-6.
204. Green, D.R. and G. Kroemer, *The pathophysiology of mitochondrial cell death*. Science, 2004. **305**(5684): p. 626-9.
205. Guo, X., et al., *The GTPase dMiro is required for axonal transport of mitochondria to Drosophila synapses*. Neuron, 2005. **47**(3): p. 379-93.

206. Verstreken, P., et al., *Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at Drosophila neuromuscular junctions*. *Neuron*, 2005. **47**(3): p. 365-78.
207. Henchcliffe, C. and M.F. Beal, *Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis*. *Nat Clin Pract Neurol*, 2008. **4**(11): p. 600-9.
208. Schapira, A.H., et al., *Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease*. *Lancet*, 1989. **1**(8649): p. 1269.
209. Mizuno, Y., et al., *Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989. **163**(3): p. 1450-5.
210. Parker, W.D., Jr., J.K. Parks, and R.H. Swerdlow, *Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex*. *Brain Res*, 2008. **1189**: p. 215-8.
211. Bindoff, L.A., et al., *Respiratory chain abnormalities in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease*. *J Neurol Sci*, 1991. **104**(2): p. 203-8.
212. Krige, D., et al., *Platelet mitochondrial function in Parkinson's disease. The Royal Kings and Queens Parkinson Disease Research Group*. *Ann Neurol*, 1992. **32**(6): p. 782-8.
213. Keeney, P.M., et al., *Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled*. *J Neurosci*, 2006. **26**(19): p. 5256-64.
214. Schapira, A.H., *Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease*. *Lancet Neurol*, 2008. **7**(1): p. 97-109.
215. Perier, C., et al., *Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(52): p. 19126-31.
216. Schapira, A.H., *Oxidative stress in Parkinson's disease*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1995. **21**(1): p. 3-9.
217. Hensley, K., et al., *Interaction of alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron and alternative electron acceptors with complex I indicates a substrate reduction site upstream from the rotenone binding site*. *J Neurochem*, 1998. **71**(6): p. 2549-57.
218. Dexter, D.T., et al., *Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease*. *J Neurochem*, 1989. **52**(2): p. 381-9.
219. Zhang, J., et al., *Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons*. *Am J Pathol*, 1999. **154**(5): p. 1423-9.
220. Hong, Z., et al., *DJ-1 and alpha-synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease*. *Brain*, 2010. **133**(Pt 3): p. 713-26.
221. Choi, J., et al., *Oxidative damage of DJ-1 is linked to sporadic Parkinson and Alzheimer diseases*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(16): p. 10816-24.
222. Jenner, P., *Oxidative stress in Parkinson's disease*. *Ann Neurol*, 2003. **53** Suppl 3: p. S26-36; discussion S36-8.

223. Perry, T.L. and V.W. Yong, *Idiopathic Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and glutathione metabolism in the substantia nigra of patients*. *Neurosci Lett*, 1986. **67**(3): p. 269-74.
224. Greenamyre, J.T., et al., *Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease*. *Biochem Soc Symp*, 1999. **66**: p. 85-97.
225. Jiao, Y., et al., *Genetic dissection of strain dependent paraquat-induced neurodegeneration in the substantia nigra pars compacta*. *PLoS One*, 2012. **7**(1): p. e29447.
226. Pan-Montojo, F.J. and R.H. Funk, *Oral administration of rotenone using a gavage and image analysis of alpha-synuclein inclusions in the enteric nervous system*. *J Vis Exp*, 2010(44).
227. Monville, C., E.M. Torres, and S.B. Dunnett, *Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model*. *J Neurosci Methods*, 2006. **158**(2): p. 219-23.
228. Levitt, M., et al., *Elucidation of the Rate-Limiting Step in Norepinephrine Biosynthesis in the Perfused Guinea-Pig Heart*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1965. **148**: p. 1-8.
229. Benavides-Piccione, R. and J. DeFelipe, *Distribution of neurons expressing tyrosine hydroxylase in the human cerebral cortex*. *J Anat*, 2007. **211**(2): p. 212-22.
230. Godefroy, D., et al., *Three-dimensional distribution of tyrosine hydroxylase, vasopressin and oxytocin neurones in the transparent postnatal mouse brain*. *J Neuroendocrinol*, 2017. **29**(12).
231. Gundersen, H.J., et al., *Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis*. *APMIS*, 1988. **96**(5): p. 379-94.
232. West, M.J., L. Slomianka, and H.J. Gundersen, *Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator*. *Anat Rec*, 1991. **231**(4): p. 482-97.
233. Dawson, T.M., H.S. Ko, and V.L. Dawson, *Genetic animal models of Parkinson's disease*. *Neuron*, 2010. **66**(5): p. 646-61.
234. Kim, R.H., et al., *Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(14): p. 5215-20.
235. Hou, L., et al., *Paraquat and maneb co-exposure induces noradrenergic locus coeruleus neurodegeneration through NADPH oxidase-mediated microglial activation*. *Toxicology*, 2017. **380**: p. 1-10.
236. Ren, J.P., Y.W. Zhao, and X.J. Sun, *Toxic influence of chronic oral administration of paraquat on nigrostriatal dopaminergic neurons in C57BL/6 mice*. *Chin Med J (Engl)*, 2009. **122**(19): p. 2366-71.
237. Shtifman, A., et al., *Altered Ca²⁺ homeostasis in the skeletal muscle of DJ-1 null mice*. *Neurobiol Aging*, 2011. **32**(1): p. 125-32.

