

Aus der
Neurologischen Klinik und Poliklinik
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Günter Höglinger

**Gen-Umwelt-Interaktion bei Morbus Parkinson: Untersuchung
des neuroprotektiven Effekts von Glykolsäure und D-Laktat
sowie der Rolle des endogenen Alpha-Synucleins**

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

vorgelegt von

Theresa Straßl

aus

Trostberg

Jahr

2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Johannes Levin

Mitberichterstatter: PD Dr. Annika Eißner

PD Dr. Roman Schniepp

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

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2024

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	7
Abbildungsverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis	11
Abkürzungsverzeichnis	12
1 Einleitung	14
1.1 Allgemeine Einführung und Epidemiologie	14
1.2 Klinik und Pathophysiologie	15
1.2.1 Basalganglienschleife	17
1.2.2 Progression nach Braak.....	18
1.3 Ätiologie	20
1.3.1 Genetik und familiäre Parkinsonerkrankung.....	20
1.3.2 Bedeutung von ASYN	23
1.3.3 Umwelttoxine.....	27
1.3.4 Gen-Umwelt-Interaktion.....	29
1.4 Tiermodelle in der Parkinson-Forschung	32
1.4.1 6-OHDA.....	32
1.4.2 MPTP	32
1.4.3 Paraquat	33
1.4.4 Rotenon.....	33
2 Zielsetzung	35
2.1 Untersuchung der neuroprotektiven Wirkung von Glykolsäure und D-Laktat im Paraquat-Mausmodell	35
2.2 Untersuchung der Rolle des endogenen ASYN in der Progression des MP im Rotenon-Mausmodell	37
3 Material und Methoden	39
3.1 Setting	39
3.2 Materialien	39
3.2.1 Geräte.....	39
3.2.2 Verbrauchsmaterialien	40
3.2.3 Chemikalien und Puffer	42

3.2.4	Antikörper für Immunhistochemie.....	43
3.3	Methoden.....	43
3.3.1	Tierhaltung.....	43
3.3.2	Quantifizierung der Motorfunktion im Rotarodtest	45
3.3.3	Transkardiale Perfusion und Präparation des Hirngewebes.....	46
3.3.4	Anfertigung histologischer Schnitte.....	46
3.3.5	Immunhistochemie.....	47
3.3.6	Montieren der Schnitte.....	49
3.3.7	Quantifizierung der dopaminergen Neurone mittels Stereologiemikroskop	50
3.3.8	Statistische Auswertung.....	52
4	Ergebnisse	54
4.1	Neuroprotektive Wirkung von GS und DL gegen Paraquattoxizität im Mausmodell.....	54
4.1.1	Hintergrund.....	54
4.1.2	Verhinderung einer Motordysfunktion bei Behandlung mit GS und DL	54
4.1.3	Schutz vor Neurodegeneration der SNpc durch Behandlung mit GS und DL	55
4.1.4	Kein Nachweis einer Neurogenese in der SNpc bei GS- und DL- Behandlung.....	58
4.1.5	Interpretation.....	60
4.2	Keine neurodegenerative Wirkung durch intragastrale Rotenonbehandlung in einjährigen ASYN-KO-Mäusen oder sechsmonatigen WT-Mäusen.....	61
4.2.1	Hintergrund.....	61
4.2.2	Keine Motordysfunktion durch Rotenonbehandlung bei einjährigen ASYN- KO-Mäusen	61
4.2.3	Keine Motordysfunktion durch Rotenonbehandlung bei WT-Mäusen im Alter von sechs Monaten.....	63
4.2.4	Motordysfunktion bei ASYN-KO-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp (6 Mo).....	64
4.2.5	Keine Neurodegeneration in der SNpc in ASYN-KO- und sechsmonatigen WT-Mäusen bei oraler Rotenonbehandlung nach zwei und vier Monaten	65
4.2.6	Interpretation.....	68
5	Diskussion	69

5.1	Untersuchung der neuroprotektiven Wirkung von GS und DL im Paraquat-Mausmodell.....	69
5.1.1	Grund der Versuchsdurchführung.....	69
5.1.2	Wahl der Methodik	69
5.1.3	Neuroprotektive Wirkung von DJ-1 durch GS und DL	70
5.1.4	Zusammenhang zwischen DJ-1 und Mitochondrien	70
5.1.5	Molekulare Mechanismen der DJ-1-Funktion zum Schutz der Mitochondrien	71
5.1.6	Weitere Funktionen von DJ-1 zum Schutz vor oxidativem Stress.....	74
5.1.7	Ausblick und Bedeutung von GS und DL in Säugetieren.....	75
5.1.8	Einsatz als Therapeutikum.....	77
5.1.9	Schlussfolgerungen.....	78
5.2	Bedeutung des endogenen ASYN für die Pathophysiologie des MP	79
5.2.1	Grund der Versuchsdurchführung.....	79
5.2.2	Wahl des Tiermodells	79
5.2.3	Neurodegeneration durch intragastrale Rotenonbehandlung in einjährigen WT-Mäusen.....	81
5.2.4	Kein Anhalt für Neurodegeneration in Wildtypmäusen im Alter von sechs Monaten nach intragastraler Rotenonbehandlung	82
5.2.5	Hypothesen zur Bedeutung von endogenem ASYN für die Pathogenese des MP	83
5.2.6	Weitere Untersuchungen zur Unterstützung dieser Theorie	88
5.2.7	Gen-Umwelt-Interaktion von ASYN-KO mit weiteren Umwelttoxinen	89
5.2.8	Motordysfunktion bei den ASYN-KO-Mäusen	90
5.2.9	Bedeutung der Ergebnisse für therapeutische Ansätze des MP	91
5.2.10	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	92
5.3	Bedeutung der Gen-Umwelt-Interaktion für die Versuche dieser Arbeit	94
	Literaturverzeichnis	95
	Danksagung	115
	Eidesstattliche Versicherung.....	116
	Publikationen zur Dissertation.....	117

Zusammenfassung

Als bedeutender Faktor in der Ätiologie des Morbus Parkinson wird die Interaktion zwischen genetischen und Umweltfaktoren angesehen [11]. In der vorliegenden Arbeit werden zwei Versuche zur Untersuchung dieser Gen-Umweltinteraktion in der Pathologie und Progression der Erkrankung beschrieben.

Versuch 1: Untersuchung der neuroprotektiven Wirkung von Glykolsäure und D-Laktat im Paraquat-Mausmodell

Eine der bekannten, erblichen Parkinsonformen konnte auf einen Funktionsverlust des Gens DJ-1 zurückgeführt werden [12]. Dieses Gen codiert für ein Enzym aus der Familie der Glyoxalasen, zu dessen Reaktionsprodukten unter anderem die Verbindungen Glykolsäure (GS) und D-Laktat (DL) gehören [13].

Zunächst wurde dem Enzym DJ-1 in erster Linie eine entgiftende Funktion zugesprochen, mit der es der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen entgegenwirkt [13]. Toyoda et al. hat jedoch eine weitere Funktion von DJ-1 in Form eines neuroprotektiven Effekts seiner Enzymprodukte GS und DL untersucht. Diesen beiden Verbindungen konnte bereits *in vitro* ein neuroprotektiver Effekt unter erhöhtem, oxidativen Stress nachgewiesen werden, der durch eine Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials vermittelt wird [4].

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der neuroprotektive Effekt einer GS- und DL-Behandlung gegen die Toxizität von Paraquat im Mausmodell reproduzierbar ist. Paraquat ist ein Herbizid, das in der Parkinsonforschung eingesetzt wird, da es unter anderem im Mausmodell eine mit Morbus Parkinson vergleichbare Pathologie auslöst [14]. Dazu wurden Wildtypmäuse für drei Wochen intraperitoneal mit Paraquat oder NaCl (Vehikelgruppe) behandelt. Zwei der Paraquatgruppen erhielten zusätzlich oral GS oder DL. Im Anschluss wurde die Motorfunktion der Mäuse in einem Rotarodtest analysiert und die Gehirnschnitte mit Anti-Tyrosinhydroxylase-Antikörpern gefärbt und mikroskopisch untersucht. Mit dieser Färbung können die dopaminergen Neuronen der Substantia nigra, pars compacta angefärbt und deren Anzahl im Stereologie-Mikroskop bestimmt werden, um eine Neurodegeneration nachzuweisen.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Paraquatbehandlung im Mausmodell eine Motordysfunktion und einen signifikanten Verlust dopaminerger Neurone der Substantia

nigra, pars compacta im Vergleich zur Vehikelgruppe auslösen konnte. Die gleichzeitige Behandlung mit GS oder DL konnte diesen neurodegenerativen Effekt vollständig verhindern. Dies weist auf einen neuroprotektiven Effekt der Produkte von DJ-1 gegen Umwelttoxine hin. GS und DL könnten damit potenziell eine Rolle in der Therapie der Erkrankung spielen.

Versuch 2: Untersuchung der Rolle des endogenen ASYN in der Progression des MP im Rotenon-Mausmodell

Nach Braak erfolgt die Progression des Morbus Parkinson stadienhaft entlang von Nervenbahnen, aufsteigend vom enterischen Nervensystem bis ins zentrale Nervensystem [15]. Die Progression scheint auf Proteinablagerungen aus fehlgefaltetem Alpha-Synuclein (ASYN) zurückzuführen zu sein, welche in der entsprechenden zeitlichen Sequenz in den betroffenen Neuronen nachweisbar werden [16]. Sie erfolgt wahrscheinlich durch retrograden, axonalen Transport von ASYN über synaptisch verbundene Nervenzellen [17]. Eine orale Behandlung mit dem Pestizid Rotenon kann eine vergleichbare, stadienhafte Progression im Mausmodell auslösen, an deren Ende die Aggregation von ASYN und begleitende Neurodegeneration in der SNpc steht [18].

Im zweiten Versuch sollte die Rolle des endogenen ASYN bei der Progression des MP analysiert werden. Es wurde untersucht, ob eine parkinsontypische Pathologie in der SNpc durch eine orale Rotenonbehandlung auch bei ASYN-KO-Mäusen induzierbar ist.

Dazu wurden ASYN-KO-Mäuse, die kein körpereigenes ASYN produzieren, über zwei bzw. vier Monate oral mit Rotenon behandelt. Anschließend wurden die Motorfunktion der Mäuse im Rotarodtest und eine potenzielle Neurodegeneration der SNpc durch stereologische Untersuchung von immunfluoreszierenden Gehirnschnitten untersucht [3].

Es zeigte sich, dass eine orale Rotenonbehandlung in Abwesenheit von endogenem ASYN weder eine Motordysfunktion noch eine Neurodegeneration der SNpc auslösen konnte. Daraus lässt sich folgern, dass das Vorhandensein von körpereigenem ASYN Voraussetzung für die Progression der Erkrankung ist [3].

Teilergebnisse dieses Versuches wurden bereits publiziert in Scientific reports, 2022 [3].

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Darstellung eines Parkinsonpatienten von Sir William Richard Gowers in “A manual of diseases of the nervous system” 1886 [6]	14
Abb. 1-2: Neuropathologie des MP	16
Abb. 1-3: Klassisches Modell der Basalganglienschleife im Gesunden und bei MP	18
Abb. 1-4: Die sechs Stadien der Pathologie des MP nach Braak	19
Abb. 1-5: Aufnahme und Wirkmechanismus der Toxine 6-OHDA, MPTP, Paraquat und Rotenon	32
Abb. 2-1: Funktion des Enzyms DJ-1	35
Abb. 2-2: Verbessertes Überleben dopaminerger Neurone durch GS- oder DL- Behandlung in vitro	36
Abb. 3-1: Behandlungsschema Paraquat-Mausmodell	44
Abb. 3-2: Behandlungsschema Rotenon.....	45
Abb. 3-3: Prinzip der Immunhistochemie	47
Abb. 3-4: Jeder 6. Koronarschnitt eines Gehirns der Kontrollgruppe mit Anti-TH- Färbung.....	52
Abb. 4-1: Verhinderung einer Paraquat-induzierten Abnahme der Motorfunktion durch GS- oder DL-Behandlung im Mausmodell.....	55
Abb. 4-2: Vollständige Verhinderung einer Paraquat-induzierten Neurodegeneration durch Behandlung mit GS oder DL im Fluoreszenzmikroskop (Übersicht).....	56
Abb. 4-3: Verhinderung einer Paraquat-induzierten Neurodegeneration durch GS oder DL-Behandlung	58
Abb. 4-4: Keine Induktion einer Neurogenese in der SNpc durch GS- oder DL- Behandlung.....	59
Abb. 4-5: Keine Motordysfunktion bei ASYN-KO-Mäusen unter intragastraler Rotenonbehandlung im Zeitverlauf	62
Abb. 4-6: Keine Motordysfunktion im Zeitverlauf durch intragastrale Rotenonbehandlung bei WT-Mäusen im Alter von sechs Monaten	63
Abb. 4-7: Erniedrigte basale Motorfunktion bei ASYN-KO-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen (6 Monate) unabhängig von der Behandlung	64
Abb. 4-8: Erniedrigte Rotarodleistung von ASYN-KO-Mäusen im Vergleich zu sechsmonatigen Wildtypmäusen zum Zeitpunkt 0	65
Abb. 4-9: Kein Anhalt für Neurodegeneration in der SNpc bei ASYN-KO-Mäusen und Wildtypmäusen (6 Monate) unter intragastraler Rotenonbehandlung	66

Abb. 4-10: Kein Anhalt für Neurodegeneration der SNpc in der Quantifizierung der TH ⁺ Neurone bei ASYN-KO- und WT-Mäusen (6 Monate) unter intragastraler Rotenonbehandlung.....	68
Abb. 5-1: Wirkung von GS	73
Abb. 5-2: Keine erhöhte Sensitivität auf Paraquattoxizität bei DJ-1-KO-Mäusen.....	76
Abb. 5-3: Progression der ASYN-Pathologie vom ENS ins ZNS	80
Abb. 5-4: Nachweis der Neurodegeneration bei intragastraler Rotenonbehandlung in einjährigen Wildtypmäusen durch Quantifizierung der TH ⁺ Neuronen	81
Abb. 5-5: Wirkung verschiedener Toxine auf dopaminerge Neuronen (WT vs. ASYN-KO).....	84
Abb. 5-6: Möglicher Mechanismus der Progression von ASYN	87

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: gemeinsame Wirkungsmechanismen von familiären Parkinsonformen und Toxinen [71, 75, 109, 144]	29
Tabelle 3-1: Verwendete Geräte	40
Tabelle 3-2: Verbrauchsmaterialien	41
Tabelle 3-3: Chemikalien und Puffer	42
Tabelle 3-4: Verwendete Antikörper	43
Tabelle 3-5: Gefriermedium, ca. 20 min mischen, bei 4 °C lagern	47
Tabelle 3-6: Protokoll der Anti-TH-Färbung	48
Tabelle 3-7: Blockierlösung	49
Tabelle 3-8: Protokoll Montiermedium	50
Tabelle 3-9: Einstellungen am Stereologiemikroskop	51
Tabelle 4-1: Quantifizierung der dopaminergen, TH ⁺ Neuronen der SNpc nach immunhistochemischer Färbung mittels StereoInvestigator Software (n = 6)	57
Tabelle 4-2: Quantifizierung der dopaminergen, TH ⁺ Neuronen der SNpc nach immunhistochemischer Färbung mittels StereoInvestigator Software (n = 5) [3].....	67

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
6-OHDA	Hydroxydopamin
AGE	Advanced glycation end products
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ASYN	α -Synuclein
BSYN	β -Synuclein
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DAT	Dopamintransporter
DD-Wasser	Doppelt destilliertes Wasser
dH₂O	Destilliertes Wasser
DKI	Diffusion kurtosis imaging
DL	D-Laktat
dmX	Dorsaler motorischer Vaguskern
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ENS	Enterisches Nervensystem
g	Gramm
GS	Glykolsäure
GSYN	γ -Synuclein
h	Stunde
i.p.	Intraperitoneal
IVC	Individuell ventilierter Käfige
kg	Kilogramm
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
KO	Knockout
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
MAO	Monoaminoxidase
min	Minute
ml	Milliliter
Mo	Monate
MP	Morbus Parkinson
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
NaCl	Natriumchlorid

Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFA	Phosphatgepufferte Formaldehydlösung
PINK1	P-TEN induced novel kinase 1
PNS	Peripheres Nervensystem
PTP	Permeabilitäts-Transitionsproteine
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	Umdrehungen/Minute
Rpm/s	Umdrehungen/Minute/Sekunde
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean)
SPF	Spezifisch-pathogen-freien
TH	Tyrosinhydroxylase
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
ZNP	Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung
ZNS	Zentrales Nervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung und Epidemiologie

1817 legte der britische Arzt James Parkinson mit seinem „Essay on the Shaking Palsy“ (Abhandlung über die Schüttellähmung) den Grundstein für die Erforschung des Morbus Parkinson (MP). Darin beschrieb er erstmals die Kardinalsymptome der Erkrankung [19].



Abb. 1-1: Darstellung eines Parkinsonpatienten von Sir William Richard Gowers in “A manual of diseases of the nervous system” 1886 [6]

Morbus Parkinson ist nach Morbus Alzheimer die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung [20]. Die Prävalenz unterliegt regionalen Unterschieden, in Nordamerika und Mitteleuropa wird sie auf 100 bis 200 Erkrankte pro 100000 Einwohner geschätzt, im Altersbereich über 65 Jahren auf etwa 1,8 %. Üblicherweise handelt es sich bei MP um eine Erkrankung des höheren Lebensalters, die meist jenseits des 40. Lebensjahres auftritt [21]. Die steigende Lebenserwartung lässt auch eine Zunahme der Erkrankung in den nächsten Jahren erwarten.

Neben der idiopathischen Form des MP sind familiäre Formen infolge von Genmutationen bekannt, die teilweise zu einem früheren Krankheitsbeginn führen. Als Young-Onset wird in der Literatur ein Krankheitsbeginn vor dem 40. Lebensjahr

bezeichnet, von Juvenilem Parkinson spricht man bei Symptomen vor dem 20. Lebensjahr [22].

1.2 Klinik und Pathophysiologie

Bei Morbus Parkinson handelt es sich um eine systemische, progrediente, neurodegenerative Erkrankung. Sie betrifft bestimmte Neuronen des enterischen, peripheren und zentralen Nervensystems (ENS, PNS, ZNS). Als charakteristische Symptome des Morbus Parkinson gelten Akinese/Bradykinese (Bewegungsarmut bzw. Bewegungsverlangsamung), Rigor (Muskelsteifigkeit), Ruhetremor (Muskelzittern) und posturale Instabilität (Haltungsinstabilität) (Abb. 1-1). Klassischerweise beginnen die Symptome einseitig. Die Asymmetrie bleibt meist über den Krankheitsverlauf erhalten. Seltener treten Hypophonie (leises Sprechen), Schluckstörungen mit folglich erhöhtem Speichelfluss und eine verringerte Feinmotorik und Koordination auf [21].

Die Motorsymptome sind großteils auf die fortschreitende Degeneration der dopaminergen, neuromelaninhaltigen Nervenzellen der Substantia nigra pars compacta (SNpc) des Mittelhirns zurückzuführen [21]. Das freigesetzte Neuromelanin der untergegangenen Neuronen wird durch Mikroglia abgebaut. Das macht die Neurodegeneration makroskopisch durch eine Depigmentierung der Substantia nigra sichtbar (Abb. 1-2; A, B). Es kommt zu einem Mangel an Dopamin an entsprechenden Rezeptoren des Striatums. Dort liegen die präsynaptischen Endungen der dopaminergen Neurone [22]. Substantia nigra und Corpus Striatum sind wichtige Bestandteile der Basalganglienschleife, die für die Ausführung bewusster Bewegungen essentiell ist [22].

Hinzu kommen nichtmotorische Symptome, die bei fast 90 % der Patienten vorkommen und unterschiedlich stark ausgeprägt sind [23]. Dazu zählen Schlafstörungen, Geruchstörungen und Obstipation, welche häufig bereits Jahre vor Einsetzen der motorischen Symptome auftreten, sowie Demenz und Depression [21, 24]. Diese Symptome sind durch den Verlust nicht-dopaminergener Neurone in anderen Hirnarealen erklärbar mit Beteiligung noradrenerger, serotoninerger und cholinergere Systeme [21].

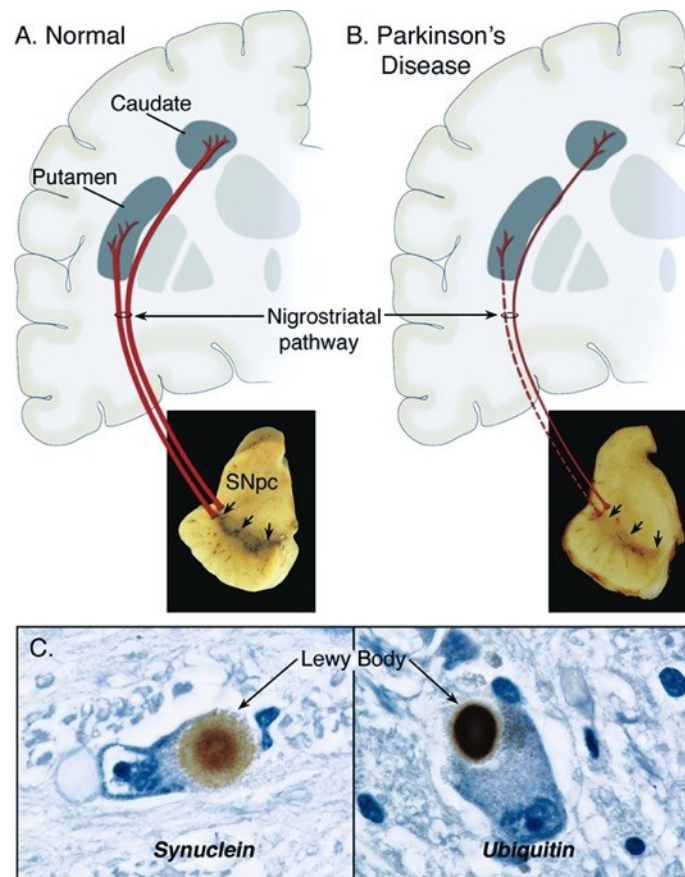


Abb. 1-2: Neuropathologie des MP

Makroskopisch sichtbare Depigmentierung der SNpc durch Neurodegeneration und Schädigung der nigrostriatalen Bahn bei MP (B) im Vergleich zum Gesunden (A). Lewy Körperchen in dopaminergen Neuronen der SNpc (C). Immunhistochemische Färbung von ASYN- und Ubiquitin-Ablagerungen. (Dauer et al., 2003, S. 891 [7])

In den betroffenen Neuronen bilden sich Zelleinschlüsse, die in Nervenfortsätzen als Lewy-Neuriten (LN) oder im Zellsoma als Lewy-Körperchen (Lewy body, LB) bezeichnet werden (Abb. 1-2; C) [22]. Hauptbestandteil der Einschlüsse sind Proteinablagerungen aus aggregiertem Alpha-Synuclein (ASYN) und Ubiquitin [25]. Lewy-Körperchen kommen in bestimmten, anatomisch verbundenen Nervenzelltypen vor. Neben der Substantia nigra sind verschiedene Gebiete von ENS, PNS und ZNS betroffen. Die Ablagerung der Lewy-Körperchen folgt dabei einer festen Reihenfolge von der Peripherie ins Gehirn [10]. Zuerst sind der Bulbus olfactorius (OB), das ENS, der dorsale motorische Vagus Kern (dmX) und die sympathischen Ganglien betroffen, später die Formatio reticularis, die Raphekerne, der Nucleus Coeruleus und die SNpc. Im Endstadium sind Lewy-Körperchen auch in Thalamus und Kortex nachweisbar [16, 26, 27, 28].

1.2.1 Basalganglienschleife

Die charakteristischen Motorsymptome des Morbus Parkinson können auf eine Fehlfunktion der Basalganglienschleife zurückgeführt werden. Bei den Basalganglien handelt es sich um mehrere, subkortikale Kerngebiete, die als Rückkopplungsschleife die Generierung von Willkürmotorik modulieren.

Der Ausgangspunkt der Basalganglienschleife liegt im Striatum, welches Efferenzen von Kortex und Thalamus erhält. Von dort werden stark vereinfacht zwei Signalwege unterschieden: Ein direkter exzitatorischer Pfad und ein indirekter inhibitorischer Pfad (Abb. 1-3) [29]:

- Der direkte Pfad führt über Striatum und Globus pallidus internus zu einer Verstärkung der Motorik. Da beide Kerngebiete hemmend wirken (GABAerg), folgt insgesamt eine Desinhibition, also eine verstärkte Aktivierung von Thalamus und Kortex.
- Beim indirekten Pfad hingegen wirkt das Striatum hemmend auf den Globus pallidus externus, welcher wiederum den Nucleus subthalamicus inhibiert. Folglich kommt es zu einer verstärkten Aktivierung des Globus pallidus internus und damit einer Hemmung von Thalamus und Kortex.

Der Substantia nigra pars compacta kommt ein modulierender Einfluss auf die Aktivität des Striatums zu, der die direkte Schleife verstärkt (über D1 Rezeptoren) und die indirekte unterdrückt (über D2 Rezeptoren). Dies resultiert in einer verstärkten Motoraktivität.

Durch den Verlust der dopaminergen Neurone der SNpc bei Morbus Parkinson fällt diese Verstärkung weg. Es überwiegt der hemmende Einfluss der Basalganglien auf Thalamus und Kortex, was in hypokinetischen Bewegungseinschränkungen resultiert [29].

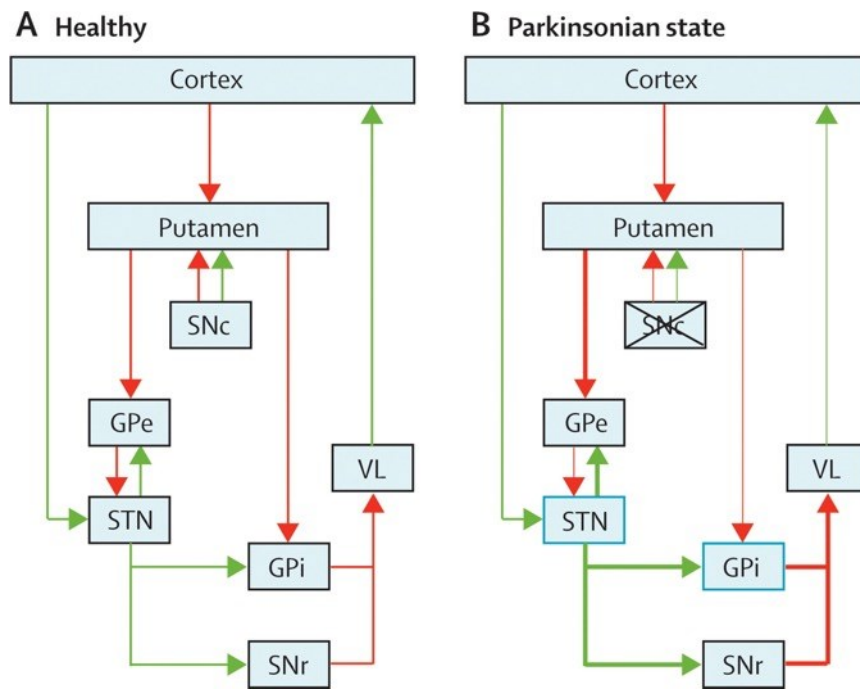


Abb. 1-3: Klassisches Modell der Basalganglienschleife im Gesunden und bei MP

Afferenzen aus dem Motorkortex erreichen das Putamen (Teil des Striatums). Von dort sind ein direkter, Motorik-verstärkender Pfad (monosynaptisch über GPi) sowie ein indirekter, inhibitorischer Pfad (trisynaptisch über GPe – STN – GPi) möglich. Vom inhibitorischen GPi gehen Efferenzen über den Thalamus zurück zum Motorkortex. Die SNpc hat modulierende Eigenschaften auf das Striatum, bei Gesunden verstärkt sie den direkten und unterdrückt den indirekten Pfad (A). Bei MP fällt diese Modulation durch Neurodegeneration der SNpc weg, es kommt zu hypokinetischen Bewegungsstörungen (B). GPe = Globus pallidus externus, GPi = Globus pallidus internus, SNc = Substantia nigra pars compacta, STN = Nucleus subthalamicus, VL = ventrolateraler Nucleus des Thalamus. (Modifiziert nach Rodriguez-Oroz et al., 2009, S. 1130 [5])

1.2.2 Progression nach Braak

Die pathologische Motorsymptomatik manifestiert sich erst ab einem Verlust von ca. 50 % der dopaminergen Neuronen der Substantia nigra pars compacta [30]. Die Diagnosestellung erfolgt klinisch und dadurch meist relativ spät, wenn bereits ein irreversibler Verlust eines Großteils der Nervenzellen stattgefunden hat. Unspezifische, nichtmotorische Symptome wie Riechverlust und Konstipation können jedoch viel früher auftreten [31, 32, 33]. Neuropathologische Veränderungen sind bereits Jahre vorher nachweisbar. Dabei folgt die Ablagerung der Lewy-Körperchen einer festen topographischen Sequenz, anhand derer Braak die Erkrankung in sechs neuropathologische Stadien einteilte (Abb. 1-4) [10, 16]:

Initial treten Lewy-Körperchen mit Alpha-Synuclein-Ablagerungen im Bulbus Olfactorius und im dorsalen motorischen Vaguskern in der Medulla oblongata auf

(Stadium 1). Auffällig ist, dass diese beiden Areale über den Geruchssinn und als Verbindung zum enterischen Nervensystem in direktem Kontakt zur Umwelt stehen.

Als nächstes ist der Hirnstamm betroffen (unter anderem Nachweis in der Formatio reticularis: kaudale Raphekerne, Nucleus reticularis gigantocellularis und Locus coeruleus) (Stadium 2).

Im Stadium 3 befällt die Pathologie unter anderem das Mittelhirn und damit die SNpc sowie die Amygdala. Ab Stadium 4 ist erstmals der Kortex in Form des anteromedialen, temporalen Mesokortex betroffen. Die Pathologie in der SNpc schreitet fort, sodass die Patienten erstmals klinisch auffällig werden.

Schließlich erreichen die Lewy-Körperchen im Stadium 5 und 6 die neokortikalen Assoziationsareale und den primären motorischen und somatosensorischen Kortex.

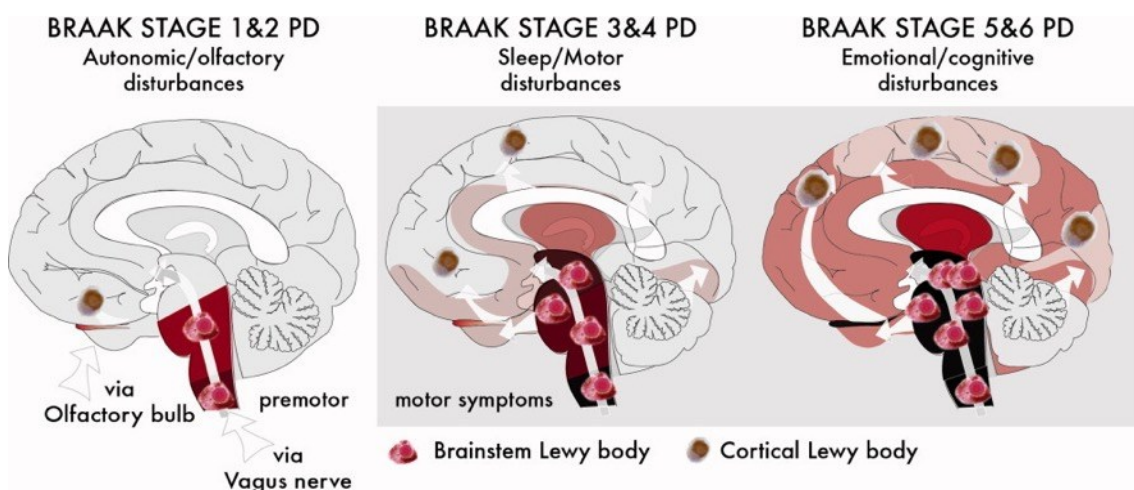


Abb. 1-4: Die sechs Stadien der Pathologie des MP nach Braak

Die ersten Läsionen sind im dorsalen motorischen Kern des N. Vagus und im Bulbus olfactorius nachweisbar (Stadium 1). Von dort aufsteigend erreichen sie den Hirnstamm (Stadium 2), die Amygdala, die Kerne des basalen Vorderhirns und die SNpc (Stadium 3), den anteromedialen Mesokortex (Stadium 4) und den Neokortex (Stadien 5,6). (Halliday et al., 2016, S. 1016 [8])

Die Symptome der Erkrankung korrelieren dabei in ihrem zeitlichen Auftreten mit den Progressionsstadien nach Braak: Riechverlust und Obstipation treten als erste klinische Manifestationen auf, der Befall von Hirnstamm und Mittelhirn äußert sich mit Schlaf-

und Motorikstörungen. Spät im Krankheitsverlauf zeigen sich Auffälligkeiten von Verhalten und Kognition [34].

Es fällt auf, dass alle betroffenen Areale des Nervensystems synaptisch miteinander verbunden sind. Dies eröffnet die Hypothese, dass sich die Erkrankung entlang von Nervenbahnen ausbreitet. Braak postulierte erstmals, dass diese Progression durch ein unbekanntes, neurotropes Pathogen oder Agens via axonalen Transport und transneuronalen Übertragung erfolgen könnte [10].

1.3 Ätiologie

Die genaue Ursache der Erkrankung ist weiterhin nicht vollständig bekannt. Die Mehrheit der Parkinsonfälle tritt sporadisch auf, nur ein kleiner Anteil von etwa 5 bis 10 % wird nachweislich durch verschiedene genetische Mutationen verursacht [35]. Die idiopathische Form wird auf eine multifaktorielle Genese zurückgeführt, bei der Umweltfaktoren und eine erhöhte genetische Anfälligkeit eine Rolle spielen [11].

1.3.1 Genetik und familiäre Parkinsonerkrankung

Einen wesentlichen Beitrag zur Erforschung der Pathophysiologie des MP leistete die Entdeckung von familiären Formen der Erkrankung [36]. Bei der Untersuchung von betroffenen Familien im Mittelmeerraum, in denen gehäuft Parkinsonfälle mit überdurchschnittlich frühem Krankheitsbeginn auffielen, wurden erstmals Mutationen im Alpha-Synuclein-Gen gefunden [37].

Durch systematische Analyse konnten inzwischen über 15 verschiedene, zugrundeliegende Gene identifiziert werden [38], die zu familiärem Parkinson führen. Zu den am besten untersuchten Formen gehören ASYN und LRRK2 mit autosomal dominantem Erbgang, sowie Parkin, PINK1 und DJ-1 mit autosomal-rezessivem Erbgang [39]. Die familiären Erkrankungen zeigen dabei Unterschiede in Phänotyp, Pathologie und Erkrankungsalter.

Durch die Erforschung dieser Gene, der von ihnen kodierten Proteine und der beteiligten Signalwege können Rückschlüsse auf die Pathologie der Erkrankung und damit auch auf die viel häufigere sporadische Form des MP gezogen werden.

