

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

**Untersuchung der Gen-Umwelt-Interaktion bei der Entstehung der
Parkinson-Krankheit: Besteht eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber
Rotenon bei Tieren mit Parkinson-assoziierten Mutationen
(PTEN-induzierte Kinase 1 und Leucine-Rich Repeat Kinase 2) im
Vergleich zu Wildtyp?**

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

vorgelegt von
Magdalena Fischer

aus
Eggenfelden

Jahr
2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichtersteller: Prof. Dr. Johannes Levin
Mitberichtersteller: PD Dr. Annika Eißner
PD Dr. Eduard Kraft

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

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.2025

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Parkinson-Syndrom.....	1
1.1.1 Allgemeines und Epidemiologie.....	1
1.1.2 Ätiologie & Pathogenese	1
1.1.2.1 Überblick	1
1.1.2.2 Genetische Faktoren mit Fokus auf LRRK2 und PINK1	4
1.1.2.3 Umweltfaktoren mit Fokus auf Rotenon	8
1.1.3 Klinische Symptome und Diagnostik	11
1.1.4 Therapeutische Optionen	12
1.2 Aktueller Stand zu Gen-Umwelt-Interaktion bei Parkinson-Syndromen.....	14
1.3 Fragestellung und Zielsetzung	15
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Material, Geräte, Chemikalien und Programme	17
2.2 Tiermodell.....	18
2.2.1 Tierhaltung	18
2.2.2 Versuchsgruppen	19
2.2.3 Rotenon-Behandlung	19
2.2.4 Rotarod-Test	20
2.2.5 Entnahme und Aufbereitung der Gehirne	20
2.3 Immunhistochemie.....	21
2.3.1 Immunfluoreszenzfärbung	21
2.3.2 Fluoreszenzmikroskopie und Stereologie	23
2.4 Statistische Analyse.....	24
3 Ergebnisse.....	25
3.1 Ergebnisse der Immunhistochemie.....	25
3.1.1 Wildtyp	25
3.1.2 LRRK2	25
3.1.3 PINK1.....	26
3.2 Ergebnisse des Rotarod-Versuchs	29
3.2.1 Wildtyp	29
3.2.2 LRRK2	30
3.2.3 PINK1.....	32

4 Diskussion	37
4.1 Immunhistochemie.....	37
4.1.1 Orale Rotenon-Gabe führt zu Neurodegeneration in der SNc.....	37
4.1.2 LRRK2-Mutation führt zu erhöhter Sensibilität gegenüber Rotenon-Exposition.....	37
4.1.3 Keine Gen-Umwelt-Interaktion zwischen PINK1-KO und Rotenon	38
4.2 Rotarod-Versuch.....	39
4.2.1 Orale Rotenon-Gabe führt zu motorischen Parkinson-Symptomen.....	39
4.2.2 Bei PINK1-KO führt Rotenon-Exposition nicht zu motorischen Symptomen	39
4.2.3 Klinische und pathologische Parkinson-Merkmale stimmen nicht immer überein	40
4.3 Schwachpunkte	40
4.4 Konklusion	41
4.4.1 Gen-Umwelt-Interaktion zwischen LRRK2-Mutation und Rotenon wahrscheinlich.....	41
4.4.2 Gen-Umwelt-Interaktion zwischen PINK1-KO und Rotenon durch ähnlichen Pathomechanismus unwahrscheinlich.....	41
4.4.3 Zunehmende Bedeutung der Prävention bei der Parkinson-Krankheit.....	42
4.5 Zusammenfassung	42
Literaturverzeichnis	45
Anhang.....	53
Anhang A: Rohdaten Histologie.....	53
Anhang B: Rohdaten Rotarod.....	55
Danksagung.....	69
Affidavit.....	71

Abkürzungsverzeichnis

DLK	Lewy-Body-Demenz
LRRK2	Leucine-Rich Repeat Kinase 2
MPP+	1-Methyl-4-phenylpyridinium-Ion
MPTP	1-Methyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin
MSA	Multisystematrophie
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PINK1	PTEN-induzierte Kinase 1
PK	Parkinson-Krankheit
PS	Parkinson-Syndrom
RT	Raumtemperatur
SN	Substantia nigra
SNc	Substantia nigra, Pars compacta
SNr	Substantia nigra, Pars reticularis
TH	Tyrosinhydroxylase

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Basalganglienschleife mit pathologischen Veränderungen bei der PK	3
Abb. 2:	Struktur des LRRK2-Proteins	4
Abb. 3:	Mitophagie durch PINK1 und Parkin beim Wildtyp im Vergleich zu PINK1- oder Parkin-Mutation.....	7
Abb. 4:	Strukturformel Rotenon	9
Abb. 5:	Übersicht Behandlungsgruppen	19
Abb. 6:	Schlundsondenbehandlung.....	20
Abb. 7:	Schematische Aufbereitung der Gehirne	21
Abb. 8:	Reaktionsschema Tyrosin zu Dopamin	22
Abb. 9:	Bildschirmfoto Stereo Investigator	24
Abb. 10:	Anzahl der dopaminergen Neurone in der SNc nach zwei und vier Monaten Behandlung für die Genlinien A) Wildtyp, B) LRRK2 und C) PINK1	27
Abb. 11:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Mäusegehirne nach immunhistochemischer Färbung der dopaminergen Neurone	28
Abb. 12:	Relative Laufleistung der Rotenon-behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe über die Behandlungsdauer	34
Abb. 13:	Absolute Laufleistung der Versuchstiere in Abhängigkeit der Behandlungsdauer	35
Abb. 14:	Rotarod Walze mit strukturierter Oberfläche.....	41

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Allgemeine Materialien, Geräte, Chemikalien und Programme.....	17
Tab. 2:	Lösungen, Medien und Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung	21
Tab. 3:	p-Werte des t-Tests der Immunhistochemie	26
Tab. 4:	Wildtyp Post-hoc-Analyse des Rotarod-Tests	30
Tab. 5:	LRRK2 Post-hoc-Analyse des Rotarod-Tests.....	31
Tab. 6:	Post-hoc-Analyse des Rotarod-Tests	33
Tab. 7:	Rohdaten der Immunhistochemie.....	53
Tab. 8:	Rohdaten des Rotarod-Versuchs	55

1 Einleitung

1.1 Das Parkinson-Syndrom

1.1.1 Allgemeines und Epidemiologie

Im Jahr 1817 beschrieb der britische Arzt James Parkinson in seinem Buch „An Essay on the Shaking Palsy“ zum ersten Mal die Parkinson-Krankheit (PK). [1] In den mehr als 200 Jahren, die seitdem vergangen sind, kamen viele Erkenntnisse über die Erkrankung hinzu, andererseits verbleiben auch heute noch wichtige Fragen offen.

Bei der PK handelt es sich um eine progredient verlaufende, chronische Erkrankung, die mit dem Verlust dopaminergener Neurone in bestimmten Arealen des Gehirns einhergeht. [2] Obwohl aktuelle epidemiologische Daten schwer zu finden sind, ist deutlich, dass es sich um eine Erkrankung mit zunehmender Relevanz handelt. In Europa liegt die Prävalenz laut einem Review von 2005 zwischen 65,5 und 12.500 pro 100.000 Einwohner. [3] Mit steigendem Alter nimmt die Prävalenz zu; wird sie unter den 65–74-Jährigen noch mit 1,0 % angegeben, liegt sie in der Altersgruppe der 85–94-Jährigen bereits bei 4,3 %. [4]

Während die Inzidenz der Parkinson-Syndrom (PS)-Patienten im Jahr 1990 noch bei 2,5 Millionen war, [5] erwartet man durch die steigende Lebenserwartung und den höheren Anteil älterer Menschen an der Gesamtbevölkerung eine zunehmende Zahl der Parkinson-Erkrankten von 6,2 Millionen in 2015 auf 12,9 Millionen bis 2040. [6] Damit einhergehend rechnet man auch damit, dass sich der Anstieg der globalen Belastung durch Parkinson-Patienten der letzten Jahrzehnte auch in Zukunft fortsetzen wird. [5]

1.1.2 Ätiologie & Pathogenese

1.1.2.1 Überblick

Der Begriff Parkinson-Syndrom umfasst vier ätiologisch zu unterscheidende Gruppen; das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS), genetische Formen, atypische sowie sekundäre Parkinson-Syndrome.

Den größten Anteil stellt mit ca. 75 % das IPS und damit die klassische PK dar.

Weiterhin sind atypische Parkinson-Syndrome wie die Lewy-Body-Demenz (DLK) oder die Multisystematrophie (MSA) bekannt, welche ebenfalls zu den neurodegenerativen Erkrankungen zählen. Dagegen treten sekundäre Parkinson-Syndrome infolge von

primären Einflussfaktoren wie Toxin- oder Medikamenteneinnahme, Tumoren, Traumata oder Entzündungen auf. [2]

In den letzten Jahren wurden bereits mehrere Genorte und deren Mutationen mit dem Parkinson-Syndrom assoziiert, die mit Park1-16 benannt wurden. [2, 7] Die Kennzeichen der genetischen Formen werden unter Punkt 1.1.2.2 weiter besprochen.