238. Grace, A.A. and B.S. Bunney, *Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--2. Action potential generating mechanisms and morphological correlates*. Neuroscience, 1983. **10**(2): p. 317-31.
239. Rizzuto, R., *Intracellular Ca(2+) pools in neuronal signalling*. Curr Opin Neurobiol, 2001. **11**(3): p. 306-11.
240. Zampese, E. and D.J. Surmeier, *Calcium, Bioenergetics, and Parkinson's Disease*. Cells, 2020. **9**(9).
241. Surmeier, D.J. and P.T. Schumacker, *Calcium, bioenergetics, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease*. J Biol Chem, 2013. **288**(15): p. 10736-41.
242. Guzman, J.N., et al., *Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1*. Nature, 2010. **468**(7324): p. 696-700.
243. Hasim, S., et al., *A glutathione-independent glyoxalase of the DJ-1 superfamily plays an important role in managing metabolically generated methylglyoxal in Candida albicans*. J Biol Chem, 2014. **289**(3): p. 1662-74.
244. Erkut, C., et al., *Trehalose renders the dauer larva of Caenorhabditis elegans resistant to extreme desiccation*. Curr Biol, 2011. **21**(15): p. 1331-6.
245. Chovsepian, A., et al., *A Primeval Mechanism of Tolerance to Desiccation Based on Glycolic Acid Saves Neurons in Mammals from Ischemia by Reducing Intracellular Calcium-Mediated Excitotoxicity*. Adv Sci (Weinh), 2021: p. e2103265.
246. Susanne Bour, Y.D., Melanie Balbach, Ina Poser, Inés Ramírez Álvarez, Helena den Haan, Christoph Kluge, Ronald Naumann, Reinhard Oertel, Irene Alba-Alejandre, Davide Accardi, Christian G. Stief, Marianne Dieterich, Peter Falkai, Rainer A. Böckmann, Horacio Pérez-Sánchez, Anthony A. Hyman, Matthias Trottmann, Francisco Pan-Montojo, *A conserved role of Parkinson-associated DJ-1 metabolites in sperm motility, mitosis, and embryonic development*. bioRxiv, 2021.
247. Diez, V., et al., *Glycolate combats massive oxidative stress by restoring redox potential in Caenorhabditis elegans*. Commun Biol, 2021. **4**(1): p. 151.
248. Wilhelm, W., Prof. Dr. med., *Praxis der Anästhesiologie*. Vol. 1. 2018: Springer. 124.
249. National Toxicology, P., *Report on the Carcinogenesis Bioassay of Chloroform (CAS No. 67-66-3)*. Natl Cancer Inst Carcinog Tech Rep Ser, 1976. **1976**: p. 1-60.
250. Jorgenson, T.A., et al., *Carcinogenicity of chloroform in drinking water to male Osborne-Mendel rats and female B6C3F1 mice*. Fundam Appl Toxicol, 1985. **5**(4): p. 760-9.
251. Miyazaki, I., et al., *Chronic Systemic Exposure to Low-Dose Rotenone Induced Central and Peripheral Neuropathology and Motor Deficits in Mice: Reproducible Animal Model of Parkinson's Disease*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(9).
252. Betarbet, R., et al., *Intersecting pathways to neurodegeneration in Parkinson's disease: effects of the pesticide rotenone on DJ-1, alpha-synuclein, and the ubiquitin-proteasome system*. Neurobiol Dis, 2006. **22**(2): p. 404-20.