α -Synuclein (PARK 1)

Mutationen im Alpha-Synuclein-Gen wurden 1997 als erste familiäre Parkinsonform identifiziert. Bislang wurden sowohl Punktmutationen (A53T, A30P und E46K) [37, 40, 41] als auch Duplikationen und Triplikationen [42, 43] beschrieben. Weitere Missense-Mutationen wurden seitdem entdeckt.

Ablagerungen des Alpha-Synuclein-Proteins konnten als Hauptbestandteil von Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten bei Parkinsonpatienten nachgewiesen werden [25]. Das deutet auf eine zentrale Rolle des Proteins in der Krankheitsentstehung hin, auch wenn die ASYN-Mutationen einen eher geringen Anteil an den familiären Fällen ausmachen [39]. ASYN-Mutationen werden autosomal-dominant vererbt [44] und führen zu einem frühen Erkrankungsbeginn mit vergleichsweise schneller Progression [45].

Parkin (PARK 2)

Weitere Einblicke in die Entstehung des MP erlaubte die Entdeckung einer Mutation im Gen für das Parkinprotein [46]. Es handelt es sich um eine E3-Ubiquitin-Ligase, die vor allem im Nervensystem exprimiert wird und Proteine für den Abbau im Proteasom mit Ubiquitin markiert [47, 48]. Auf diese Weise könnte Parkin auch für den Abbau von defektem Alpha-Synuclein eine Rolle spielen [49].

Die Mutation des Parkin-Gens ist die häufigste Ursache für familiären, autosomal-rezessiven Parkinson [50], konnte jedoch auch in sporadischen Fällen nachgewiesen werden [51]. Sie ist gekennzeichnet durch einen frühen Krankheitsbeginn vor dem 40. Lebensjahr, in einigen Fällen sogar durch einen juvenilen Parkinson mit langsamer Progression [52]. Teils zeigt sich ein abweichender Phänotyp mit milden Motorsymptomen, dafür Fußdystonie und Hyperreflexie sowie Fehlen von Demenz und autonomen Symptomen [52]. Es kommt zur charakteristischen Neurodegeneration der SNpc, Lewy-Körperchen sind allerdings spärlich oder sogar gar nicht nachweisbar [53].

PINK1 (PARK6)

Bei PINK1 (P-TEN induced novel kinase 1) handelt es sich um die zweithäufigste autosomal-rezessive Form nach Parkin. Die beiden Mutationen zeigen eine Überlappung im Phänotyp [54] und scheinen im gleichen Signalweg zu wirken [55]. Auch in sporadischen Parkinsonfällen konnten PINK1-Mutationen nachgewiesen werden [54].

PINK1 ist eine mitochondriale Kinase, die zum Schutz vor oxidativem Stress beiträgt [56] und zusammen mit Parkin den Abbau von defekten Mitochondrien, die Mitophagie, aktiviert [55].

DJ-1 (PARK 7)

Das Gen DJ-1 wurde 2003 erstmals für eine familiäre Form des MP verantwortlich gemacht [12], zuvor war es als Onkogen beschrieben worden [57]. Sowohl eine Deletion im DJ-1-Gen in einer niederländischen Familie als auch eine Punktmutation in einer italienischen Familie wurden identifiziert [12]. Ein Funktionsverlust des Gens führt zu einer autosomal-rezessiven Erkrankungsform, die schon im Alter von 30 bis 40 Jahren klinisch manifest wird [58]. DJ-1-Mutationen sind für weniger als 2 % der Early-Onset-Parkinsonfälle verantwortlich [59, 60].

Das Protein DJ-1 besteht aus 189 Aminosäuren [12] und gehört zur Familie der Glyoxalasen [13]. Es wird ubiquitär exprimiert und konnte sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen nachgewiesen werden [61]. Das Protein kommt in Zytoplasma, Nucleus und Mitochondrien vor [62]. Die Expression von DJ-1 ist unter oxidativem Stress erhöht [63]. Es wird angenommen, dass seine physiologische Aufgabe im Schutz der Mitochondrien vor oxidativem Stress besteht [62, 64, 65]. Die genaue Funktion bleibt weiterhin unklar.

Der von DJ-1 vermittelte Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wird durch Oxidation seiner drei Cysteingruppen vermittelt [66]. Eine wichtige Rolle wird dem Cystein C106 zugeschrieben, welches als Sensor für oxidativen Stress fungiert und die Aktivität von DJ-1 reguliert [66, 67]. Bei erhöhten Spiegeln reaktiver Sauerstoffspezies kommt es zur schrittweisen Oxidation der SH-Gruppe des Cysteins über -SOH und -SO₂H zu -SO₃H [65, 66]. Die SO₂H-Form von DJ-1 hat dabei die höchste Aktivität, wohingegen eine weitere Oxidation der Schwefelgruppe zur Inaktivierung des Proteins führt [68]. Der C106-Rest ist hoch konserviert und in seiner oxidierten Form unter anderem für die Translokation von DJ-1 in die Mitochondrien zuständig [69]. Unter oxidativem Stress konnte zudem eine erhöhte Translokation in den Zellkern nachgewiesen werden, wo das Protein seine Regulatorfunktion auf die Transkription verschiedener Gene ausübt [70]. Ein Defekt der C106-Gruppe hat einen Verlust der physiologischen Funktionen von DJ-1 zur Folge [65]. Neben seiner Rolle als Sensor für oxidativen Stress trägt DJ-1 auch als Antioxidans direkt zur Neutralisation von ROS bei

[64]. Weitere Funktionen von DJ-1 werden in den Kapiteln 5.1.4, 5.1.5 und 5.1.6 genauer beschrieben.

Damit besteht eine Verbindung zwischen PINK1-, Parkin- und DJ-1-Mutationen: Sie werden alle mit mitochondrialer Dysfunktion und oxidativem Stress assoziiert [71]. Es wird angenommen, dass PINK1 und Parkin im selben, DJ-1 hingegen in einem parallelen Signalweg wirken [72].

LRRK 2 (PARK 8)

Die LRRK2-Mutationen (Leucine-Rich Repeat-Kinase 2) machen etwa 1 % der sporadischen und 4 % der familiären Parkinson-Erkrankungen aus [73] und äußern sich klinisch wie die idiopathische Form [74]. Auch LRRK2 konnte in Zusammenhang mit den Mitochondrien gebracht werden [75]. Die exakte Funktion von LRRK2 ist jedoch weiterhin unklar. Eine Neurodegeneration der SNpc und des Locus Coeruleus sind typisch, das Auftreten einer LB-Pathologie hingegen variabel [76, 77].

1.3.2 Bedeutung von ASYN

Das ASYN-Gen kodiert für ein kleines, hauptsächlich präsynaptisch lokalisiertes Protein, das im gesamten Nervensystem exprimiert wird [78, 79]. Weder die genaue physiologische Funktion noch der Pathomechanismus der ASYN-Toxizität bei MP sind endgültig geklärt.

Physiologische Funktion von ASYN: SNARE-Komplexbildung beim Vesikeltransport von Neurotransmittern

ASYN-KO-Mäuse sind ein gängiges Modell, um Rückschlüsse auf die physiologische Funktion des Proteins ASYN zu ziehen. Bisherige Untersuchungen weisen darauf hin, dass es eine Rolle bei der synaptischen Übertragung spielt [80] und die Dopaminfreisetzung aus präsynaptischen Vesikeln reguliert [78, 79].

Als zu Grunde liegender Mechanismus wird eine Interaktion mit dem SNARE-Protein-Komplex bei der Vesikelfreisetzung von Neurotransmittern vermutet [81]. Es konnte eine Bindung von ASYN an Phospholipide [82] und Synaptobrevin 2/VAMP2, ein Protein des SNARE-Komplexes, nachgewiesen werden [79, 81]. Ein Triple-KO aller bekannten Synuclein-Proteine (ASYN, BSYN, GSYN) löste eine neuronale Dysfunktion im Alter

ohne begleitende Neurodegeneration aus [81, 83]. Der genaue Einfluss eines ASYN-KO auf die Dopaminspiegel und Dopaminfreisetzung sind weiterhin unklar [80, 84, 85].

Da ein Knockout der Synuclein-Gene keine Neurodegeneration zur Folge hat [80, 84, 86], scheint die Neurodegeneration des MP nicht auf den Verlust der physiologischen Funktion von ASYN zurückzuführen zu sein [87].

Überexpression von ASYN

Bisherige Studien zur Überexpression von ASYN ergaben widersprüchliche Ergebnisse. Eine erhöhte Expression durch Duplikation oder Triplikation des ASYN-Gens konnte als Ursache für familiäre Parkinsonformen identifiziert werden [42, 43]. Auch eine künstliche Überexpression von Wildtyp-ASYN sowie von A30P- und A53T-ASYN, zwei für familiäre Parkinsonformen verantwortliche Punktmutationen, konnte eine Neurodegeneration auslösen [88]. Dieser Effekt konnte jedoch nicht durchgehend reproduziert werden [89]. Eine Überexpression von ASYN allein scheint nicht auszureichen, um reproduzierbar eine Neurodegeneration auszulösen [89].

Toxizität von ASYN: Konformationen des ASYN und Aggregation

Das Protein ASYN kann verschiedene Konformationen annehmen: ASYN liegt überwiegend als lösliches, nativ ungefaltetes Monomer vor [90]. Dieses kann entweder in eine alpha-helikale, membrangebundene Form übergehen, welche wahrscheinlich die physiologische Funktion bei der synaptischen Transmission vermittelt [82, 90, 91, 92], oder in eine Beta-Faltblatt-Struktur mit Bildung von Dimeren und Oligomeren. Die Oligomere neigen zur Aggregation und bilden unlösliche Protofibrillen und Fibrillen [93, 94, 95, 96], welche den Hauptbestandteil der LB ausmachen [25]. Vor allem ASYN-Oligomeren wird eine neurotoxische Wirkung zugesprochen [97, 98, 99]. Eine verstärkte Aggregation von ASYN zeigt sich insbesondere bei erhöhten ASYN-Leveln [100], pathologischen Mutationen [94], erhöhtem, oxidativen Stress [101, 102, 103] und in Gegenwart von Eisenionen (Fe^{3+}) [104, 105].

Als logische Konsequenz untersuchen aktuelle Forschungsansätze zur Therapie des MP unter anderem Substanzen, die die Bildung von ASYN-Oligomeren und die Aggregation hemmen. Dazu zählt der Oligomermodulator Anle138b, der im Mausmodell eine protektive Wirkung gegen die Toxizität von ASYN zeigt [106, 107].

Seeding-Effekt vs. mitochondrialer Schaden

Über den zugrunde liegenden Mechanismus der Toxizität von ASYN-Oligomeren und Protofibrillen gibt es verschiedene Theorien: Während die einen von einer mitochondrialen Schädigung mit erhöhtem, oxidativen Stress für die Nervenzellen ausgehen [99, 108, 109, 110], führen andere die Toxizität auf einen sogenannten Seeding-Effekt zurück [111, 112, 113, 114, 115]. Dieser Seeding-Effekt besagt, dass fehlgefaltete ASYN-Oligomere oder -Protofibrillen intrazellulär weiteres natives, lösliches ASYN rekrutieren und zur Aggregation anregen, vergleichbar mit dem Mechanismus, der aus Prionenerkrankungen bekannt ist. Diese „Seeds“ können zwischen den Neuronen weitergegeben werden und so die Pathologie verbreiten [116].

Erstmals postulierte Braak die Hypothese, dass die Progression des MP durch ein neurotropes Pathogen erfolgt, möglicherweise in Form von fehlgefaltetem ASYN mit prionenartigen Eigenschaften [10]. Die Seeding-Hypothese beruht auf Studienergebnissen, die eine ASYN-Aggregation von intrazellulären Monomeren durch Gabe von in-vitro produzierten ASYN-Aggregaten („Seeds“) auslösen konnten [93, 111, 112, 113, 114]. Es bildeten sich intrazelluläre Einschlüsse aus exogenen und endogenen ASYN-Ablagerungen, histologisch vergleichbar mit den LB des MP [113, 114]. Danzer et al. konnte parallel zur intrazellulären Aggregatbildung nach Behandlung mit exogenen ASYN-Oligomeren eine Verminderung der endogenen ASYN-Monomere feststellen, welche sie auf eine Aggregation durch den „Seeding“-Effekt zurückführte [111].

Auch die Bildung von intrazellulären ASYN-Aggregaten in gesunden, nigralen Neuronen nach deren Transplantation in die Gehirne von Parkinsonpatienten [117, 118] wird häufig durch mögliche prionenartige Eigenschaften des ASYN erklärt. Ähnlich verhält es sich mit der Übertragung von ASYN-enthaltenden LB aus Gehirnen von Parkinsonpatienten in Mäuse- oder Affengehirne. Sie kann eine Aggregation von endogenem ASYN sowie eine progressive Neurodegeneration auslösen [119]. Es gibt jedoch bis dato keinen endgültigen Beweis, dass die Übertragbarkeit der ASYN-Pathologie auf einem „Seeding-Effekt“ beruht.

Zusammenhang zwischen ASYN, Mitochondrien und oxidativem Stress

Auf der anderen Seite scheinen die Mitochondrien eine essenzielle Rolle bei der Vermittlung der ASYN-Toxizität zu spielen. Es konnten eine Anreicherung von ASYN an der Mitochondrienmembran und der Import von ASYN in die Mitochondrien nachgewiesen werden [99, 108, 110, 120, 121], begleitet von einer verminderten Komplex-1-Aktivität der Atmungskette [97, 99, 108, 122]. Hsu et al. konnte eine veränderte, mitochondriale Struktur mit eingeschränkter Aktivität und erhöhter ROS-Produktion durch eine ASYN-Überexpression in der Zellkultur hervorrufen. Dieser toxische Effekt konnte durch die Gabe von Antioxidantien kompensiert werden [109].

Weitere nachgewiesene Effekte von ASYN auf die Mitochondrien sind unter anderem eine erhöhte Fragmentation der Mitochondrien [110], eine Verminderung des mitochondrialen Membranpotentials, eine gestörte Kalziumhomöostase, erhöhte Cytochrom-C-Freisetzung [97] sowie erhöhte Spiegel reaktiver Sauerstoffspezies [99, 108, 109, 120].

Gleichzeitig kann eine ASYN-Aggregation in vitro und in vivo durch mitochondriale Schädigung und oxidativen Stress verstärkt werden [101, 102, 103]. Dabei wird dem Vorhandensein von Eisen³⁺ - Ionen eine wichtige Rolle zugeschrieben. Reaktive Sauerstoffspezies führen zur Oxidation von Fe²⁺ zu Fe³⁺, welches wiederum die Ausbildung von ASYN-Oligomeren fördert [104].

Der genaue Ablauf von ASYN-Akkumulation, mitochondrialem Schaden und Zelltod ist unklar. Einige der Faktoren konnten in Zusammenhang gebracht werden: Toxische ASYN-Oligomere scheinen generell die Ausbildung von Poren in Lipidmembranen zu induzieren [105, 123]. Eine verstärkte Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore (PTP) durch ASYN konnte nachgewiesen werden. Sie bildet sich unter oxidativem Stress an der inneren Mitochondrienmembran aus und führt zur erhöhten Permeabilität der Membran [124]. Es folgen eine mitochondriale Membrandepolarisation, veränderte Kalziumhomöostase und mitochondriale Schwellung. Dies resultiert in der Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran mit folglichem Cytochrom-C-Freisetzung, welche zum neuronalen Zelltod führt [97, 99].

Progression der ASYN-Ablagerungen und Relevanz von freiem extrazellulärem ASYN

ASYN-Aggregate können zwischen Zellen weitergegeben werden [114, 125]. Sowohl eine Freisetzung von ASYN aus Neuronen ins Medium in Zellkulturen [114, 126, 127] als auch das Vorkommen von freiem ASYN in Liquor und Plasma [127] wurden beobachtet. Dies weist darauf hin, dass ASYN von Neuronen in den Extrazellulärraum abgegeben werden kann. Das freie, extrazelluläre ASYN kann von Nachbarzellen durch Endozytose aufgenommen werden [114, 125]. Bei operativer Unterbrechung der synaptisch verbundenen, neuronalen Strukturen im Mausmodell mittels Vagotomie oder Sympathektomie konnte eine Progression der ASYN-Pathologie ins ZNS verhindert werden [17].

Nach Braak kommt es im Verlauf zur stadienhaften Progression der ASYN-Ablagerungen vom ENS ins ZNS (siehe Kapitel 1.2.2) [16]. Ausgangsorte der pathologischen Veränderungen sind das enterische Nervensystem und der Bulbus Olfactorius, wo der Erstkontakt mit aufgenommenen Umwelttoxinen stattfindet [16]. Die Progression der Proteinablagerungen erfolgt vom ENS über Sympathikus und Parasympathikus zum ZNS durch retrograden axonalen Transport [17].

Eine Übertragung von ASYN-Fibrillen in die Darmwand von Mäusen konnte die stadienhafte Progression der ASYN-Pathologie ins ZNS auslösen. Klinisch zeigten die Mäuse gastrointestinale Funktionsstörungen, wie sie in Frühstadien des MP vorkommen, sowie motorische Defizite und eine Neurodegeneration der SNpc bei älteren Tieren [128, 129]. Braaks Stadien konnten inzwischen auch mit einer speziellen Technik der MRT-Bildgebung, dem DKI (Diffusion kurtosis imaging), in Mäusen nachgewiesen werden [130]. Mithilfe dieser Bildgebung können mikrostrukturelle Veränderungen des Nervensystems als Folge von Proteinablagerungen oder Neuroinflammation dargestellt werden und damit die Gebiete mit ASYN-Ablagerungen [130].

1.3.3 Umwelttoxine

Die genetischen Veränderungen, die den familiären Parkinsonformen zugrunde liegen, ergeben interessante Ansätze, die pathologischen Mechanismen der Erkrankung nachzuvollziehen. Nachdem sie jedoch nur für einen geringen Prozentsatz der Parkinsonfälle verantwortlich sind, liefern sie keine vollständige Erklärung für die

häufigere idiopathische Form. Diese Lücke könnte die Verbindung von Parkinson zu Umwelttoxinen füllen, für die einige Faktoren sprechen:

Einen wichtigen Anhalt gibt die historische Erwähnung der Erkrankung. Es finden sich einige, spärliche Hinweise in chinesischer und indischer Medizin, die mehrere Jahrtausende zurückreichen [131, 132]. Die Erstbeschreibung des MP wird jedoch meist dem englischen Allgemeinmediziner James Parkinson zugestanden, der 1817 seinen „Essay on the Shaking Palsy“ veröffentlichte [19], zeitgleich zur industriellen Revolution. Diese war mit enormen Veränderungen in Industrie und Landwirtschaft verbunden, unter anderem mit dem systematischen Einsatz von Chemikalien und Pestiziden im Agrarbereich. Im 19. Jahrhundert wurden erstmals Rotenon und Pyrethrum im großen Stil in der Landwirtschaft eingesetzt [133], beides Pestizide, die heute mit Parkinson assoziiert werden.

Auch durch die geographische Verteilung der Parkinsonprävalenz lassen sich Rückschlüsse auf die Bedeutung von Umwelttoxinen ziehen. Epidemiologische Studien zeigten eine erhöhte Inzidenz in ländlichen Gebieten mit intensiver landwirtschaftlicher Nutzung [134, 135]. Faktoren wie Pestizidexposition, Beschäftigung in der Landwirtschaft [136] und verschiedene Schwermetalle [137] konnten mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko in Verbindung gebracht werden.

1982 erkrankten in San Jose, Kalifornien, mehrere überdurchschnittlich junge Patienten an akuter Parkinson-Symptomatik. Sie zeigten schwere, irreversible Symptome der fortgeschrittenen Erkrankung und sprachen auf eine Behandlung mit L-Dopa an. Nachforschungen konnten dies auf die Substanz MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin) zurückführen, die durch intravenösen Drogenkonsum aufgenommen wurde [138]. MPTP kann als Nebenprodukt bei der Herstellung von MPPP entstehen, welches als „synthetisches Heroin“ verkauft wurde [138]. MPTP wurde daraufhin als Tiermodell für die Erforschung der Erkrankung eingesetzt. Es führte durch die Untersuchung struktureller und funktioneller Analoga zur Entdeckung weiterer chemischer Verbindungen, die heute mit Parkinson assoziiert werden.

Dazu zählen das Herbizid Paraquat und das Pestizid Rotenon [139]. Rotenon wird als Insektizid in der Landwirtschaft aber auch privat in Haushalt und Garten eingesetzt [139]. Seine Wirkung liegt in der Hemmung des Komplexes I der Atmungskette [140]. Wegen seines pflanzlichen Ursprungs wird es häufig als organisches Pestizid deklariert [139].

Bei Rotenonexposition konnte ein 2,5-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko für Parkinson ermittelt werden [139]. Seit 2007 wird Rotenon in der EU nicht mehr verwendet [141]. Dies gilt jedoch nicht für andere Komplex-I-Inhibitoren wie beispielsweise Permethrin, die weiterhin auf dem Markt sind [139].

Auch der Einsatz von Paraquat ist weit verbreitet. Es ist seit 1961 auf dem Markt [142]. Das Herbizid wirkt über die Produktion von Sauerstoffradikalen, die durch erhöhten, oxidativen Stress zum Zelluntergang führen [14]. Laut Tanner et al. ist eine Paraquatexposition mit einem 2,5-fach erhöhten Parkinsonrisiko verbunden [139].

Da sowohl Rotenon als auch Paraquat die Pathophysiologie und Progression von Parkinson nachbilden können, werden auch sie neben MPTP als Tiermodelle in der Forschung verwendet (siehe Kapitel 1.4.3; 1.4.4) [18, 143].

1.3.4 Gen-Umwelt-Interaktion

Genetische Mutationen und Umwelttoxine führen über die gleichen Mechanismen zu einer Störung der zellulären Homöostase und letztlich zum Zelluntergang (Tabelle 1-1). Zu diesen Mechanismen zählen unter anderem eine Dysfunktion der Mitochondrien, oxidativer Stress, Entzündungsprozesse und ein geschädigter Proteinabbau [11].

	Mitochondriale Funktion	Oxidativer Stress	Proteinabbau
Bekannte Genmutationen	ASYN, Parkin, PINK1, DJ-1, LRRK2	ASYN, DJ1	Parkin
Umwelttoxine	MPTP, Rotenon	Paraquat	

Tabelle 1-1: gemeinsame Wirkungsmechanismen von familiären Parkinsonformen und Toxinen [71, 75, 109, 144]

- **Mitochondriale Dysfunktion: ASYN, Parkin, DJ-1, PINK1, LRRK2 MPTP und Rotenon**

Mitochondrien sind für den Zellmetabolismus unersetzlich, indem sie Energie in Form von ATP zur Verfügung stellen. Die ATP-Gewinnung erfolgt durch die fünf Enzyme der Atmungskette (Komplex I bis V) an der inneren Mitochondrienmembran. Eine Störung der Mitochondrienfunktion wird mit neurodegenerativen Erkrankungen und sogar mit dem Alterungsprozess an sich in Verbindung gebracht [145].

Patienten mit idiopathischem MP zeigen eine verminderte Aktivität des Komplexes I (NADH-Dehydrogenase) der Atmungskette in der SNpc [146]. Die Pestizide MPTP und Rotenon wirken über die Hemmung dieses Enzyms [140, 147]. Folge ist eine verminderte Energieproduktion der Zelle und vermehrter oxidativer Stress. Auch einige betroffene Gene familiärer Parkinsonformen beeinflussen die mitochondriale Funktion: Parkin und PINK1 regulieren den Abbau beschädigter Mitochondrien [55]. DJ-1 schützt die Mitochondrien vor reaktiven Sauerstoffspezies [62, 64, 65].

- **Oxidativer Stress: ASYN, DJ1, Paraquat**

Oxidativer Stress bedeutet, dass die Bildung von Sauerstoffradikalen nicht mehr ausreichend durch antioxidative Schutzsysteme kompensiert werden kann [148]. Radikale enthalten freie Elektronen, die hochreaktiv sind und durch Oxidation von DNA, Proteinen und Lipiden zum Zellschaden führen [145]. Sie entstehen bei Prozessen wie Zellatmung und Dopaminmetabolismus [149].

In dopaminergen Zellen kommt es physiologisch zu erhöhtem, oxidativem Stress. Der Abbau von Dopamin kann über das Enzym Monoaminoxidase (MAO) oder nicht-enzymatisch durch Oxidation erfolgen [149]. Es entstehen hochreaktive Sauerstoffradikale, die zu einer neuronalen Schädigung führen [150]. Auch das Vorkommen von Eisen in der Substantia nigra trägt zur Bildung von Radikalen bei [150]. Dies könnte eine Erklärung sein, warum die Neuronen der SNpc besonders empfindlich auf zusätzliche Stressoren wie Umwelttoxine und genetische Mutationen reagieren [3].

Physiologischerweise verfügen Zellen über Schutzmechanismen vor oxidativem Stress. Dazu zählt das Glutathionsystem, das antioxidativ wirkt, indem es freie Elektronen bindet. Bei der Autopsie der Gehirne von Parkinsonpatienten konnten erniedrigte

Glutathionwerte gemessen werden, ein indirekter Hinweis auf erhöhten, oxidativen Stress [151].

- **Proteinabbau: Parkin**

Für den intrazellulären Proteinabbau spielen der lysosomale Abbauweg und das Ubiquitin-Proteasom-System eine wichtige Rolle. Das Ubiquitin-Proteasom-System beseitigt unter anderem fehlgefaltete und defekte Proteine im Proteasom, nachdem diese mit dem Polypeptid Ubiquitin zum Abbau markiert wurden [152]. Bei einer Mutation im Parkin-Gen ist diese Markierung durch eine defekte E3-Ubiquitin-Ligase gestört [47]. Folglich ist der Abbau fehlgefalteter Proteine eingeschränkt, was unter anderem die Elimination von aggregiertem ASYN beeinträchtigen könnte [49]. Auch der autophagisch-lysosomale Weg trägt zum Abbau von ASYN bei [153].

Der genaue Mechanismus der Interaktion zwischen genetischer Suszeptibilität und Toxinen ist weiterhin unbekannt. Viele Forschungsgruppen untersuchen derzeit den Einfluss verschiedener parkinsonassoziierter Genmutationen bzw. Knockouts auf die Toxizität von Umweltfaktoren.

1.4 Tiermodelle in der Parkinson-Forschung

Die meisten Tiermodelle der Parkinsonforschung basieren auf Neurotoxinen (Abb. 1-5) und genetischen Modellen.

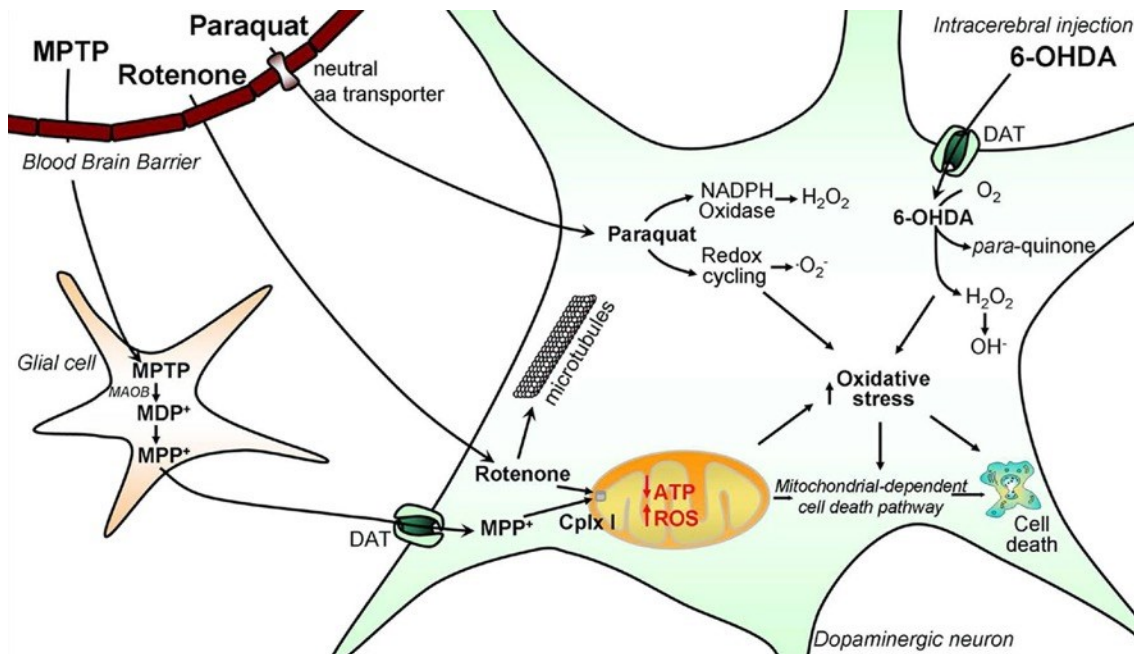


Abb. 1-5: Aufnahme und Wirkmechanismus der Toxine 6-OHDA, MPTP, Paraquat und Rotenon (Bové et al., 2012, S. 63 [144])

1.4.1 6-OHDA

6-OHDA (6-Hydroxydopamin) ähnelt strukturell Dopamin und Noradrenalin [144]. Es entsteht endogen im Dopaminmetabolismus und wirkt über die Bildung von Sauerstoffradikalen und einer Komplex-I-Inhibition der Atmungskette [154]. Da es die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann, muss es direkt ins Gehirn injiziert werden [7]. Das 6-OHDA-Tiermodell kann zwar den Verlust der dopaminergen Neurone in der Substantia nigra nachbilden, es kommt jedoch nicht zur Bildung von Lewy-Körperchen oder zur Progression der Pathologie [7].

1.4.2 MPTP

Nachdem MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin) durch den Konsum von fehlerhaft hergestelltem MPPP, eines synthetischen Opioids, bekannt wurde [138], ergab sich daraus ein weiteres Tiermodell für die Parkinsonforschung. MPTP gelangt durch seine hohe Lipophilie frei über die Blut-Hirn-Schranke und wird in Gliazellen aufgenommen [7]. Dort reagiert es unter Katalyse des Enzyms MAO-B der Gliazellen zu

MPDP und anschließend zur toxischen Form MPP^+ [7]. MPP^+ wird freigesetzt und kann über einen Dopamintransporter (DAT) in die dopaminergen Neurone aufgenommen werden [155]. In den Neuronen führt MPP^+ durch eine Hemmung des Komplexes I der Atmungskette zur Neurodegeneration der SNpc [147]. Das MPTP-Modell weist einige Schwachstellen auf: MPTP wird im Tiermodell meist systemisch (z.B. intraperitoneal) und in hohen Dosen verabreicht [156]. Dies führt zu einer akuten Schädigung der SNpc [138] und entspricht nicht dem chronischen, langsam progressiven Verlauf des MP. Außerdem kann durch MPTP keine Bildung von Lewy-Körperchen ausgelöst werden [157]. Durch eine Anpassung des Modells mit täglichen, subakuten, intraperitonealen Dosen kann eine chronische Degeneration imitiert werden [156].

1.4.3 Paraquat

Das Herbizid Paraquat führt in Mäusen zum Untergang dopaminergener Neurone [158] und zur erhöhten Expression und Aggregation von Alpha-Synuclein [159]. Nach intraperitonealer oder subkutaner Gabe gelangt es mithilfe eines Transporters für neutrale Aminosäuren über die Blut-Hirn-Schranke [160]. Anschließend wird das Paraquat⁺-Ion wahrscheinlich wie MPP^+ über den Dopamin-Transporter in die dopaminergen Endungen aufgenommen [161] und induziert dort die Bildung von Sauerstoff-Radikalen [162]. Unklar ist weiterhin, ob Paraquat lediglich in den Neuronen der SN wirkt oder auch andere Zelltypen betrifft [7] und ob es eine Progression der Neurodegeneration auslöst [163].

1.4.4 Rotenon

Im Ratten- und Mausmodell führt eine chronische Behandlung mit dem Pestizid Rotenon zu der für MP typischen Neurodegeneration der SNpc [18, 164]. Intraneuronal sind Proteineinschlüsse mit Alpha-Synuclein und Ubiquitin nachweisbar, vergleichbar mit Lewy-Körperchen [164]. Ähnlich der Wirkung von MPP^+ wirkt Rotenon über eine Komplex-I-Inhibition der Atmungskette toxisch auf die Mitochondrien. Dies führt zu einer verminderten ATP-Synthese und zur Produktion von Sauerstoffradikalen [140].

Rotenon kann direkt ins Gehirn injiziert [165] oder systemisch als tägliche intraperitoneale Gabe [166] verabreicht werden. Auch eine intravenöse oder subkutane Injektion ist möglich [167]. Diese Applikationswege sind mit einer systemischen Toxinwirkung verbunden.

Eine Möglichkeit, die Pathologie und Progression des MP besser zu imitieren, ist die chronische, orale Gabe von niedrig-dosiertem Rotenon im Mausmodell [143]. Sie führt zuerst zu Veränderungen der Neurone des ENS mit retrograder synaptischer Progression ins ZNS, wo es schließlich zu einem Verlust dopaminergener Neurone der SNpc kommt [18]. Die Mäuse zeigen die für MP typische Motordysfunktion. Bei diesem Modell kommt es weder zu einer systemischen Komplex-I-Inhibition noch zur Nachweisbarkeit erhöhter Rotenonwerte in Blut oder Gehirn [18]. Es ist mit der Hypothese von Braak zur retrograden Progression ausgehend von ENS und OB ins ZNS vereinbar [16]. Wird die synaptische Verbindung zwischen ENS und SNpc durch Durchtrennung des Nervus Vagus oder des Sympathikus unterbrochen, bleibt die Progression der Erkrankung aus [17].

2 Zielsetzung

Für die vorliegende Arbeit wurden zwei Versuche zur Untersuchung der Gen-Umwelt-Interaktion in der Pathologie und Progression des Morbus Parkinson durchgeführt.

2.1 Untersuchung der neuroprotektiven Wirkung von Glykolsäure und D-Laktat im Paraquat-Mausmodell

Wie im Kapitel 1.3.1 beschrieben, beruht eine der bekannten familiären Parkinsonformen auf dem Funktionsverlust des Gens DJ-1 [12]. Auf Zellebene führt diese Mutation zu einer veränderten Struktur und Funktion der Mitochondrien sowie einer erhöhten Anfälligkeit für oxidativen Stress [168, 169].

Das Gen DJ-1 codiert für ein Enzym aus der Familie der Glyoxalasen, die die Reaktion von 2-Oxoaldehyden (z.B. Glyoxal und Methylglyoxal) zu 2-Hydroxysäuren (z.B. Glykolsäure (GS) und D-Laktat (DL)) katalysieren (Abb. 2-1) [13].