Zu den charakteristischen Veränderungen der PK gehört der Untergang dopaminergener Neurone in bestimmten Bereichen des Gehirns sowie das Auftreten von eosinophilen, intraneuronalen Einschlusskörpern, den Lewy-Bodies. [8] Den Hauptbestandteil der Lewy-Bodies macht wahrscheinlich aggregiertes Alpha-Synuklein aus, ein Protein, das physiologischerweise präsynaptisch vorkommt und dessen Funktion noch nicht abschließend geklärt ist. [9, 10]

Die Neurodegeneration findet zunächst vor allem in der Pars compacta der Substantia nigra (SNc) sowie im Locus coeruleus statt, [7] bevor im fortgeschrittenen Stadium auch kortikale Areale betroffen sind. [11]

Durch die Degeneration der dopaminergen Projektion von der SNc folgt ein Dopaminmangel im Striatum, beginnend im Putamen, später auch im Nucleus caudatus und im Nucleus accumbens. Dieser Dopaminmangel führt durch reduzierte Inhibition zu einer pathologisch erhöhten Aktivität der GABAergen Projektionsneuronen im Globus pallidus internus. Die Folge ist eine unverhältnismäßig starke Hemmung der thalamischen Kerne, wodurch weniger Feedback an kortikale Strukturen gelangt (siehe Abb. 1). [12]

Aber auch andere Bereiche wie der Bulbus olfactorius, motorische dorsale Vaguskerne und schlafregulierende Neurone in der Pons können von der Degeneration betroffen sein. Möglicherweise nimmt die Degeneration dort sogar ihren Anfang, wodurch man Geruchs- und Schlafstörungen als mögliche Frühsymptome erklären könnte. [12]

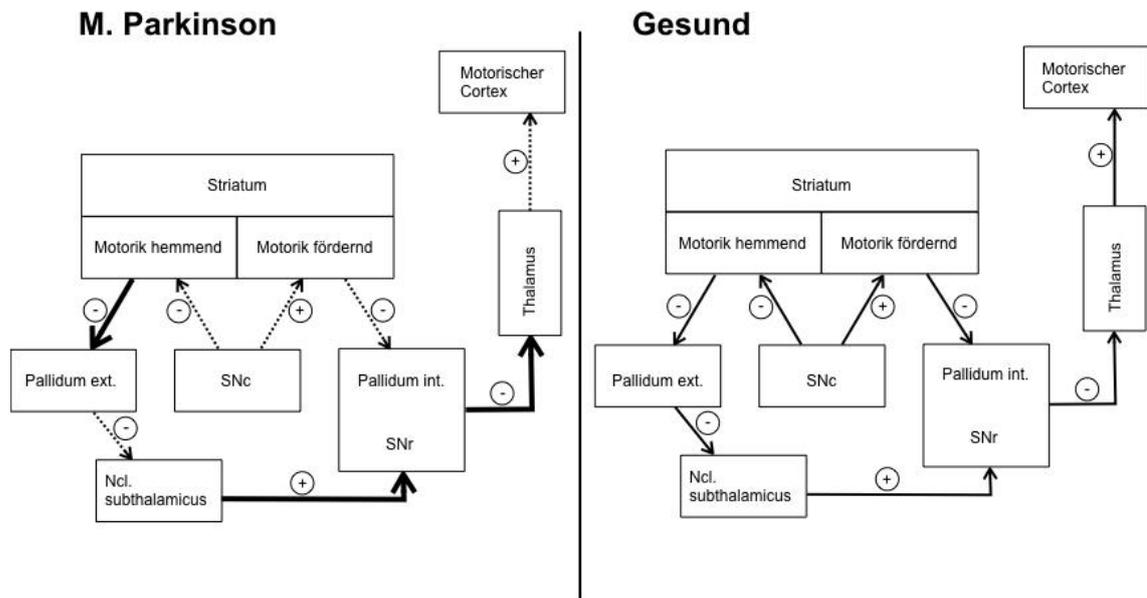


Abb. 1: Basalganglienschleife mit pathologischen Veränderungen bei der PK. Zu sehen ist eine schematische Darstellung der Basalganglienschleife mit den pathologischen Veränderungen im Rahmen der Parkinson-Erkrankung (links) im Vergleich zum physiologischen Zustand (rechts). Der Dopaminmangel in der SNc (Substantia nigra, Pars compacta) führt insgesamt zu einer verstärkten Aktivierung des Pallidum internum sowie der SNr (Substantia nigra, Pars reticularis). Dadurch gelangen weniger Signale an den Thalamus sowie an kortikale Strukturen (eigene Darstellung).

Die Ursache für die Degeneration ist noch nicht vollständig geklärt. Vermutlich spielt aber vermehrter oxidativer Stress als Folge von mitochondrialer Dysfunktion und unzureichenden Entgiftungsmechanismen sowohl für sporadische als auch für genetische Formen des Parkinson-Syndroms eine zentrale Rolle. Eine bereits mehrfach untersuchte mögliche Ursache der mitochondrialen Dysfunktion scheint die Inhibition des Komplex I der Atmungskette zu sein. [7, 12, 13]

Vermutlich spielt die mitochondriale Dysfunktion auch für die Akkumulation von Alpha-Synuklein eine wichtige Rolle. [14] Ein Defekt des Komplex I der Elektronentransportkette könnte durch fehlenden Abbau von Alpha-Synuklein zu dessen Akkumulation beitragen. [7]

Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion zwischen Alpha-Synuklein und der mitochondrialen Membran besteht, die möglicherweise dazu führt, dass die Membranfusion gehemmt und so die Fragmentation der Mitochondrien verursacht wird. [15, 16]

Interessanterweise konnte hier zudem der Einfluss genetischer Faktoren nachgewiesen werden. Es konnte festgestellt werden, dass die Expression der Gene PTEN-induzierte Kinase 1 (PINK1), Parkin oder DJ-1 die mitochondriale Fragmentation unterbindet und

bekannte Parkinson-assoziierte Mutationen in diesen Genen deren schützenden Effekt neutralisieren. [17]

1.1.2.2 Genetische Faktoren mit Fokus auf LRRK2 und PINK1

Auch bei den genetischen Formen des Parkinson-Syndroms führen entweder gestörte intrazelluläre Schutzmechanismen oder gesteigerte oxidative Belastung zur Neurodegeneration. [18] Zu den Parkinson-assoziierten Genen, die die mitochondriale Funktion beeinflussen, gehören auch die für diese Arbeit relevanten Gene Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) und PINK1 [19], die im Folgenden näher betrachtet werden sollen.

LRRK2

Das Gen LRRK2 kodiert für das gleichnamige Protein, welches unter anderem eine Kinase- und eine GTPase-Domäne besitzt (s. Abb. 2). [20] Es befindet sich auf dem Chromosom 12q12 und wird auch als PARK8 bezeichnet. [21] Eine wichtige Funktion der LRRK2-Kinase scheint die Bildung von Homodimeren zu sein, welche für eine größtmögliche Aktivität der Kinase notwendig ist. [21]

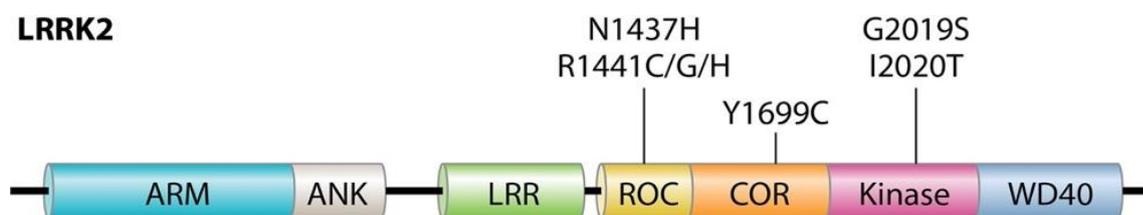


Abb. 2: Struktur des LRRK2-Proteins. Es handelt sich um eine schematische Darstellung des LRRK2-Proteins. Es beinhaltet sowohl eine Kinase- als auch eine Roc-GTPase-Domäne, die durch eine COR-Domäne verbunden sind. Oberhalb sind die sieben bekannten LRRK2-Mutationen an deren jeweiliger Lokalisation gekennzeichnet (Usmani et al., 2021).

Die Expression des LRRK2-Proteins findet in verschiedenen Organen statt, wobei die Expression in Nieren, Lunge und Immunzellen am höchsten zu sein scheint, im ZNS dagegen mäßig. [21] Bei Untersuchungen mittels in-situ-Hybridisierung wurde die Expression von LRRK2 in dopaminergen Neuronen des Mittelhirns von Mäusen als niedrig beschrieben, wohingegen andere mittels RT-PCR in der gleichen Region eine hohe Expression beschrieben. [22, 23] Auch beim Menschen konnte LRRK2-mRNA in der SNC gefunden werden, andere Regionen wie das Putamen zeigten aber eine höhere Expression. [24] Somit kann festgestellt werden, dass das LRRK2-Gen sowohl in Regionen exprimiert wird, die für die Entstehung des PS ausschlaggebend sind, als auch in Teilen des ZNS, die nach aktuellem Wissensstand nicht mit der Pathogenese des PS zusammenhängen, wie beispielsweise dem Hippocampus. [22]

Es ist anzunehmen, dass das LRRK2-Protein in mehrere Signalwege involviert ist. [20] Dadurch, dass es sich um ein pleiotropes, komplexes Gen und Protein handelt, ist es noch nicht gelungen, dessen genaue Rolle im Stoffwechsel zu identifizieren. [25-27] Mehrere Untersuchungen deuten auf eine Rolle des LRRK2-Proteins bei endolysosomalen Prozessen hin, welche für die Einhaltung einer zellulären Homöostase wichtig sind und zusammen mit mitochondrialer Dysfunktion häufig im Zusammenhang mit der Entstehung der PK genannt wird. [21, 28] Die genaue Bestimmung der Rolle des LRRK2-Proteins ist bisher nicht gelungen, jedoch führen LRRK2-KO-Modelle sowie der Einsatz von Kinase-Inhibitoren zu endolysosomaler Dysfunktion. Die Phosphorylierung von verschiedenen Rab-Proteinen durch LRRK2 könnte hierbei eine zentrale Rolle spielen. [21]

Da Mutationen im LRRK2-Gen die häufigste Ursache für autosomal-dominant vererbte Parkinson-Syndrome darstellen [29, 30], wurden diese auch schon intensiv erforscht. Bisher wurden sieben verschiedene Punktmutationen beschrieben (G2019S, I2020T, R1441C/G/H, Y1699C und N1437H). [21] Zu den möglichen Folgen dieser Mutationen gehören eine erhöhte Aktivität der Kinase sowie Veränderungen der GTPase-Funktion und des Verhaltens bezüglich der Dimerisierung. [25, 31, 32]

Die Gly2019Ser-Mutation soll bis zu 7 % der genetischen Parkinson-Syndrome in der kaukasischen Population verursachen [33, 34] und wurde überdies auch bei 1–2 % der idiopathischen Parkinson-Syndrome gefunden. Sie stellt hiermit die häufigste Parkinson-assoziierte Mutation in LRRK2 dar. [35] Als zweithäufigste LRRK2-Mutation wird die R1441C-Mutation mit einem Auftreten bei bis zu 2,5 % der sporadischen PS-Fälle beschrieben, welche auch in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde. [36, 37] Sie befindet sich auf der Roc-GTPase-Domäne des LRRK2-Gens (s. Abb. 2). Während allen LRRK2-Mutationen eine erhöhte Kinase-Aktivität zugeschrieben wird, haben Untersuchungen bezüglich der R1441C-Mutation auch eine Unterdrückung der GTP-Hydrolyse sowie eine erhöhte Affinität des LRRK2-Proteins zu GTP gezeigt. Die Bindung an GTP scheint wiederum ein wichtiger Faktor für die Kinaseaktivität zu sein. [21, 36, 37]