253. Sherer, T.B., et al., *Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation*. Exp Neurol, 2003. **179**(1): p. 9-16.
254. Zhu, C., et al., *Variable effects of chronic subcutaneous administration of rotenone on striatal histology*. J Comp Neurol, 2004. **478**(4): p. 418-26.
255. Hoglinger, G.U., W.H. Oertel, and E.C. Hirsch, *The rotenone model of parkinsonism--the five years inspection*. J Neural Transm Suppl, 2006(70): p. 269-72.
256. Lapointe, N., et al., *Rotenone induces non-specific central nervous system and systemic toxicity*. FASEB J, 2004. **18**(6): p. 717-9.
257. Ferrante, R.J., et al., *Systemic administration of rotenone produces selective damage in the striatum and globus pallidus, but not in the substantia nigra*. Brain Res, 1997. **753**(1): p. 157-62.
258. Brooks, S.P. and S.B. Dunnett, *Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide*. Nat Rev Neurosci, 2009. **10**(7): p. 519-29.
259. Luong, T.N., et al., *Assessment of motor balance and coordination in mice using the balance beam*. J Vis Exp, 2011(49).
260. Kaltenboeck, A., et al., *Direct costs and survival of medicare beneficiaries with early and advanced Parkinson's disease*. Parkinsonism Relat Disord, 2012. **18**(4): p. 321-6.
261. DeKosky, S.T. and S. Asthana, *The evolution of geriatric neurology*. Handb Clin Neurol, 2019. **167**: p. 575-584.
262. Ortner, N.J., *Voltage-Gated Ca(2+) Channels in Dopaminergic Substantia Nigra Neurons: Therapeutic Targets for Neuroprotection in Parkinson's Disease?* Front Synaptic Neurosci, 2021. **13**: p. 636103.
263. Dong, J., et al., *Current Pharmaceutical Treatments and Alternative Therapies of Parkinson's Disease*. Curr Neuropharmacol, 2016. **14**(4): p. 339-55.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich alle danken, die die Vollendung meiner Promotion ermöglicht haben:

Herrn Prof. Dr. med. Johannes Levin danke ich herzlich für die Chance, eine interessante Doktorarbeit in der Neuropathologie ermöglicht zu haben, sowie für die sehr freundliche Betreuung dieser experimentellen Arbeit.

Herrn PhD Dr. med. Francisco Pan-Montojo danke ich ganz besonders für das anspruchsvolle Promotionsthema und seine tatkräftige Unterstützung. Danken möchte ich ihn weiterhin für die motivierenden Worte, für das Beantworten jeglicher Fragen sowie für das Voranbringen der schriftlichen Dissertation.

Frau Yanina Dening, Frau Alexandra Chovsepien und Frau Qi Shang danke ich sehr für die Einarbeitung im Labor, für die Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Experimente, für die Hilfe bei der Auswertung der Statistik sowie für die wertvollen Hilfestellungen im Laboralltag. Auch möchte ich mich für die kollegiale und hilfsbereite Atmosphäre in der Arbeitsgruppe bedanken.




Weiterhin möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranden Frau Theresa Straßl, Herrn Constantinos Hadjistyllis und Frau Magdalena Fischer für die gegenseitige Hilfe bedanken.

Danken möchte ich außerdem Frau Dr. med. vet. Stefanie Beer und Frau Gerda Mitteregger-Kretzschmar stellvertretend für das Team der Tierhaltung im Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung, die die gute Versorgung der Mäuse und den korrekten Ablauf der Versuche gewährleistet haben.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich an Frau Elke Schwerdtfeger für die ausführliche Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit aussprechen.

Zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie bedanken, insbesondere bei meinen Eltern Frédérique Genton und Patrick Jouin, die mir das Medizinstudium und gar die Promotion ermöglichten und mich bedingungslos unterstützten, sowie bei Conan Furlong für sein Verständnis und seine Geduld.

Affidavit

	LUDWIG- MAXIMILIANS- UNIVERSITÄT MÜNCHEN	Promotionsbüro Medizinische Fakultät		
Eidesstattliche Versicherung				

JOUIN-GENTON, Victoire Joséphine Constance

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eidesstatt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

DJ-1 als Beispiel der zentralen Rolle von Gen-Umwelt-Interaktionen in der Pathogenese und Pathologie des Morbus Parkinson

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.

München, den 14.11.2024

Victoire Jouin-Genton

Unterschrift Victoire Jouin-Genton