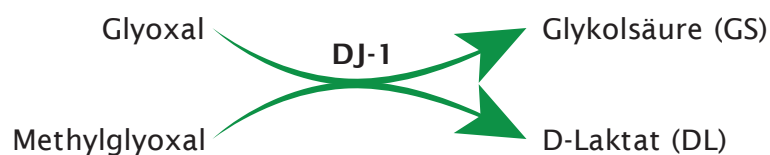


Abb. 2-1: Funktion des Enzyms DJ-1

Bisher sind zwei Gruppen von Glyoxalasen bekannt: GloI und GloII reagieren Glutathion-abhängig [170], wohingegen die zweite Gruppe (GloIII, z.B. DJ-1) keinen Kofaktor benötigt [171]. Die Substrate des Enzyms DJ-1 entstehen unter anderem als Nebenprodukte der Glykolyse und sind aggressive Aldehyde, die mit Lipiden und Proteinen reagieren und dabei sogenannte Advanced Glycation Endproducts (AGEs) bilden [172]. Dabei handelt es sich um glykierte Reaktionsprodukte, die mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Parkinson assoziiert werden [173, 174]. Zunächst wurde dem Enzym DJ-1 in erster Linie eine entgiftende Funktion zugesprochen, indem es der schädlichen Wirkung der AGEs und somit der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen entgegenwirkt [13].

Toyoda et al. hat eine weitere Funktion von DJ-1 in Form eines neuroprotektiven Effekts der Enzymprodukte GS und DL untersucht. Dies sind körpereigene Verbindungen, denen bereits in vitro eine Verbesserung des neuronalen Überlebens unter erhöhtem, oxidativen Stress durch eine Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials nachgewiesen

werden konnte. Die bisherigen Versuche wurden an Dauerlarven von *C. elegans*, HeLa-Zellen und Zellkulturen aus dopaminergen Neuronen durchgeführt (Abb. 2-2) [4].

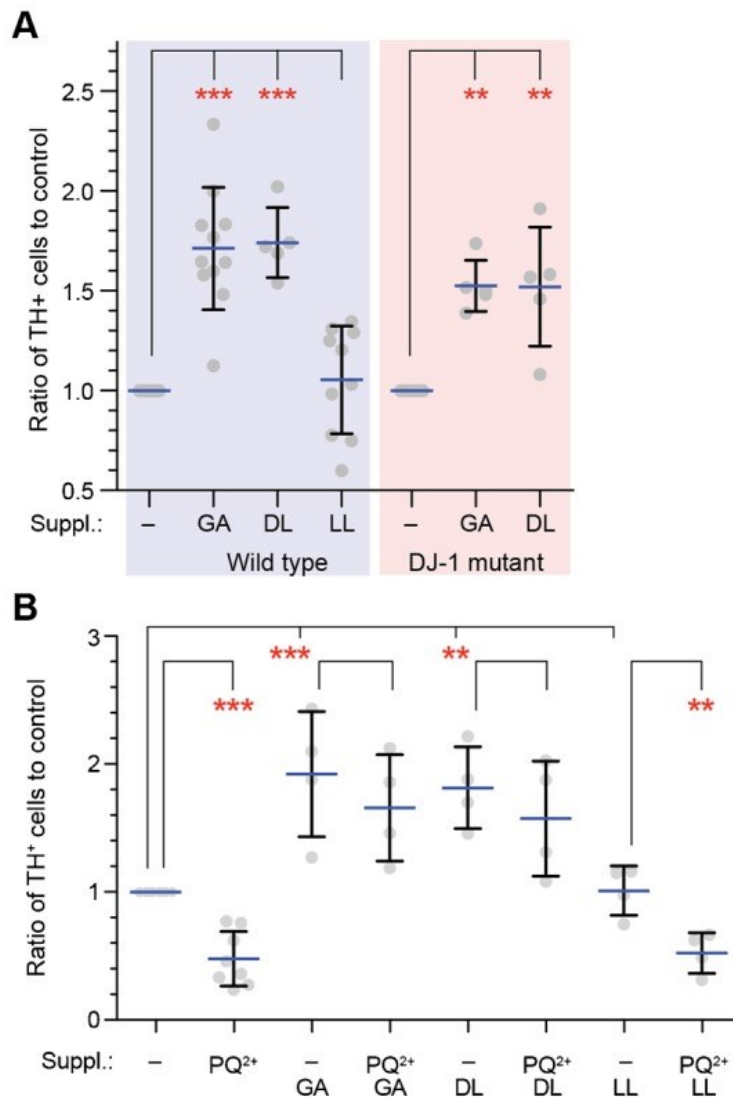


Abb. 2-2: Verbessertes Überleben dopaminergener Neurone durch GS- oder DL-Behandlung in vitro

Überleben der dopaminergen Neurone (Verhältnis der Anzahl TH⁺ Neurone zur Kontrolle) von Wildtyp- und DJ-1-mutierten Mäuseembryos in An- und Abwesenheit von 10 mM GS, DL oder LL (A). Überleben der dopaminergen Neurone aus Wildtyp E14.5 Embryonen in An- und Abwesenheit von 10mM GS, DL oder LL unter Paraquatbehandlung (12,5µM) (Durchschnitt und SD; **p<0,01; ***p<0,001) (B).

(Toyoda et al., 2014, S. 781 [4]: “Glycolate and D-lactate support viability of dopaminergic neurons in vitro”; URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4133730/>; lizenziert unter CC BY 3.0; Copyright 2014 The Company of Biologists Ltd; <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>)

Im Paraquat-Versuch dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der protektive Effekt von GS und DL auch in vivo im Mausmodell reproduzierbar ist und der neurodegenerativen Wirkung des Herbizids Paraquat entgegenwirken kann.

- a) Führt eine dreiwöchige, intraperitoneale Gabe von Paraquat zu einer signifikanten Verschlechterung der Motorfunktion im Rotarod-Test und kann eine gleichzeitige GS- oder DL-Behandlung dieser entgegenwirken (paarweiser T-Test für verbundene Stichproben, Signifikanzniveau 5%)?
- b) Gibt es einen signifikanten Unterschied in der Anzahl dopaminergener Neurone der SNpc zwischen behandelten und nicht behandelten Mäusen (paarweiser T-Test für unverbundene Stichproben, Signifikanzniveau 5%)?

2.2 Untersuchung der Rolle des endogenen ASYN in der Progression des MP im Rotenon-Mausmodell

Im Tiermodell werden Umwelttoxine schon lange eingesetzt, um die Pathologie des MP zu imitieren. Sie können das Spektrum der Erkrankung jedoch nicht vollständig nachbilden. Es zeigen sich häufig Abweichungen in der klinischen Präsentation, der Neurodegeneration der SNpc und der Bildung von Lewy-Körperchen. Die Applikation der Toxine erfolgt meist systemisch, was nicht dem Erstkontakt mit Umwelttoxinen im Menschen entspricht und natürliche Barrierefunktionen des Körpers umgeht [18, 175].

Nach Braak erfolgt die Ausbreitung der Neurodegeneration beim MP in Stadien aufsteigend vom ENS und OB bis ins ZNS [27]. Pan-Montojo et al. hat ein Tiermodell entwickelt, das diesen Verlauf besser imitieren kann: Durch intragastrale Langzeitgabe von Rotenon kann eine mit MP vergleichbare, stadienhafte Progression der Erkrankung vom ENS bis ins ZNS mit Aggregation von ASYN und Neurodegeneration der SNpc induziert werden [18]. Im Blut kann das Toxin nicht nachgewiesen werden [18].

Die Progression erfolgt wahrscheinlich durch axonalen Transport von ASYN über synaptisch verbundene Nervenzellen [17]. Passenderweise konnte eine operative Unterbrechung der Nervenbahnen zwischen ENS und ZNS durch Hemivagotomie oder partielle Sympathektomie die Progression ins ZNS aufhalten [17]. ASYN kann sowohl von Neuronen freigesetzt [114, 126, 127] als auch durch Endozytose wieder intrazellulär aufgenommen und damit zwischen Neuronen weitergegeben werden [125]. Die genaue

Rolle des ASYN bei der Progression der Erkrankung bleibt jedoch weiterhin kontrovers diskutiert.

Im Rotenonversuch sollte die Rolle des körpereigenen ASYN bei der Pathogenese des MP untersucht werden (Ergebnisse bereits zum Teil veröffentlicht [3]).

Ist eine parkinsontypische Progression durch orale Rotenonbehandlung bei ASYN-KO-Mäusen induzierbar, wenn kein körpereigenes ASYN produziert werden kann?

- a) Gibt es einen signifikanten Unterschied in der Entwicklung der Motorfunktion im Rotarod-Test zwischen rotenonbehandelten und -unbehandelten ASYN-KO-Mäusen (repeated measures Two-Way-ANOVA, Signifikanzniveau 5%)?
- b) Gibt es einen signifikanten Unterschied in der Anzahl dopaminerger Neuronen in der SNpc zwischen rotenonbehandelten und -unbehandelten ASYN-KO-Mäusen (paarweiser T-Test für unverbundene Stichproben, Signifikanzniveau 5%)?

Da für weitere Versuche dieses Labors eine Gruppe von jüngeren Wildtypmäusen im Alter von sechs Monaten eine intragastrale Rotenonbehandlung erhielt, sollte zusätzlich die Altersabhängigkeit der Rotenontoxizität überprüft werden.

- c) Zeigen Wildtypmäuse im Alter von sechs Monaten bereits eine Neurodegeneration oder Motordysfunktion nach intragastraler Rotenonbehandlung?

3 Material und Methoden

3.1 Setting

Für die vorliegende Dissertation wurden zwei prospektive, experimentelle Studien am Mausmodell zur Gen-Umwelt-Interaktion bei Morbus Parkinson durchgeführt. Die Studien erfolgten im Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung (ZNP) der neurologischen Klinik und Poliklinik der LMU München von Februar bis September 2017 nach den Vorgaben des Deutschen Tierschutzgesetzes. Das Tierversuchsvorhaben wurde durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-5-2016).

3.2 Materialien

Alle verwendeten Geräte und Materialien sind in den folgenden Tabellen aufgelistet (Tabelle 3-1, Tabelle 3-2, Tabelle 3-3, Tabelle 3-4). Die Herstellung spezieller Versuchslösungen wird in den entsprechenden Abschnitten genauer beschrieben.

3.2.1 Geräte

Artikel	Modell	Hersteller
Rotarod-Gerät	RotaRod Advanced	TSE Systems GmbH; Bad Homburg, Deutschland
Perfusionsgerät	Sacrifice Perfusion System Controlled Pressure	Leica Microsystems; Wetzlar, Deutschland
Schlittenmikrotom	Leica SM2010 R	Leica Microsystems; Wetzlar, Deutschland
Fluoreszenz- Stereologiemikroskop	Leica MZ10 F	Leica Microsystems; Wetzlar, Deutschland
Stereologie-Software	StereoInvestigator®	MBF Bioscience; Williston, USA
Fluoreszenzmikroskop	Olympus IX50	Olympus America Inc.; Tokio, Japan
Imaging-Software	cell^F	Olympus America Inc.; Tokio, Japan
Zentrifuge	5804 R	Eppendorf AG; Hamburg
Zentrifuge	5415 D	Eppendorf AG; Hamburg

Artikel	Modell	Hersteller
Feinwaage	CP2202S	Sartorius Corporate Administration GmbH; Göttingen
Schüttler	Unimax 1010	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG; Schwabach
Magnetrührer	MR 3001 K	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG; Schwabach
Vortex-Schüttler	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc.; New York, USA
Pipetten	Eppendorf research plus	Eppendorf AG; Hamburg
pH-Meter	FiveGo	Mettler-Toldedo; Columbus, USA
Reinstwasseranlage	PURELAB® flex	ELGA LabWater; High Wycombe, UK
Digitales Einstich-Thermometer	Thermo Jack Pro	Dostmann electronic GmbH; Wertheim-Reicholzheim

Tabelle 3-1: Verwendete Geräte

3.2.2 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Produkt	Hersteller
Knopfkanüle 1,2x60mm (Schlundsonde)	21082-12060	Unimed; Lausanne, Schweiz
Einmalspritzen 20 ml	4606736V	B. Braun Melsungen AG; Melsungen
Einmalspritzen 5 ml	4606710V	B. Braun Melsungen AG; Melsungen
Einmalspritzen TBC/Heparin 1 ml	22006	Dispomed Witt oHG; Gelnhausen
Einmalkanülen	EU20	A. Hartenstein GmbH; Würzburg
Flügelkanüle Venofix® orange	4056500-01	B. Braun Melsungen AG; Melsungen
Zellkulturtestplatte 96	167008	ThermoFisher Scientific; Braunschweig

Artikel	Produkt	Hersteller
Zellkulturtestplatte 24	92024	TPP Techno Plastic Products; Trasadingen, Schweiz
Netwell™	3478	Corning Incorporated; Kennebunk, USA
Parafilm®	PF10	A. Hartenstein GmbH; Würzburg
Zentrifugenröhrchen 15 ml	ZR97	A. Hartenstein GmbH; Würzburg
Zentrifugenröhrchen 50 ml	ZR82	A. Hartenstein GmbH; Würzburg
Pipettenspitzen lose, 100-1000 µl	PSBI	A. Hartenstein GmbH; Würzburg
Pipettenspitzen lose, 5-200 µl	PSGI	A. Hartenstein GmbH; Würzburg
Pipettenspitzen lose, 0,5-20 µl	PSK	A. Hartenstein GmbH; Würzburg
Serologische Pipetten 50 ml	PS50	A. Hartenstein GmbH; Würzburg
Serologische Pipetten 25 ml	PS25	A. Hartenstein GmbH; Würzburg
Serologische Pipetten 10 ml	PS10	A. Hartenstein GmbH; Würzburg
Reaktionsgefäße mit Deckel, 2,0 ml „Safe Fit“	RK2G	A. Hartenstein GmbH; Würzburg
Reaktionsgefäße mit Deckel, 1,5 ml „Safe Fit“	RSF1	A. Hartenstein GmbH; Würzburg
Reaktionsgefäße mit Deckel, 0,5 ml „Safe Fit“	RK05	A. Hartenstein GmbH; Würzburg
Objektträger 76x26x1 mm	OTMM	A. Hartenstein GmbH; Würzburg
Deckgläser 24x50 mm	DK50	A. Hartenstein GmbH; Würzburg

Tabelle 3-2: Verbrauchsmaterialien

3.2.3 Chemikalien und Puffer

Artikel	Kat. No	Hersteller
Paraquat-dichlorid-hydrat	36541	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
NaCl Lösung 0,9 %	2246228	B. Braun; MelsungenAG; Melsungen
Glykolsäure	128465	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
D-Laktat	71716	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
Rotenon	R8875	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
Carboxymethylcellulose	C5678	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
Chloroform	6340.1	Carl Roth; Karlsruhe
Ketamin 10 % Injektionslösung		Serumwerk Bernburg AG; Bernburg
Rompun® 2 % Injektionslösung Xylazinhydrochlorid		KVP Pharma- und Veterinär Produkte GmbH; Kiel
PBS 10x Konzentrat	P5493	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
PFA (Roti®-Histofix 4 %)	P087.3	Carl Roth; Karlsruhe
Sucrose	84100	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
2-Methylbutan	M32631	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
Glycerin	G5516	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
Ethylenglykol	324558	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
Tissue-Tek® O.C.T.™Compound	TTEK	A. Hartenstein GmbH; Würzburg
Donkey Serum	017-000-121	Jackson ImmunoResearch Inc.; West Grove, USA
Triton X-100	85112	ThermoFisher Scientific; Waltham, USA
Mowiol® 4-88	81381	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
TRIS (M 121,14 g/mol)	4855.1	Carl Roth; Karlsruhe
Trockeneis		

Tabelle 3-3: Chemikalien und Puffer

3.2.4 Antikörper für Immunhistochemie

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Kat. No	Hersteller
Tyrosinhydroxylase	Schaf	1:1500	P60101-150	Pel-Freez Biologicals, Rogers, USA
Ki-67-Antikörper	Kaninchen	1:250	ab16667	Abcam; Cambridge, UK
Anti-Sheep-Sekundärantikörper Alexa 568 nm	Esel	1:500	A-21099	Invitrogen, life technologies; Carlsbad, USA
Anti-Rabbit-Sekundärantikörper Alexa 488 nm	Esel	1:500	A-21206	Invitrogen, life technologies; Carlsbad, USA
DAPI		1:10000		Vector Laboratories, USA

Tabelle 3-4: Verwendete Antikörper

3.3 Methoden

3.3.1 Tierhaltung

Für diese Arbeit wurden ausschließlich Wildtyp-Inzucht-Mausstämme C57BL/6 bzw. B6;129X1-Snca^{tm1Rosl}/J-Mäuse (ASYN-KO) eingesetzt. Sie wurden aus der Zucht des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung (ZNP) der LMU München (Feodor-Lynenstr. 23, 81377 München) und von Jackson Laboratories (USA) bezogen. Die Haltung der Tiere erfolgte im ZNP unter spezifisch-pathogen-freien (SPF) Bedingungen mit geschlossenem Barriersystem. Alle Mäuse wurden in individuell ventilierten Käfigen (IVC) in Gruppen von zwei bis fünf Tieren bei Raumtemperatur und einem Tag-Nacht-Rhythmus von zwölf Stunden mit freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Die Tierhaltung und Behandlung aller verwendeten Mäuse erfolgte durch Mitarbeiter der des ZNP [3].

Paraquat-Mausmodell

Für den Paraquatversuch wurden C57BL/6-Mäuse im Alter von zwölf Wochen in vier Gruppen mit je neun Mäusen verwendet (Abb. 3-1). Drei der Gruppen wurden für drei Wochen nach dem Protokoll von Jiao et al. zweimal pro Woche mit Paraquat behandelt [176]. Das Paraquat (Dosis: 10 mg/kgKG; Verabreichung von 100 µl einer Injektionslösung in sterilem, isotonen NaCl) wurde intraperitoneal (i.p.) injiziert. Die vierte Gruppe erhielt als Vehikelgruppe lediglich isotone Kochsalzlösung. Zwei der Paraquatgruppen wurde zusätzlich fünfmal pro Woche oral per Schlundsonde Glykolsäure oder D-Laktat (je 46 mg/kgKG, gelöst in Wasser) als therapeutische Behandlung verabreicht. Die dritte Paraquat- sowie die Vehikelgruppe erhielten analog Wasser. Die Tötung durch transkardiale Perfusion erfolgte eine Woche nach Ende der Behandlung.

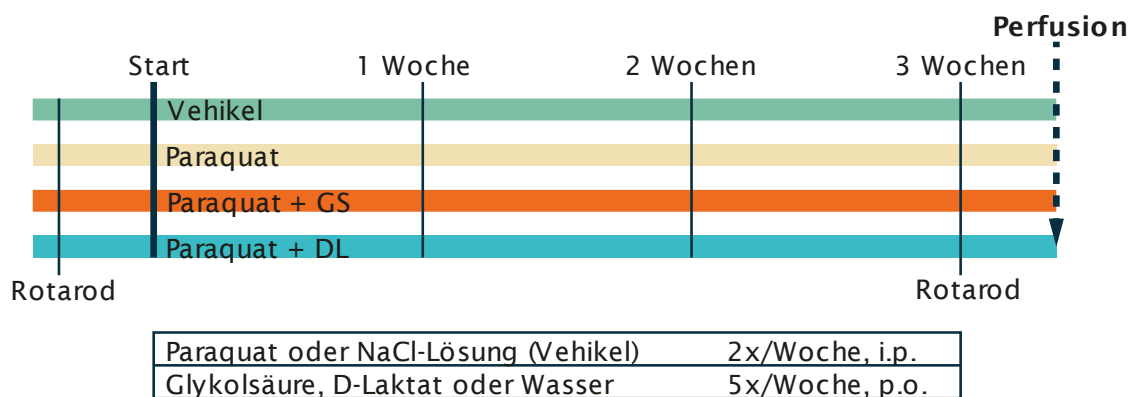


Abb. 3-1: Behandlungsschema Paraquat-Mausmodell

Rotenon-Mausmodell

Für die orale Rotenonbehandlung nach Pan-Montojo et al. [143] wurde zunächst Rotenon in Chloroform gelöst (50 mg Rotenon in 1 ml Chloroform) und dies als Basislösung bei -20°C aufbewahrt. Die Zubereitung der endgültigen Rotenonlösung erfolgte während der Studie alle drei Tage frisch aus dieser Basislösung. Dazu wurden 100 µl der Basislösung auf 8 ml mit Carboxymethylcellulose (2%) verdünnt. Dies entspricht einer Rotenonkonzentration von 0,625 mg/ml in der Endzubereitung [3].

Für den Rotenonversuch wurden vier Gruppen mit je sieben Alpha-Synuclein-Knockoutmäusen (ASYN-KO; Linie: B6;129X1-Snca^{tm1Rosl}/J) im Alter von einem Jahr für zwei bzw. vier Monate behandelt (Abb. 3-2). Zwei der Gruppen wurde Rotenon (0,01 ml/gKG der Endzubereitung) an fünf Tagen pro Woche oral per Schlundsonde

verabreicht. Analog wurden zwei Gruppen als Vehikel eingesetzt und erhielten lediglich Carboxymethylcelluloselösung (2%) mit Chloroform (1,25%) [3]. Zusätzlich wurde eine fünfte Gruppe von sechs Wildtypmäusen im Alter von sechs Monaten für vier Monate mit Rotenon behandelt. Nach der letzten Behandlung und anschließendem Rotarodtest wurde die Tötung durch transkardiale Perfusion durchgeführt [3].

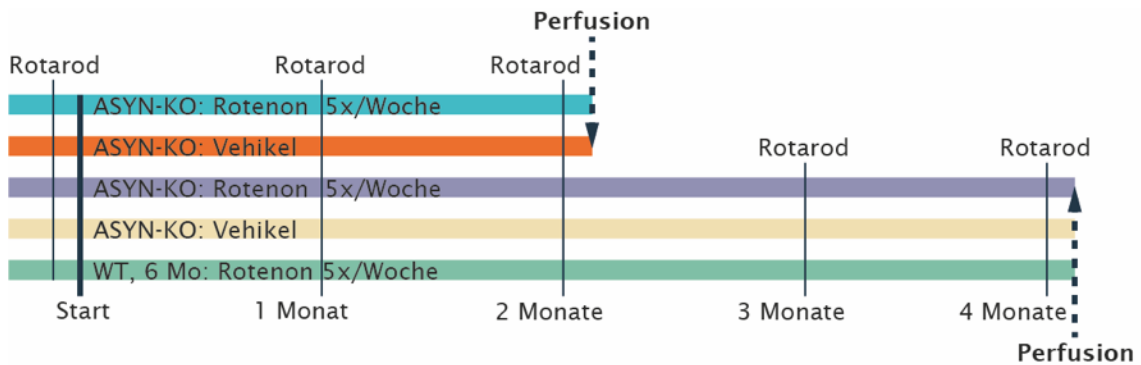


Abb. 3-2: Behandlungsschema Rotenon

(Eigene Darstellung in Anlehnung an Dening et al., 2022, S.3 [3])

Zeitgleich erfolgte eine vergleichbare Rotenonbehandlung nach identischem Protokoll in einer Kooperation in Brünn an einjährigen Wildtypmäusen der gleichen Mauslinie. Diese Tiere wurden durch einen Kollegen histopathologisch untersucht (siehe Kapitel 5.2.3) [130]. Bei den Versuchstieren aus Brünn sowie in Vorversuchen der Arbeitsgruppe dieses Labors wurde bereits eine Neurodegeneration durch intragastrale Rotenonbehandlung bei einjährigen WT-Mäusen gezeigt. Deshalb wurde nach dem „3R“-Prinzip für die vorliegende Arbeit auf die erneute Untersuchung einer Wildtypkontrollgruppe im Alter von einem Jahr verzichtet. Nach dem ethischen Prinzip der „3R“ soll das Leiden von Versuchstieren reduziert werden, indem Tierversuche nach Möglichkeit durch Alternativen ersetzt werden (Replace), die Anzahl der Versuchstiere so gering wie möglich gehalten (Reduce) und die Belastung der Tiere verringert wird (Refine) [177].

3.3.2 Quantifizierung der Motorfunktion im Rotarodtest

Zur quantitativen Bestimmung der klinischen Folgen der Neurodegeneration wurde mittels Rotarodtest die Motorfunktion der Mäuse untersucht. Hierfür müssen sich die Mäuse auf einem rotierenden, waagrecht verlaufenden Rohr halten. Gemessen wird die Zeit, bis die Mäuse erstmals herunterfallen. Der Test wurde als beschleunigter Rotarodtest mit einer Startgeschwindigkeit von 4 rpm (Umdrehungen pro Minute) und einer Beschleunigung der Rotation um 0,3 rpm/s (Umdrehungen pro Minute/Sekunde)

durchgeführt. Im Paraquat-Mausmodell wurde für jede Maus der Mittelwert aus acht Wiederholungen vor bzw. sechs Wiederholungen nach Behandlungsende berechnet. Bei dem Rotenonversuch erfolgten für jede Maus neun Wiederholungen pro Messzeitpunkt (vor und nach Behandlung, sowie monatlich währenddessen) [3]. Die Rotarod-Daten wurden von Mitarbeitern der Tierhaltung des ZNP erhoben und zur Verfügung gestellt.

3.3.3 Transkardiale Perfusion und Präparation des Hirngewebes

Die Perfusion aller Mäuse erfolgte eine Woche nach Behandlungsende. Die Tiere wurden gewichtsadaptiert mit einer Injektionslösung aus Ketamin (100 mg/kgKG) und Xylazin (10 mg/kgKG) i.p. tief narkotisiert und mit abgespreizten Gliedmaßen auf dem Rücken fixiert. Bauch und Brustkorb wurden eröffnet, um das Herz freizulegen. Zur Perfusion wurde eine Pumpe verwendet, über die mittels Drei-Wege-Hahn und Schlauchsystem zuerst phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, 0,01 M), dann phosphatgepufferte Formaldehydlösung (PFA; 4 % in 0,1 M PBS) in den Kreislauf der Maus geleitet werden konnte. Eine mit der Pumpe verbundene Flügelkanüle wurde in die linke Kammer des schlagenden Herzens gestochen. Blut und PBS konnten nach vollständiger Zirkulation durch den Blutkreislauf über den zugleich eröffneten rechten Vorhof ablaufen. Über die Kanüle wurde PBS in den gesamten Blutkreislauf geleitet, bis die Blutleere des Kreislaufes durch eine Entfärbung der Leber sichtbar wurde. Sobald der gesamte Körper gespült war, erfolgte die Perfusion mit PFA. An einem Flexibilitätsverlust des Mäuseschwanzes konnte der Erfolg der Perfusion überprüft werden. Die Gehirne wurden entnommen und zur Fixation nacheinander für je 24 Stunden bei 4 °C in folgenden Lösungen eingelegt: 4 % PFA, PBS, 15 % Sucrose (Sucrose in DD-Wasser) und 30 % Sucrose. Nach der Fixation wurden die Gehirne stufenweise schockgefroren: Nach einigen Sekunden in 2-Methylbutan (bei - 50 °C) wurden die Gehirne im Gefäß mit Methylbutan für zwölf Sekunden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die anschließende Lagerung der Gehirne erfolgte bei - 80 °C [3].

3.3.4 Anfertigung histologischer Schnitte

Die gefrorenen Mäusegehirne wurden mit TissueTek® auf einem Mikrotom befestigt und von rostral nach kaudal in 40 µm dicke Koronarschnitte geschnitten. Während des gesamten Schneidevorgangs wurden die Gehirne mit Trockeneis gekühlt. Die Schnitte wurden in einem Gefriermedium (Tabelle 3-5) in 96er Zellkulturtestplatten eingelegt, die Platten mit Parafilm verschlossen und bei - 20 °C gelagert.

50 % PBS

25 % Glycerin

25 % Ethylenglykol

Tabelle 3-5: Gefriermedium, ca. 20 min mischen, bei 4 °C lagern

3.3.5 Immunhistochemie

Alle Färbungen wurden an freischwimmenden Schnitten mit indirekter Immunhistochemie angefertigt. Dabei bindet ein spezifischer Primärantikörper an das entsprechende Antigen des Gehirnschnittes. Ein mit Fluoreszenzfarbstoff markierter Sekundärantikörper geht eine Bindung mit dem Fc-Teil des Primärantikörpers ein und macht das markierte Antigen im Mikroskop detektierbar (Abb. 3-3). Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in Blockierlösung (Tabelle 3-7), falls nicht anders beschrieben.

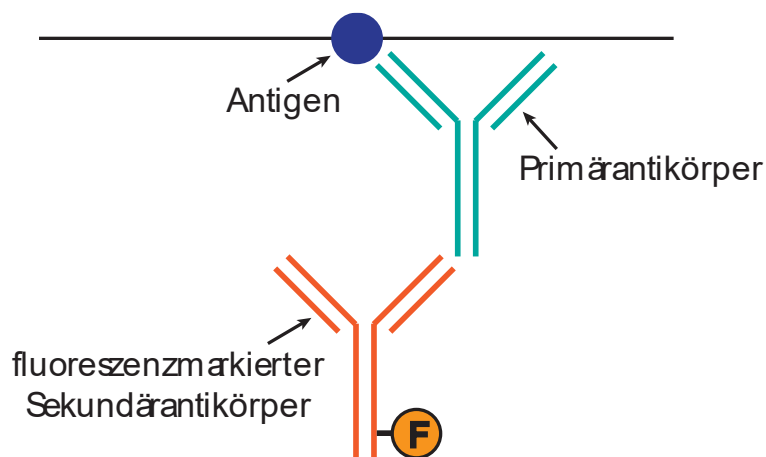


Abb. 3-3: Prinzip der Immunhistochemie

(Eigene Darstellung in Anlehnung an Im et al., 2019, S. 13 [178])

Immunhistochemische Färbung mit Antityrosinhydroxylase-Antikörper

Für beide Versuchsansätze wurden Färbungen der Gehirnschnitte mit Antityrosinhydroxylase-Antikörper (1:1500) angefertigt (Tabelle 3-6). Für den Paraquatversuch wurden die Gehirne von sechs Mäusen pro Gruppe, für den Rotenonversuch je fünf Gehirne histologisch aufgearbeitet. Das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) katalysiert die Reaktion von Tyrosin zu DOPA bei der Synthese von Dopamin und anderen Katecholaminen. Es kann damit zur Färbung und Quantifizierung der dopaminergen Neurone der Substantia nigra pars compacta

eingesetzt werden [176]. Alle Inkubationsschritte wurden unter Bewegung durchgeführt, um ein Verkleben der Schnitte zu verhindern und eine optimale Verteilung der Antikörper zu gewährleisten. Zur Färbung wurde jeder sechste Schnitt (Säule 1 und 7 der 96er Zellkulturplatte) in PBS gewaschen, um die Schnitte von Gefriermedium zu reinigen. Durch Inkubation mit Blockierlösung (Tabelle 3-7) für eine Stunde bei Raumtemperatur wurde die Ausbildung unspezifischer Antikörperbindungen verhindert. Gleichzeitig wurden die lipophilen Membranen des Gewebes zerstört und dadurch eine Bindung des Antikörpers an intrazelluläre Antigene möglich. Die Schnitte wurden anschließend mit dem Primärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur und dann bei 4 °C über Nacht inkubiert. Als primärer Antikörper wurde Anti-TH vom Schaf in einer Verdünnung von 1:1500 verwendet. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS zur Entfernung ungebundener Antikörper erfolgte die Inkubation mit dem Anti-Schaf-Sekundärantikörper vom Esel (1:500; 568 nm) für drei Stunden bei Raumtemperatur. Um ein Ausbleichen des Antikörpers zu verhindern, erfolgten dieser und alle folgenden Schritte lichtgeschützt. Für weitere fünf Minuten wurden die Zellkerne mit DAPI (1:10000 in PBS) angefärbt. Nach abschließendem Waschen wurden die Schnitte bis zum Montieren bei 4 °C in PBS gelagert [3].

Protokoll Anti-TH-Färbung:

- Waschen 3 x 10 min mit PBS bei Raumtemperatur
- Inkubation mit Blockierlösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur
- Inkubation mit Primärantikörper (Anti-TH-Antikörper, Sheep) für 1 Stunde bei Raumtemperatur, dann über Nacht bei 4 °C (Verdünnung: 1:1500 in Blockierlösung)
- Waschen 3 x 10 min mit PBS bei Raumtemperatur
- Inkubation mit Sekundärantikörper (Donkey anti-Sheep IgG, 568 nm) für 3 Stunden bei Raumtemperatur (Verdünnung 1:500 in Blockierlösung)
- Inkubation mit DAPI (1:10000 in PBS) für 5 min
- Waschen 3 x 10 min mit PBS bei Raumtemperatur

Tabelle 3-6: Protokoll der Anti-TH-Färbung

PBS

Donkey Serum 5 %

Triton 0,05 %

Tabelle 3-7: Blockierlösung

Immunhistochemische Färbung mit Ki-67

Um eine mögliche Neurogenese durch die Behandlung mit GS oder DL zu untersuchen, wurde für die Behandlungsgruppen eine Doppelfärbung mit Anti-TH und Ki-67 durchgeführt. Es wurden Schnitte der Substantia nigra und der Seitenventrikel als Positivkontrolle verwendet.

Analog zur reinen Anti-TH-Färbung wurden die Schnitte gewaschen und blockiert. Sie wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur und über Nacht bei 4 °C mit Ki-67-Antikörper (1:250) und TH-Antikörper (1:1500) inkubiert und gewaschen. Es folgten die Inkubation mit den Sekundärantikörpern für weitere drei Stunden bei RT mit Donkey-Anti-Rabbit- (1:500; 488 nm) und Donkey-Anti-Sheep-Antikörper (1:500; 568 nm), erneutes Waschen der Schnitte und die Lagerung in PBS.

3.3.6 Montieren der Schnitte

Die Schnitte wurden von rostral nach okzipital angeordnet auf Objektträger aufgezogen, dort angetrocknet und das Deckglas mit Montiermedium (100 µl pro Objektträger; Tabelle 3-8) fixiert. Nach Trocknung über Nacht wurde das Deckglas mit Nagellack versiegelt und die Schnitte lichtgeschützt gelagert.

Protokoll Montiermedium:

Mowiol 2,4 g

Glycerin 6 ml

dH₂O 6 ml

TRIS 12 ml (0,2 M; pH 8,5)

- Glycerin, Mowiol und dH₂O für mindestens 2 h bei RT mischen
- TRIS hinzugeben und für 2 h bei 53 °C mischen bis zur vollständigen Lösung
- Zentrifugieren (4000 rpm bei 4 °C für 20 min)
- Überstand zu je 1 ml in Eppendorfgefäße abfüllen (bei -20 °C bis zu 12 Monate haltbar)

Tabelle 3-8: Protokoll Montiermedium

3.3.7 Quantifizierung der dopaminergen Neurone mittels Stereologiemikroskop

Die Anzahl der dopaminergen, TH⁺ Neurone in der Substantia nigra pars compacta wurde mit Hilfe eines Stereologiemikroskops und zugehöriger Software (StereoInvestigator software, MicroBrightField Inc.) bestimmt [3].