Es gibt mehrere Wege, wie diese Veränderungen durch LRRK2-Mutationen zu einer Degeneration von dopaminergen Neuronen führen könnte. Im Prinzip sind dopaminerge Neurone durch ihren hohen Energiebedarf anfällig für eine Schädigung durch Energiemangel, welcher durch oxidativen Stress oder auch eine mitochondriale Dysfunktion begünstigt werden kann. Durch die vielseitigen Funktionen des LRRK2-Proteins für die zelluläre Homöostase können bei Mutationen im LRRK2-Gen mehrere Mechanismen aufeinandertreffen, die eine Neurodegeneration begünstigen. Hierzu zählen allen voran die mitochondriale sowie die endolysosomale Dysfunktion. [21, 28] Zudem konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass durch die R1441C-Mutation im LRRK2-Gen die Expression

mehrerer an der Apoptose sowie Neuroprotektion beteiligten Gene verändert wird, so dass sich insgesamt eine negative Auswirkung auf das Überleben dopaminerger Neurone ergibt. [38]

Klinisch unterscheiden sich hereditäre PS-Fälle mit LRRK2-Mutation kaum von sporadischen Fällen. Insgesamt wurden Symptome bei Patienten mit Mutationen im LRRK2-Gen als eher milder ausgeprägt und mit langsamer Progression beschrieben, wobei auch schon ein schnelleres Fortschreiten der motorischen Symptome beschrieben wurde. [39, 40] Einige Unterschiede wie selteneres Auftreten von kognitiven Einschränkungen [39], vermehrtes Auftreten von Schlafstörungen [41], eine etwas höhere Häufigkeit eines asymmetrischen Tremors und ein minimal geringeres Durchschnittsalter bei Eintreten der Symptome wurden dargelegt, im Großen und Ganzen konnten aber keine wesentlichen Unterschiede zum klinischen Bild des IPS festgestellt werden. [39]

PINK1

Anders als bei LRRK2 werden Mutationen des PINK1-Gens autosomal-rezessiv vererbt. [42] Das Gen befindet sich auf Chromosom 1p36, besteht aus 8 Exons und ist mit dem PARK6 Locus assoziiert. Ebenfalls autosomal-rezessiv vererbt werden die Parkinson-assoziierten Mutationen im Parkin- und DJ-1-Gen. [43]

Es wurden bereits über 50 Mutationen im PINK1-Gen beschrieben, die mit dem Parkinson-Syndrom in Verbindung stehen, darunter Missense- sowie Nonsense-Mutationen bis hin zu ganzen Gendeletionen, wobei scheinbar bereits heterozygote Mutationen für eine erhöhte Anfälligkeit ausreichen. [42, 44] Die Expression findet im Gehirn von Menschen und Nagern ubiquitär, inklusive Parkinson-relevanten Regionen wie der SN statt, [45] außerdem auch in anderen Geweben wie Skelett- und Herzmuskel. [43]

Bei dem PINK1-Protein handelt es sich wahrscheinlich um eine Kinase, die vorwiegend in den Mitochondrien gefunden werden kann. [42, 46] Bei Beeinträchtigung der Funktion des PINK1-Proteins durch Mutation kommt es zu einer verminderten Aktivität der Kinase, die durch den C-Terminus des Proteins reguliert wird. [44] Mutationen, die den C-Terminus betreffen, wurden genau wie Gendeletionen im PINK1-Gen im Zusammenhang mit early-onset PS beobachtet. [47, 48]

Möglicherweise bewahrt PINK1 durch Phosphorylierung des mitochondrialen Chaperons TRAP1 (TNF-Rezeptor-assoziiertes Protein 1) Zellen vor Apoptose durch oxidativen Stress. [49] Durch Beeinträchtigung des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette kann die Mutation des PINK1-Gens zu einem verringerten Membranpotenzial der Mitochondrien und einer damit einhergehenden erhöhten Neigung zur Apoptose führen. [50]

Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Funktion des PINK1-Proteins eng mit der von Parkin, einer E3-Ubiquitin-Ligase, zusammenhängt. So wird vermutet, dass sich PINK1 bei niedrigem Membranpotenzial an der äußeren Membran der Mitochondrien anreichert und durch Ubiquitin-Phosphorylierung Parkin aktiviert. [43, 51] Gemeinsam wird so der Prozess der mitochondrialen Autophagie initiiert, auch Mitophagie genannt (s. Abb. 3). Durch die Beseitigung dysfunktionaler Mitochondrien sollen Zellen vor oxidativem Stress und darauf folgender Apoptose geschützt werden. [43] Diese Beobachtungen stützen die These, dass die Degeneration dopaminerger Neurone bei Mutationen im PINK1-Gen in einer gestörten mitochondrialen Funktion begründet ist. [44]

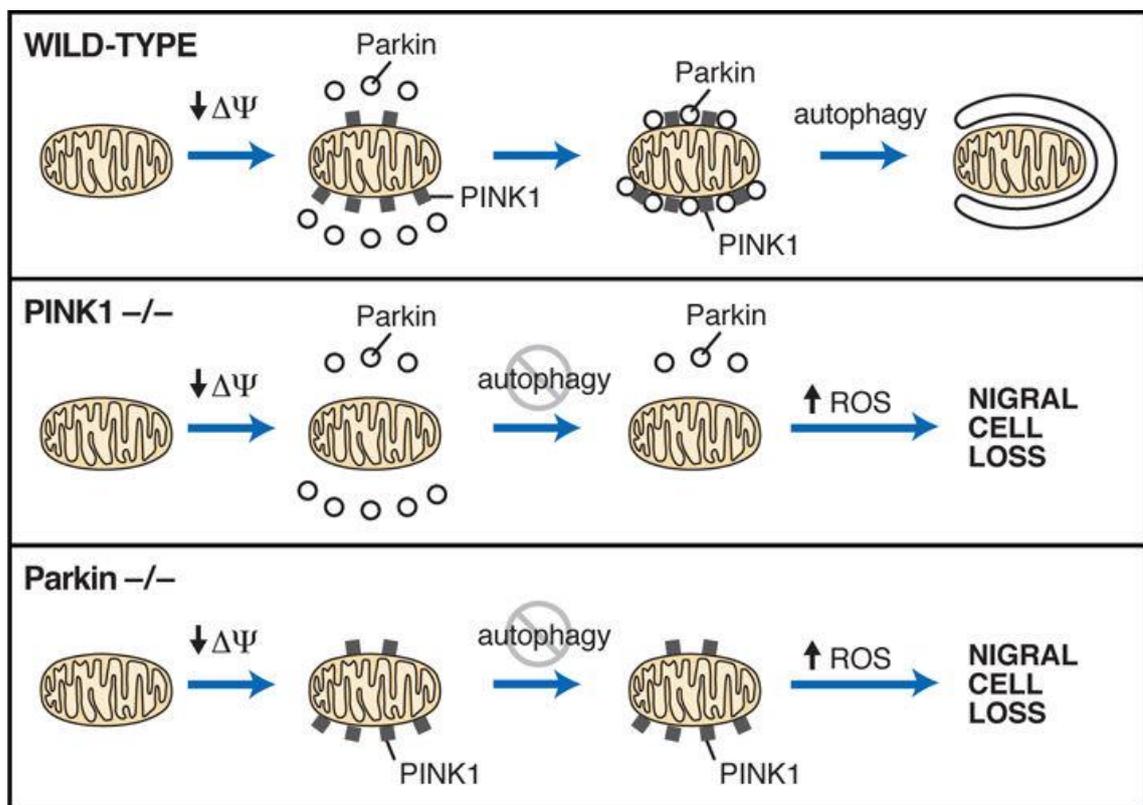


Abb. 3: Mitophagie durch PINK1 und Parkin beim Wildtyp im Vergleich zu PINK1- oder Parkin-Mutation. Diese Darstellung zeigt schematisch die Funktionen von PINK1 und Parkin, die beim Wildtyp (oben) zur Mitophagie führen. Ein erniedrigtes mitochondriales Membranpotenzial führt zur Anreicherung von PINK1 an der mitochondrialen Membran, woraufhin durch Ubiquitin-Phosphorylierung Parkin aktiviert wird. Anschließend wird die selektive Mitophagie eingeleitet. Sowohl bei PINK1- (Mitte), als auch bei Parkin-Mutation kommt es durch fehlende Wechselwirkungen zu erhöhtem oxidativem Stress bei fehlender Mitophagie, welche schließlich den Zelltod zur Folge haben kann (Barodia et al., 2017).

Obwohl einige Studien ein übereinstimmendes klinisches Bild der hereditären und sporadischen Formen des PS beschreiben, [52] wurden an anderen Stellen wesentliche Unterschiede beschrieben. So manifestieren sich autosomal-rezessiv vererbte Formen des PS deutlich früher, teilweise bereits in der zweiten Lebensdekade, weshalb manche

sogar von juvenilem Parkinsonismus sprechen. [18] Speziell bei Mutationen im PINK1-Gen wurde das Manifestationsalter mit 32 bis 48 Jahren beschrieben. Weitere Unterschiede zum IPS sind das eher symmetrische Auftreten der Symptome und das seltenere Vorkommen einer begleitenden Demenz. [18]

Zudem wird genetischen PS-Formen mit PINK1-Mutation ein eher langsamer Fortschritt der motorischen Symptome sowie eine langfristig gute Ansprechbarkeit auf eine Therapie mit L-DOPA zugeschrieben. [53] Eine Untersuchung zweier Brüder mit der gleichen Nonsense-Mutation im PINK1-Gen weist außerdem auf eine stärkere Bedeutung von neuropsychiatrischen Symptomen im Sinne von Depressionen, Angststörungen und Dysphorie hin. [54]

1.1.2.3 Umweltfaktoren mit Fokus auf Rotenon

Schon seit Jahrzehnten stehen nicht nur genetische, sondern auch Faktoren aus der Umwelt wie Infektionen oder toxische Substanzen als Einflussfaktoren der Parkinson-Erkrankung zur Debatte. [55]

Durch einige Fälle von akutem Parkinsonismus, ausgelöst durch die Substanz MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin), die dem Herbizid Paraquat strukturell sehr ähnlich ist, gelangten Pestizide als PK-beeinflussende Umweltfaktoren erstmals in den Fokus. [56] Es handelte sich dabei um die Beschreibung von vier Patientenfällen, die nach intravenösem Drogenabusus mit akut aufgetretenen typischen PS-Syndromen hospitalisiert wurden. Die Patienten zeigten unter anderem Rigor und Bradykinese, bei einem der Patienten konnte zudem ein asymmetrischer Ruhetremor festgestellt werden. Die Beschwerden besserten sich bei allen Patienten nach medikamentöser Therapie mit L-DOPA und Carbidopa, erhöhte Proteinwerte im Liquor und eine ausbleibende Besserung der Symptome auch nach mehreren Monaten deuteten allerdings auf eine dauerhafte Schädigung hin. [57]

Durch seine funktionelle Ähnlichkeit zu MPP⁺ (1-Methyl-4-phenylpyridinium-Ion), dem toxischen Metaboliten von MPTP, wurde so auch Rotenon (siehe Abb. 2) als potenzieller Einflussfaktor für die Parkinson-Erkrankung erkannt. [58] Als organisches Insektizid und Piscizid wird Rotenon in zahlreichen Ländern beispielsweise bei Befall von Honigbienen mit *Varroa*-Milben eingesetzt. Seine neurotoxische Wirkung entfaltet Rotenon durch Bindung an eine Untereinheit des mitochondrialen Enzymkomplexes I der Atmungskette und damit durch eine Behinderung der oxidativen Phosphorylierung. [59]

Andere sehen die Ursache der Neurotoxizität in einer Hemmung der Entstehung von Mikrotubulin aus Tubulin, was zu einer Akkumulation von Tubulin-Monomeren führt, die

toxisch wirken kann. [60, 61] Gestützt wird diese These zum Beispiel durch Untersuchungen, die zeigen, dass das Protein Parkin Tubulin zu binden und damit dessen Abbau zu fördern scheint. Mutationen im Parkin-Gen gehören zu den Parkinson-assoziierten Mutationen, da bei einer Dysfunktion von Parkin dieser Mechanismus gestört wird. [62]

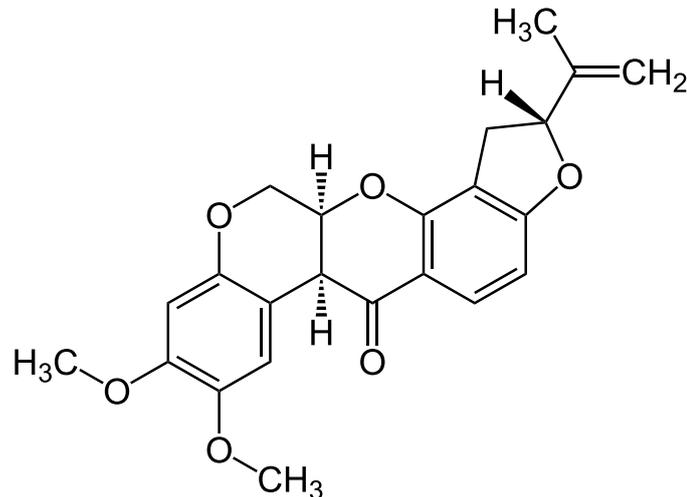


Abb. 4: Strukturformel Rotenon. Die Abbildung zeigt die Strukturformel des Umwelttoxins Rotenon, welches als möglicher Einflussfaktor auf das Parkinson-Syndrom bekannt ist (eigene Darstellung in Anlehnung an Merck [63]).

Zusammen mit epidemiologischen Hinweisen, dass die PK in ländlichen Regionen häufiger zu finden ist, [64, 65] haben diese frühen Erkenntnisse dazu geführt, dass Pestizide zunehmend mit dem PS in Verbindung gebracht und als Umweltfaktor weiter untersucht wurden. [66] In den folgenden Jahren wurde eine Assoziation zwischen der PK und der Exposition gegenüber verschiedener Pestizide inklusive Rotenon mehrfach nachgewiesen. [56, 64, 67]

Die Hypothese des negativen Einflusses von Pestiziden wird außerdem durch die Beobachtungen gestützt, dass Schutzmaßnahmen wie das Tragen von Handschuhen im Umgang mit Pestiziden das PS-Risiko senken können. [68]

Auf der Suche nach pathophysiologischen Mechanismen in der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung findet man immer wieder die Stichworte mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress. [69, 70] Auch die Pestizide, die bisher mit der PK in Verbindung gebracht werden konnten, lassen sich meist einem dieser Mechanismen zuordnen. [71] So konnten mithilfe von Rotenon durch Hemmung des mitochondrialen Komplexes I und Paraquat durch Induktion von oxidativem Stress nicht nur charakteristische pathologische, sondern auch klinische PK-Kennzeichen reproduziert werden. [71] Erstaunlicherweise wurde für Rotenon eine selektive Schädigung des nigrostriatalen Systems

beobachtet, was sich in einer Reduktion der Spontanmotorik äußerte. [69] Durch die Gabe von L-DOPA konnten diese Symptome aufgehoben werden. [72] Erst bei intravenöser Gabe von 2,5 mg/kg pro Tag konnte ein unspezifisch neurotoxischer Effekt beobachtet werden. [73]

Zu den neuropathologischen Veränderungen durch orale Rotenon-Aufnahme zählt auch die Akkumulation von Alpha-Synuklein in Neuronen des ENS und damit einhergehend eine verminderte gastrointestinale Motilität. [74, 75] Interessant ist dabei, dass die Versuchstiere motorische Symptome zeigten, obwohl Rotenon im Blut nicht nachweisbar war und akkumuliertes Alpha-Synuklein nur in synaptisch verbundenen Neuronen gefunden wurde, was auf eine transsynaptische Ausbreitung der Pathologie bis ins ZNS hinweist. [75]

Einige Untersuchungen weisen außerdem auf eine ursächliche Rolle des Gastrointestinaltraktes bei der Pathogenese der PK hin. Zum einen konnte bereits vor dem Auftreten motorischer Symptome bei unbehandelten Parkinson-Patienten Alpha-Synuklein in der Kolonschleimhaut nachgewiesen werden, in der gesunden Kontrollgruppe hingegen nicht. [76] Weiterhin konnte am Tiermodell gezeigt werden, dass Injektion von Alpha-Synuklein in die Darmwand zu dessen Ausbreitung entlang des N. vagus bis hin zu seinen dorsalen motorischen Kerngebieten und letztendlich zur SN führt. Es wird eine transsynaptische Ausbreitung von Alpha-Synuklein anhand von Mikrotubuli-assoziiertem Transport vermutet. [77]

Daher besteht die Vermutung, dass der GIT möglicherweise als Verbindung zwischen Einflüssen aus der Umwelt und der Krankheitsentstehung des Parkinson-Syndroms dient. [78-80] Auch Braak et al., die zunächst von einer Ausbreitung der Pathologie ausgehend vom Hirnstamm ausgingen [81], wiesen später auf eine mögliche Ausbreitung vom ENS und dem Bulbus olfactorius aus hin. [82]

Neben dem Einfluss von Pestiziden auf das Krankheitsrisiko [64, 83] wurde auch eine Vielzahl weiterer Umweltfaktoren und deren Assoziation zum PS untersucht. Dazu zählt neben der Ernährung mit einem hohem Anteil an gesättigten Fettsäuren oder Milchprodukten auch eine Assoziation zwischen der PK und Diabetes mellitus Typ II. [84, 85] Eine protektive Wirkung wird dagegen neben Koffein auch Nikotin zugeschrieben, wobei bislang unklar ist, ob es sich hierbei um eine ursächliche Wirkung oder nur um eine Korrelation durch bestimmte Persönlichkeitszüge handelt. [85, 86]

Interessanterweise wurde bereits 1985 erstmals eine mögliche Assoziation zwischen Infektionen mit Coronaviren und PS durch erhöhte Antikörper-Titer im Liquor bei PS-Patienten beschrieben. [87, 88] Durch drei aktuelle Fallbeschreibungen von Patienten mit

akutem Parkinsonismus nach Infektion mit SARS-CoV-2 gelangt diese These wieder zu höchster Relevanz. [89-91]

Einige Autoren vermuten daher ein erhöhtes Risiko insbesondere anfälliger Patienten für neurodegenerative Erkrankungen wie der PK bei Infektion mit Coronaviren, [92, 93] während andere vor voreiligen Schlüssen warnen und auch die Möglichkeit der Kombination aus undiagnostizierten PS-Patienten im Prodromalstadium und der Covid-19-Infektion als Triggerfaktor nennen. [94, 95]

1.1.3 Klinische Symptome und Diagnostik

Die pathologischen Veränderungen im Rahmen der Parkinson-Erkrankung führen zu deren charakteristischen Symptomen. So verursacht der Ausfall der nigrostriatalen Projektion eine Brady- oder Akinese, während der Wegfall der dopaminergen Hemmung in der *Formatio reticularis* Tremor und Rigor zur Folge hat. [96]

Bei den klinischen Symptomen des Parkinson-Syndroms unterscheidet man zwischen den Kardinalsymptomen Brady- oder Akinese, Ruhetremor und posturale Instabilität und fakultativen Symptomen, die für die Diagnosestellung nicht erforderlich sind und verschiedene Organsysteme betreffen können. Von einem Parkinson-Syndrom spricht man, wenn eine Bradykinese zusammen mit einem weiteren Kardinalsymptom vorliegt. [2] Ein IPS liegt definitionsgemäß dann vor, wenn zusätzlich weitere Kriterien erfüllt werden, beispielsweise das gute Ansprechen auf eine L-DOPA-Therapie über einen längeren Zeitraum. Zudem darf die Diagnose IPS erst gestellt werden, wenn keine Hinweise für ein symptomatisches oder atypisches PS vorliegen. [2]

Für die Diagnosestellung und häufig auch für die Therapie liegt der Fokus klar auf den motorischen Symptomen. Dabei beschrieb bereits James Parkinson die Erkrankung als eine Multisystemerkrankung mit motorischen und nicht-motorischen Symptomen. [1] Aktuellere Untersuchungen deuten auf ein bis zu 20-jähriges Prodromalstadium des PS vor Auftreten der motorischen Symptome hin, in dem die nicht-motorischen Symptome dominieren. [97] Zu den Symptomen, deren Assoziation zur Parkinson-Erkrankung als gut erwiesen gilt, zählen REM-Schlafstörungen [98] und Hyposmie [99]. Ebenfalls häufig dokumentiert sind gastrointestinale Symptome wie Defäkationsstörungen und Obstipation [80, 100] sowie psychische Manifestationen wie Depression und Angststörungen. [101] Daneben zählen zahlreiche weitere Symptome wie orthostatische Hypotension und Apathie zu den beschriebenen Symptomen im Zusammenhang des PS. [78, 102, 103] Erschwerend kommt hinzu, dass sich die klinische Symptomatik sowie das Ansprechen auf eine medikamentöse Therapie von Patient zu Patient stark unterscheiden. [78]

Genauerer zu den Unterschieden der klinischen Symptome zwischen genetischen Formen, insbesondere mit Mutationen im LRRK2- sowie im PINK1-Gen, und sporadischen Fällen wurde weiter vorausgehend unter Punkt 1.1.2.2 besprochen.