Die Stereologie ist eine Methode, mit der dickere, histologische Schnitte räumlich interpretiert werden können, um beispielsweise die Anzahl von Zellen in einer bestimmten Region oder Organvolumina zu quantifizieren [179]. Die stereologische Analyse beruht auf dem Prinzip des „optical Fractionator“ [180]. Die Quantifizierung der Neuronen erfolgt in einem bekannten Bruchteil (Fraktion) des Gesamtvolumens. Anschließend wird die Zellzahl auf das Gesamtvolumen (in diesem Fall der gesamten SNpc) hochgerechnet [180, 181]. Die Hochrechnung ermöglicht folgende Formel [180, 181]:

$$N = \sum Q \cdot \underbrace{\frac{t}{h} \cdot \frac{1}{asf} \cdot \frac{1}{ssf}}_{\text{Fraktion am Gesamtvolumen}}$$

mit

Fraktion am Gesamtvolumen

N Gesamtzellzahl (die errechnete Neuronenzahl der SNpc)

Q Gesamtzahl der gezählten Neuronen

h Höhe des optischen Dissektors, also der Dicke der optischen Schnittebene

t Schnittdicke

asf area sampling fraction = Anteil der untersuchten Fläche des Schnitts an seiner Gesamtfläche

ssf section sampling fraction = Anteil der untersuchten Schnitte an der Gesamtzahl der Schnitte (z. B. jeder sechste Schnitt → $ssf = 1/6$)

Für diese Arbeit wurde jeder sechste Koronarschnitt der Substantia nigra herangezogen (insgesamt etwa fünf bis sechs Schnitte pro Gehirn, Abb. 3-4) und die Neuronenzahl bei zehnfacher Vergrößerung in repräsentativen Gitterarealen quantifiziert. Die Software wurde nach den Angaben in (Tabelle 3-9) eingestellt.

Low Mag Lens	10xHCPLApo
High Mag Lens	10xHCPLApo
Counting Frame X	75,00 µm
Counting Frame Y	75,00 µm
Grid Size X	173,33 µm
Grid Size Y	146,76 µm
Grid Rotation	0,00 degrees
Section Cut Thickness	40,00 µm
GuardZone Type	Center Disector
Disector High	30,00 µm
Focusing Method	Manual Focus
Refocus at each site	false

Tabelle 3-9: Einstellungen am Stereologiemikroskop

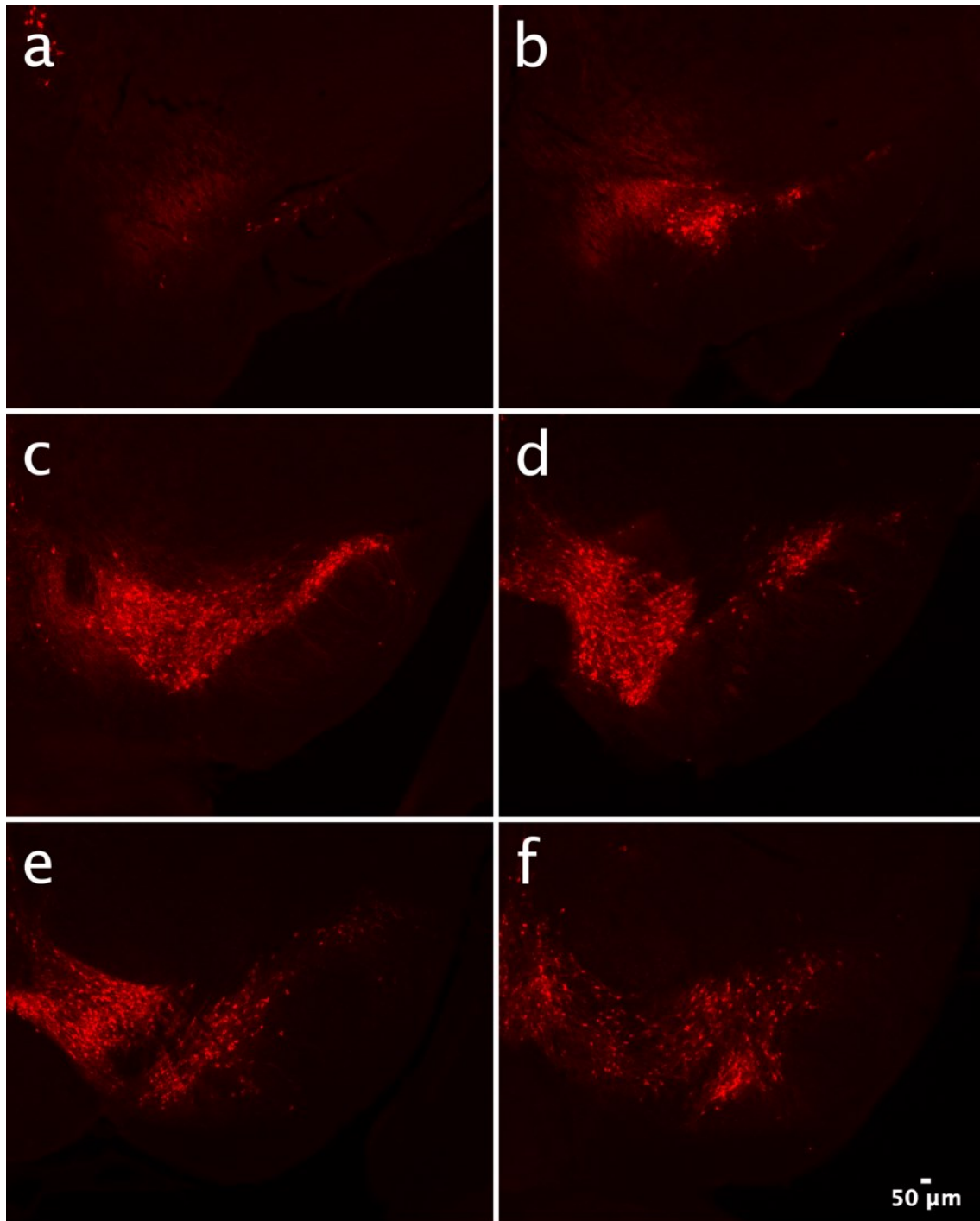


Abb. 3-4: Jeder 6. Koronarschnitt eines Gehirns der Kontrollgruppe mit Anti-TH-Färbung
SNpc und ventrales tegmentales Areal (VTA) von rostral nach okzipital (A-F).

3.3.8 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden Microsoft Excel für Mac Version 16.35 und das Statistikprogramm GraphPad Prism Version 8 verwendet. Für die Neuronenzahl der SNpc beider Versuche wurde basierend auf den Ergebnissen und Vorversuchen eine Normalverteilung der Mittelwerte und Standardabweichungen angenommen. Die

Mittelwerte der Gruppen sollten anhand von paarweisen, unverbundenen T-Tests auf einen signifikanten Unterschied untersucht werden. Auch für die Motorfunktion wurde eine Normalverteilung angenommen. Pro Maus und Messzeitpunkt wurde ein Mittelwert der Laufleistung gebildet. Die Abnahme der Durchschnittsleistung innerhalb der Gruppen wurde im Paraquat-Modell mittels paarweisem T-Test für verbundene Stichproben ermittelt. Im Rotenon-Modell wurden die Durchschnittsleistung pro Gruppe im Zeitverlauf sowie der Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen mittels repeated measures Two-way-ANOVA verglichen. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt. Die Bearbeitung der Mikroskopiebilder erfolgte mit ImageJ Software und Adobe Photoshop zur besseren Darstellbarkeit.

4 Ergebnisse

4.1 Neuroprotektive Wirkung von GS und DL gegen Paraquattoxizität im Mausmodell

4.1.1 Hintergrund

In vitro konnte bereits eine neuroprotektive Wirkung der Produkte des Enzyms DJ-1 gezeigt werden [4]: Die bisherigen Untersuchungen ergaben, dass Glykolsäure und D-Laktat das mitochondriale Membranpotential stabilisieren und das neuronale Überleben bei oxidativem Stress verbessern. Nun sollte untersucht werden, ob ähnliche Effekte auch in vivo im Mausmodell nachgewiesen werden können und ob die Behandlung mit beiden Substanzen eine durch das Herbizid Paraquat ausgelöste, mit MP vergleichbare Pathologie verhindern kann. Dazu sollten sowohl die motorische Funktion als auch immunhistochemisch die Neurodegeneration in der SNpc der Mäuse gemessen werden.

4.1.2 Verhinderung einer Motordysfunktion bei Behandlung mit GS und DL

Bei der Messung der Motorfunktion als Ausdruck der klinischen Auswirkung der Neurodegeneration wurde die Laufleistung im Rotarodtest vor und nach Behandlung untersucht. Alle Gruppen zeigten bezogen auf die Ausgangsleistung der Gruppe eine Abnahme der Motorfunktion über den Zeitverlauf, welche bei der Paraquatgruppe am stärksten ausgeprägt war (durchschnittliche Abnahme um 11,9 %). Die Ergebnisse der beiden Therapie-Gruppen waren mit der Vehikelgruppe vergleichbar (Abnahme um durchschnittlich 5,9 % bei GS- bzw. 7,7 % bei DL-Behandlung sowie 3,2 % in der Vehikelgruppe). Lediglich die Abnahme der Laufleistung in der Paraquatgruppe zeigte sich im paarweisen T-Test für verbundene Stichproben signifikant ($p=0,024$) (Abb. 4-1).

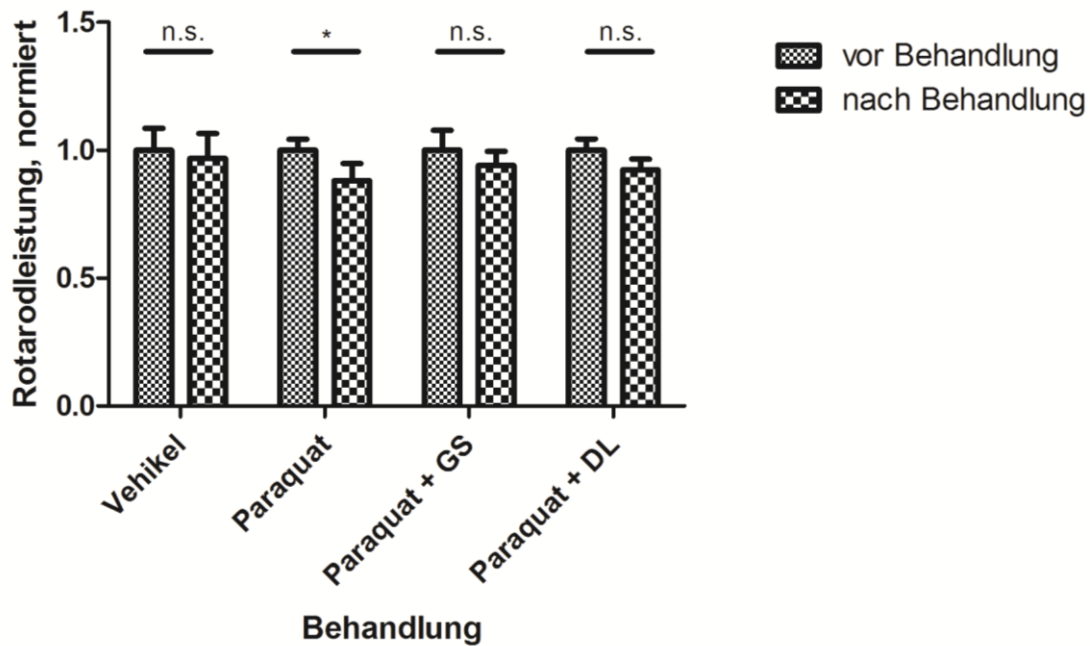


Abb. 4-1: Verhinderung einer Paraquat-induzierten Abnahme der Motorfunktion durch GS- oder DL-Behandlung im Mausmodell

Ein beschleunigter Rotarodtest (Startgeschwindigkeit: 4 rpm, Beschleunigung: 0,3 rpm/s) wurde vor und nach Behandlung durchgeführt. Abgebildet ist die Leistung im Rotarodtest bezogen auf die durchschnittliche Ausgangsleistung der Versuchsgruppe für eine Paraquat- bzw. Vehikelgruppe sowie bei zusätzlicher GS- und DL-Behandlung (Gruppendurchschnitt \pm SEM). Die Mäuse zeigten eine signifikante Abnahme der Laufleistung in der Paraquatgruppe, welcher durch GS- oder DL-Behandlung entgegengewirkt werden konnte ($n = 9$; paarweiser T-Test für verbundene Stichproben; $p_{(\text{Vehikel})} = 0,576$; $p_{(\text{Paraquat})} = 0,024$; $p_{(\text{GS})} = 0,424$; $p_{(\text{DL})} = 0,272$).

4.1.3 Schutz vor Neurodegeneration der SNpc durch Behandlung mit GS und DL

Durch immunhistochemische Färbung der Tyrosinhydroxylase sind dopaminerge Neurone nachweisbar [176]. Das Enzym katalysiert die Synthese von Katecholaminen, unter anderem auch Dopamin, aus Tyrosin.

Mikroskopisch war bereits in der Übersichtsvergrößerung ein starker Unterschied in der Dichte der dopaminergen Neuronen der SNpc zwischen der Vehikelgruppe und der Paraquatgruppe feststellbar (Abb. 4-2). Der neurotoxische Effekt des Paraquats konnte durch die zusätzliche Gabe von GS oder DL über die drei Wochen der Behandlung vollständig verhindert werden. Die Gehirnschnitte dieser beiden Gruppen zeigten sich mikroskopisch vollständig gesund mit einer normalen Dichte dopaminergener Neurone.

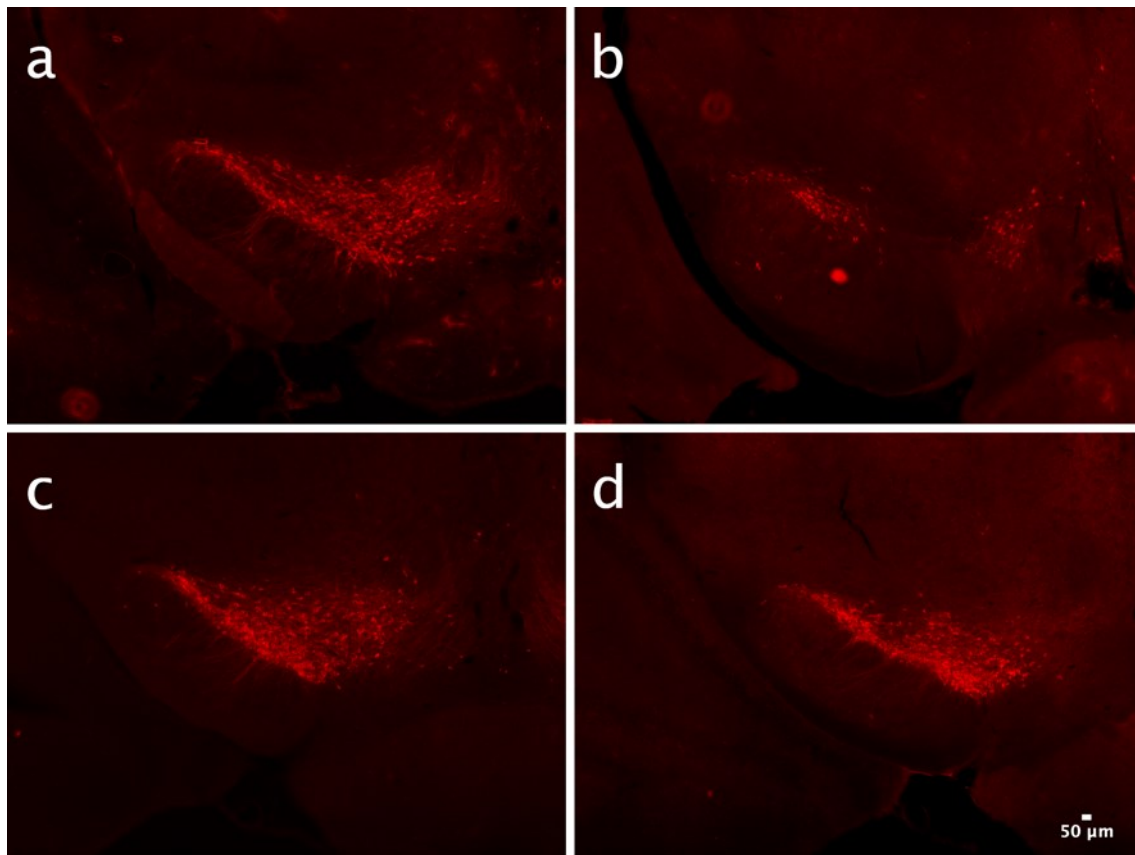


Abb. 4-2: Vollständige Verhinderung einer Paraquat-induzierten Neurodegeneration durch Behandlung mit GS oder DL im Fluoreszenzmikroskop (Übersicht)

Immunohistochemische Färbung gegen TH zeigte einen Verlust dopaminerger Neurone in der SNpc in der Paraquatgruppe (B) im Vergleich zur Vehikelgruppe (A). Dieser neurotoxische Effekt konnte durch die zusätzliche Behandlung mit GS (C) oder DL (D) vollständig aufgehoben werden. Die Schnitthöhe der Bilder ist aufgrund der selektiven Färbung jedes sechsten Schnittes nicht auf allen Bildern vollständig identisch (n = 6).

Ein äquivalentes Ergebnis ergab die Quantifizierung der dopaminerger Neuronen im Stereologiemikroskop (Tabelle 4-1; Abb. 4-3). Die Paraquatgruppe zeigte im Durchschnitt eine signifikant niedrigere Gesamtzahl dopaminerger Neurone in der SNpc von 7025 Neuronen im Vergleich zur Vehikelgruppe mit durchschnittlich 9445 Neuronen ($p = 0,0086$ im paarweisen T-Test für unverbundene Stichproben). Die beiden Behandlungsgruppen hingegen wiesen sogar eine höhere Durchschnittszellzahl als die Vehikelgruppe auf (10331 für GS und 10789 für DL, ohne Signifikanz). Der Unterschied der Behandlungsgruppen zur Paraquatgruppe zeigte sich signifikant ($p = 0,0021$ für GS bzw. $p = 0,0005$ für DL).

Gruppe:	Vehikel	Paraquat	Glykolsäure	D-Laktat
Maus 1:	9532	5618	10319	11997
Maus 2:	11174	8293	11364	11554
Maus 3:	8495	5888	10003	10573
Maus 4:	9623	9180	8411	11681
Maus 5:	9971	6552	12314	9338
Maus 6:	7882	6616	9575	9591
Durchschnitt	9445	7025	10331	10789
± SEM:	± 470,8	± 574,9	± 558,7	± 462,9

Tabelle 4-1: Quantifizierung der dopaminergen, TH⁺ Neuronen der SNpc nach immunhistochemischer Färbung mittels StereoInvestigator Software (n = 6)

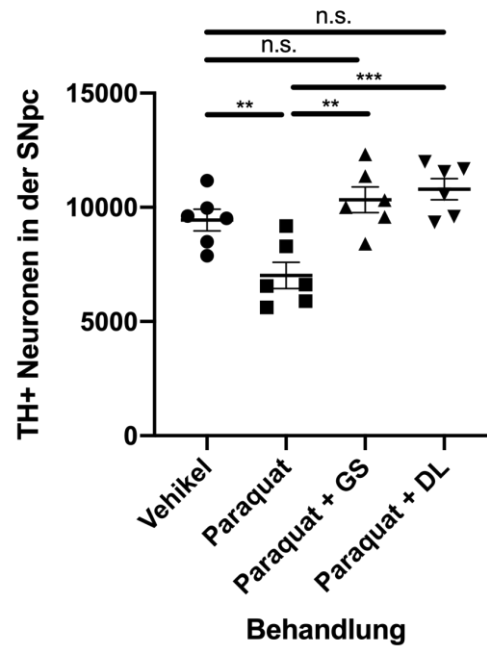


Abb. 4-3: Verhinderung einer Paraquat-induzierten Neurodegeneration durch GS oder DL-Behandlung

Quantifizierung der TH⁺ Neuronen der SNpc in Wildtypmäusen unter Paraquatbehandlung nach immunhistochemischer Anti-TH-Färbung mittels StereoInvestigator Software (absolute Neuronenzahl der SNpc im Gruppendurchschnitt ± SEM). Die Paraquatgruppe zeigte einen signifikanten Verlust dopaminerger Neuronen im Vergleich zur Vehikelgruppe. Bei gleichzeitiger Behandlung mit GS oder DL konnte die Neurodegeneration vollständig verhindert werden (n = 6; paarweiser Vergleich im T-Test für unverbundene Stichproben, $p_{(\text{Paraquat vs. Vehikel})} = 0,0086$; $p_{(\text{GS vs. Paraquat})} = 0,0021$; $p_{(\text{DL vs. Paraquat})} = 0,0005$).

4.1.4 Kein Nachweis einer Neurogenese in der SNpc bei GS- und DL-Behandlung

Da die beiden Behandlungsgruppen mit GS und DL eine leicht erhöhte Zellzahl im Vergleich zur Vehikelgruppe aufwiesen, wurde untersucht, ob die Substanzen in der Lage sind, eine Neurogenese zu induzieren. Der Unterschied zur Vehikelgruppe war jedoch nicht signifikant.

Das Protein Ki-67 ist ein Proliferationsmarker. Da es nur während der Mitose exprimiert wird, können durch eine Ki-67-Färbung teilungsaktive Zellen nachgewiesen werden [182]. Das Fehlen von Ki-67 im TH-Antikörper-positiven Bereich der Substantia nigra der Behandlungsgruppen wies darauf hin, dass keine Neurogenese induziert wurde (Abb. 4-4). Als Kontrolle wurden Gehirnschnitte im Bereich der Seitenventrikel angefärbt, da dort physiologisch eine Neurogenese bei Erwachsenen stattfindet. Diese Färbung erwies sich als positiv.

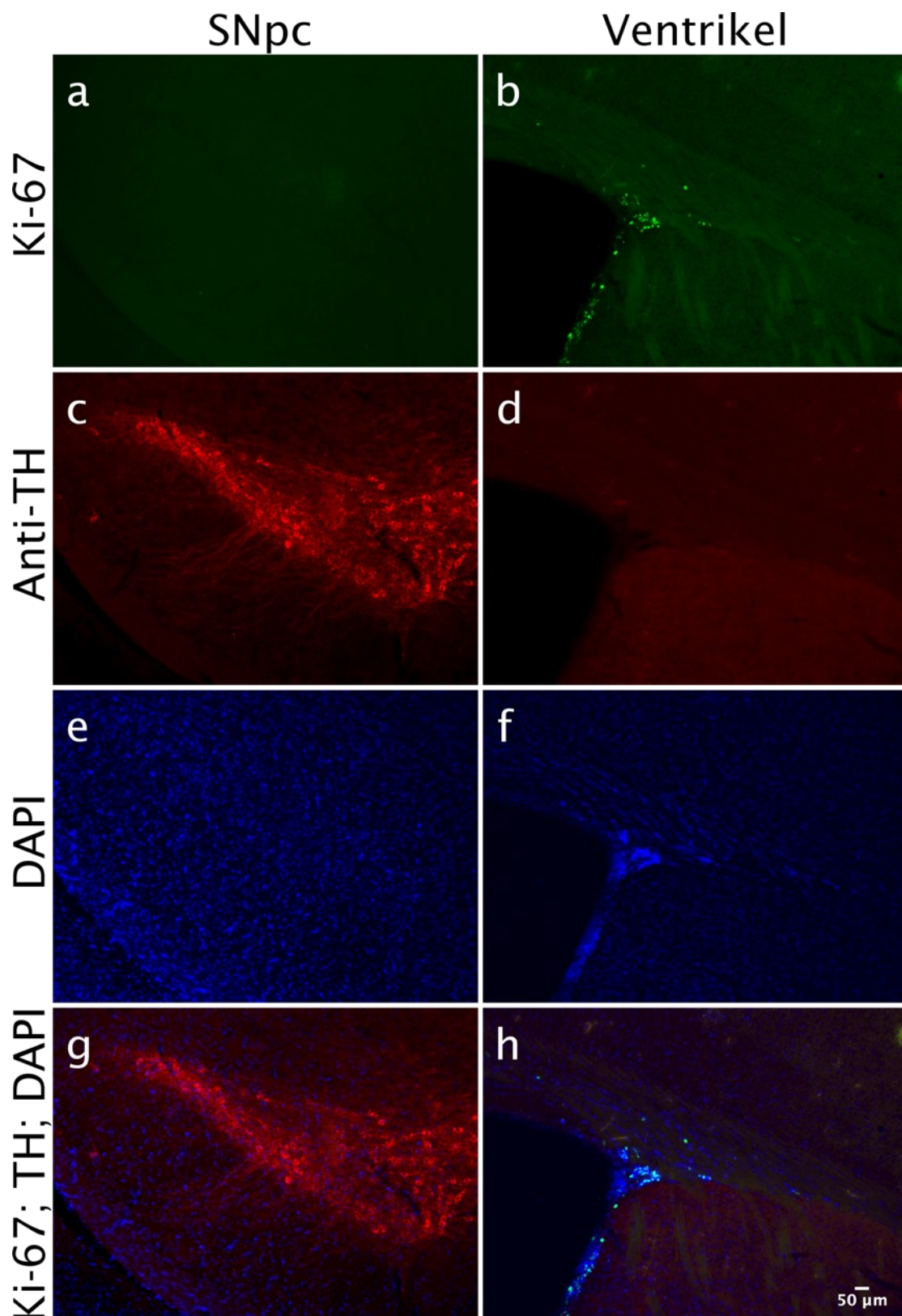


Abb. 4-4: Keine Induktion einer Neurogenese in der SNpc durch GS- oder DL-Behandlung

A, B) Die immunhistochemische Färbung gegen KI-67 zeigte keine Anzeichen einer Zellteilung im Bereich der SNpc (A) wohl aber im Bereich der Seitenventrikel als Positivkontrolle (B). **C, D)** Anti-TH-Färbung. **E, F)** DAPI-Färbung der Zellkerne. **G, H)** Überlagerung aller Färbungen.

4.1.5 Interpretation

Die Behandlung mit Glykolsäure und D-Laktat konnte den toxischen Effekt von Paraquat und die Entstehung einer Parkinson-ähnlichen Neurodegeneration verhindern. Sowohl klinisch als auch pathologisch war bei den behandelten Mäusen keine Auffälligkeit sichtbar. Eine durch die beiden Substanzen ausgelöste Neurogenese konnte nicht nachgewiesen werden. Die Mäuse zeigten während der Behandlung keinerlei Anzeichen einer Toxizität durch Glykolsäure oder D-Laktat. Beide Substanzen sind Produkte des körpereigenen Metabolismus, sie könnten für die Behandlung des Morbus Parkinson eine Rolle spielen.

4.2 Keine neurodegenerative Wirkung durch intragastrale Rotenonbehandlung in einjährigen ASYN-KO-Mäusen oder sechsmonatigen WT-Mäusen

4.2.1 Hintergrund

Da die Rolle des endogenen Alpha-Synucleins bei der Pathogenese und Progression des MP weiterhin nicht vollständig geklärt ist, sollte untersucht werden, ob ASYN-KO-Mäuse ohne endogene ASYN-Produktion unter Toxinexposition eine mit MP vergleichbare Pathologie entwickeln.

Bei einjährigen Wildtypmäusen wurde eine Rotenon-bedingte Neurodegeneration bereits in vorangegangenen und auswärtigen Versuchen gezeigt [18, 130] (Siehe Abb. 5-4). Die Rotenonbehandlung der Versuche erfolgte nach dem gleichen Protokoll und bei Khairnar et al. zudem zeitgleich zu den Versuchen dieser Arbeit. Aus Rücksicht auf das “3R“-Prinzip (siehe Kapitel 3.3.1) wurde auf eine Wiederholung dieses Teilversuchs verzichtet. Da in meiner Arbeitsgruppe für einen anderen Versuch WT-Mäuse im Alter von sechs Monaten mit Rotenon behandelt wurden, sollte zusätzlich untersucht werden, ob auch in diesem Alter schon eine Neurodegeneration auslösbar ist.

Bei diesen in-vivo-Versuchen sollten die motorische Funktion der Tiere im Behandlungsverlauf in Form eines Rotarodtests sowie immunhistochemisch die Neurodegeneration in der SNpc gemessen werden. Teilergebnisse dieses Versuches wurden bereits veröffentlicht [3].

4.2.2 Keine Motordysfunktion durch Rotenonbehandlung bei einjährigen ASYN-KO-Mäusen

Der Untergang dopaminergener Neurone der SNpc spiegelt sich in Parkinsonpatienten in Form motorischer Defizite wider. Um die Motorfunktion im Mausmodell zu überprüfen, wurde ein beschleunigter Rotarodtest durchgeführt. Nach zweimonatiger Behandlung zeigten sowohl die Vehikel- als auch die Rotenongruppen der ASYN-KO-Mäuse im Behandlungsverlauf eine vergleichbare, leichte Zunahme der Leistung im Rotarodtest im Vergleich zum Ausgangswert (durchschnittlichen Zunahme von 4,1 s in der Vehikel- und 7,2 s in der Rotenongruppe) (Abb. 4-5, A). Für die Zweimonats-Auswertung der Motorik wurden alle vier Gruppen einbezogen.

Ähnlich verhielt es sich bei den ASYN-KO-Mäusen unter viermonatiger Behandlung: Die durchschnittliche Zunahme der Rotarodleistung betrug bei der Vehikel- 1,6 s und bei der Rotenongruppe 7,3 s (Abb. 4-5, B). Die Entwicklung der Motorfunktion der Gruppen im Zeitverlauf zeigte sich statistisch nicht signifikant (repeated measures two-way ANOVA) [3].

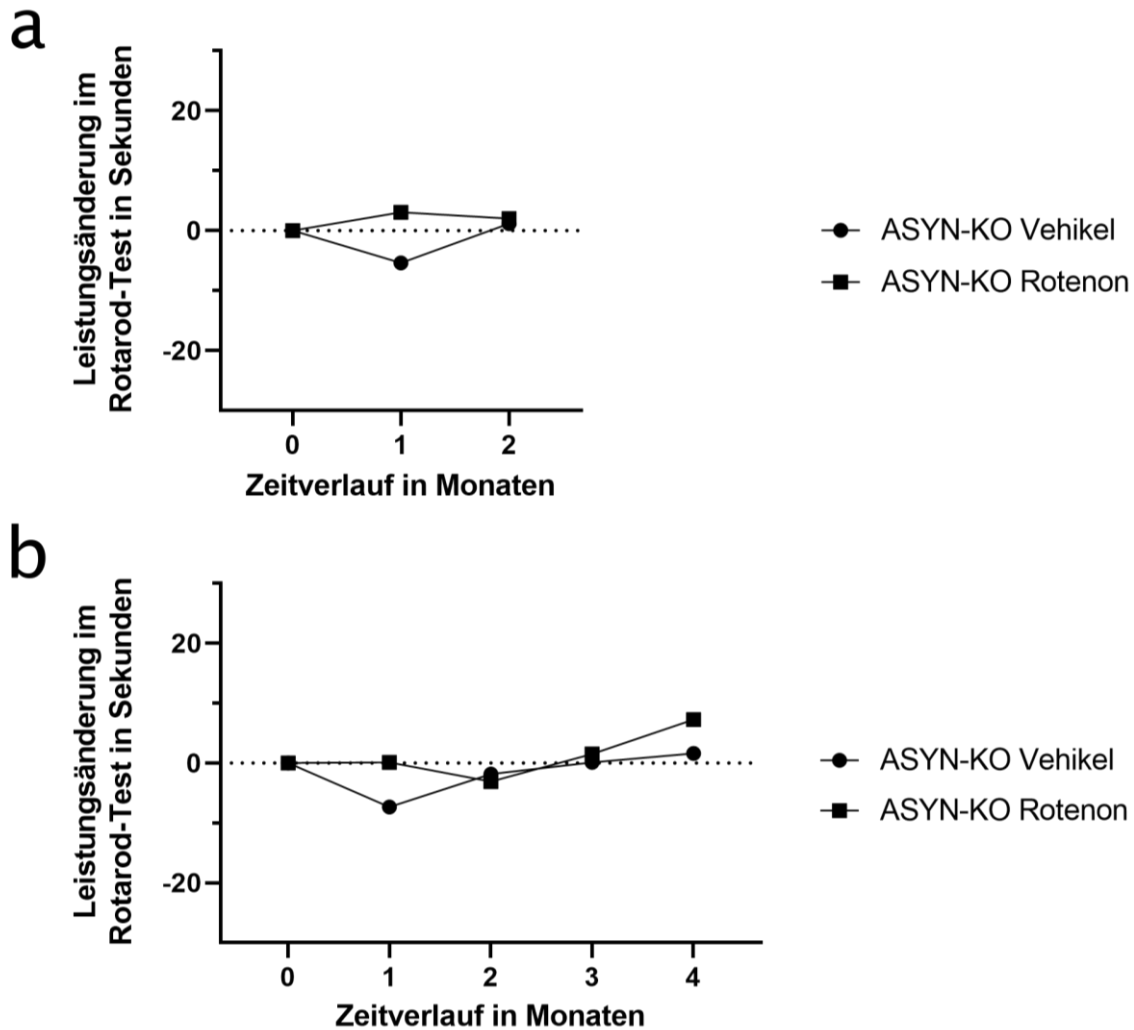


Abb. 4-5: Keine Motordysfunktion bei ASYN-KO-Mäusen unter intragastraler Rotenonbehandlung im Zeitverlauf

A) zweimonatige Behandlung mit Betrachtung aller 4 ASYN-KO-Gruppen. **B)** viermonatige Behandlung. Ein beschleunigter Rotarodtest (Startgeschwindigkeit: 4 rpm, Beschleunigung: 0,3 rpm/s) wurde mit je 9 Wiederholungen pro Maus und Messzeitpunkt monatlich bis zur Perfusion durchgeführt. Abgebildet ist der Gruppendurchschnitt der Differenz zur Ausgangsleistung für ASYN-KO-Mäuse unter Rotenon- bzw. Vehikelbehandlung. Es zeigte sich statistisch kein signifikanter Unterschied in der Entwicklung der Laufleistung der Gruppen im Zeitverlauf ($n = 7$; repeated measures two-way ANOVA; $p_{(\text{Zeit} \times \text{Behandlung}, 4 \text{ Mo})} = 0,7053$; $p_{(\text{Zeit} \times \text{Behandlung}, 2 \text{ Mo})} = 0,1805$). (Daten veröffentlicht in Dening et al., 2022, S.4 [3])

Damit konnten bei keiner der ASYN-KO-Gruppen Anzeichen einer Motordysfunktion durch die Rotenonbehandlung nachgewiesen werden [3].

4.2.3 Keine Motordysfunktion durch Rotenonbehandlung bei WT-Mäusen im Alter von sechs Monaten

Bei einjährigen WT-Mäusen konnte in vorangegangenen Versuchen bereits eine Motordysfunktion durch intragastrale Rotenonbehandlung nachgewiesen werden [18]. Die Untersuchung von Artgenossen im Alter von sechs Monaten im Rahmen dieser Arbeit konnte hingegen keine motorischen Einschränkungen feststellen.