1.1.4 Therapeutische Optionen

Aktuell besteht die Therapie von Parkinson-Patienten aus einer Kombination von medikamentöser Therapie und unterstützenden Verfahren wie Physio-, Ergo-, Logopädie und Schlucktherapie sowie neuropsychologischen Therapiemöglichkeiten. In der Pharmakotherapie finden verschiedene Medikamentengruppen wie MAO-B-Hemmer, Non-Ergot-Dopaminagonisten und früher oder später auch L-Dopa Anwendung, wobei unerwünschte Nebenwirkungen wie Dyskinesien sowie eine Abnahme der Wirksamkeit im Verlauf als Nebenwirkungen nicht zu vernachlässigen sind. Für spezifische nicht-motorische Symptome stehen zudem weitere Medikamente zur Wahl, wie beispielsweise Rivastigmin für die Parkinson-assoziierte Demenz. Daneben gibt es die Möglichkeit der tiefen Hirnstimulation, die vor allem jüngeren Patienten oder solchen mit therapieresistentem Verlauf empfohlen wird. [7, 104]

Mit den derzeitigen Behandlungsmöglichkeiten gelingt zwar in den meisten Fällen zumindest für einige Jahre eine gute Symptomkontrolle, eine Verbesserung der Prognose oder gar Heilung ist jedoch nicht möglich. Demnach treten durchschnittlich innerhalb der ersten zehn Jahre unter Behandlung Dyskinesien und Wirkungsfluktuationen auf, innerhalb von 20 Jahren werden behandelte Patienten üblicherweise pflegebedürftig, wobei Verlauf und Prognose individuell sehr verschieden sein können. [104] Zusätzlich eingeschränkt werden die Behandlungsmöglichkeiten durch die verzögerte Diagnosestellung angesichts der späten klinischen Manifestation in Form von motorischen Symptomen, bei deren Auftreten bereits ein Dopamin-Defizit von 70 % besteht. [12]

Um eine frühere Diagnosestellung zu ermöglichen, wurden bereits einige Biomarker untersucht, darunter Fragebögen, genetische Untersuchungen, bildgebende Verfahren und laborchemische Parameter aus Liquor und Blut. Einige dieser Parameter wie bildgebende Verfahren können zwar durchaus aussagekräftig sein, generell gilt es aber als wahrscheinlicher, dass eine Zusammenschau aus klinischen, bildgebenden, genetischen und laborchemischen Daten mit standardisierten Assays notwendig sein wird, um den Fortschritt der Erkrankung ausreichend beurteilen zu können. [105, 106] Auch der Nachweis von Alpha-Synuklein in der Mucosa des Kolons wirkte zunächst als vielversprechender Biomarker, stellte sich dann aber als zu wenig spezifisch heraus. [107] Ein weiteres Beispiel für die Suche nach Frühmarkern für die PK stellen pathologische

Veränderungen des ENS in Form von Neurodegeneration und Alpha-Synuklein-Akkumulation dar. [108]

Letztlich kann festgestellt werden, dass alle Frühmarker der Erkrankung erst dann sinnvoll genutzt werden können, wenn als Konsequenz eine frühzeitige, spezifische und krankheitsmodifizierende Therapie zur Verfügung steht und somit auch die Prognose verbessert werden kann, was bisher leider nicht der Fall ist. [109, 110]

Sowohl für Prionerkrankungen, als auch für andere neurodegenerative Erkrankungen wie MSA und die PK gibt es im Tiermodell ermutigende Ergebnisse für die Substanz AnLe138b, welche durch die direkte Bindung an Aggregate ebenfalls die Akkumulation von Alpha-Synuklein reduzieren und einer Neurodegeneration und Krankheitsprogression vorbeugen soll. [111, 112] Die Produkte des DJ-1-Gens, ein weiteres mit der PK assoziiertes Gen, D-Lactat und Glykolsäure, konnten nicht nur bei DJ-1-, sondern auch bei PINK1-Mutation und nach Paraquat-Exposition das mitochondriale Membranpotenzial stabilisieren. [113] In Zellkulturen konnten beide Substanzen außerdem das Überleben dopaminerger Neurone verbessern, somit besteht hier die Hoffnung auf einen zukünftigen präventiven oder therapeutischen Einsatz bei PS-Patienten. [113]

Vielversprechende Ergebnisse in der Untersuchung von beispielsweise Impfungen oder monoklonalen Antikörpern gegen akkumuliertes Alpha-Synuklein haben wiederum zu deren Untersuchung in klinischen Studien geführt. [114] Ein weiteres Beispiel für einen spezifischen Therapieansatz ist die Hemmung der durch Mutation überhöhten Kinaseaktivität bei genetischen LRRK2-Formen mit G2019S-Mutation, die ebenfalls Gegenstand klinischer Studien ist. [115] Auch eine Behandlung mit Ambroxol überzeugt bisher als neuroprotektiv und damit eventuell krankheitsmodifizierend bei Parkinson-Patienten. [116] Im Tiermodell konnten auch Injektionen mit Baicalein überzeugen, indem es die Akkumulation von Alpha-Synuklein in Neuronen verhinderte. [117] Daneben gibt es weiterhin das große Feld der Gentherapie, in dem bisher aber noch keine klinisch überzeugende Methode beschrieben wurde. [118]

Trotz einiger vielversprechender Ansätze ist es also noch ein weiter Weg bis zu einer möglichen Zulassung und einer breiten klinischen Verfügbarkeit von Medikamenten, die die Progression und Neurodegeneration aufhalten oder verlangsamen können. Aufgrund von steigenden Inzidenzen und demographischen Entwicklungen zeigen präventive Maßnahmen ein großes Potenzial; dazu gehören zum Beispiel Empfehlungen zur gesunden Ernährung, vermehrte körperliche Aktivität sowie präventive Maßnahmen im Hinblick auf Schädel-Hirn-Traumata, aber auch eine Reduktion der Verwendung von Pestiziden. [119]

Insbesondere bei genetischer Disposition wären präventive Maßnahmen sinnvoll, zum Beispiel durch Vermeidung der Exposition von schädlichen Umweltfaktoren wie Pestiziden.

1.2 Aktueller Stand zu Gen-Umwelt-Interaktion bei Parkinson-Syndromen

Nachdem in Untersuchungen zur Entstehung der Parkinson-Erkrankung zunächst der Fokus stark auf Umweltfaktoren lag, verschob er sich dann in den 1990er-Jahren mit den ersten Beschreibungen von genetischen Formen stark in Richtung Genetik. Heutzutage geht man größtenteils von einem multifaktoriellen Geschehen aus, manche sprechen sogar von Gen-Umwelt-Interaktionen als der wahrscheinlich wichtigsten Ursache für die meisten Fälle von PS. [120, 121] Dafür spricht nicht nur, dass nicht alle gegenüber nachweislich Parkinson-begünstigenden Substanzen exponierten Patienten ein PS entwickeln, sondern auch Gemeinsamkeiten in der Pathogenese von genetisch und toxisch verursachten Parkinson-Formen wie mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress. [122]

Obwohl es einige Hinweise auf Gen-Umwelt-Interaktionen gibt und Viele darin die Hauptursache für PS sehen, gibt es wenige konkrete Beweise in der Literatur. Als belegt gilt aber beispielsweise eine erhöhte Anfälligkeit für Rotenon bei Mäusen mit Parkin-KO, einem weiteren mit der PK assoziierten Gen. [123] Auch für die häufigste Mutation im LRRK2-Gen, die G2019S-Mutation, konnte im Mausmodell eine vermehrte Neurodegeneration bei Exposition gegenüber MPTP, welches Rotenon funktionell stark ähnelt, festgestellt werden, als bei Wildtyp-Mäusen. [124] Eine weitere Gen-Umwelt-Interaktion bezüglich Rotenon beschreibt dagegen einen neuroprotektiven Effekt bei Gendeletion von NOX2, einem Gen, das für eine Untereinheit des membrangebundenen Enzymkomplexes NADPH-Oxidase kodiert. [125]

Daneben wurde auch bei Untersuchungen mit Paraquat eine erhöhte Anfälligkeit bei Expression des Alpha-Synuklein-Gens gegenüber dessen Unterdrückung beschrieben. [126] Auch für Personen mit homozygoter Mutation von GSTT1 (Glutathion S-Transferase T1) wird bei Paraquat-Exposition ein erhöhtes Risiko für die PK durch oxidativen Stress vermutet. [127] Neben direkten toxischen Effekten führt auch die Modifikation von Genen bestimmter Enzyme durch ein weiteres mit der PK assoziiertes Fungizid, Benomyl, zu einer erhöhten Anfälligkeit für die PK. [128]

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist es herauszufinden, ob eine Gen-Umwelt-Interaktion in Form von erhöhter Anfälligkeit gegenüber Rotenon besteht, wenn in den Genen PINK1 oder LRRK2 eine Parkinson-begünstigende Mutation vorliegt. Diese Fragestellung wird im Tiermodell untersucht, indem Mäuse der Genlinien Wildtyp, PINK1-KO und LRRK2-Mutation jeweils in Rotenon-Behandlungs- und Kontrollgruppen eingeteilt werden und die Auswirkungen der Rotenon-Exposition in Form von motorischen Symptomen und Neurodegeneration in der SNc mittels Immunhistochemie quantifiziert werden.

Die Erforschung der Pathogenese der PK legt den Grundstein für die Entwicklung zukünftiger Maßnahmen der Prävention und Therapie, von denen nicht nur einzelne Patienten profitieren können, sondern auch gesundheitsökonomische Vorteile zu erwarten sind.

2 Material und Methoden

2.1 Material, Geräte, Chemikalien und Programme

In der folgenden Tabelle sind die allgemeinen Materialien, Geräte, Chemikalien und Programme aufgelistet, die für die Experimente verwendet wurden (siehe Tab. 1).