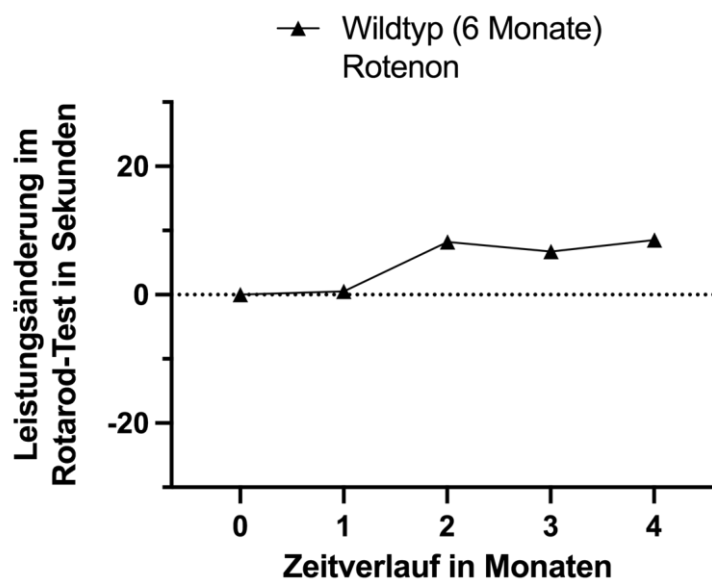


Abb. 4-6: Keine Motordysfunktion im Zeitverlauf durch intragastrale Rotenonbehandlung bei WT-Mäusen im Alter von sechs Monaten

Ein beschleunigter Rotarodtest (Startgeschwindigkeit: 4 rpm, Beschleunigung: 0,3 rpm/s) wurde mit je 9 Wiederholungen pro Maus und Messzeitpunkt monatlich bis zur Perfusion durchgeführt. Abgebildet ist der Gruppendurchschnitt der Differenz zur Ausgangsleistung von sechsmonatigen Wildtypmäusen unter Rotenonbehandlung. Es zeigte sich statistisch kein signifikanter Unterschied der Laufleistung im Zeitverlauf ($n = 6$; repeated measures one-way ANOVA; $p = 0,4309$).

Auch diese Gruppe zeigte im Gruppendurchschnitt eine geringe Zunahme der Laufleistung um 8,5 s über die vier Monate der Rotenonbehandlung (Abb. 4-6). Dies könnte dafür sprechen, dass die Toxizität von Rotenon altersabhängig ist, was mit der zunehmenden Inzidenz des MP im Alter kompatibel ist.

4.2.4 Motordysfunktion bei ASYN-KO-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp (6 Mo)

Interessanterweise zeichnete sich bei der Auswertung der absoluten Laufleistung aller fünf untersuchten Gruppen eine weitere Auffälligkeit ab. Im gesamten Verlauf zeigten die ASYN-KO-Mäuse konstant eine schlechtere Motorfunktion als die sechsmonatige Wildtypgruppe. Dieser Unterschied war bereits vor Beginn der Rotenongabe nachweisbar und damit unabhängig von der Behandlung (Vehikel oder Rotenon) (Abb. 4-7).

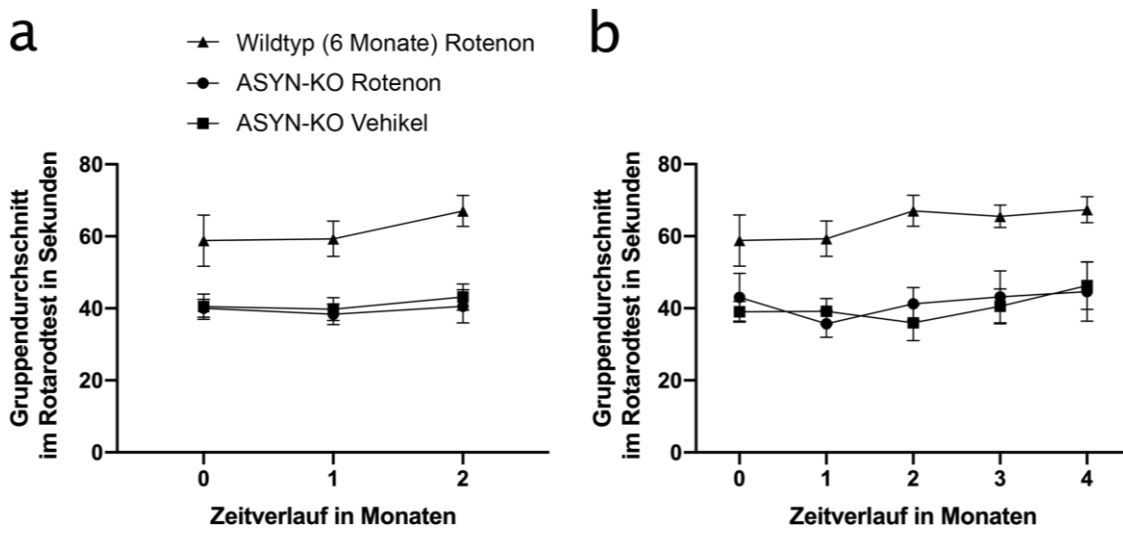


Abb. 4-7: Erniedrigte basale Motorfunktion bei ASYN-KO-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen (6 Monate) unabhängig von der Behandlung

A) zweimonatige Behandlung mit Betrachtung aller 5 Gruppen. **B).** viermonatige Behandlung

Ein beschleunigter Rotarodtest (Beschleunigung: 0,3 rpm/s, Startgeschwindigkeit: 4 rpm) wurde mit je 9 Wiederholungen pro Maus und Messzeitpunkt vor Behandlung sowie monatlich bis zur Perfusion durchgeführt. Abgebildet ist der Gruppenschnitt der Laufleistung \pm SEM für ASYN-KO-Mäuse unter Rotenon- bzw. Vehikelbehandlung sowie für die Wildtypgruppe. Die ASYN-KO-Mäuse zeigten eine schlechtere Basismotorfunktion ($n=7$ bei ASYN-KO-Gruppen; $n=6$ bei WT; repeated measures Two-way ANOVA; $p_{(\text{Behandlung, 4 Mo})} = 0,0018$; $p_{(\text{Behandlung, 2 Mo})} = 0,0003$). (Daten veröffentlicht in Denning et al., 2022, S.4 [3])

Die genauere Betrachtung der Rotarodergebnisse zum Zeitpunkt 0 ergab einen signifikanten Unterschied der Rotarodleistung zwischen allen ASYN-KO-Mäusen und ihren sechsmonatigen WT-Artgenossen ($p = 0,0021$ im T-Test für unverbundene Stichproben) (Abb. 4-8).

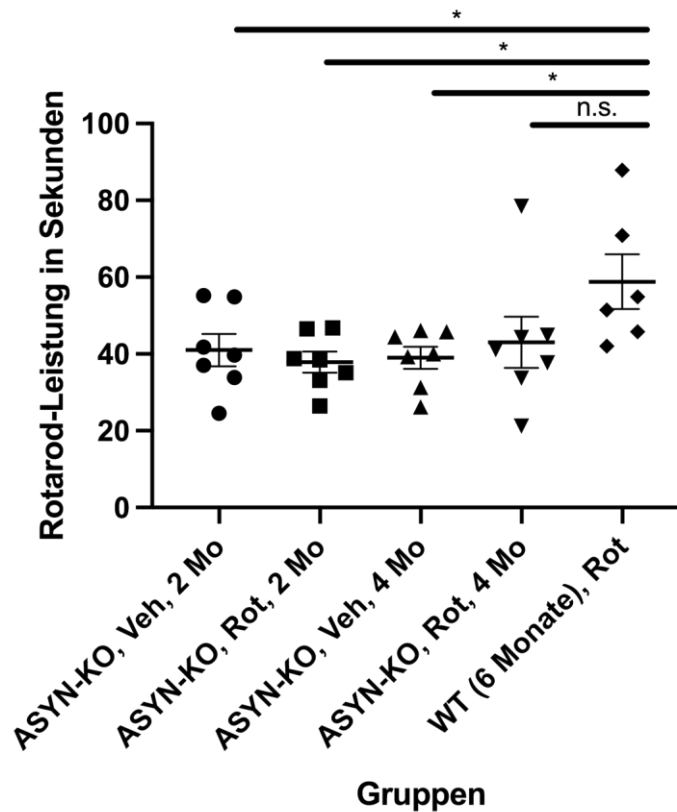


Abb. 4-8: Erniedrigte Rotarodleistung von ASYN-KO-Mäusen im Vergleich zu sechsmonatigen Wildtypmäusen zum Zeitpunkt 0

Abgebildet ist der Gruppendurchschnitt der Laufleistung \pm SEM für alle ASYN-KO-Mäuse sowie für die sechsmonatige Wildtypgruppe im beschleunigten Rotarodtest vor Behandlung (Beschleunigung: 0,3 rpm/s, Startgeschwindigkeit: 4 rpm, je 9 Wiederholungen pro Maus). Die ASYN-KO-Mäuse zeigten eine signifikant schlechtere Basismotorfunktion unabhängig von der Rotenonbehandlung (n=7 bei ASYN-KO; n=6 bei WT; T-Test für unverbundene Stichproben KO-Mäuse vs. WT; $p = 0,0021$). (Daten veröffentlicht in Dening et al., 2022, S.4 [3])

4.2.5 Keine Neurodegeneration in der SNpc in ASYN-KO- und sechsmonatigen WT-Mäusen bei oraler Rotenonbehandlung nach zwei und vier Monaten

Um einen möglichen Zelluntergang in der SNpc festzustellen, wurden die dopaminergen Neurone immunhistochemisch gefärbt (Anti-TH-Färbung) und im Stereologiemikroskop quantifiziert. Dabei war bereits mikroskopisch in der Übersichtsvergrößerung (Abb. 4-9) eine vergleichbare, neuronale Dichte in allen fünf Gruppen einschließlich der sechsmonatigen Wildtypgruppe sichtbar. Die Schnitte aller Gruppen waren in keiner Weise pathologisch verändert mit einer normalen Dichte und Verteilung der dopaminergen Neuronen [3].

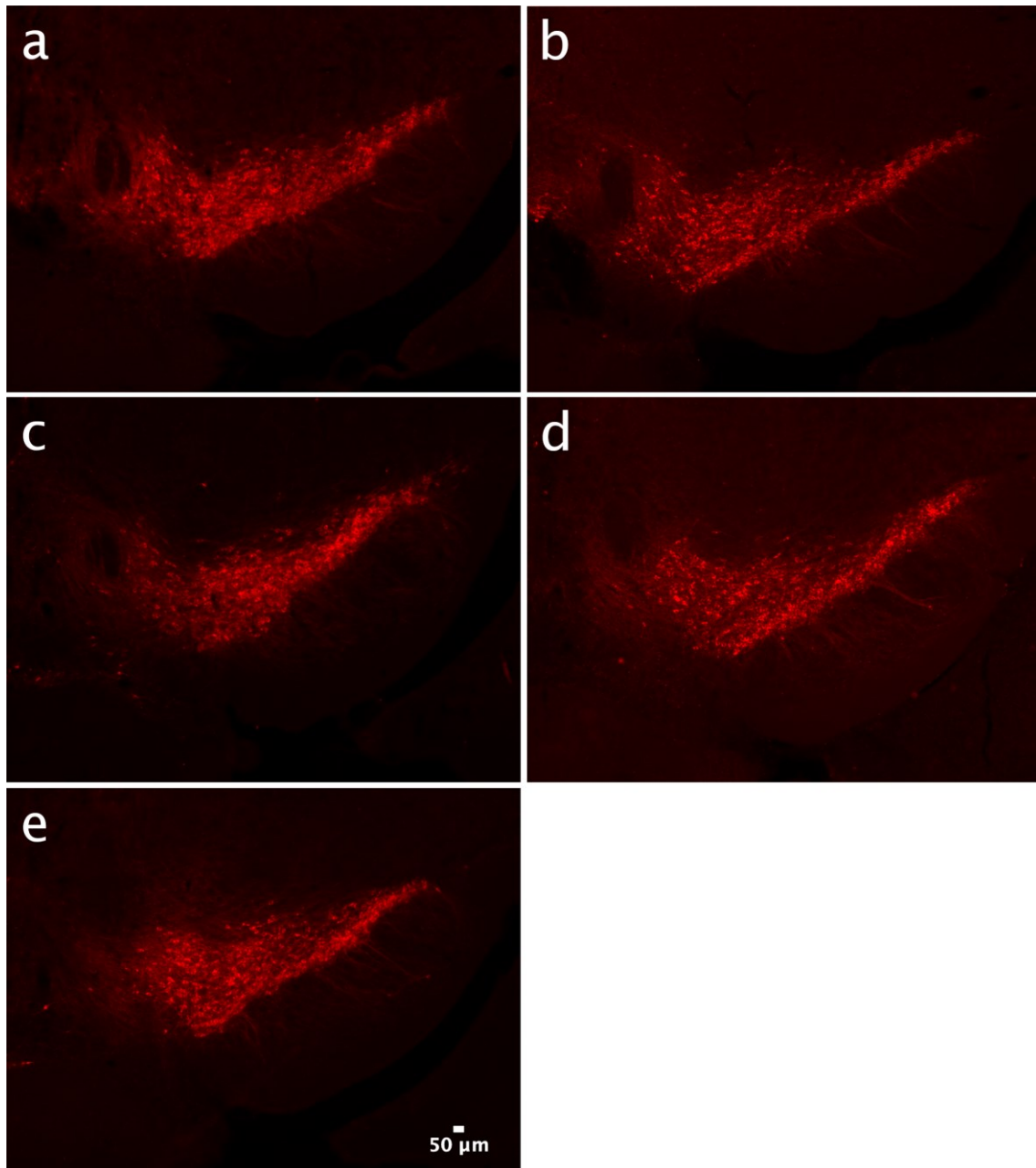


Abb. 4-9: Kein Anhalt für Neurodegeneration in der SNpc bei ASYN-KO-Mäusen und Wildtypmäusen (6 Monate) unter intragastraler Rotenonbehandlung

Mikroskopische Übersicht der SNpc nach immunhistochemischer Anti-TH-Färbung. Alle Gruppen zeigten eine vergleichbare Dichte dopaminerger Neuronen ohne Anhalt für Neurodegeneration. Viermonatige Behandlung von ASYN-KO-Vehikel-Gruppe (A) und ASYN-KO-Rotenon-Gruppe (C). Zweimonatige Behandlung von ASYN-KO-Vehikel-Gruppe (B) und ASYN-KO-Rotenon-Gruppe (D). Viermonatige Behandlung Wildtyp-Rotenon-Gruppe im Alter von sechs Monaten (E). (Modifiziert nach Dening et al., 2022, S.4 [3]: „Figure 2“; lizenziert unter CC BY 4.0)

Auch die Quantifizierung der dopaminergen Neuronen im Stereologiemikroskop ergab vergleichbare Ergebnisse für alle fünf Gruppen (Tabelle 4-2; Abb. 4-10). Der paarweise Vergleich der Gruppen im T-Test für unverbundene Stichproben konnte keinen signifikanten Unterschied nachweisen [3].

Gruppe:	ASYN-KO Vehikel	ASYN-KO Rotenon	ASYN-KO Vehikel	ASYN-KO Rotenon	WT (6 Mo) Rotenon
Behandlung:	2 Monate	2 Monate	4 Monate	4 Monate	4 Monate
Maus 1:	12725	9433	11617	10354	10414
Maus 2:	11712	11744	11871	10161	13042
Maus 3:	10414	11301	9908	12504	11364
Maus 4:	6426	10573	14181	12345	12630
Maus 5:	9940	5951	10699	9940	11269
Durchschnitt	10243	9800	11655	11061	11744
± SEM:	± 1073	± 1039	± 720,9	± 561,2	± 480

Tabelle 4-2: Quantifizierung der dopaminergen, TH⁺ Neuronen der SNpc nach immunhistochemischer Färbung mittels StereoInvestigator Software (n = 5) [3]

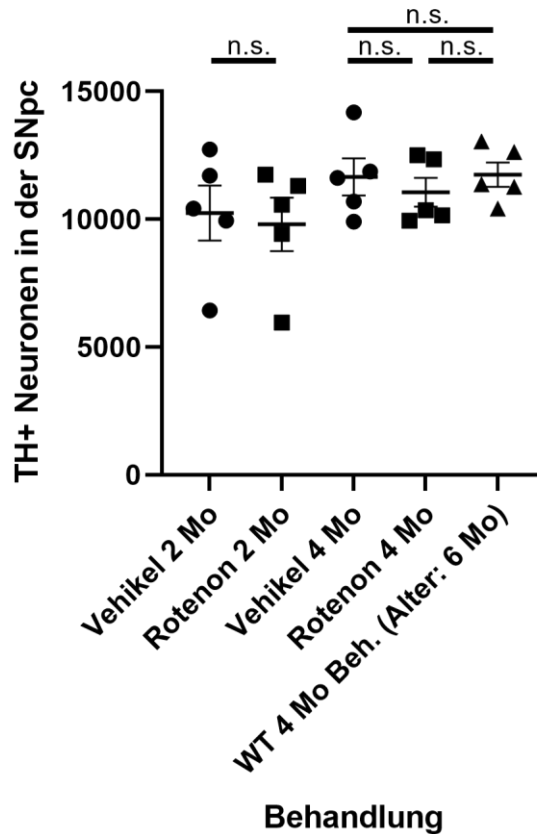


Abb. 4-10: Kein Anhalt für Neurodegeneration der SNpc in der Quantifizierung der TH⁺ Neurone bei ASYN-KO- und WT-Mäusen (6 Monate) unter intragastraler Rotenonbehandlung

Bestimmung der Neuronenzahl der SNpc nach immunhistochemischer Anti-TH-Färbung mittels StereoInvestigator Software. Darstellung der absoluten Neuronenzahl der SNpc nach 4-monatiger bzw. 2-monatiger Behandlung (Gruppenschnitt ± SEM). Vergleichbare Anzahl dopaminergener Neuronen ohne signifikanten Unterschied ($n = 5$; paarweiser Vergleich im T-Test für unverbundene Stichproben, $p(\text{Vehikel vs Rotenon, 4 Monate}) = 0,5335$; $p(\text{ASYN-KO-Rotenon vs. WT-Rotenon, 4 Monate}) = 0,3821$; $p(\text{ASYN-KO-Vehikel vs. WT-Rotenon, 4 Monate}) = 0,921$; $p(\text{Vehikel vs Rotenon, 2 Monate}) = 0,9519$). (Daten veröffentlicht in Dening et al., 2022, S.4 [3])

4.2.6 Interpretation

Sowohl in der klinischen als auch in der histologischen Untersuchung zeigte sich bei ASYN-KO-Mäusen nach zwei- bzw. viermonatiger Behandlung mit Rotenon keinerlei Hinweis für die Entwicklung einer Neurodegeneration [3].

Auch für die sechsmonatigen Wildtypmäuse war kein Effekt der oralen Rotenonbehandlung nachweisbar. Dies könnte für eine Altersabhängigkeit der Toxizität von Rotenon sprechen.

Interessanterweise zeigten die ASYN-KO-Mäuse unabhängig von der Rotenonbehandlung eine schlechtere Motorfunktion als die Wildtypmäuse [3].

5 Diskussion

5.1 Untersuchung der neuroprotektiven Wirkung von GS und DL im Paraquat-Mausmodell

5.1.1 Grund der Versuchsdurchführung

Nachdem Toyoda et al. bereits eine neuroprotektive Wirkung der Produkte des Enzyms DJ-1 in vitro nachweisen konnte [4], sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob dies in vivo auf ein Paraquat-Mausmodell übertragbar ist.

In primären Zellkulturen mit dopaminergen Neuronen konnten die Moleküle GS und DL das neuronale Überleben verlängern und vor der toxischen Wirkung des Pestizids Paraquat schützen. Dabei wurde die Bedeutung der beiden Substanzen für die Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials zum Schutz vor oxidativem Stress deutlich [4]. Dieser Effekt war im Mausmodell reproduzierbar. GS und DL konnten die neurotoxische Wirkung von Paraquat vollständig aufheben. Sowohl der für den Morbus Parkinson typische Untergang der dopaminergen Neurone der SNpc als auch der Verlust der Motorfunktion im beschleunigten Rotarod-Test, die durch reine Paraquatgabe auslösbar waren, konnten durch die zusätzliche Behandlung mit GS und DL vollständig abgewendet werden.

5.1.2 Wahl der Methodik

Zur Abschätzung der neuroprotektiven Wirkung von GS und DL wurde ein bereits etabliertes Mausmodell gewählt. Die Paraquatbehandlung erfolgte intraperitoneal nach dem Protokoll von Jiao et al. [176].

Die neurodegenerative Wirkung der verwendeten Toxine in beiden Versuchen dieser Arbeit wurde anhand der Auszählung dopaminergener Neurone der SNpc im Stereologiemikroskop festgestellt.

Für die Evaluation der Motorsymptome wurde ein beschleunigter Rotarod-Test gewählt. Dieser ist zur Einschätzung der Motordysfunktion im Parkinson-Mausmodell seit langem etabliert. Die beschleunigte Version zeigt dabei die beste Korrelation zwischen der Schädigung der SNpc und der klinischen Symptomatik [183].

5.1.3 Neuroprotektive Wirkung von DJ-1 durch GS und DL

Genauer untersucht wurde bereits die Rolle von DJ-1 bei der Entgiftung sogenannter „Advanced Glycation Endproducts“ (AGEs) [184]: In der Glykolyse fallen Triosephosphate an, welche zu Methylglyoxal reagieren, einem aggressiven Aldehyd aus der Gruppe der AGEs [172]. Das schädliche Methylglyoxal wird anschließend durch die Glyoxalase DJ-1 zu D-Laktat abgebaut [13]. AGEs werden mit einer Vielzahl von Erkrankungen in Verbindung gebracht [13].

Toyoda et al. schlägt nach seinen in-vitro-Versuchen neben der Entgiftungsfunktion der AGEs eine weitere Funktion des Enzyms DJ-1 durch die Produktion von GS und DL vor. Die körpereigenen Metabolite könnten direkt eine neuroprotektive Funktion ausüben und durch die Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials Neurone vor der schädlichen Wirkung von oxidativem Stress (ausgelöst zum Beispiel durch Paraquat) schützen [4].

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Hypothese. Weitere Forschung ist nötig, um den exakten molekularen Mechanismus aufzudecken, mit dem GS und DL auf die Mitochondrien einwirken.

5.1.4 Zusammenhang zwischen DJ-1 und Mitochondrien

Die zentrale Aufgabe von Mitochondrien besteht darin, durch oxidative Phosphorylierung den Energiebedarf der Zellen zu decken. Dabei wird unter Sauerstoffverbrauch ATP generiert. Als schädliches Nebenprodukt der Zellatmung entstehen Sauerstoffradikale, sogenannte reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Dies sind hochreaktive Verbindungen wie beispielsweise Wasserstoffperoxid, die zur Schädigung verschiedener Zellbestandteile, darunter Proteine und DNA, führen, aber auch wichtige Signalwege vermitteln. Eine verstärkte ROS-Produktion oder ein Versagen der intrazellulären Schutzmechanismen bedeuten oxidativen Stress für den Organismus [185, 186].

Es gibt zahlreiche Hinweise, die Parkinson in Verbindung mit Mitochondrien bringen. Sowohl zahlreiche Umwelttoxine, die teils als Tiermodell Anwendung finden, als auch einige der genetischen Parkinsonformen beeinträchtigen primär die mitochondriale Funktion (siehe Kapitel 1.3.4). Eine dieser familiären Parkinsonformen beruht auf einer Mutation des Gens DJ-1 [38].

Mutationen bzw. der Verlust des Gens haben eine veränderte Mitochondrienstruktur und mitochondriale Funktion [72, 168, 187] sowie eine erhöhte Anfälligkeit der Zellen auf oxidativen Stress zur Folge [64, 187, 188, 189]. Auch eine Erniedrigung des mitochondrialen Membranpotentials [72, 187] und eine vermehrte Öffnung der Permeabilitätstransitions-pore (PTP) [169] konnten gezeigt werden. Da diese mitochondrialen Veränderungen durch Gabe von Antioxidantien verhindert werden können, scheint ein intaktes DJ-1 zum Schutz der Mitochondrien vor oxidativem Stress beizutragen [72, 168, 169].

DJ-1 kann in die mitochondriale Matrix und den Intermembranraum aufgenommen [61] sowie an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert werden [62, 65]. Dies erfolgt vermehrt unter oxidativem Stress [65]. Voraussetzung für die mitochondriale Aufnahme und die antioxidative Schutzfunktion von DJ-1 ist die Oxidation der Schwefelgruppe des Cysteins C106 zu SO_2H [65, 69].

Besonders in den Neuronen der SNpc fällt den Mitochondrien eine große Bedeutung zu. Die langen Axone und die geringe Myelinisierung des nigrostriatalen Systems bedeuten einen hohen Energieumsatz [15, 190], da die Weiterleitung von Aktionspotentialen einen hohen ATP-Verbrauch zur Folge hat [191]. In dopaminergen Neuronen der SNpc konnte eine erhöhte zelluläre Atmung und die damit verbundene Produktion von ROS nachgewiesen werden [192]. Da der mitochondrialen Atmungskette ein Großteil der ROS-Produktion zufällt, benötigen die dopaminergen Neuronen verstärkt Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress [38]. Sie könnten besonders stark auf einen Verlust von DJ-1 und anderen, antioxidativen Schutzmechanismen reagieren. Welcher Mechanismus dieser antioxidativen Schutzfunktion von DJ-1 zugrunde liegt, bleibt jedoch weiterhin unklar.

5.1.5 Molekulare Mechanismen der DJ-1-Funktion zum Schutz der Mitochondrien

Toyoda et al. stellte die Hypothese auf, dass die Schutzfunktion von DJ-1 auf seine Produkte GS und DL zurückzuführen ist. Die neuroprotektive Wirkung der beiden Metabolite scheint über eine Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) vermittelt zu werden. Paraquat führt zu einer Verminderung des MMP, welche durch eine GS- oder DL-Behandlung aufgehoben werden kann [4].

Bei GS wurde diese stabilisierende Funktion genauer aufgeklärt: In einer Studie über den neuroprotektiven Effekt von GS in Zusammenhang mit Schlaganfall und Reperfusion wurde der Einfluss von GS auf den Kalziumhaushalt untersucht. Eine Behandlung mit GS scheint die intrazellulären Kalziumspiegel zu senken und so das mitochondriale Membranpotential zu stabilisieren [1]. Bei cerebralen Ischämien wird der neuronale Zelltod durch die so genannte Exzitotoxizität ausgelöst. Es handelt sich um einen glutamatabhängigen Kalziumeinstrom über NMDA-Rezeptoren. Die erhöhten intrazellulären Kalziumspiegel führen zur Apoptose der Neuronen [193]. GS hemmt diesen Kalziumeinstrom und wirkt damit der Exzitotoxizität entgegen [1] (Abb. 5-1).

Eine weitere Studie konnte zeigen, dass GS in den Serin/Glycinmetabolismus eingespeist wird. Es stellt die durch oxidativen Stress verminderten NADPH/NADP⁺ und GSH/GSSG-Verhältnisse zugunsten der reduzierten Formen wieder her [2]. Diese sind wichtiger Bestandteil des Glutathionsystems, eines der wichtigsten antioxidativen Schutzsysteme des Organismus. Glutathion besitzt in seiner reduzierten Form (GSH) am Cystein eine Thiolgruppe (-SH). Durch Reaktion dieser Thiolgruppen können sich zwei Glutathionmoleküle über die Ausbildung eines Disulfids verbinden (oxidierte Form des Glutathions: GSSG). Die frei werdenden Elektronen und Protonen können nun auf unter anderem auf Wasserstoffperoxid übertragen werden, es entsteht Wasser. Wichtiges Koenzym für die Regeneration von GSH ist NADPH [9] (Siehe Abb. 5-1). Auf diese Weise kann GS das Redoxpotential in Würmern wiederherstellen und vor oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid schützen [2].

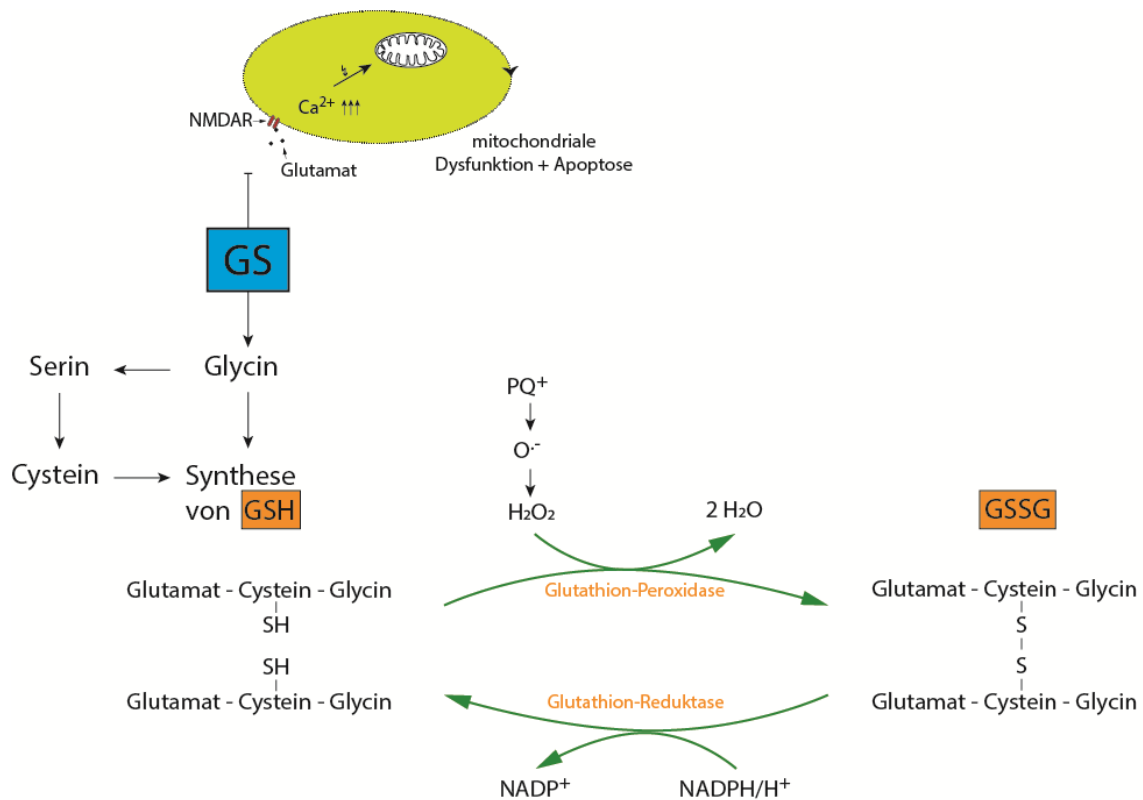


Abb. 5-1: Wirkung von GS

Hemmung des intrazellulären Kalziumeinstroms im Rahmen der Exzitotoxizität [1]; Einspeisung in den Glycin-/Serinmetabolismus und Erhöhung der GSH/GSSG und NADPH/NADP⁺ Ratios [2]. GSH spielt eine wichtige Rolle in der Neutralisation von ROS, unter anderem H₂O₂, welches auch bei Paraquatexposition entsteht. Zur Regeneration des GSH aus GSSG wird wiederum NADPH/H⁺ benötigt [9]. (Eigene Darstellung in Anlehnung an Diez et al., 2021, S. 6, S. 10 [2])

Für die Mechanismen der mitochondrialen Schutzfunktion von DJ-1 existieren zahlreiche weitere Forschungsansätze, von denen im Folgenden einige beispielhaft beschrieben werden.

Nach Aufnahme von DJ-1 in die Mitochondrien unter erhöhtem, oxidativen Stress hemmt es dort den Abbau von Bcl-X_L durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) [194]. Bcl-X_L ist ein antiapoptotisch wirksames Protein, das dem Zelluntergang entgegenwirkt.

Nachdem DJ-1 unter oxidativem Stress in die Mitochondrien aufgenommen wurde, löst es dort verstärkt Mitophagie aus, eine Form der mitochondrien-spezifischen Autophagie, die dem Abbau defekter Mitochondrien dient [72].

5.1.6 Weitere Funktionen von DJ-1 zum Schutz vor oxidativem Stress

Neben der Interaktion mit Mitochondrien sind zahlreiche weitere Signalwege und Mechanismen bekannt, über die DJ-1 seine antioxidative Schutzwirkung ausüben könnte.

DJ-1-Wirkung als ROS-Sensor

Wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben, dient DJ-1 durch Oxidation des Cysteins C106 als Sensor für oxidativen Stress und wird dadurch aktiviert [66].

Direkte Neutralisation von ROS

DJ-1 scheint durch Selbstoxidation unter ROS-Belastung selbst antioxidative Eigenschaften zu haben [64].

Transkription

Außerdem wurde eine indirekte Wirkung von DJ-1 auf die Expression verschiedener Gene nachgewiesen, die Bestandteil antioxidativer Schutzmechanismen sind. Es bindet als Koaktivator an Transkriptionsfaktoren und beeinflusst die Transkription der Zielgene [195, 196].

Zu den wichtigsten Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress zählen Glutathionsystem, Superoxiddismutase und Katalase [186]. Die Interaktion von DJ-1 mit einigen dieser Systeme wurde nachgewiesen: DJ-1 erhöht die Transkription von Glutathion-Ligase [189] und Superoxiddismutase (SOD) 1 und 3 [197, 198].

Unter oxidativem Stress reguliert DJ-1 außerdem die Aktivität der Transkriptionsfaktoren Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor) [195], p53 [196] sowie den PI3K/PKB-Signalweg [199]. Letztendlich münden auch diese Signalwege indirekt in einer verstärkten Neuroprotektion.

Regulation der Proteinaktivität

Das Protein DJ-1 interagiert mit zahlreichen Proteinen, die Bestandteil wichtiger antioxidativer Systeme sind, und reguliert direkt ihre Aktivität. Unter anderem konnte eine verstärkte Enzymaktivität der Glutathionligase nachgewiesen werden [189].

Protease- und Chaperonaktivität

Chaperone bewirken einen verstärkten Abbau fehlgefalteter Proteine und könnten so die pathologischen Aggregate aus ASYN-Oligomeren reduzieren. DJ-1 induziert eine erhöhte Expression des Chaperons Hsp70, das in vitro vor einer Aggregation von pathologischem ASYN mit A53T-Mutation schützt und das zelluläre Überleben verbessert [189]. Auch eine direkte Funktion von DJ-1 als Chaperon wurde nachgewiesen, die unter oxidativem Stress zur Hemmung der ASYN-Aggregation beiträgt [200].

5.1.7 Ausblick und Bedeutung von GS und DL in Säugetieren

Neben der Erforschung des genauen, molekularen Mechanismus der GS- und DL-Wirkung bleibt zu überprüfen, ob der neuroprotektive Effekt von GS und DL auch in anderen Parkinson-Tiermodellen nachweisbar ist. Dies gilt insbesondere für die orale Rotenon-Behandlung, die die natürliche Progression der Erkrankung imitieren kann.

Auch weitere Untersuchungen zur Gen-Umwelt-Interaktion stellen einen interessanten Ansatz weiterer Forschung dar: Wie verhalten sich verschiedene, mit Morbus Parkinson assoziierte Gendefekte unter Paraquat- und GS/DL-Behandlung? Ist bei DJ-1-KO-Mäusen eine veränderte Wirkung der Behandlung nachweisbar? Und sind die Mechanismen auf den Menschen und die idiopathische Form des MP übertragbar?