Tab. 1: Allgemeine Materialien, Geräte, Chemikalien und Programme

Materialien	
Produkt	Hersteller
Pipetten (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Deutschland
Falcon Tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner, Deutschland
Cellstar® Serologische Pipetten, 10ml	Greiner, Deutschland
Deckgläser 24 x 50 mm	Paul Marienfeld GmbH, Deutschland
Superfrost Ultra Plus Objektträger	Thermo Fisher Scientific, USA
Parafilm® M	Bemis Company Inc., USA
12-Well Multiwellplatte Cellstar®	Greiner, Deutschland
Peha-soft Nitrilhandschuhe	Paul Hartmann, Deutschland
Geräte	
Produkt	Hersteller
pH-Meter FiveGo F2	Mettler-Toledo, Schweiz
Leica SM2010R Schlittenmikrotom	Leica, Deutschland
Unimax 1010 Schüttelgerät	Heidolph, Deutschland
Schlundsonde A3	Unimed, Schweiz
Pipettor Turbo-Fix	TechnoPlasticProducts AG, Schweiz
ThermoJack Pro Thermometer	Dostmann electronic GmbH, Deutschland
Magnetrührer MR 3001 K	Heidolph, Deutschland
Vortex-Genie 2™ G-560E	Scientific Industries Inc., USA
Sacrifice Perfusion System	Leica, Deutschland
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Deutschland
Mikroskop IX50-S8F	Olympus Optical Co., Japan
Purelab® Flex Water Purification System	Elga LabWater, UK
Laborwaage Sartorius CP2202S-OCE	Sartorius, Deutschland

Chemikalien	
Produkt	Hersteller
2-Methylbutan	Sigma-Aldrich, Deutschland
Tissue-Tek® O.C.T. Compound	SakuraFinetek Europe, Niederlande
Sucrose	Sigma-Aldrich, Deutschland
Programme	
Produkt	Hersteller
Microsoft Excel 2010	Microsoft, USA
CellF analySIS Image Processing	Matrix Optics, Malaysia
Stereoinvestigator® 64-bit	MicroBrightField Inc., USA
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, USA

2.2 Tiermodell

Die Tierversuche für dieses Projekt wurden von der Regierung von Oberbayern gemäß § 8 des deutschen Tierschutzgesetzes genehmigt.

2.2.1 Tierhaltung

Für das Tiermodell wurden bei Behandlungsstart 24 Wochen alte männliche Mäuse der Linie C57JBL6 verwendet, die im Helmholtz Zentrum München generiert wurden. Zusätzlich zu den Wildtyp-Mäusen wurden Tiere mit heterozygoter LRRK2-R1441C-KI-Mutation und mit PINK1-KO-Mutation (im Folgenden als LRRK2 und PINK1 bezeichnet) gezüchtet. Jeweils zwei bis fünf Mäuse wurden auf einer Bodenfläche von 530 cm² in THKB-M2V-M-Polysulfonkäfigen (Typ M II, verlängert) gehalten. Jeder Käfig war mit einem Luftfilter (IVC-Haltung, individually ventilated cages), ausreichend Einstreu (Ssniff H1505-18 bedding BK8/15), einem Maushaus und Material zum Nest- und Höhlenbau (Firma Abedd) ausgestattet. Die Käfige wurden wöchentlich gewechselt, mit 80 °C heißem Wasser gewaschen und bei 121 °C autoklaviert. Die Raumtemperatur betrug 21 °C, die Luftfeuchtigkeit 68 %. Die Tiere hatten unbegrenzten Zugang zu Futter (Trockenfutter, autoklaviert, Haltungsfutter V 1536 Firma Ssniff) und Wasser und wurden unter einem 12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Um die Versuchstiere vor Krankheitserregern zu schützen, wurden sie unter SPF-Bedingungen (spezifisch pathogenfrei) gehalten. Dies beinhaltet ein geschlossenes Barriere-System mit Personalschleuse, Materialschleuse, Durchreichautoklav, Überdruckbelüftung und Wasserstoffperoxid-Schleuse. Der SPF-Status wurde vierteljährlich mithilfe von Sentinel-Mäusen überprüft und nach den FEL-ASA-Empfehlungen durchgeführt (dreimal klein und einmal erweitert).

2.2.2 Versuchsgruppen

Die Tiere wurden innerhalb der drei Genlinien (Wildtyp, LRRK2, PINK1) in jeweils vier Behandlungsgruppen aufgeteilt. Sie wurden für jeweils zwei oder vier Monate entweder mit Rotenon oder einer Kontrolllösung behandelt (siehe Abb. 3).

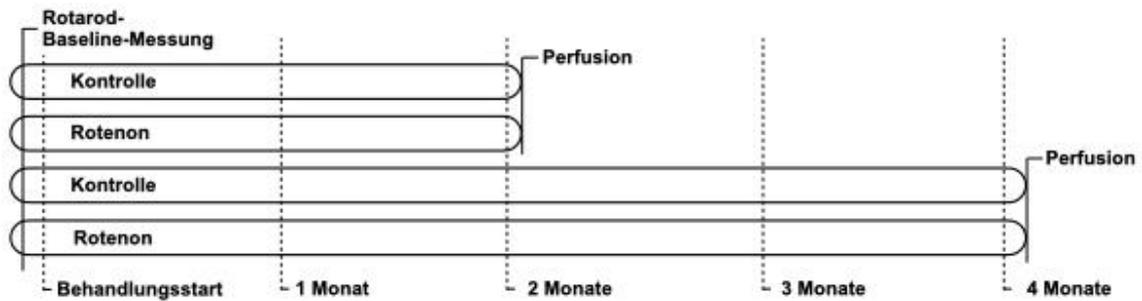


Abb. 5: Übersicht Behandlungsgruppen. Die Abbildung zeigt eine schematische Übersicht der vier Behandlungsgruppen pro Genlinie. Die Versuchstiere wurden für entweder zwei oder vier Monate behandelt, für beide Behandlungszeiträume wurde jeweils eine Rotenon- mit einer Kontrollgruppe verglichen. Vor Start der Behandlung erfolgte die erste Messung der Laufleistung mit dem Rotarod, diese wurde in monatlichen Abständen bis zur Perfusion wiederholt (eigene Darstellung).

2.2.3 Rotenon-Behandlung

Die Behandlung der Versuchstiere erfolgte oral mittels einer Schlundsonde für fünf Tage pro Woche über einen Zeitraum von entweder zwei oder vier Monaten.

Für die Behandlung mit Rotenon wurden 100 µl einer 50 mg/ml Rotenon-Lösung in 8 ml destilliertem Wasser verdünnt. Pro Maus wurden von der verdünnten Lösung 200 µl verabreicht. Für das erwartete Gewicht pro Maus von 25 g ergibt das eine Konzentration von 5 mg/kg. Da die Versuchstiere bei Behandlungsstart aber bereits durchschnittlich 30 g wogen, ergab sich eine Konzentration von 4,17 mg/kg.

Die Tiere der Kontrollgruppen wurden auf die gleiche Weise für zwei oder vier Monate mit einer Kontrolllösung (2 % Carboxymethylcellulose und 1,25 % Chloroform) behandelt (siehe Abb. 4).

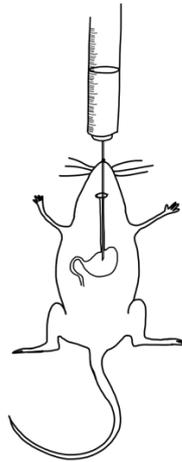


Abb. 6: Schlundsondenbehandlung. Den Versuchstieren wurde über zwei oder vier Monate entweder Rotenon oder Kontrolllösung mittels einer Schlundsonde verabreicht (eigene Darstellung).

2.2.4 Rotarod-Test

Um die motorischen Fähigkeiten der Versuchstiere im Verlauf zu beobachten, wurden vor dem Start der Behandlung (Baseline) und dann ein Mal pro Monat Tests mithilfe des Rotarod (3375-5, TSE Systems Deutschland) durchgeführt. Dabei wurden die Mäuse auf rotierende Walzen gesetzt und die Zeit bis zum Herunterfallen der Tiere gemessen. Die Startgeschwindigkeit beträgt 4 rpm, dann wurde mit 0,3 rpm/s beschleunigt. Nach 200 s wurde ein Testdurchlauf beendet, auch wenn die Maus noch nicht gefallen war. Der Test wurde pro Tier drei Mal täglich an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt.

2.2.5 Entnahme und Aufbereitung der Gehirne

Die Versuchstiere wurden mittels intraperitonealer Gabe von Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (10 mg/kg) narkotisiert, dann erfolgte die intrakardiale Perfusion zunächst mit 0,01 % Heparin in PBS, anschließend mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS (pH = 7,4). Die Gehirne wurden entnommen und zur Fixierung für 24–48 Stunden in 4 % PFA-Lösung aufbewahrt. Anschließend wurden sie für jeweils 24 Stunden in PBS, dann in 15 % und schließlich in 30 % Sucroselösung asserviert. Danach wurden die Gehirne schockgefroren. Dazu wurde ein Zentrifugenröhrchen mit 2-Methylbutan befüllt und auf -50 °C gekühlt, indem das Röhrchen in flüssigen Stickstoff getunkt wurde. Die Gehirne wurden nacheinander zunächst für 10 Sekunden in das Zentrifugenröhrchen gegeben, sodass sie mit der -50 °C kalten Flüssigkeit bedeckt waren. Dann wurde das Röhrchen mit dem Gehirn darin nochmals für 4–5 Sekunden in flüssigen Stickstoff getunkt. Anschließend wurden die Gehirne mit einer Pinzette in beschriftete Gläschen transferiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt (siehe Abb. 5).

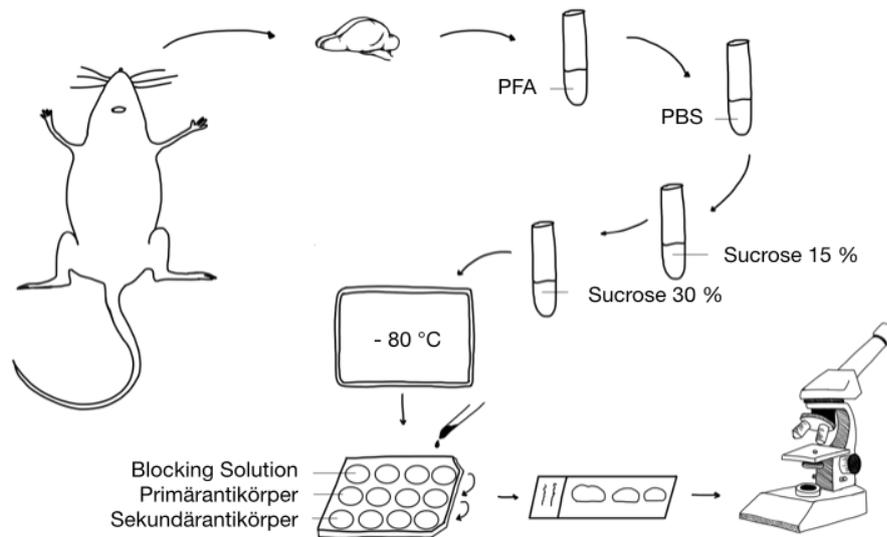


Abb. 7: Schematische Aufbereitung der Gehirne. Nach Entnahme der Gehirne wurden diese in PFA (Paraformaldehyd) fixiert und anschließend für jeweils mindestens 24 Stunden in PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung), 15 % und 30 % Sucroselösung aufbewahrt. Die Gehirne wurden daraufhin schockgefroren und in 40 µm dicke Schnitte geschnitten, um diese immunhistochemisch anzufärben und die Zellzahl in der SNC mikroskopisch zu ermitteln (eigene Darstellung).