Die GS- und DL- Wirkung auf DJ-1-KO-Mäuse wurde bereits von Kollegen meiner Arbeitsgruppe untersucht. An dieser Stelle sollen die Ergebnisse beider Versuche hinsichtlich der Toxizität von Paraquat kurz verglichen werden (Abb. 5-2):

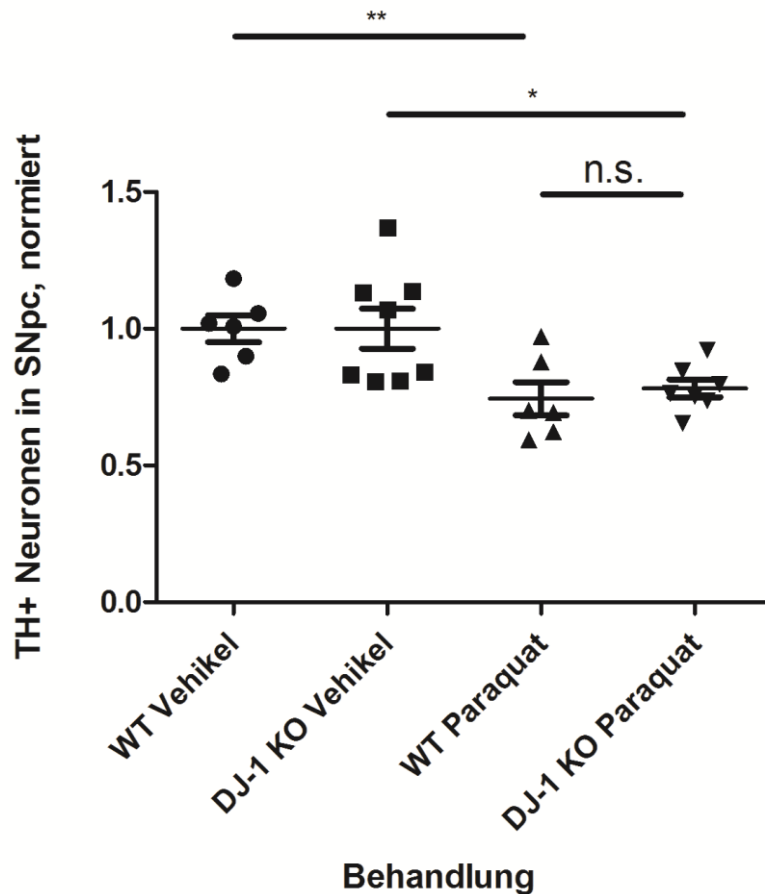


Abb. 5-2: Keine erhöhte Sensitivität auf Paraquattoxizität bei DJ-1-KO-Mäusen

Vergleich der Anzahl TH⁺ Neuronen der SNpc in Wildtypmäusen und DJ-1-KO-Mäusen unter Paraquatbehandlung (immunhistochemische Anti-TH-Färbung; Neuronenzahl der SNpc genormt auf den Gruppendurchschnitt der zugehörigen Vehikelgruppe ± SEM). Die Paraquatgruppen zeigten einen signifikanten Verlust dopaminerger Neuronen im Vergleich zu den Vehikelgruppen. Diese Abnahme war jedoch in Wildtyp- und DJ-1-KO-Mäusen vergleichbar. (n = 6 (WT) bzw. n = 7-8 (DJ-1-KO); paarweiser Vergleich im T-Test für unverbundene Stichproben, p (KO Paraquat vs. WT Paraquat) = 0,609). (DJ-1-KO-Daten zur Verfügung gestellt von Victoire Jouin-Genton)

Beide Versuche (Wildtyp- und DJ-1-KO-Mäuse) wurden nach demselben Protokoll unter identischen Bedingungen durchgeführt. Lediglich die Auswertung erfolgte durch verschiedene Untersucher. Um einen Unterschied in der Neuronenzahl durch den Auszählenden auszugleichen, wurden die Daten jeweils auf die Vehikelgruppe des Versuches normiert. Dabei zeigte sich eine vergleichbare Sensitivität auf Paraquat in Wildtypmäusen und DJ-1-KO-Mäusen (Daten des DJ-1-KO-Versuches mit freundlicher Genehmigung von Victoire Jouin-Genton).

Nachdem den Verbindungen GS und DL in der Zellkultur und in Würmern eine wichtige Rolle im Schutz vor oxidativem Stress nachgewiesen wurde [4], stellt sich die Frage, ob der Glyoxalaseaktivität auch in Säugetieren eine vergleichbare Bedeutung zukommt. In diesem Fall wären auch im Säugetiermodell zwei Beobachtungen zu erwarten:

- eine verstärkte Sensitivität auf Paraquat bei Verlust des DJ-1-Gens
- eine Hochregulation der DJ-1-Expression unter oxidativem Stress

Hinsichtlich der Sensitivität auf Paraquat zeigte sich kein wegweisender Unterschied zwischen DJ-1-KO- und Wildtypmäusen (siehe Abb. 5-2).

In laufenden Experimenten von Dr. rer. nat. Oertel der TU Dresden wurde die Konzentration von endogener GS im Blut von WT- und DJ-1-KO-Mäusen untersucht. Die physiologische GS-Konzentration lag weit unterhalb der Konzentrationen, die für eine erfolgreiche Behandlung nötig waren. Zwischen WT- und DJ-1-KO-Mäusen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (mit freundlicher Genehmigung von Dr. rer. nat. Oertel, Daten noch nicht veröffentlicht).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass GS und DL in Säugetieren keine essenzielle Bedeutung im Schutz vor oxidativem Stress mehr zukommt. Die Fähigkeit, extern zugeführtes GS und DL zu verwerten, scheint jedoch erhalten zu sein, da die Verabreichung von GS- und DL in Dosen, die weit über den physiologischen Spiegeln liegen, eine Schutzfunktion vor oxidativem Stress vermitteln konnte.

5.1.8 Einsatz als Therapeutikum

Der neuroprotektive Effekt von GS und DL könnte als therapeutischer Ansatz für den Morbus Parkinson eine Rolle spielen. Da die Mäuse für diese Arbeit jedoch zeitgleich zur Paraquatexposition behandelt wurden, und damit vor Einsetzen der Neurodegeneration, ist eine Frühdiagnostik der Erkrankung für die Wirkung von GS und DL notwendig. Die motorischen Symptome des MP treten erst ab einem Verlust von ca. 50% der dopaminergen Neurone der SNpc auf [30]. Nachdem die Diagnosestellung klinisch erfolgt, ist die Neurodegeneration zu diesem Zeitpunkt meist schon fortgeschritten. Die Behandlung mit GS und DL konnte den Neuronenverlust abwenden, aber keine Neurogenese bewirken und damit kein bereits untergegangenes Nervengewebe regenerieren. Im Menschen findet die Exposition gegenüber Umwelttoxinen bereits Jahre vor Einsetzen der Symptomatik statt, was eine Behandlung erschwert.

Ein Zusammenhang mit DJ-1 konnte für zahlreiche weitere Erkrankungen nachgewiesen werden, darunter Alzheimer [44, 201], Apoplex [44, 202], kardiale Ischämie [203], Diabetes mellitus [204], amyotrophe Lateralsklerose (ALS) [205, 206] und verschiedene maligne Erkrankungen [207]. Damit könnte die GS/DL-vermittelte membranstabilisierende Wirkung in Mitochondrien [4] auch auf diese Krankheitsbilder einen positiven Einfluss haben. Im Bereich der ALS wurden die körpereigenen Metabolite bereits erfolgreich an einem Patienten eingesetzt und konnten eine Verlangsamung der Krankheitsprogression mit verbesserter, motorischer Funktion bewirken (Daten noch nicht veröffentlicht).

Auch der protektive Einfluss von GS auf das Nervengewebe nach zerebralen Ischämien und deren Reperfusionstherapie konnte nachgewiesen werden [1]. Die intraarterielle Verabreichung von GS während der Reperfusion konnte in Mäusen und Schweinen die Ausbreitung des Infarktareales verringern und das neuronale Überleben verbessern. Klinisch könnte GS folglich additiv zur zerebralen Thrombektomie oder Lysetherapie eingesetzt werden, um das Infarktvolumen zu begrenzen [1].

5.1.9 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend spielt die Glyoxalase DJ-1 über multiple Mechanismen eine wichtige Rolle beim Schutz der Neuronen vor oxidativem Schaden. Einige dieser Mechanismen werden über die Produkte GS und DL vermittelt. Sie stabilisieren das mitochondriale Membranpotential [4], senken den intrazellulären Kalziumeinstrom [1] und tragen durch Regeneration von Glutathion zum Schutz vor oxidativem Stress bei [2] (siehe Kapitel 5.1.5). GS und DL konnten das neuronale Überleben unter oxidativem Stress durch Paraquatbehandlung in Mäusen signifikant verbessern und stellen damit einen möglichen therapeutischen Ansatz in der Behandlung des MP dar.

5.2 Bedeutung des endogenen ASYN für die Pathophysiologie des MP

5.2.1 Grund der Versuchsdurchführung

Die zentrale Bedeutung des Proteins ASYN für die Pathogenese des Morbus Parkinson ist seit langem bekannt: Das zugehörige Gen wurde als erste Ursache für familiären Parkinson identifiziert [37, 40]. Gleichzeitig stellen Ablagerungen von ASYN-Aggregaten als Hauptbestandteil der Lewy-Körperchen ein auffälliges Merkmal der Neuropathologie dar [25]. Es wurde vielfach gezeigt, dass die Neurodegeneration bei MP durch die Toxizität des Proteins ASYN vermittelt wird [98, 111, 125]. Diese wird vor allem auf die Ablagerung fehlgefalteter ASYN-Oligomere zurückgeführt [97, 98, 99]. Sowohl die physiologische Funktion des Proteins als auch der zugrunde liegende Mechanismus der Toxizität von ASYN sind jedoch weiterhin nicht vollständig geklärt.

Die Ätiologie der Erkrankung wird auf eine Interaktion zwischen genetischer Suszeptibilität und der Exposition von Toxinen zurückgeführt [208]. Die Bedeutung dieser Gen-Umwelt-Interaktion sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit für ASYN-KO-Mäuse untersucht werden, die kein endogenes ASYN exprimieren. Es stellt sich die Frage, ob das Vorhandensein von endogenem ASYN Voraussetzung für die Progression des MP ist und ob ein Verlust von ASYN einer toxininduzierten Neurodegeneration im Mausmodell entgegenwirken kann. Dieser Ansatz stellt einen wichtigen therapeutischen Angriffspunkt da: Durch Ausschaltung des endogenen ASYN könnte eine Progression der Erkrankung verhindert werden [209]. Die Abhängigkeit der Rotenontoxizität von endogenem ASYN in vivo, mit Progression der Pathologie vom ENS ins ZNS, wurde bisher nicht untersucht.

5.2.2 Wahl des Tiermodells

Um die physiologischen Gegebenheiten im Menschen möglichst realitätsnah zu imitieren, war die Untersuchung der ASYN-Funktion im Gesamtorganismus nötig. Mausmodelle stellen dabei aufgrund ihrer ähnlichen Physiologie ein etabliertes Modell dar. Vor allem die durch Braak beschriebene Progression der pathologischen ASYN-Ablagerungen vom ENS ins ZNS [16] (siehe Kapitel 1.2.2) durch neuronalen Transport bei intakter Blut-Hirn-Schranke ist auf andere Weise kaum nachbildbar (Siehe Abb. 5-3).

Bisherige Rotenon-Tiermodelle konnten die natürliche Progression der Erkrankung nur unzureichend darstellen. Durch die gängige, systemische Verabreichung von Rotenon werden der natürliche Kontakt von Toxinen mit ENS und OB beispielsweise durch Ingestion, Inhalation oder Hautkontakt und die mögliche Progression zwischen Nervenzellen durch axonalen Transport nicht imitiert [18]. Das Toxin breitet sich bei intraperitonealer oder intravenöser Gabe in hohen Konzentrationen über das Blut aus. Es führt zu einer systemischen Komplex-I-Inhibition, anstatt selektiv die synaptisch verbundenen, neuronalen Strukturen zu betreffen [18]. Versuche mit systemischer Rotenongabe konnten teilweise die histopathologischen Aspekte des MP wie eine Neurodegeneration in der SNpc oder die Bildung von Einschlusskörperchen nicht nachbilden [210]. Nach intragastraler Rotenongabe hingegen konnten sowohl die Progression über axonalen Transport, die Bildung von LB selektiv in den synaptisch verbundenen Regionen des Nervensystems, eine Neurodegeneration dopaminergener Neurone der SNpc sowie eine Motordysfunktion im Rotarod-Test nachgewiesen werden [18]. Dabei war keine systemische Rotenonwirkung in Form erhöhter Toxinspiegel im Blut oder einer generalisierten Komplex-1-Inhibition messbar [18]. Das verwendete Tiermodell erlaubt damit die bestmögliche Imitation der Pathophysiologie des MP [17].

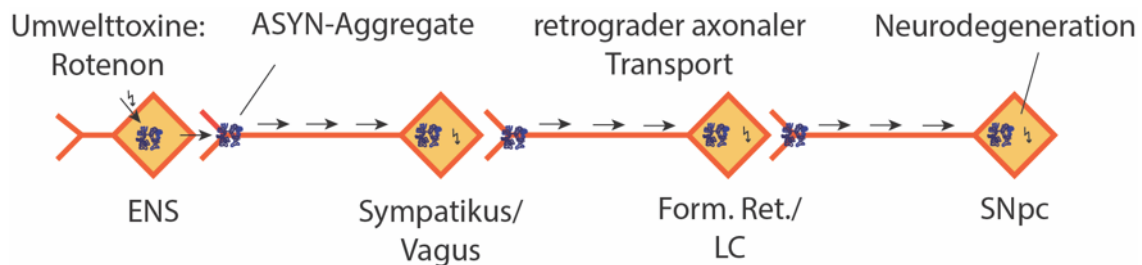


Abb. 5-3: Progression der ASYN-Pathologie vom ENS ins ZNS

Nach lokaler Toxinwirkung von Rotenon im ENS kommt es zur Aggregation pathologischer ASYN-Formen. Diese erreichen durch retrograden axonalen Transport über N.Vagus, Sympathikus und Hirnstamm (Form. Ret.: Formatio reticularis, LC Locus coeruleus) die SNpc, wo sie eine Neurodegeneration auslösen. (Eigene Darstellung in Anlehnung an Braak et al., 2003, S. 524 [10])

5.2.3 Neurodegeneration durch intragastrale Rotenonbehandlung in einjährigen WT-Mäusen

Die neurodegenerative Wirkung einer Rotenonbehandlung auf einjährige Wildtypmäuse konnte bereits erfolgreich in Vorversuchen [18] sowie zeitgleich zum Versuch dieser Arbeit in einer Kooperation mit Brünn (Abb. 5-4) [130] gezeigt werden. Unter Berücksichtigung des „3R“-Prinzips (siehe Kapitel 3.3.1) wurde deshalb auf eine Versuchswiederholung der Wildtyp-Kontrollgruppe im Alter von einem Jahr verzichtet.

Die Kollegen in Brünn behandelten zeitgleich zum vorliegenden Versuch einjährige Wildtypmäuse der identischen Mauslinie nach dem gleichen Rotenon-Protokoll. Aus dieser Versuchsreihe wurde von einem Kollegen meiner Arbeitsgruppe die Neurodegeneration von einjährigen Wildtypmäusen mit und ohne Rotenonbehandlung verglichen (Abb. 5-4) [130]. Analog zum Versuch dieser Arbeit wurden die TH⁺ Neuronen der SNpc quantifiziert. Es zeigte sich eine signifikant verringerte Anzahl dopaminerger Neurone in der Rotenongruppe gegenüber der Kontrollgruppe nach viermonatiger Behandlung (durchschnittlich 11214 Neuronen vs. 12166; $p = 0,020$ im T-Test für unverbundene Stichproben).

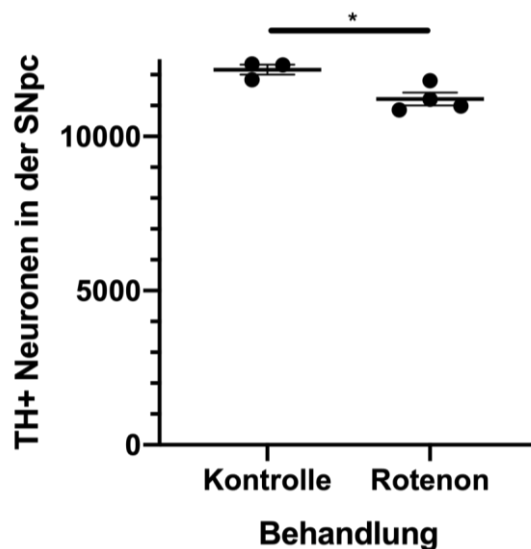


Abb. 5-4: Nachweis der Neurodegeneration bei intragastraler Rotenonbehandlung in einjährigen Wildtypmäusen durch Quantifizierung der TH⁺ Neuronen

Bestimmung der absoluten Neuronenzahl der SNpc (Gruppendurchschnitt ± SEM) nach immunhistochemischer Anti-TH-Färbung mittels StereoInvestigator Software nach 4-monatiger Behandlung von einjährigen Wildtypmäusen. Signifikant verminderte Neuronenzahl in der SNpc unter Rotenonbehandlung verglichen zur Kontrolle ($n = 4$ (Rotenon) bzw. $n = 3$ (Kontrolle); T-Test für unverbundene Stichproben, $p = 0,020$). (Daten zur Verfügung gestellt von Constantinos Hadjistyllis [130])

5.2.4 Kein Anhalt für Neurodegeneration in Wildtypmäusen im Alter von sechs Monaten nach intragastraler Rotenonbehandlung

Die sechsmonatige Wildtypgruppe dieser Arbeit wurde zusätzlich untersucht, da sie als Kontrollgruppe für weitere Versuche mit LRRK2- und PINK1-KO-Mäusen eingesetzt werden sollte. In einigen Studien konnte das PINK1-KO-Mausmodell im Vergleich zum Wildtyp per se mit einer schlechteren Motorfunktion im Alter in Verbindung gebracht werden [211]. Daher sollte die Pestizidwirkung bei den LRRK2- und PINK1-KO-Mäusen vor Auftreten dieses KO-abhängigen Phänotyps und damit im jüngeren Lebensalter von sechs Monaten getestet werden, um eine Veränderung des Phänotyps eindeutig als Folge der Pestizidwirkung betrachten zu können.

Da MP im höheren Lebensalter auftritt, boten die sechsmonatigen Wildtypmäuse die Möglichkeit, zusätzlich die Altersabhängigkeit der Rotenontoxizität zu untersuchen.

Bei den sechsmonatigen Tieren konnten keine charakteristischen, motorischen oder histopathologischen Merkmale des MP unter intragastraler Rotenongabe nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis könnte dafürsprechen, dass die Neurodegeneration unter Toxinexposition analog zum Auftreten des MP altersabhängig ist. Ursächlich wird beim MP eine zunehmende Zellschädigung durch oxidativen Stress im Laufe des Lebens propagiert [212]. Die Toxizität von Rotenon wird über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch eine Inhibition des Komplexes I der Atmungskette vermittelt [140]. Somit kann das Alter der Mäuse eine entscheidende Rolle für die Toxizität spielen.

Nachdem für diesen Versuch auf eine eigene Wildtypkontrollgruppe im Alter von einem Jahr verzichtet wurde und keine der verwendeten Gruppen Folgen einer intragastralen Rotenonbehandlung zeigte, müssen außerdem folgende Aspekte in Betracht gezogen werden:

a) Dosis und Dauer der Behandlung

Da keine der Gruppen auf die Rotenongabe angesprochen hat, muss auch die Möglichkeit einer fehlerhaften Rotenonbehandlung berücksichtigt werden. Unter anderem sind eine zu geringe Behandlungsdauer oder Toxindosis denkbar. Das verwendete Mausmodell mit intragastraler Verabreichung ist jedoch bereits seit längerem etabliert und wurde vielfach

erfolgreich eingesetzt [17, 18, 213, 214]. Dosis und Dauer der Behandlung wurden nach dem Protokoll von Pan-Montojo et al. gewählt [143]. In diesem zeigten die Mäuse sowohl klinisch als auch histopathologisch ein eindeutiges Ansprechen mit signifikanter Abnahme der TH⁺ Neuronen um 15,4 % nach dreimonatiger Behandlung bei identischer Zubereitung der Rotenonlösung [18]. In in-vitro-Versuchen sowie bei der Untersuchung weiterer genetischer Mausmodelle meiner Arbeitsgruppe mit Rotenon der identischen Charge war die Rotenonbehandlung erfolgreich. Dies macht eine fehlerhafte Rotenonwirkung als Ursache für das Ausbleiben der Toxinwirkung im vorliegenden Versuch eher unwahrscheinlich.

b) Stichprobenzahl

Das fehlende Ansprechen auf die Toxinwirkung könnte weiterhin auf die geringe Stichprobenzahl zurückzuführen sein. Nachdem jedoch unter Rotenonbehandlung keine abnehmende Tendenz in der motorischen Leistung geschweige denn ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen sichtbar war, erscheint diese Erklärung unwahrscheinlich. Alle Gruppen zeigten eine vergleichbare leichte Zunahme in der Rotarodleistung, sowie eine unauffällige neuronale Dichte in der SNpc.

5.2.5 Hypothesen zur Bedeutung von endogenem ASYN für die Pathogenese des MP

Wie eingangs beschrieben (siehe Kapitel 1.2.2), verläuft die Progression des MP nach Braak stadienhaft vom enterischen Nervensystem ins ZNS. Dabei scheint in der Peripherie eine Zellschädigung durch Umwelttoxine stattzufinden. Nachfolgend kommt es zur Progression von pathologischen ASYN-Aggregaten über synaptisch verbundene Nervenbahnen bis ins ZNS [10]. Für den zugrunde liegenden Mechanismus gibt es zwei verschiedene Theorien: Es werden ein Seeding-Effekt von ASYN vergleichbar mit Prionenerkrankungen [111, 112] sowie eine Schädigung der Mitochondrien [99, 108] diskutiert.

Für die Ergebnisse der ASYN-KO-Gruppen dieses Versuchs lassen sich einige Folgerungen ableiten:

Für alle ASYN-KO-Gruppen war weder die Entwicklung einer Motordysfunktion noch einer Neurodegeneration nachweisbar. Die intragastrale Rotenonbehandlung konnte unter Abwesenheit von endogenem ASYN keinerlei Aspekte des MP hervorrufen. Dies deutet darauf hin, dass entweder die Toxizität des Rotenons oder die Progression der Erkrankung von endogenem ASYN abhängig ist [3].

In In-vitro-Versuchen konnte sehr wohl eine toxische Wirkung von Rotenon auf dopaminerge Neurone nachgewiesen werden, und zwar in vergleichbarem Ausmaß bei Wildtyp- und ASYN-KO-Zellen (Abb. 5-5) [3]. Damit scheint die Toxizität von Rotenon selbst unabhängig von endogenem ASYN zu sein [3]. Für das ASYN-KO-Mausmodell der vorliegenden Arbeit erlaubt diese Beobachtung die Hypothese, dass die lokale, toxische Wirkung des Rotenons im ENS auf Zellebene sehr wohl ablaufen könnte, anschließend jedoch keine Progression der Pathologie in ZNS stattfindet [3].

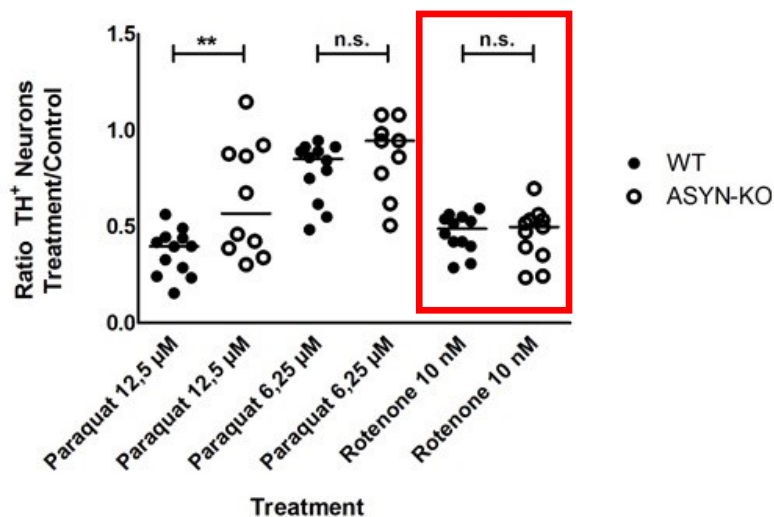


Abb. 5-5: Wirkung verschiedener Toxine auf dopaminerge Neurone (WT vs. ASYN-KO)

Vergleichbare Toxizität von Rotenon auf WT- und ASYN-KO-Neurone (siehe roter Kasten; T-Test für unverbundene Stichproben). Im Gegensatz dazu erhöhte Toxizität von Paraquat auf WT- im Vergleich zu ASYN-KO-Neuronen. (Modifiziert nach Dening et al., 2022, S.5, [3]: „Figure 3A“; lizenziert unter CC BY 4.0)

Interessanterweise wurde die Progression der ASYN-Pathologie vom Darm bis ins ZNS in ASYN-KO-Mäusen in einer weiteren Studie untersucht [129]. In dieser wurde die ASYN-Oligomerbildung jedoch nicht durch intragastrale Rotenongabe ausgelöst. Es erfolgte die direkte Injektion von toxischen ASYN-Fibrillen in die Muskelschicht von Duodenum und Pylorus. In Wildtypmäusen konnte die Progression der ASYN-Pathologie bis ins ZNS gezeigt werden, gefolgt von einer Neurodegeneration der SNpc und einer Motordysfunktion im Rotarodtest. ASYN-KO-Mäuse hingegen zeigten keine ASYN-Aggregate in PNS und ZNS, konsequenterweise blieben auch Neurodegeneration und Motordysfunktion aus. Identische Ergebnisse konnten auch durch eine Vagotomie bei Wildtypmäusen reproduziert werden [129]. Diese Beobachtungen unterstützen die Resultate der vorliegenden Arbeit und sind mit Braaks Postulaten vereinbar. Auch Kim et al. folgerte aus den Experimenten, dass endogenes ASYN Voraussetzung für die Progression der Pathologie vom ENS ins ZNS ist [129].

In den Zellkultur-Versuchen meiner Arbeitsgruppe konnte eine weitere, interessante Beobachtung gemacht werden [3]: Exogen zugeführte ASYN-Oligomere werden von den Neuriten der Nervenzellen aufgenommen und erreichen durch retrograden Transport das Zellsoma. Dort führen sie zur Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials und damit zu einer Beeinträchtigung der Mitochondrienfunktion. Dieser Effekt ist sowohl in Wildtyp- als auch in ASYN-KO-Zellen nachweisbar. Die exogenen ASYN-Oligomere zeigen eine vergleichbare Toxizität auf WT- und ASYN-KO-Zellen, womit die Toxizität der Oligomere auf die dopaminergen Neurone unabhängig von endogenem ASYN zu sein scheint [3].

Nimmt man all diese Beobachtungen zusammen, könnten der Mechanismus der ASYN-Toxizität bei MP und die Progression der Erkrankung folgendermaßen zusammenhängen (Abb. 5-6) [3]: Der direkte Kontakt des Organismus mit Umwelttoxinen (im Fall dieses Versuchs Rotenon) löst lokal im ENS oder Bulbus Olfactorius eine Schädigung auf zellulärer Ebene aus, wahrscheinlich in Form von oxidativem Stress und einer Schädigung der Mitochondrienfunktion. Da dieser Vorgang unabhängig von endogenem ASYN abläuft, lässt sich die vergleichbare Toxizität von Rotenon auf Wildtyp- und ASYN-KO-Zellen erklären (Abb. 5-5). Die toxinvermittelte, mitochondriale Dysfunktion bewirkt daraufhin eine Störung des ASYN-Gleichgewichts mit vermehrter Bildung toxischer ASYN-Oligomere und -Protofibrillen, die von der Zelle in den Extrazellulärraum abgegeben werden. Die ASYN-Aggregate können anschließend von

benachbarten Zellen durch Endozytose aufgenommen und retrograd bis zum Zellsoma transportiert werden. Dort bewirken die toxischen ASYN-Aggregate erneut eine Schädigung der Mitochondrien, was wiederum in einer Aggregation von endogenem ASYN resultiert. Ein Fehlen des endogenen ASYN, wie bei den ASYN-KO-Mäusen dieser Arbeit, kann die Progression der ASYN-Aggregate in höhere neuronale Strukturen unterbrechen. Dieser vorgestellte Mechanismus ermöglicht einen Teufelskreis aus ASYN-Aggregation und mitochondrialer Schädigung und impliziert einen Alternativmechanismus der ASYN-Toxizität zum „Seeding-Effekt“ [3].

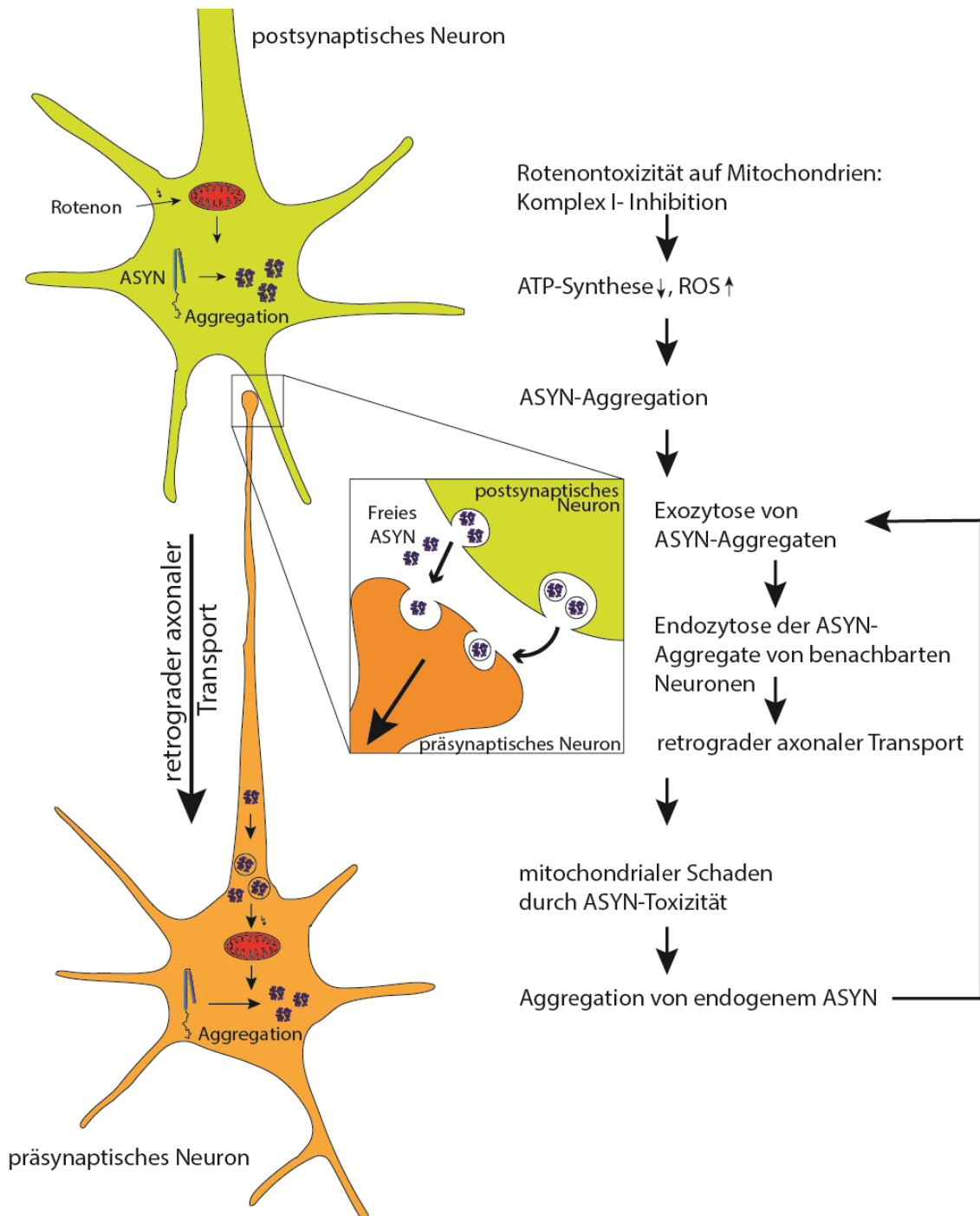


Abb. 5-6: Möglicher Mechanismus der Progression von ASYN

Ein Toxinkontakt führt lokal im ENS/OB zu oxidativem Stress und mitochondrialer Schädigung. Diese fördern die Bildung von toxischen ASYN-Formen, welche in den Extrazellulärraum abgegeben werden. Das freie ASYN wird von benachbarten Neuronen aufgenommen und gelangt durch retrograden axonalen Transport zum Soma. Dort kommt es erneut zur Mitochondrienschädigung und zur Aggregation von endogenem, nativem ASYN.

(Eigene Darstellung in Anlehnung an Pan-Montojo et al., 2014, S.8 [163], Huang et al., 2018, S.251 [215])

5.2.6 Weitere Untersuchungen zur Unterstützung dieser Theorie

Der beschriebene Mechanismus lässt sich sehr gut mit der Progression nach Braak [16] vereinbaren, welche im vorliegenden Mausmodell imitiert werden kann. Diese Progression konnte sowohl durch eine chirurgische Unterbrechung der Nervenbahnen durch Vagotomie oder Sympathektomie [17] als auch durch ein Fehlen von körpereigenen ASYN im Mausmodell dieser Arbeit unterbunden werden.

Es wurde gezeigt, dass sowohl die Weitergabe von ASYN-Aggregaten zwischen Zellen [114, 125] als auch die Freisetzung von ASYN aus Neuronen in den Extrazellulärraum [114, 126, 127] möglich sind. Freies extrazelluläres ASYN kann durch Endozytose in benachbarte Neuronen aufgenommen werden [114, 125].

Auch die Beobachtung, dass oxidativer Stress über die Oxidation von Eisen (Fe^{2+} zu Fe^{3+}) die Bildung von ASYN-Oligomeren verstärkt [104], ist mit dem oben beschriebenen Mechanismus vereinbar.

Mitochondrialer Schaden vs. Seeding-Effekt

Wie bereits in Kapitel 1.3.2 beschrieben, existieren zwei Theorien zur Toxizität von ASYN-Oligomeren und Protofibrillen: Mitochondrialer Schaden [3, 99, 108, 109] und Seeding-Effekt [111, 112, 113, 114].

Es gibt zahlreiche Hinweise auf eine essenzielle Rolle der Mitochondrien bei der Vermittlung der ASYN-Toxizität (siehe Kapitel 1.3.2). Dazu zählen die Assoziation von ASYN und Mitochondrienmembran [99, 108, 120], eine verminderte Komplex-I-Aktivität der Atmungskette [97, 99, 108, 122], eine Fragmentation der Mitochondrien [110], sowie eine veränderte mitochondriale Struktur und erhöhte ROS Produktion [109]. Luth et al. konnte eine Verminderung des mitochondrialen Membranpotentials, eine gestörte Kalziumhomöostase und eine erhöhte Cytochrom-C-Freisetzung ausgelöst durch ASYN nachweisen [97].