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 Immunfluoreszenzfärbung

Die verwendeten Lösungen, Medien und Antikörper sind in der folgenden Tabelle aufgelistet (siehe Tab. 2).

Tab. 2: Lösungen, Medien und Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung

Freezing Medium		
Produkt	Konzentration	Hersteller
PBS	50 %	
Ethylen Glykol	25 %	Sigma-Aldrich, Deutschland
Glycerol	25 %	Sigma-Aldrich, Deutschland
Blocking Solution		
Produkt	Konzentration	Hersteller
PBS	94,95 %	
Donkey Serum	5 %	Jackson Immunores. Lab., USA
Triton X-100	0,05 %	Thermo Fisher Scientific, USA

Mounting Medium				
Produkt	Konzentration		Hersteller	
Glycerol	25 %		Sigma-Aldrich, Deutschland	
Mowiol® 4-88	100 mg/ml		Sigma-Aldrich, Deutschland	
Tris	50 % 0,2 M		Carl Roth, Deutschland	
Antikörper				
Antikörper	Wirt	Antigen	Verdünnung	Hersteller
Primär	sheep	anti-Tyrosinhydroxylase	1:1500	Pel-Freez, USA
Sekundär	donkey	568 anti-sheep	1:500	Invitrogen, USA

Insgesamt wurden 67 Gehirne immunhistochemisch untersucht und in die Auswertung mit einbezogen. In neun von den insgesamt zwölf Gruppen (drei Genlinien mit jeweils vier Behandlungsgruppen) befanden sich jeweils sechs Tiere. Aufgrund einer höheren Drop-Out-Rate als erwartet verblieben in einer Gruppe (PINK1-KO, zwei Monate Kontrolle) nur drei Tiere, in zwei weiteren Gruppen (Wildtyp, vier Monate Kontrolle und LRRK2-KO vier Monate Rotenon) befanden sich bis Abschluss der Behandlung jeweils fünf Tiere.

Vor der Färbung wurden die Gehirne in 40 µm dicke Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden bei -20 °C in einer 96-Multiwellplatte mit Freezing Medium bedeckt aufbewahrt.

Jeder sechste Schnitt wurde gefärbt. Hierzu wurden die Schnitte in eine 12-Multiwellplatte übertragen und 3-mal für jeweils 10 min. bei Raumtemperatur (RT) in PBS gewaschen. Da nur die dopaminergen Neurone angefärbt werden sollten, wurde ein Primärantikörper verwendet, der an die Tyrosinhydroxylase (TH) bindet (siehe Abb. 6).

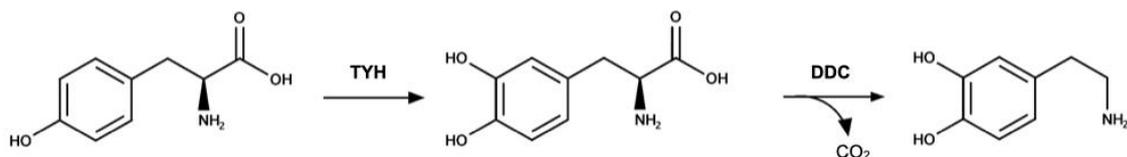


Abb. 8: Reaktionsschema Tyrosin zu Dopamin. Das Enzym Tyrosinhydroxylase (TYH) ermöglicht die Reaktion von Tyrosin zu Dopa. Unter Abspaltung von CO₂ katalysiert die Dopa-Decarboxylase (DDC) die Umwandlung von Dopa zu Dopamin (eigene Darstellung).

Um das intrazelluläre Enzym Tyroxinhydroxylase für den Antikörper zugänglich zu machen und unspezifische Bindungen zu verhindern, wurden die Schnitte in eine 24-Multiwellplatte transferiert und für eine Stunde bei RT in Blocking Solution geschwenkt.

Anschließend wurden die Schnitte für eine Stunde bei RT, dann über Nacht (für mindestens zwölf Stunden) bei 4 °C in dem Primärantikörper Sheep-anti-TH (Verdünnung 1:1500) bei Bewegung inkubiert. Nach dem Auswaschen des Primärantikörpers (dreimalig für je zehn Minuten in PBS) wurden sie für drei Stunden bei RT unter Bewegung in dem Sekundärantikörper Alexa Fluor™ 568 donkey-anti-sheep inkubiert, der anschließend ebenfalls ausgewaschen wurde. Im Umgang mit dem Sekundärantikörper wurde stets auf dunkles Arbeiten geachtet.

Die Schnitte wurden innerhalb eines Tages mithilfe von Mounting Medium auf Objektträger montiert. Vor und nach dem Montieren wurden sie im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

2.3.2 Fluoreszenzmikroskopie und Stereologie

Zur Quantifizierung der dopaminergen Neurone in der SN wurde ein Leica Fluoreszenzmikroskop (10x Objektiv) und das Programm Stereo Investigator (MicroBrightField Inc., USA) mit der Optical Fractionator Methode genutzt (siehe Abb. 7). Die Anzahl der Neurone in der SN wurde mithilfe der folgenden Formel berechnet:

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

Hierbei ist Q die Anzahl der gezählten Zellen, t die Dicke des Schnittes, h die Dicke des Zählbereiches, asf (area sampling fraction) der Anteil des Zählbereiches an dem Gesamtbereich der Stichprobe und ssf (section sampling fraction) der Anteil der Stichproben an dem Gesamtbereich. [129]

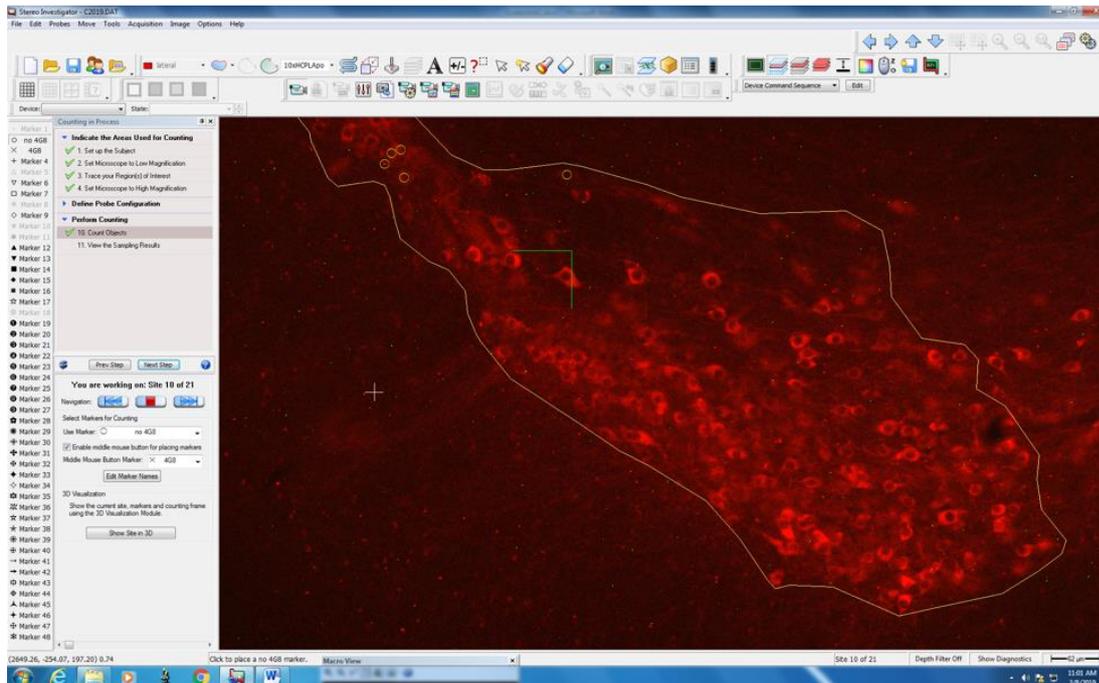


Abb. 9: Bildschirmfoto Stereo Investigator. Die Abbildung zeigt ein Bildschirmfoto während der Arbeit mit dem Programm Stereo Investigator. Es erscheint an beispielhaften Stellen ein Viereck, innerhalb dessen die dopaminergen Neurone markiert werden müssen. Anschließend wird daraus die Anzahl der dopaminergen Neurone in der gesamten SN berechnet, die zuvor manuell eingegrenzt werden muss (eigene Darstellung).

2.4 Statistische Analyse

Zur Auswertung der histologischen Daten wurde für die Zeitpunkte zwei Monate sowie vier Monate Behandlungsdauer ein paarweiser Vergleich der Behandlungsgruppen bezüglich der Zellzahl mittels einseitigem t-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Somit wurde innerhalb der Genlinien die Behandlungs- mit der Kontrollgruppe für die jeweilige Behandlungsdauer verglichen.

Für die Analyse der motorischen Fähigkeiten mittels Rotarod-Tests wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse für die Faktoren Behandlungsdauer sowie Behandlung mit anschließender post-hoc-Analyse mit Dunnett-Korrektur durchgeführt. Dabei wurden die Werte für jeden Zeitpunkt paarweise mit der Baseline (Messung der Laufleistung vor Behandlungsbeginn) verglichen.

Es wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ und ein Konfidenzintervall von 95 % festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Immunhistochemie

Zur Beurteilung des Krankheitsfortschritts wurde die Zellzahl der dopaminergen Neurone in der SN betrachtet. Die ermittelten Zellzahlen der mit Rotenon behandelten Tiere wurden mit denen der zugehörigen Kontrollgruppe für die gleiche Behandlungsdauer innerhalb der Genlinien mittels einseitigem t-Test für unverbundene Stichproben verglichen.

Für das festgelegte Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ konnte außer in der Gruppe LRRK2-KO, vier Monate Behandlung, in keiner der Gruppen ein signifikanter Unterschied zwischen den Zellzahlen ermittelt werden. Die durchschnittliche Anzahl der dopaminergen Neurone in der SN war jedoch bei den Rotenon-behandelten Tieren zu beiden Zeitpunkten in allen Gruppen geringer als in der jeweiligen Kontrollgruppe (siehe Abb. 8 und Abb. 9).

Im Folgenden sind die Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) sowie die P-Werte für jede Gruppe angegeben. Tabelle 3 zeigt einen Überblick über die jeweiligen p-Werte des t-Tests.

3.1.1 Wildtyp

Die Analyse der Zellzahlen der Tiere vom Wildtyp ergab sowohl für zwei (Kontrolle 12008 ± 1490 ; Rotenon 10162 ± 1324 ; $p = 0,188$) als auch für vier Monate Behandlungsdauer (Kontrolle 12473 ± 833 ; Rotenon 10098 ± 1071 ; $p = 0,062$) keinen signifikanten Unterschied zwischen Rotenon-Behandlung und Kontrolle. Wie in Abb. 8 dargestellt, ist die durchschnittliche Anzahl der dopaminergen Neurone in der SNc bei den mit Rotenon behandelten Tieren geringer als in den Kontrollgruppen, sowohl nach zwei als auch nach vier Monaten Behandlungsdauer.