Gleichzeitig können eine mitochondriale Schädigung und oxidativer Stress eine ASYN-Aggregation in vitro und in vivo verstärken [101, 102, 103, 104].

Die Seeding-Theorie besagt hingegen, dass fehlgefaltete ASYN-Oligomere oder -Protofibrillen intrazellulär natives, lösliches ASYN rekrutieren und zur Aggregation

anregen. Diese „Seeds“ können dann zwischen den Neuronen weitergegeben werden [116]. Als Hinweis auf den Seeding-Effekt wurden dabei unter anderem folgende Beobachtungen gedeutet:

Die Gabe von in-vitro produzierten, exogenen ASYN-Aggregaten („Seeds“) führt zur Aggregation von intrazellulärem ASYN [93, 111, 112, 113, 114]. Auch die Bildung von ASYN-Aggregaten in primär gesunden, nigralen Neuronen nach deren Transplantation in die Gehirne von MP-Patienten [117, 118] wird häufig auf einen Seeding-Effekt des ASYN zurückgeführt.

Bei Zutreffen des „Seeding-Effekts“ würde man erwarten, dass ein Verlust des endogenen ASYN die Toxizität exogen zugeführter ASYN-Oligomere vermindern kann [3]. Die Toxizität von extrazellulärem ASYN zeigte sich jedoch unabhängig von endogenem ASYN. Sie wird durch direkte Interaktion der Oligomere mit den Mitochondrien vermittelt [3]. Lediglich die Progression der ASYN-Pathologie im Mausmodell ist von endogenem ASYN abhängig [3].

5.2.7 Gen-Umwelt-Interaktion von ASYN-KO mit weiteren Umwelttoxinen

Die Interaktion zwischen ASYN-KO-Zellen bzw. -Tiermodellen und weiteren Umwelttoxinen wurde teilweise untersucht. Da andere Toxine systemisch verabreicht werden und im Gegensatz zur intragastralen Rotenongabe die Progression über das Nervensystem nicht abbilden können, müssen hier andere Mechanismen bedacht werden.

ASYN-KO-Mäuse zeigten eine verminderte Sensitivität bis hin zur vollständigen Resistenz gegenüber der Toxizität von MPTP [85, 216, 217, 218, 219] sowie Malonat und 3-Nitropropionsäure, zwei Substanzen mit toxischer Wirkung auf die Mitochondrien [220]. Die Ursache für die Resistenz gegen MPTP ist nicht abschließend geklärt und wird teils auf die Pharmakokinetik von MPTP zurückgeführt. Die Aufnahme von MPTP in Neuronen erfolgt in Form von MPP^+ über den Dopamintransporter DAT [155]. Intrazellulär bewirkt es die Hemmung des Komplexes 1 der Atmungskette [147]. In ASYN-KO-Mäusen konnte teils eine verminderte Expression des DAT-Transporters nachgewiesen werden [86], sodass eine Hemmung der intrazellulären Aufnahme von MPTP diskutiert wird. Andere Versuche konnten jedoch eine verminderte Sensitivität von ASYN-KO-Mäusen auf die MPTP-Behandlung ohne begleitende Verminderung des DAT-Transporters nachweisen [216, 219].

Dopaminerge ASYN-KO-Zellen zeigten in meiner Versuchsgruppe ein besseres Überleben unter Paraquatbehandlung als die Wildtypkontrolle. Hier scheint endogenes ASYN die Toxizität zu erhöhen, wohingegen bei der Rotenonbehandlung kein Unterschied in der Zellkultur nachweisbar war (Abb. 5-5) [3].

5.2.8 Motordysfunktion bei den ASYN-KO-Mäusen

Ein auffälliges Ergebnis dieser Arbeit war der signifikante Unterschied der Laufleistung zwischen ASYN-KO-Mäusen und sechsmonatigen Wildtypmäusen unabhängig von der Rotenonbehandlung. Die KO-Mäuse zeigten schon vor Behandlungsbeginn eine um ca. 32 % schlechtere Laufleistung im Rotarod-Test als die Wildtyptiere. Dieser Unterschied blieb über den gesamten Zeitraum der Behandlung bestehen. Gleichzeitig wies die SNpc jedoch keinerlei Anzeichen eines Neuronenverlustes auf, womit eine Neurodegeneration als mögliche Ursache für die verminderte Motorfunktion unwahrscheinlich ist.

Da die Wildtypmäuse im Vergleich zu den einjährigen ASYN-KO-Mäusen nur sechs Monate alt waren, könnte der Altersunterschied für die verminderte Motorfunktion der ASYN-KO-Mäuse verantwortlich sein. In Wildtypmäusen konnte Richter et al. eine schlechtere Lauffunktion im Alter nachweisen: Einjährige Mäuse der Linie C57B1/6 zeigten eine signifikant schlechtere Leistung im Rotarod-Test verglichen mit Artgenossen im Alter von 2,5 bzw. 5 Monaten [210]. Das höhere Lebensalter der KO-Mäuse scheint auf den ersten Blick eine durchaus plausible Erklärung für die schlechtere Motorfunktion zu sein.

Um den Einfluss des Alters auf die Motorfunktion ausschalten zu können, wurden Rotarod-Daten von einjährigen Wildtypmäusen aus Vorversuchen von einem Kollegen mit den Ergebnissen der KO-Gruppen verglichen. Die einjährigen WT-Mäuse zeigten ebenfalls eine bessere Laufleistung als die ASYN-KO-Mäusen [3]. Demnach scheint die Ursache der Motordysfunktion im KO selbst und nicht im Lebensalter zu liegen.

Bisherige Studien konnten keine schwerwiegenden Veränderungen im Phänotyp von ASYN-KO-Mäusen nachweisen. Weder die Lebensspanne der Mäuse noch ihre Fertilität wurde durch den KO beeinträchtigt. Die Hirnarchitektur wies keine offensichtlichen Veränderungen auf [80, 216].

Hinsichtlich der Motoraktivität von ASYN-KO-Mäusen bzw. -Ratten konnte in den meisten Studien keine Veränderung nachgewiesen werden [78, 84, 85, 86]. Abeliovich et al. konnte lediglich eine verminderte motorische Aktivität unter Amphetamingabe beobachten [80]. Einige Studien berichten über geringgradige Verhaltensänderungen bei Mehrfach-KO mehrerer Mitglieder der Synucleinfamilie, unter anderem in Form eines hyperdopaminergen Phänotyps [83, 221]. Lediglich bei Triple-KO-Mäusen aller drei bekannten Synucleingene zeigte sich eine Verminderung der Rotarodleistung in einem Alter von vier Monaten [83].

Interessanterweise konnten in ASYN-KO-Neuronen meiner Arbeitsgruppe Veränderungen des Glucosestoffwechsels und der mitochondrialen Funktion mit verminderter Zellatmung nachgewiesen werden [3]. Die ASYN-KO-Zellen wiesen eine verminderte Glykolyse, eine verminderte Sauerstoffverbrauchsrate (oxygen consumption rate) und eine verminderte basale Atmungsrate (basal respiration rate) auf [3]. Die Veränderungen scheinen auf den Genotyp oder die Mauslinie zurückzuführen zu sein und könnten für den Unterschied im Rotarodtest zwischen WT- und ASYN-KO-Mäusen verantwortlich sein [3].

5.2.9 Bedeutung der Ergebnisse für therapeutische Ansätze des MP

Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen die Theorie, dass eine Unterdrückung oder Entfernung des ASYN die Progression der Erkrankung unterbinden könnte. Die Hemmung von Synthese, Funktion und Aggregation des ASYN stellt einen wichtigen therapeutischen Ansatz dar [222]. Es ist jedoch wichtig, die physiologische Funktion von ASYN zu verstehen, um die Folgen eines Mangels einschätzen zu können. Wie eingangs beschrieben (siehe Kapitel 1.3.2) spielt ASYN bei der SNARE-Komplexbildung und beim Vesikeltransport in der synaptischen Übertragung eine Rolle [79, 80].

Bisher konnte der Verlust von ASYN mit keinen offensichtlichen, gravierenden Folgen assoziiert werden (siehe Kapitel 5.2.8) [87]. Die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene Motordysfunktion sowie die gestörte, mitochondriale Funktion in ASYN-KO-Zellen, die in weiteren Experimenten meiner Arbeitsgruppe gezeigt wurde [3], könnten jedoch einen Hinweis auf potenzielle Einschränkungen durch einen ASYN-Mangel geben. Ein Therapieansatz besteht in der Hemmung der ASYN-Produktion, beispielsweise mittels RNAi [222]. Dieser Ansatz könnte sich als problematisch erweisen, falls eine verminderte

ASYN-Produktion mit einer Motordysfunktion und gestörten Mitochondrienfunktion einhergeht wie der ASYN-KO dieser Arbeit.

Es wird angenommen, dass die Toxizität von ASYN von den aggregierten Formen (Oligomere und Fibrillen) ausgeht (siehe Kapitel 1.3.2). Daher scheint es sinnvoller, nicht die gesamte ASYN-Bildung zu hemmen, sondern spezifisch die Entstehung pathologischer Formen zu unterbinden, um die physiologische Funktion des Proteins zu erhalten [222]. Dazu existieren verschiedene Ansätze: Es wird an Antikörpern gegen ASYN-Oligomere geforscht [223], andererseits könnten Antiaggregativa die Aggregation von ASYN verhindern [106, 222]. Bisherige klinische Therapiemöglichkeiten des MP sind rein symptomatisch. Sie erhöhen in erster Linie die Dopaminkonzentration im synaptischen Spalt und mildern so die motorischen Symptome [209]. Erste Studienergebnisse zu krankheitsmodifizierenden Therapien (Englisch: disease-modifying therapy), die tatsächlich die Progression der Erkrankung beeinflussen, zeigen zwar vielversprechende Ergebnisse im Tierversuch, befinden sich aber meist noch in der präklinischen Studienphase [222]. An dieser Stelle ist beispielsweise der Oligomermodulator Anle138b zu erwähnen. Er inhibiert die Oligomerbildung und Aggregation von ASYN in vitro und in vivo [106]. ASYN-Monomere werden hingegen nicht beeinträchtigt. Im Mausmodell konnte Anle138b eine Neurodegeneration und Motordysfunktion verhindern [106], sogar wenn die Behandlung nach Einsetzen der motorischen Symptome begonnen wurde [107]. Auch in der Therapie anderer neurodegenerativer Erkrankungen wie der Multisystematrophie bot der Oligomermodulator vielversprechende Ergebnisse [224]. Nachdem die Verabreichung von Anle138b in gesunden Patienten in einer Phase-1a-Studie bereits ein günstiges Nebenwirkungsprofil zeigen konnte, steht nun die Untersuchung an Patienten mit MP und weiteren Synukleinopathien an [225].

5.2.10 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass ein KO des endogenen ASYN der Progression einer ASYN-Pathologie entgegenwirkt. Damit scheint die Progression der Erkrankung über neuronal verbundene Strukturen von endogenem ASYN abhängig zu sein [3]. Das lenkt den Blick auf ASYN als potenzielles therapeutisches Ziel in der Behandlung des MP.

Die ASYN-Toxizität scheint durch Aggregation von pathologischen ASYN-Formen vermittelt zu werden [97, 98, 99] und nicht durch einen Funktionsverlust des physiologischen Proteins. Dieser Ansatz wird auch durch die vorliegenden Ergebnisse unterstützt, da ein ASYN-KO keine der bekannten Aspekte des MP auslösen konnte.

Plausibel scheint folgende Sequenz der Progression des MP (siehe Kapitel 5.2.5) [3]: Durch eine Störung des Gleichgewichts der verschiedenen ASYN-Spezies kommt es zu einer Konformationsänderung des ASYN mit verstärkter intrazellulärer Aggregation von Oligomeren. Die Aggregate könnten durch Neuron-zu-Neuron-Übertragung in benachbarte Neuronen aufgenommen werden. Dort führen sie durch eine Schädigung der Mitochondrien und oxidativen Stress zur erneuten Aggregation von endogenem ASYN. Die vorgestellte Sequenz impliziert einen Alternativmechanismus der ASYN-Toxizität zum „Seeding-Effekt“ in Form einer mitochondrialen Schädigung.

In den Versuchen dieser Arbeit zeigten einjährige ASYN-KO-Mäuse eine eingeschränkte Motorfunktion im Rotarodtest im Vergleich zu Wildtyp-Artgenossen [3]. Diese Motordysfunktion war unabhängig von der Rotenonbehandlung, da sie bereits vor der Toxingabe nachweisbar war und keine Progredienz über die Dauer der Behandlung zeigte. Sie erfolgte ohne begleitende Neurodegeneration der SNpc. Diese Beobachtung stellt eine Hemmung von endogenem ASYN als Therapieansatz in Frage. Vielversprechender scheint der Einsatz von Antikörpern oder Antiaggregativa, die die Aggregation pathologischer Proteinformen wie Oligomere und Fibrillen hemmen und nicht die physiologische Funktion des Proteins stören [222].

Die Untersuchung der Rotenontoxizität bei jüngeren Wildtypmäusen im Alter von sechs Monaten ergab außerdem eine Altersabhängigkeit des Toxineffekts. Nur bei Wildtypmäusen im Alter von einem Jahr konnte Rotenon eine Neurodegeneration und Motordysfunktion auslösen [130]. Diese Beobachtung ist gut vereinbar mit der zunehmenden Inzidenz von MP im höheren Lebensalter.

Weitere Versuche meiner Arbeitsgruppe zur Gen-Umwelt-Interaktion in der Ätiologie des MP untersuchen aktuell den Einfluss weiterer genetischer Mutationen auf die Wirkung verschiedener Toxine, unter anderem die Toxizität von Paraquat auf DJ-1-KO-Mäuse sowie von Rotenon auf PINK1-KO- und LRRK2-KO-Mäuse.

5.3 Bedeutung der Gen-Umwelt-Interaktion für die Versuche dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Auseinandersetzung mit genetischen und Umweltfaktoren und deren Interaktion in der Pathogenese des Morbus Parkinson. Genetische Mutationen und Umwelttoxine führen über die gleichen Mechanismen zu einer Störung der zellulären Homöostase und letztlich zum Zelluntergang. Zu diesen Mechanismen zählen unter anderem eine Dysfunktion der Mitochondrien und eng damit assoziiert oxidativer Stress [11]:

- Die Moleküle Glykolsäure und D-Laktat können vor der toxischen Wirkung des Pestizids Paraquat schützen. Dabei wurde die Bedeutung der beiden Substanzen für die Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials zum Schutz vor oxidativem Stress deutlich [4] (Siehe Kapitel 5.1.5).
- Auch die Toxizität der eingesetzten Toxine Paraquat und Rotenon beruht auf einer mitochondrialen Schädigung und oxidativem Stress (Siehe Kapitel 1.4.3, 1.4.4)
- Die Progression der Alpha-Synuclein-Pathologie ist von endogenem Alpha-Synuclein abhängig und scheint über eine mitochondriale Schädigung vermittelt zu werden (Siehe Kapitel 5.2.5).

Die Erforschung der Interaktion zwischen genetischer Suszeptibilität und Umweltfaktoren eröffnet zudem die Möglichkeit der Entwicklung neuer Therapieansätze:

Glykolsäure und D-Laktat, die durch die Untersuchung der genetischen Parkinsonform DJ-1 in den Fokus geraten sind, könnten potenziell in der Therapie des Morbus Parkinson in Frage kommen (Siehe Kapitel 5.1.8). Einen weiteren Ansatzpunkt in der Therapie stellt die Hemmung der Alpha-Synuclein-Oligomerbildung oder -Aggregation dar. Sie könnte eine Progression der Erkrankung verhindern [222] (Siehe Kapitel 5.2.9).

Mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress sind damit als zentraler Aspekt der Gen-Umwelt-Interaktion zu werten – sowohl im Verständnis der Pathophysiologie und Progression der Erkrankung als auch als potenzieller therapeutischer Ansatz.

Literaturverzeichnis

1. Chovsepian A, Berchtold D, Winek K, Mamrak U, Ramírez Álvarez I, Dening Y, Golubczyk D, Weitbrecht L, Dames C, Aillery M, Fernandez-Sanz C, Gajewski Z, Dieterich M, Janowski M, Falkai P, Walczak P, Plesnila N, Meisel A, Pan-Montojo F. *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), 2022. 9(4): p. e2103265.
2. Diez V, Traikov S, Schmeisser K, Adhikari AKD, Kurzchalia TV. *Glycolate combats massive oxidative stress by restoring redox potential in Caenorhabditis elegans*. Commun Biol, 2021. 4(1): p. 151.
3. Dening Y, Straßl T, Ruf V, Dirscherl P, Chovsepian A, Stievenard A, Khairnar A, Schmidt F, Giesert F, Herms J, Levin J, Dieterich M, Falkai P, Weisenhorn DV, Wurst W, Giese A, Pan-Montojo F. *Toxicity of extracellular alpha-synuclein is independent of intracellular alpha-synuclein*. Scientific reports, 2022. 12(1): p. 21951.
4. Toyoda Y, Erkut C, Pan-Montojo F, Boland S, Stewart MP, Muller DJ, Wurst W, Hyman AA, Kurzchalia TV. *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): pp. 777-84.
5. Rodriguez-Oroz MC, Jahanshahi M, Krack P, Litvan I, Macias R, Bezard E, Obeso JA. *Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms*. Lancet Neurol, 2009. 8(12): pp. 1128-39.
6. Gowers SWR. *A manual of diseases of the nervous system* [Internet]. 1886. Stand 01/2010; Zugriff 11/2022. URL: https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Sir_William_Richard_Gowers_Parkinson_Disease_sketch_1886.jpg.
7. Dauer W, Przedborski S. *Parkinson's disease: mechanisms and models*. Neuron, 2003. 39(6): pp. 889-909.
8. Halliday G, Lees A, Stern M. *Milestones in Parkinson's disease--clinical and pathologic features*. Mov Disord, 2011. 26(6): pp. 1015-21.
9. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. *Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis*. Mol Aspects Med, 2009. 30(1-2): pp. 1-12.
10. Braak H, Rüb U, Gai WP, Del Tredici K. *Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen*. J Neural Transm (Vienna), 2003. 110(5): pp. 517-36.
11. Fleming SM. *Mechanisms of gene-environment interactions in Parkinson's disease*. Curr Environ Health Rep, 2017. 4(2): pp. 192-9.
12. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten

- JC, Brice A, Meo G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P. *Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism*. Science (New York, NY), 2003. 299(5604): pp. 256-9.
13. Lee J-y, Song J, Kwon K, Jang S, Kim C, Baek K, Kim J, Park C. *Human DJ-1 and its homologs are novel glyoxalases*. Human Molecular Genetics, 2012. 21(14): pp. 3215-25.
 14. McCormack AL, Atienza JG, Johnston LC, Andersen JK, Vu S, Di Monte DA. *Role of oxidative stress in paraquat-induced dopaminergic cell degeneration*. Journal of neurochemistry, 2005. 93(4): pp. 1030-7.
 15. Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Del Tredici K. *Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology*. Cell Tissue Res, 2004. 318(1): pp. 121-34.
 16. Braak H, Tredici KD, Rüb U, de Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E. *Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease*. Neurobiology of Aging, 2003. 24(2): pp. 197-211.
 17. Pan-Montojo F, Schwarz M, Winkler C, Arnhold M, O'Sullivan GA, Pal A, Said J, Marsico G, Verbavatz JM, Rodrigo-Angulo M, Gille G, Funk RH, Reichmann H. *Environmental toxins trigger PD-like progression via increased alpha-synuclein release from enteric neurons in mice*. Scientific reports, 2012. 2(898): pp. 1-12.
 18. Pan-Montojo F, Anichtchik O, Dening Y, Knels L, Pursche S, Jung R, Jackson S, Gille G, Spillantini MG, Reichmann H, Funk RH. *Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice*. PloS one, 2010. 5(1): p. e8762.
 19. Parkinson J. *An essay on the shaking palsy. 1817*. The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences, 2002. 14(2): pp. 223-36; discussion 2.
 20. Nussbaum RL, Ellis CE. *Alzheimer's disease and Parkinson's disease*. New England Journal of Medicine, 2003. 348(14): pp. 1356-64.
 21. Berg D. *Krankheiten der Basalganglien*. In: Hacke W (Hrsg). Neurologie. Springer-Lehrbuch. Auflage 16. Springer, Berlin, Heidelberg. 2016. pp. 589-623.
 22. Grosset D, Fernandez H, Grosset K, Okun M. *Parkinson's disease: Clinician's desk reference*. Auflage 1. CRC Press, London. 2009. pp. 9-23.
 23. Shulman LM, Taback RL, Bean J, Weiner WJ. *Comorbidity of the nonmotor symptoms of Parkinson's disease*. Mov Disord, 2001. 16(3): pp. 507-10.
 24. Ross GW, Abbott RD, Petrovitch H, Tanner CM, White LR. *Pre-motor features of Parkinson's disease: the Honolulu-Asia Aging Study experience*. Parkinsonism Relat Disord, 2012. 18 Suppl 1: pp. S199-202.
 25. Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. *Alpha-synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and*

- dementia with lewy bodies*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. 95(11): pp. 6469-73.
26. Braak H, Rüb U, Sandmann-Keil D, Gai WP, de Vos RA, Jansen Steur EN, Arai K, Braak E. *Parkinson's disease: affection of brain stem nuclei controlling premotor and motor neurons of the somatomotor system*. Acta Neuropathol, 2000. 99(5): pp. 489-95.
 27. Braak H, de Vos RAI, Bohl J, Del Tredici K. *Gastric α -synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology*. Neuroscience Letters, 2006. 396(1): pp. 67-72.
 28. Rüb U, Del Tredici K, Schultz C, Ghebremedhin E, de Vos RAI, Jansen Steur E, Braak H. *Parkinson's disease: the thalamic components of the limbic loop are severely impaired by α -synuclein immunopositive inclusion body pathology*. Neurobiology of Aging, 2002. 23(2): pp. 245-54.
 29. Fazl A, Fleisher J. *Anatomy, physiology, and clinical syndromes of the basal ganglia: A brief review*. Semin Pediatr Neurol, 2018. 25: pp. 2-9.
 30. Fearnley JM, Lees AJ. *Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity*. Brain, 1991. 114 (Pt 5): pp. 2283-301.
 31. Haehner A, Hummel T, Hummel C, Sommer U, Junghanns S, Reichmann H. *Olfactory loss may be a first sign of idiopathic Parkinson's disease*. Movement Disorders, 2007. 22(6): pp. 839-42.
 32. Abbott RD, Petrovitch H, White LR, Masaki KH, Tanner CM, Curb JD, Grandinetti A, Blanchette PL, Popper JS, Ross GW. *Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease*. Neurology, 2001. 57(3): pp. 456-62.
 33. Liddle RA. *Parkinson's disease from the gut*. Brain Res, 2018. 1693(Pt B): pp. 201-6.
 34. Halliday GM, McCann H. *The progression of pathology in Parkinson's disease*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2010. 1184(1): pp. 188-95.
 35. Lesage S, Brice A. *Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors*. Hum Mol Genet, 2009. 18(R1): pp. R48-59.
 36. Corti O, Lesage S, Brice A. *What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease*. Physiological reviews, 2011. 91(4): pp. 1161-218.
 37. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. *Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease*. Science (New York, NY), 1997. 276(5321): pp. 2045-7.

38. Dolgacheva LP, Berezhnov AV, Fedotova EI, Zinchenko VP, Abramov AY. *Role of DJ-1 in the mechanism of pathogenesis of Parkinson's disease*. J Bioenerg Biomembr, 2019. 51(3): pp. 175-88.
39. Kim CY, Alcalay RN. *Genetic forms of Parkinson's disease*. Semin Neurol, 2017. 37(2): pp. 135-46.
40. Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Eppelen JT, Schols L, Riess O. *Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease*. Nat Genet, 1998. 18(2): pp. 106-8.
41. Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atarés B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Muñoz DG, de Yebenes JG. *The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia*. Ann Neurol, 2004. 55(2): pp. 164-73.
42. Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, Waucquier N, Defebvre L, Amouyel P, Farrer M, Destee A. *Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease*. Lancet, 2004. 364(9440): pp. 1167-9.
43. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muentner M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K. *Alpha-synuclein locus triplication causes Parkinson's disease*. Science (New York, NY), 2003. 302(5646): p. 841.
44. Aleyasin H, Rousseaux MWC, Phillips M, Kim RH, Bland RJ, Callaghan S, Slack RS, During MJ, Mak TW, Park DS. *The Parkinson's disease gene DJ-1 is also a key regulator of stroke-induced damage*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. 104(47): p. 18748.
45. Kasten M, Klein C. *The many faces of alpha-synuclein mutations*. Mov Disord, 2013. 28(6): pp. 697-701.
46. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. *Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism*. Nature, 1998. 392: pp. 605-8.
47. Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T. *Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase*. Nat Genet, 2000. 25(3): pp. 302-5.
48. Zhang Y, Gao J, Chung KK, Huang H, Dawson VL, Dawson TM. *Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. 97(24): pp. 13354-9.
49. Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Frosch MP, Trockenbacher A, Schneider R, Mizuno Y, Kosik KS, Selkoe DJ. *Ubiquitination of a new form of*

- alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease.* Science (New York, NY), 2001. 293(5528): pp. 263-9.
50. Nuytemans K, Theuns J, Cruts M, Van Broeckhoven C. *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): pp. 763-80.
 51. Jeon BS, Kim J-M, Lee D-S, Hattori N, Mizuno Y. *An apparently sporadic case with parkin gene mutation in a Korean woman.* Archives of Neurology, 2001. 58(6): pp. 988-9.
 52. Ishikawa A, Tsuji S. *Clinical analysis of 17 patients in 12 Japanese families with autosomal-recessive type juvenile parkinsonism.* Neurology, 1996. 47(1): pp. 160-6.
 53. Doherty KM, Silveira-Moriyama L, Parkkinen L, Healy DG, Farrell M, Mencacci NE, Ahmed Z, Brett FM, Hardy J, Quinn N, Counihan TJ, Lynch T, Fox ZV, Revesz T, Lees AJ, Holton JL. *Parkin disease: a clinicopathologic entity?* JAMA Neurol, 2013. 70(5): pp. 571-9.
 54. Bonifati V, Rohé CF, Breedveld GJ, Fabrizio E, De Mari M, Tassorelli C, Tavella A, Marconi R, Nicholl DJ, Chien HF, Fincati E, Abbruzzese G, Marini P, De Gaetano A, Horstink MW, Maat-Kievit JA, Sampaio C, Antonini A, Stocchi F, Montagna P, Toni V, Guidi M, Dalla Libera A, Tinazzi M, De Pandis F, Fabbrini G, Goldwurm S, de Klein A, Barbosa E, Lopiano L, Martignoni E, Lamberti P, Vanacore N, Meco G, Oostra BA. *Early-onset parkinsonism associated with PINK1 mutations: frequency, genotypes, and phenotypes.* Neurology, 2005. 65(1): pp. 87-95.
 55. Geisler S, Holmström KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ, Springer W. *PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1.* Nat Cell Biol, 2010. 12(2): pp. 119-31.
 56. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, González-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW. *Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1.* Science (New York, NY), 2004. 304(5674): pp. 1158-60.
 57. Nagakubo D, Taira T, Kitaura H, Ikeda M, Tamai K, Iguchi-Arigo SM, Ariga H. *DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras.* Biochemical and biophysical research communications, 1997. 231(2): pp. 509-13.
 58. Dekker M, Bonifati V, van Swieten J, Leenders N, Galjaard RJ, Snijders P, Horstink M, Heutink P, Oostra B, van Duijn C. *Clinical features and neuroimaging of PARK7-linked parkinsonism.* Mov Disord, 2003. 18(7): pp. 751-7.

59. Abou-Sleiman PM, Healy DG, Quinn N, Lees AJ, Wood NW. *The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease*. *Ann Neurol*, 2003. 54(3): pp. 283-6.
60. Sironi F, Primignani P, Ricca S, Tunesi S, Zini M, Tesei S, Cilia R, Pezzoli G, Seia M, Goldwurm S. *DJ1 analysis in a large cohort of Italian early onset Parkinson Disease patients*. *Neurosci Lett*, 2013. 557 Pt B(Pb): pp. 165-70.
61. Zhang L, Shimoji M, Thomas B, Moore DJ, Yu SW, Marupudi NI, Torp R, Torgner IA, Ottersen OP, Dawson TM, Dawson VL. *Mitochondrial localization of the Parkinson's disease related protein DJ-1: implications for pathogenesis*. *Hum Mol Genet*, 2005. 14(14): pp. 2063-73.
62. Junn E, Jang WH, Zhao X, Jeong BS, Mouradian MM. *Mitochondrial localization of DJ-1 leads to enhanced neuroprotection*. *J Neurosci Res*, 2009. 87(1): pp. 123-9.
63. Yanagida T, Tsushima J, Kitamura Y, Yanagisawa D, Takata K, Shibaie T, Yamamoto A, Taniguchi T, Yasui H, Taira T, Morikawa S, Inubushi T, Tooyama I, Ariga H. *Oxidative stress induction of DJ-1 protein in reactive astrocytes scavenges free radicals and reduces cell injury*. *Oxid Med Cell Longev*, 2009. 2(1): pp. 36-42.
64. Taira T, Saito Y, Niki T, Iguchi-Ariga SM, Takahashi K, Ariga H. *DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death*. *EMBO Rep*, 2004. 5(2): pp. 213-8.
65. Canet-Avilés RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S, Baptista MJ, Ringe D, Petsko GA, Cookson MR. *The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. 101(24): pp. 9103-8.
66. Kinumi T, Kimata J, Taira T, Ariga H, Niki E. *Cysteine-106 of DJ-1 is the most sensitive cysteine residue to hydrogen peroxide-mediated oxidation in vivo in human umbilical vein endothelial cells*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2004. 317(3): pp. 722-8.
67. Meulener MC, Xu K, Thomson L, Ischiropoulos H, Bonini NM. *Mutational analysis of DJ-1 in Drosophila implicates functional inactivation by oxidative damage and aging*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006. 103(33): pp. 12517-22.
68. Zhou W, Zhu M, Wilson MA, Petsko GA, Fink AL. *The oxidation state of DJ-1 regulates its chaperone activity toward alpha-synuclein*. *J Mol Biol*, 2006. 356(4): pp. 1036-48.
69. Blackinton J, Lakshminarasimhan M, Thomas KJ, Ahmad R, Greggio E, Raza AS, Cookson MR, Wilson MA. *Formation of a stabilized cysteine sulfinic acid is critical for the mitochondrial function of the parkinsonism protein DJ-1*. *The Journal of biological chemistry*, 2009. 284(10): pp. 6476-85.

70. Kim SJ, Park YJ, Hwang IY, Youdim MB, Park KS, Oh YJ. *Nuclear translocation of DJ-1 during oxidative stress-induced neuronal cell death*. *Free Radic Biol Med*, 2012. 53(4): pp. 936-50.
71. Cookson MR. *Parkinsonism due to mutations in PINK1, Parkin, and DJ-1 and oxidative stress and mitochondrial pathways*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2012. 2(9): p. a009415.
72. Thomas KJ, McCoy MK, Blackinton J, Beilina A, van der Brug M, Sandebring A, Miller D, Maric D, Cedazo-Minguez A, Cookson MR. *DJ-1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway to control mitochondrial function and autophagy*. *Hum Mol Genet*, 2011. 20(1): pp. 40-50.
73. Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS, Bonifati V, Durr A, Bressman S, Brice A, Aasly J, Zabetian CP, Goldwurm S, Ferreira JJ, Tolosa E, Kay DM, Klein C, Williams DR, Marras C, Lang AE, Wszolek ZK, Berciano J, Schapira AH, Lynch T, Bhatia KP, Gasser T, Lees AJ, Wood NW. *Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study*. *Lancet Neurol*, 2008. 7(7): pp. 583-90.
74. Aasly JO, Toft M, Fernandez-Mata I, Kachergus J, Hulihan M, White LR, Farrer M. *Clinical features of LRRK2-associated Parkinson's disease in central Norway*. *Ann Neurol*, 2005. 57(5): pp. 762-5.
75. Mortiboys H, Johansen KK, Aasly JO, Bandmann O. *Mitochondrial impairment in patients with Parkinson disease with the G2019S mutation in LRRK2*. *Neurology*, 2010. 75(22): pp. 2017-20.
76. Kalia LV, Lang AE, Hazrati L-N, Fujioka S, Wszolek ZK, Dickson DW, Ross OA, Van Deerlin VM, Trojanowski JQ, Hurtig HI, Alcalay RN, Marder KS, Clark LN, Gaig C, Tolosa E, Ruiz-Martínez J, Marti-Masso JF, Ferrer I, López de Munain A, Goldman SM, Schüle B, Langston JW, Aasly JO, Giordana MT, Bonifati V, Puschmann A, Canesi M, Pezzoli G, Maues De Paula A, Hasegawa K, Duyckaerts C, Brice A, Stoessl AJ, Marras C. *Clinical correlations with Lewy body pathology in LRRK2-related Parkinson disease*. *JAMA Neurol*, 2015. 72(1): pp. 100-5.
77. Pouloupoulos M, Cortes E, Vonsattel JP, Fahn S, Waters C, Cote LJ, Moskowitz C, Honig LS, Clark LN, Marder KS, Alcalay RN. *Clinical and pathological characteristics of LRRK2 G2019S patients with PD*. *J Mol Neurosci*, 2012. 47(1): pp. 139-43.
78. Cabin DE, Shimazu K, Murphy D, Cole NB, Gottschalk W, McIlwain KL, Orrison B, Chen A, Ellis CE, Paylor R, Lu B, Nussbaum RL. *Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2002. 22(20): pp. 8797-807.
79. Diao J, Burre J, Vivona S, Cipriano DJ, Sharma M, Kyoung M, Sudhof TC, Brunger AT. *Native alpha-synuclein induces clustering of synaptic-vesicle mimics via binding to phospholipids and synaptobrevin-2/VAMP2*. *Elife*, 2013. 2: p. e00592.

80. Abeliovich A, Schmitz Y, Fariñas I, Choi-Lundberg D, Ho W-H, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JMG, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, Sulzer D, Rosenthal A. *Mice lacking α -synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system*. *Neuron*, 2000. 25(1): pp. 239-52.
81. Burre J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Sudhof TC. *Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro*. *Science*, 2010. 329(5999): pp. 1663-7.
82. Högen T, Levin J, Schmidt F, Caruana M, Vassallo N, Kretschmar H, Bötzel K, Kamp F, Giese A. *Two different binding modes of α -synuclein to lipid vesicles depending on its aggregation state*. *Biophys J*, 2012. 102(7): pp. 1646-55.
83. Anwar S, Peters O, Millership S, Ninkina N, Doig N, Connor-Robson N, Threlfell S, Kooner G, Deacon RM, Bannerman DM, Bolam JP, Chandra SS, Cragg SJ, Wade-Martins R, Buchman VL. *Functional alterations to the nigrostriatal system in mice lacking all three members of the synuclein family*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2011. 31(20): pp. 7264-74.
84. Zharikov AD, Cannon JR, Tapias V, Bai Q, Horowitz MP, Shah V, El Ayadi A, Hastings TG, Greenamyre JT, Burton EA. *shRNA targeting alpha-synuclein prevents neurodegeneration in a Parkinson's disease model*. *J Clin Invest*, 2015. 125(7): pp. 2721-35.
85. Robertson DC, Schmidt O, Ninkina N, Jones PA, Sharkey J, Buchman VL. *Developmental loss and resistance to MPTP toxicity of dopaminergic neurones in substantia nigra pars compacta of gamma-synuclein, alpha-synuclein and double alpha/gamma-synuclein null mutant mice*. *Journal of neurochemistry*, 2004. 89(5): pp. 1126-36.
86. Al-Wandi A, Ninkina N, Millership S, Williamson SJ, Jones PA, Buchman VL. *Absence of alpha-synuclein affects dopamine metabolism and synaptic markers in the striatum of aging mice*. *Neurobiol Aging*, 2010. 31(5): pp. 796-804.
87. Sulzer D, Edwards RH. *The physiological role of alpha-synuclein and its relationship to Parkinson's disease*. *Journal of neurochemistry*, 2019. 150(5): pp. 475-86.
88. Thiruchelvam MJ, Powers JM, Cory-Slechta DA, Richfield EK. *Risk factors for dopaminergic neuron loss in human alpha-synuclein transgenic mice*. *Eur J Neurosci*, 2004. 19(4): pp. 845-54.
89. Matsuoka Y, Vila M, Lincoln S, McCormack A, Picciano M, LaFrancois J, Yu X, Dickson D, Langston WJ, McGowan E, Farrer M, Hardy J, Duff K, Przedborski S, Di Monte DA. *Lack of nigral pathology in transgenic mice expressing human alpha-synuclein driven by the tyrosine hydroxylase promoter*. *Neurobiology of disease*, 2001. 8(3): pp. 535-9.
90. Fauvet B, Mbefo MK, Fares MB, Desobry C, Michael S, Ardah MT, Tsika E, Coune P, Prudent M, Lion N, Eliezer D, Moore DJ, Schneider B, Aebischer P, El-Agnaf OM, Masliah E, Lashuel HA. *alpha-Synuclein in central nervous system*

- and from erythrocytes, mammalian cells, and Escherichia coli exists predominantly as disordered monomer.* The Journal of biological chemistry, 2012. 287(19): pp. 15345-64.
91. Eliezer D, Kutluay E, Bussell R, Jr., Browne G. *Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states.* J Mol Biol, 2001. 307(4): pp. 1061-73.
 92. Bartels T, Ahlstrom LS, Leftin A, Kamp F, Haass C, Brown MF, Beyer K. *The N-terminus of the intrinsically disordered protein alpha-synuclein triggers membrane binding and helix folding.* Biophys J, 2010. 99(7): pp. 2116-24.
 93. Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Williamson RE, Lansbury PT, Jr. *Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(2): pp. 571-6.
 94. Narhi L, Wood SJ, Steavenson S, Jiang Y, Wu GM, Anafi D, Kaufman SA, Martin F, Sitney K, Denis P, Louis JC, Wypych J, Biere AL, Citron M. *Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation.* The Journal of biological chemistry, 1999. 274(14): pp. 9843-6.
 95. Conway KA, Harper JD, Lansbury PT. *Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease.* Nat Med, 1998. 4(11): pp. 1318-20.
 96. Conway KA, Harper JD, Lansbury PT, Jr. *Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid.* Biochemistry, 2000. 39(10): pp. 2552-63.
 97. Luth ES, Stavrovskaya IG, Bartels T, Kristal BS, Selkoe DJ. *Soluble, prefibrillar alpha-synuclein oligomers promote complex I-dependent, Ca²⁺-induced mitochondrial dysfunction.* The Journal of biological chemistry, 2014. 289(31): pp. 21490-507.
 98. Winner B, Jappelli R, Maji SK, Desplats PA, Boyer L, Aigner S, Hetzer C, Loher T, Vilar M, Campioni S, Tzitzilonis C, Soragni A, Jessberger S, Mira H, Consiglio A, Pham E, Masliah E, Gage FH, Riek R. *In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. 108(10): pp. 4194-9.
 99. Ludtmann MHR, Angelova PR, Horrocks MH, Choi ML, Rodrigues M, Baev AY, Berezhnov AV, Yao Z, Little D, Banushi B, Al-Menhali AS, Ranasinghe RT, Whiten DR, Yapom R, Dolt KS, Devine MJ, Gissen P, Kunath T, Jaganjac M, Pavlov EV, Klenerman D, Abramov AY, Gandhi S. *alpha-synuclein oligomers interact with ATP synthase and open the permeability transition pore in Parkinson's disease.* Nat Commun, 2018. 9(1).
 100. Hashimoto M, Hsu LJ, Sisk A, Xia Y, Takeda A, Sundsmo M, Masliah E. *Human recombinant NACP/alpha-synuclein is aggregated and fibrillated in vitro: relevance for Lewy body disease.* Brain research, 1998. 799(2): pp. 301-6.

101. Souza JM, Giasson BI, Chen Q, Lee VM, Ischiropoulos H. *Dityrosine cross-linking promotes formation of stable alpha -synuclein polymers. Implication of nitrative and oxidative stress in the pathogenesis of neurodegenerative synucleinopathies.* The Journal of biological chemistry, 2000. 275(24): pp. 18344-9.
102. Esteves AR, Arduino DM, Swerdlow RH, Oliveira CR, Cardoso SM. *Oxidative stress involvement in alpha-synuclein oligomerization in Parkinson's disease cybrids.* Antioxid Redox Signal, 2009. 11(3): pp. 439-48.
103. Scudamore O, Ciossek T. *Increased oxidative stress exacerbates alpha-synuclein aggregation in vivo.* Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 2018. 77(6): pp. 443-53.
104. Levin J, Högen T, Hillmer AS, Bader B, Schmidt F, Kamp F, Kretschmar HA, Bötzel K, Giese A. *Generation of ferric iron links oxidative stress to alpha-synuclein oligomer formation.* Journal of Parkinson's disease, 2011. 1(2): pp. 205-16.
105. Kostka M, Högen T, Danzer KM, Levin J, Habeck M, Wirth A, Wagner R, Glabe CG, Finger S, Heinzlmann U, Garidel P, Duan W, Ross CA, Kretschmar H, Giese A. *Single particle characterization of iron-induced pore-forming alpha-synuclein oligomers.* The Journal of biological chemistry, 2008. 283(16): pp. 10992-1003.
106. Wagner J, Ryazanov S, Leonov A, Levin J, Shi S, Schmidt F, Prix C, Pan-Montojo F, Bertsch U, Mitteregger-Kretschmar G, Geissen M, Eiden M, Leidel F, Hirschberger T, Deeg AA, Krauth JJ, Zinth W, Tavan P, Pilger J, Zweckstetter M, Frank T, Bähr M, Weishaupt JH, Uhr M, Urlaub H, Teichmann U, Samwer M, Bötzel K, Groschup M, Kretschmar H, Griesinger C, Giese A. *Anle138b: a novel oligomer modulator for disease-modifying therapy of neurodegenerative diseases such as prion and Parkinson's disease.* Acta Neuropathol, 2013. 125(6): pp. 795-813.
107. Levin J, Schmidt F, Boehm C, Prix C, Bötzel K, Ryazanov S, Leonov A, Griesinger C, Giese A. *The oligomer modulator anle138b inhibits disease progression in a Parkinson mouse model even with treatment started after disease onset.* Acta Neuropathol, 2014. 127(5): pp. 779-80.
108. Devi L, Raghavendran V, Prabhu BM, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK. *Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain.* The Journal of biological chemistry, 2008. 283(14): pp. 9089-100.
109. Hsu LJ, Sagara Y, Arroyo A, Rockenstein E, Sisk A, Mallory M, Wong J, Takenouchi T, Hashimoto M, Masliah E. *alpha-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress.* Am J Pathol, 2000. 157(2): pp. 401-10.
110. Kamp F, Exner N, Lutz AK, Wender N, Hegermann J, Brunner B, Nuscher B, Bartels T, Giese A, Beyer K, Eimer S, Winklhofer KF, Haass C. *Inhibition of mitochondrial fusion by alpha-synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1.* Embo j, 2010. 29(20): pp. 3571-89.

111. Danzer KM, Haasen D, Karow AR, Moussaud S, Habeck M, Giese A, Kretschmar H, Hengerer B, Kostka M. *Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2007. 27(34): pp. 9220-32.
112. Danzer KM, Krebs SK, Wolff M, Birk G, Hengerer B. *Seeding induced by alpha-synuclein oligomers provides evidence for spreading of alpha-synuclein pathology*. Journal of neurochemistry, 2009. 111(1): pp. 192-203.
113. Wood SJ, Wypych J, Steavenson S, Louis JC, Citron M, Biere AL. *Alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease*. The Journal of biological chemistry, 1999. 274(28): pp. 19509-12.
114. Hansen C, Angot E, Bergstrom AL, Steiner JA, Pieri L, Paul G, Outeiro TF, Melki R, Kallunki P, Fog K, Li JY, Brundin P. *alpha-Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells*. J Clin Invest, 2011. 121(2): pp. 715-25.
115. Karpowicz RJ, Jr., Trojanowski JQ, Lee VM. *Transmission of alpha-synuclein seeds in neurodegenerative disease: recent developments*. Lab Invest, 2019. 99(7): pp. 971-81.
116. Volpicelli-Daley L, Brundin P. *Prion-like propagation of pathology in Parkinson disease*. Handb Clin Neurol, 2018. 153: pp. 321-35.
117. Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Freeman TB, Olanow CW. *Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease*. Nat Med, 2008. 14(5): pp. 504-6.
118. Li JY, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ, Lashley T, Quinn NP, Rehncrona S, Bjorklund A, Widner H, Revesz T, Lindvall O, Brundin P. *Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation*. Nat Med, 2008. 14(5): pp. 501-3.
119. Recasens A, Dehay B, Bove J, Carballo-Carbajal I, Dovero S, Perez-Villalba A, Fernagut PO, Blesa J, Parent A, Perier C, Farinas I, Obeso JA, Bezard E, Vila M. *Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger alpha-synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys*. Ann Neurol, 2014. 75(3): pp. 351-62.
120. Parihar MS, Parihar A, Fujita M, Hashimoto M, Ghafourifar P. *Mitochondrial association of alpha-synuclein causes oxidative stress*. Cell Mol Life Sci, 2008. 65(7-8): pp. 1272-84.
121. Ghio S, Kamp F, Cauchi R, Giese A, Vassallo N. *Interaction of alpha-synuclein with biomembranes in Parkinson's disease--role of cardiolipin*. Prog Lipid Res, 2016. 61: pp. 73-82.
122. Chinta SJ, Mallajosyula JK, Rane A, Andersen JK. *Mitochondrial alpha-synuclein accumulation impairs complex I function in dopaminergic neurons and results in increased mitophagy in vivo*. Neurosci Lett, 2010. 486(3): pp. 235-9.

123. Schmidt F, Levin J, Kamp F, Kretzschmar H, Giese A, Bötzel K. *Single-channel electrophysiology reveals a distinct and uniform pore complex formed by α -synuclein oligomers in lipid membranes*. PloS one, 2012. 7(8): p. e42545.
124. Srinivasan B. *Mitochondrial permeability transition pore: an enigmatic gatekeeper*. New Horizons in Science & Technology (NHS&T), 2012. 1: pp. 47-51.
125. Desplats P, Lee H-J, Bae E-J, Patrick C, Rockenstein E, Crews L, Spencer B, Masliah E, Lee S-J. *Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of α -synuclein*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. 106(31): pp. 13010-5.
126. Lee HJ, Patel S, Lee SJ. *Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2005. 25(25): pp. 6016-24.
127. El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, Cooper LJ, Fullwood NJ, Gibson MJ, Curran MD, Court JA, Mann DM, Ikeda S, Cookson MR, Hardy J, Allsop D. *Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma*. Faseb j, 2003. 17(13): pp. 1945-7.
128. Challis C, Hori A, Sampson T, Yoo B, Challis R, Hamilton A, Mazmanian S, Volpicelli-Daley L, Gradinaru V. *Gut-seeded α -synuclein fibrils promote gut dysfunction and brain pathology specifically in aged mice*. Nature Neuroscience, 2020. 23: pp. 1-10.
129. Kim S, Kwon SH, Kam TI, Panicker N, Karuppagounder SS, Lee S, Lee JH, Kim WR, Kook M, Foss CA, Shen C, Lee H, Kulkarni S, Pasricha PJ, Lee G, Pomper MG, Dawson VL, Dawson TM, Ko HS. *Transneuronal propagation of pathologic α -synuclein from the gut to the brain models Parkinson's disease*. Neuron, 2019. 103(4): pp. 627-41.
130. Khairnar A, Ruda-Kucerova J, Arab A, Hadjistryllis C, Sejnoha Minsterova A, Shang Q, Chovsepian A, Drazanova E, Szabó N, Starcuk Z, Jr., Rektorova I, Pan-Montojo F. *Diffusion kurtosis imaging detects the time-dependent progress of pathological changes in the oral rotenone mouse model of Parkinson's disease*. Journal of neurochemistry, 2021. 158(3): pp. 779-97.
131. Gourie-Devi M, Ramu MG, Venkataram BS. *Treatment of Parkinson's disease in 'Ayurveda' (ancient Indian system of medicine): discussion paper*. J R Soc Med, 1991. 84(8): pp. 491-2.
132. Zhang ZX, Dong ZH, Román GC. *Early descriptions of Parkinson disease in ancient China*. Arch Neurol, 2006. 63(5): pp. 782-4.
133. Richardson JR, Fitsanakis V, Westerink RHS, Kanthasamy AG. *Neurotoxicity of pesticides*. Acta Neuropathol, 2019. 138(3): pp. 343-62.
134. Barbeau A, Roy M, Bernier G, Campanella G, Paris S. *Ecogenetics of Parkinson's disease: prevalence and environmental aspects in rural areas*. Can J Neurol Sci, 1987. 14(1): pp. 36-41.

135. Costello S, Cockburn M, Bronstein J, Zhang X, Ritz B. *Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California*. Am J Epidemiol, 2009. 169(8): pp. 919-26.
136. Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Richardson RJ. *The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living*. Neurology, 1998. 50(5): pp. 1346-50.
137. Caudle WM, Guillot TS, Lazo CR, Miller GW. *Industrial toxicants and Parkinson's disease*. Neurotoxicology, 2012. 33(2): pp. 178-88.
138. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. *Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis*. Science (New York, NY), 1983. 219(4587): pp. 979-80.
139. Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, Marras C, Bhudhikanok GS, Kasten M, Chade AR, Comyns K, Richards MB, Meng C, Priestley B, Fernandez HH, Cambi F, Umbach DM, Blair A, Sandler DP, Langston JW. *Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease*. Environmental health perspectives, 2011. 119(6): pp. 866-72.
140. Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, Miller GW, Yagi T, Matsuno-Yagi A, Greenamyre JT. *Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2003. 23(34): pp. 10756-64.
141. Schapira AHV. *Complex I: Inhibitors, inhibition and neurodegeneration*. Experimental neurology, 2010. 224(2): pp. 331-5.
142. Bromilow RH. *Paraquat and sustainable agriculture*. Pest Manag Sci, 2004. 60(4): pp. 340-9.
143. Pan-Montojo FJ, Funk RHW. *Oral administration of rotenone using a gavage and image analysis of alpha-synuclein inclusions in the enteric nervous system*. Journal of Visualized Experiments : JoVE, 2010. (44): p. e2123.
144. Bové J, Perier C. *Neurotoxin-based models of Parkinson's disease*. Neuroscience, 2012. 211: pp. 51-76.
145. Beal MF. *Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases*. Ann Neurol, 1995. 38(3): pp. 357-66.
146. Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. *Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease*. Journal of neurochemistry, 1990. 54(3): pp. 823-7.
147. Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE. *Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine*. Life sciences, 1985. 36(26): pp. 2503-8.
148. Lotharius J, Brundin P. *Pathogenesis of parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein*. Nature Reviews Neuroscience, 2002. 3(12): pp. 932-42.

149. Jenner P. *Oxidative stress in Parkinson's disease*. *Annals of Neurology*, 2003. 53(S3): pp. 26-38.
150. Segura-Aguilar J, Paris I, Muñoz P, Ferrari E, Zecca L, Zucca FA. *Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease*. *Journal of neurochemistry*, 2014. 129(6): pp. 898-915.
151. Sofic E, Lange KW, Jellinger K, Riederer P. *Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease*. *Neurosci Lett*, 1992. 142(2): pp. 128-30.
152. Hanna J, Guerra-Moreno A, Ang J, Micoogullari Y. *Protein degradation and the pathologic basis of disease*. *Am J Pathol*, 2019. 189(1): pp. 94-103.
153. Ebrahimi-Fakhari D, Cantuti-Castelvetri I, Fan Z, Rockenstein E, Masliah E, Hyman BT, McLean PJ, Unni VK. *Distinct roles in vivo for the ubiquitin-proteasome system and the autophagy-lysosomal pathway in the degradation of α -synuclein*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2011. 31(41): pp. 14508-20.
154. Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M-F, Benabid A-L, Sadoul R, Verna J-M. *Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease*. *Progress in Neurobiology*, 2001. 65(2): pp. 135-72.
155. Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH. *Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1985. 82(7): pp. 2173-7.
156. Schober A. *Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP*. *Cell Tissue Res*, 2004. 318(1): pp. 215-24.
157. Shimoji M, Zhang L, Mandir AS, Dawson VL, Dawson TM. *Absence of inclusion body formation in the MPTP mouse model of Parkinson's disease*. *Brain Res Mol Brain Res*, 2005. 134(1): pp. 103-8.
158. McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory-Slechta DA, Di Monte DA. *Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat*. *Neurobiology of disease*, 2002. 10(2): pp. 119-27.
159. Manning-Bog AB, McCormack AL, Li J, Uversky VN, Fink AL, Di Monte DA. *The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein*. *The Journal of biological chemistry*, 2002. 277(3): pp. 1641-4.
160. Shimizu K, Ohtaki K, Matsubara K, Aoyama K, Uezono T, Saito O, Suno M, Ogawa K, Hayase N, Kimura K, Shiono H. *Carrier-mediated processes in blood - brain barrier penetration and neural uptake of paraquat*. *Brain research*, 2001. 906(1-2): pp. 135-42.

161. Rappold PM, Cui M, Chesser AS, Tibbett J, Grima JC, Duan L, Sen N, Javitch JA, Tieu K. *Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. 108(51): pp. 20766-71.
162. Bonnef-Barkay D, Reaney SH, Langston WJ, Di Monte DA. *Redox cycling of the herbicide paraquat in microglial cultures*. Brain Res Mol Brain Res, 2005. 134(1): pp. 52-6.
163. Pan-Montojo F, Reichmann H. *Considerations on the role of environmental toxins in idiopathic Parkinson's disease pathophysiology*. Translational neurodegeneration, 2014. 3.
164. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. *Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease*. Nature neuroscience, 2000. 3(12): pp. 1301-6.
165. Alam M, Mayerhofer A, Schmidt WJ. *The neurobehavioral changes induced by bilateral rotenone lesion in medial forebrain bundle of rats are reversed by L-DOPA*. Behav Brain Res, 2004. 151(1-2): pp. 117-24.
166. Cannon JR, Tapias V, Na HM, Honick AS, Drolet RE, Greenamyre JT. *A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease*. Neurobiology of disease, 2009. 34(2): pp. 279-90.
167. Fleming SM, Zhu C, Fernagut PO, Mehta A, DiCarlo CD, Seaman RL, Chesselet MF. *Behavioral and immunohistochemical effects of chronic intravenous and subcutaneous infusions of varying doses of rotenone*. Experimental neurology, 2004. 187(2): pp. 418-29.
168. Irrcher I, Aleyasin H, Seifert EL, Hewitt SJ, Chhabra S, Phillips M, Lutz AK, Rousseaux MWC, Bevilacqua L, Jahani-Asl A, Callaghan S, MacLaurin JG, Winklhofer KF, Rizzu P, Rippstein P, Kim RH, Chen CX, Fon EA, Slack RS, Harper ME, McBride HM, Mak TW, Park DS. *Loss of the Parkinson's disease-linked gene DJ-1 perturbs mitochondrial dynamics*. Human Molecular Genetics, 2010. 19(19): pp. 3734-46.
169. Giaime E, Yamaguchi H, Gautier CA, Kitada T, Shen J. *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.
170. Racker E. *The mechanism of action of glyoxalase* Journal of Biological Chemistry, 1951. 190(2): pp. 685-96.
171. Misra K, Banerjee AB, Ray S, Ray M. *Glyoxalase III from Escherichia coli: a single novel enzyme for the conversion of methylglyoxal into D-lactate without reduced glutathione*. Biochem J, 1995. 305 (Pt 3): pp. 999-1003.
172. Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS. *Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose*. Biochem J, 1999. 344(Pt 1): pp. 109-16.

173. Vitek MP, Bhattacharya K, Glendening JM, Stopa E, Vlassara H, Bucala R, Manogue K, Cerami A. *Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. 91(11): pp. 4766-70.
174. Vicente Miranda H, El-Agnaf OMA, Outeiro TF. *Glycation in Parkinson's disease and Alzheimer's disease*. Movement Disorders, 2016. 31(6): pp. 782-90.
175. Blesa J, Przedborski S. *Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability*. Front Neuroanat, 2014. 8: p. 155.
176. Jiao Y, Lu L, Williams RW, Smeyne RJ. *Genetic dissection of strain dependent paraquat-induced neurodegeneration in the substantia nigra pars compacta*. PloS one, 2012. 7(1): p. e29447.
177. Flecknell P. *Replacement, reduction and refinement*. Altex, 2002. 19(2): pp. 73-8.
178. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. *An introduction to performing immunofluorescence staining*. Methods Mol Biol, 2019. 1897: pp. 299-311.
179. West MJ. *Design based stereological methods for estimating the total number of objects in histological material*. Folia morphologica, 2001. 60(1): pp. 11-9.
180. West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ. *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): pp. 482-97.
181. Slomianka L. *Basic quantitative morphological methods applied to the central nervous system*. Journal of Comparative Neurology, 2021. 529(4): pp. 694-756.
182. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. *Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67*. J Immunol, 1984. 133(4): pp. 1710-5.
183. Monville C, Torres EM, Dunnett SB. *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): pp. 219-23.
184. Richarme G, Mihoub M, Dairou J, Bui LC, Leger T, Lamouri A. *Parkinsonism-associated protein DJ-1/Park7 is a major protein deglycase that repairs methylglyoxal- and glyoxal-glycated cysteine, arginine, and lysine residues*. Journal of Biological Chemistry, 2015. 290(3): pp. 1885-97.
185. Turrens JF. *Mitochondrial formation of reactive oxygen species*. J Physiol, 2003. 552(Pt 2): pp. 335-44.
186. Gandhi S, Abramov AY. *Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration*. Oxidative medicine and cellular longevity, 2012. 2012: pp. 428010-.
187. Wang X, Petrie TG, Liu Y, Liu J, Fujioka H, Zhu X. *Parkinson's disease-associated DJ-1 mutations impair mitochondrial dynamics and cause mitochondrial dysfunction*. Journal of neurochemistry, 2012. 121(5): pp. 830-9.

188. Kim RH, Smith PD, Aleyasin H, Hayley S, Mount MP, Pownall S, Wakeham A, You-Ten AJ, Kalia SK, Horne P, Westaway D, Lozano AM, Anisman H, Park DS, Mak TW. *Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. 102(14): pp. 5215-20.
189. Zhou W, Freed CR. *DJ-1 up-regulates glutathione synthesis during oxidative stress and inhibits A53T alpha-synuclein toxicity*. The Journal of biological chemistry, 2005. 280(52): pp. 43150-8.
190. Fu Y, Paxinos G, Watson C, Halliday GM. *The substantia nigra and ventral tegmental dopaminergic neurons from development to degeneration*. J Chem Neuroanat, 2016. 76(Pt B): pp. 98-107.
191. Pissadaki EK, Bolam JP. *The energy cost of action potential propagation in dopamine neurons: clues to susceptibility in Parkinson's disease*. Front Comput Neurosci, 2013. 7: pp. 1-17.
192. Pacelli C, Giguère N, Bourque MJ, Lévesque M, Slack RS, Trudeau L. *Elevated mitochondrial bioenergetics and axonal arborization size are key contributors to the vulnerability of dopamine neurons*. Curr Biol, 2015. 25(18): pp. 2349-60.
193. Choi DW. *Excitotoxicity: Still Hammering the Ischemic Brain in 2020*. Frontiers in neuroscience, 2020. 14: pp. 579953-.
194. Ren H, Fu K, Wang D, Mu C, Wang G. *Oxidized DJ-1 interacts with the mitochondrial protein BCL-XL*. The Journal of biological chemistry, 2011. 286(40): pp. 35308-17.
195. Clements CM, McNally RS, Conti BJ, Mak TW, Ting JPY. *DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. 103(41): pp. 15091-6.
196. Shinbo Y, Taira T, Niki T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. *DJ-1 restores p53 transcription activity inhibited by Topors/p53BP3*. Int J Oncol, 2005. 26(3): pp. 641-8.
197. Nishinaga H, Takahashi-Niki K, Taira T, Andreadis A, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. *Expression profiles of genes in DJ-1-knockdown and L 166 P DJ-1 mutant cells*. Neurosci Lett, 2005. 390(1): pp. 54-9.
198. Wang Z, Liu J, Chen S, Wang Y, Cao L, Zhang Y, Kang W, Li H, Gui Y, Chen S, Ding J. *DJ-1 modulates the expression of Cu/Zn-superoxide dismutase-1 through the Erk1/2-Elk1 pathway in neuroprotection*. Ann Neurol, 2011. 70(4): pp. 591-9.
199. Kim RH, Peters M, Jang Y, Shi W, Pintilie M, Fletcher GC, DeLuca C, Liepa J, Zhou L, Snow B, Binari RC, Manoukian AS, Bray MR, Liu FF, Tsao MS, Mak TW. *DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN*. Cancer Cell, 2005. 7(3): pp. 263-73.

200. Shendelman S, Jonason A, Martinat C, Leete T, Abeliovich A. *DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation*. PLoS Biol, 2004. 2(11): p. e362.
201. Choi J, Sullards MC, Olzmann JA, Rees HD, Weintraub ST, Bostwick DE, Gearing M, Levey AI, Chin LS, Li L. *Oxidative damage of DJ-1 is linked to sporadic Parkinson and Alzheimer diseases*. The Journal of biological chemistry, 2006. 281(16): pp. 10816-24.
202. Yanagisawa D, Kitamura Y, Inden M, Takata K, Taniguchi T, Morikawa S, Morita M, Inubushi T, Tooyama I, Taira T, Iguchi-Arigo S, Akaike A, Ariga H. *DJ-1 protects against neurodegeneration caused by focal cerebral ischemia and reperfusion in rats*. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2008. 28: pp. 563-78.
203. Dongworth RK, Mukherjee UA, Hall AR, Astin R, Ong SB, Yao Z, Dyson A, Szabadkai G, Davidson SM, Yellon DM, Hausenloy DJ. *DJ-1 protects against cell death following acute cardiac ischemia-reperfusion injury*. Cell Death Dis, 2014. 5: p. e1082.
204. Jain D, Weber G, Eberhard D, Mehana AE, Eglinger J, Welters A, Bartosinska B, Jeruschke K, Weiss J, P ath G, Ariga H, Seufert J, Lammert E. *DJ-1 protects pancreatic beta cells from cytokine- and streptozotocin-mediated cell death*. PloS one, 2015. 10(9): p. e0138535.
205. Lev N, Ickowicz D, Barhum Y, Melamed E, Offen D. *DJ-1 changes in G93A-SOD1 transgenic mice: Implications for oxidative stress in ALS*. Journal of Molecular Neuroscience, 2009. 38(2): pp. 94-102.
206. Lev N, Barhum Y, Lotan I, Steiner I, Offen D. *DJ-1 knockout augments disease severity and shortens survival in a mouse model of ALS*. PloS one, 2015. 10(3): p. e0117190.
207. Cao J, Lou S, Ying M, Yang B. *DJ-1 as a human oncogene and potential therapeutic target*. Biochemical Pharmacology, 2015. 93(3): pp. 241-50.
208. Dunn AR, O'Connell KMS, Kaczorowski CC. *Gene-by-environment interactions in Alzheimer's disease and Parkinson's disease*. Neurosci Biobehav Rev, 2019. 103: pp. 73-80.
209. Levin J, N ubling G, Giese A, Janzen A, Oertel W. *[Neuroprotective treatment of idiopathic, genetic and atypical Parkinson's disease with alpha-synuclein-Pathology]*. Nervenarzt, 2021. 92(12): pp. 1249-59.
210. Richter F, Hamann M, Richter A. *Chronic rotenone treatment induces behavioral effects but no pathological signs of parkinsonism in mice*. J Neurosci Res, 2007. 85(3): pp. 681-91.
211. Kelm-Nelson CA, Brauer AFL, Barth KJ, Lake JM, Sinnen MLK, Stehula FJ, Muslu C, Marongiu R, Kaplitt MG, Ciucci MR. *Characterization of early-onset*

- motor deficits in the Pink1^{-/-} mouse model of Parkinson disease.* Brain research, 2018. 1680: pp. 1-12.
212. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. *Mitochondria, oxidants, and aging.* Cell, 2005. 120(4): pp. 483-95.
 213. Martinez EM, Young AL, Patankar YR, Berwin BL, Wang L, von Herrmann KM, Weier JM, Havrda MC. *Editor's highlight: Nlrp3 is required for inflammatory changes and nigral cell loss resulting from chronic intragastric rotenone exposure in mice.* Toxicol Sci, 2017. 159(1): pp. 64-75.
 214. Jia F, Song N, Zhao C, Xie J, Jiang H. *Unexpected improvements of spatial learning and memory abilities in chronic rotenone intoxicated mice.* PloS one, 2014. 9(3): p. e91641.
 215. Huang A, Zhang X, Li R, Chi Y. *Memristor Neural Network Design.* 2018.
 216. Dauer W, Kholodilov N, Vila M, Trillat AC, Goodchild R, Larsen KE, Staal R, Tieu K, Schmitz Y, Yuan CA, Rocha M, Jackson-Lewis V, Hersch S, Sulzer D, Przedborski S, Burke R, Hen R. *Resistance of alpha -synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(22): pp. 14524-9.
 217. Drolet RE, Behrouz B, Lookingland KJ, Goudreau JL. *Mice lacking alpha-synuclein have an attenuated loss of striatal dopamine following prolonged chronic MPTP administration.* Neurotoxicology, 2004. 25(5): pp. 761-9.
 218. Thomas B, Mandir AS, West N, Liu Y, Andrabi SA, Stirling W, Dawson VL, Dawson TM, Lee MK. *Resistance to MPTP-neurotoxicity in alpha-synuclein knockout mice is complemented by human alpha-synuclein and associated with increased beta-synuclein and Akt activation.* PloS one, 2011. 6(1): p. e16706.
 219. Schluter OM, Fornai F, Alessandri MG, Takamori S, Geppert M, Jahn R, Sudhof TC. *Role of alpha-synuclein in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in mice.* Neuroscience, 2003. 118(4): pp. 985-1002.
 220. Klivenyi P, Siwek D, Gardian G, Yang L, Starkov A, Cleren C, Ferrante R, Kowall N, Abeliovich A, Beal M. *Mice lacking alpha-synuclein are resistant to mitochondrial toxins.* Neurobiology of disease, 2006. 21: pp. 541-8.
 221. Senior SL, Ninkina N, Deacon R, Bannerman D, Buchman VL, Cragg SJ, Wade-Martins R. *Increased striatal dopamine release and hyperdopaminergic-like behaviour in mice lacking both alpha-synuclein and gamma-synuclein.* Eur J Neurosci, 2008. 27(4): pp. 947-57.
 222. Brundin P, Dave KD, Kordower JH. *Therapeutic approaches to target alpha-synuclein pathology.* Experimental neurology, 2017. 298(Pt B): pp. 225-35.
 223. Du XY, Xie XX, Liu RT. *The Role of α -Synuclein Oligomers in Parkinson's Disease.* Int J Mol Sci, 2020. 21(22).
 224. Heras-Garvin A, Weckbecker D, Ryazanov S, Leonov A, Griesinger C, Giese A, Wenning GK, Stefanova N. *Anle138b modulates α -synuclein oligomerization and*

prevents motor decline and neurodegeneration in a mouse model of multiple system atrophy. *Mov Disord*, 2019. 34(2): pp. 255-63.

225. Levin J, Sing N, Melbourne S, Morgan A, Mariner C, Spillantini MG, Wegrzynowicz M, Dalley JW, Langer S, Ryazanov S, Leonov A, Griesinger C, Schmidt F, Weckbecker D, Prager K, Matthias T, Giese A. *Safety, tolerability and pharmacokinetics of the oligomer modulator anle138b with exposure levels sufficient for therapeutic efficacy in a murine Parkinson model: A randomised, double-blind, placebo-controlled phase 1a trial*. *EBioMedicine*, 2022. 80: p. 104021.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die mich auf dem steinigen Weg dieser Doktorarbeit unterstützt und begleitet haben.

Meinem Betreuer PD Dr. med. Francisco Pan-Montojo danke ich für die Überlassung des Themas und die Betreuung über viele Jahre; meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Johannes Levin für die Betreuung und Korrektur dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Labors, insbesondere Yanina Dening, für die nette Zusammenarbeit und wertvolle Unterstützung.

Ein großes Dankeschön geht außerdem an alle Mitarbeiter der Tierhaltung des ZNP für die Hilfe bei Tierhaltung, Perfusion und Rotarod-Test.

Meiner gesamten Familie und meinem Freundeskreis möchte ich für die langjährige Unterstützung, Aufmunterung, Geduld und Ratschläge danken. Ohne Euch wäre diese Arbeit niemals zustande gekommen.

Eidesstattliche Versicherung

Straßl, Theresa

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

Gen-Umwelt-Interaktion bei Morbus Parkinson: Untersuchung des neuroprotektiven Effekts von Glykolsäure und D-Laktat sowie der Rolle des endogenen Alpha-Synucleins

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 27.11.24

Ort, Datum

Theresa Straßl

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Publikationen zur Dissertation

Straßl T, Levin J, Ramirez-Alvarez I, Dieterich M, Giese A, Pan-Montojo F.

Glycolic acid and D-lactate protect against paraquat toxicity in mice.

37. Jahrestagung der Australasian Neuroscience Society (ANS), Sydney 03. – 06.12.2017

Dening Y, Straßl T, Ruf V, Levin J, Herms J, Dieterich M, Giese A, Pan-Montojo F.

Oral rotenone treatment does not induce Parkinson's Disease pathology progression in the absence of alpha-synuclein in mice.

37. Jahrestagung der Australasian Neuroscience Society (ANS), Sydney 03. – 06.12.2017

Dening Y, **Straßl T**, Ruf V, Dirscherl P, Chovsepian A, Stievenard A, et al.

Toxicity of extracellular alpha-synuclein is independent of intracellular alpha-synuclein.

Scientific reports, 2022. 12(1): p. 21951.

doi: 10.1038/s41598-022-25790-2