3.1.2 LRRK2

Die Anzahl der Zellen in der SNc für die Rotenon-behandelten Tiere der LRRK2-Linie unterschied sich nach zwei Monaten Behandlung noch nicht signifikant von denen der Kontrollgruppe (Kontrolle 11549 ± 1173 ; Rotenon 9179 ± 1306 ; $p = 0,103$). Nach vier Monaten Behandlung (Kontrolle 12972 ± 907 ; Rotenon 10452 ± 944 ; $p = 0,044$) war der Unterschied statistisch signifikant (siehe Abb. 8).

3.1.3 PINK1

Auch in der PINK1 KO-Linie konnte nach zwei (Kontrolle 13918 ± 1001 ; Rotenon 11943 ± 870 ; $p = 0,105$) und vier Monaten Behandlung (Kontrolle 12724 ± 744 ; Rotenon 11796 ± 564 ; $p = 0,172$) kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden, obwohl wie in den anderen Gruppen die durchschnittliche Zellzahl der Rotenon-behandelten Versuchstiere geringer war als die der jeweiligen Kontrollgruppe (siehe Abb. 8).

Tab. 3: *p*-Werte des *t*-Tests der Immunhistochemie

Behandlungsdauer	Genlinie		
	Wildtyp	LRRK2	PINK1
2 Monate	$p = 0,188$	$p = 0,103$	$p = 0,105$
4 Monate	$p = 0,062$	* $p = 0,044$	$p = 0,172$

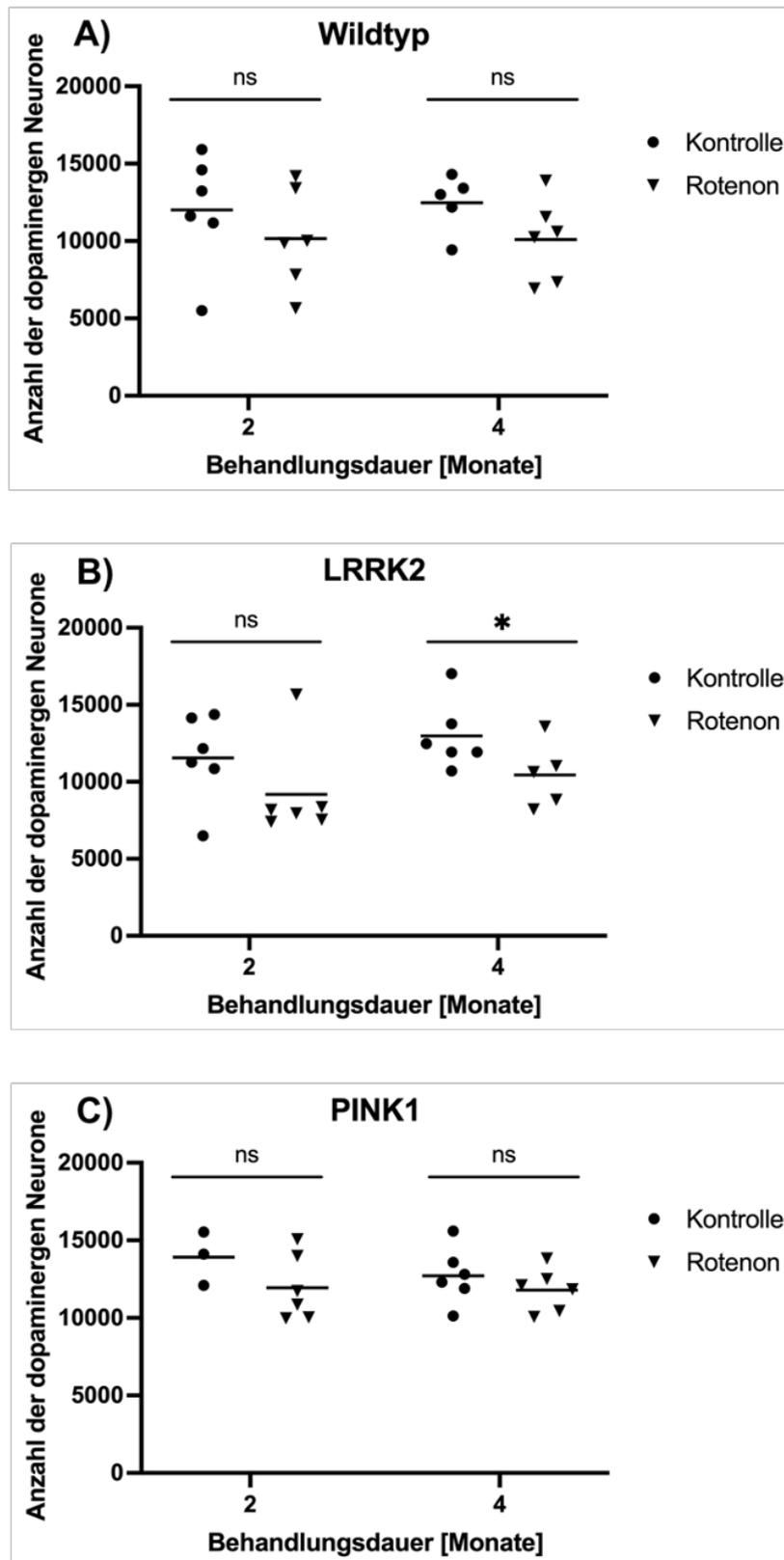


Abb. 10: Anzahl der dopaminergen Neurone in der SNc nach zwei und vier Monaten Behandlung für die Genlinien A) Wildtyp, B) LRRK2 und C) PINK1. Zu sehen ist jeweils der Vergleich zwischen Rotenon- und Kontrollgruppe nach zwei und vier Monaten Behandlung. Jeder Punkt entspricht der Zellzahl einer Maus, die Linie markiert den Mittelwert der Gruppe. Zu beiden Zeitpunkten fallen die durchschnittlichen Zellzahlen der Rotenon-behandelten Versuchstiere geringer aus als in der Kontrollgruppe. In der LRRK2-Linie war der Unterschied zwischen Rotenon- und Kontrollgruppe nach vier Monaten Behandlung statistisch signifikant (eigene Darstellung).

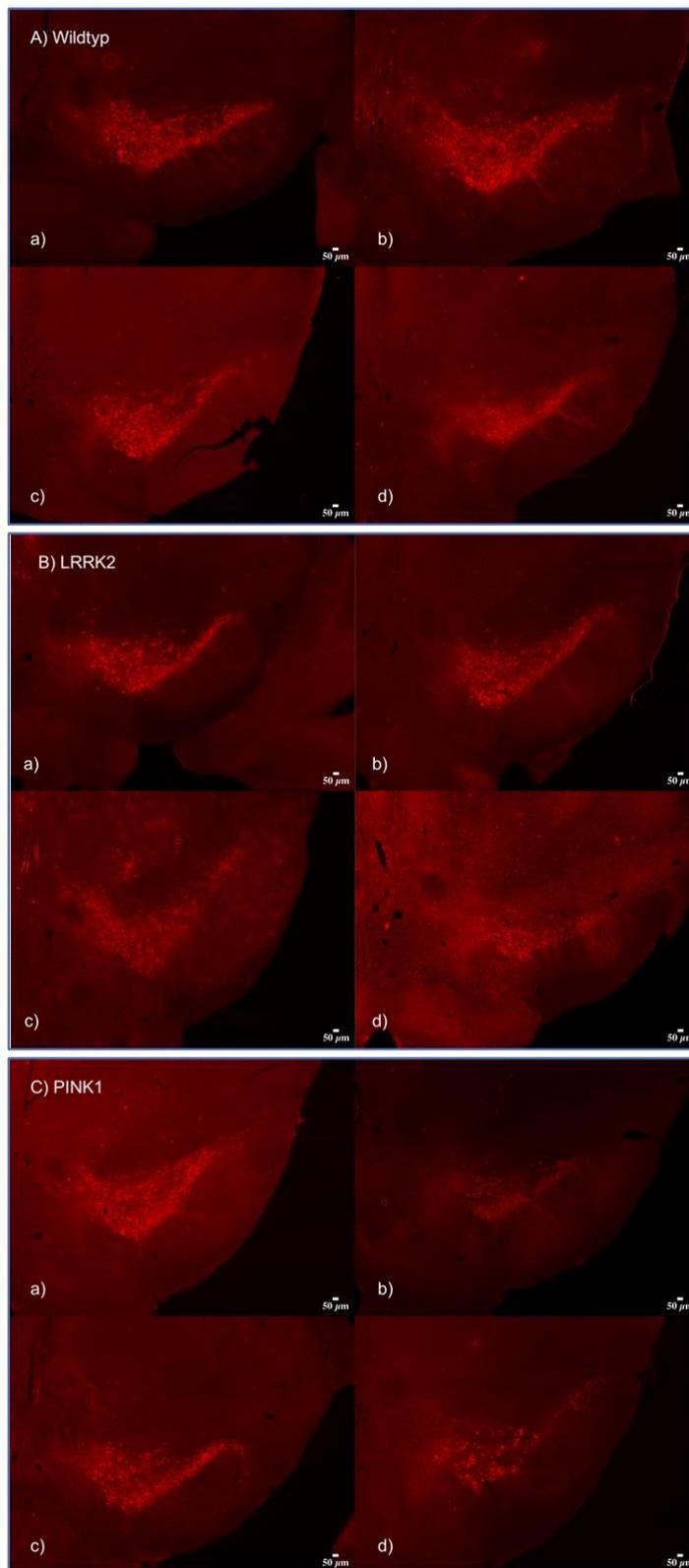


Abb. 11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Mäusegehirne nach immunhistochemischer Färbung der dopaminergen Neurone. Verwendet wurden der Primärantikörper sheep-anti-TH sowie der Sekundärantikörper Alexa Fluor™ 568 donkey-anti-sheep. Zu sehen sind pro Genlinie (A) Wildtyp, B) LRRK2, C) PINK1) jeweils vier Aufnahmen von Gehirnen mit angeschnittener SN, die stellvertretend für die Behandlungsgruppen a) zwei Monate Kontrolle, b) vier Monate Kontrolle, c) zwei Monate Rotenon und d) vier Monate Rotenon stehen. Die Rotenon-behandelten Versuchstiere zeigen in allen Genlinien eine geringere Dichte an angefärbten Neuronen als die Tiere der jeweiligen Kontrollgruppe (eigene Darstellung).

3.2 Ergebnisse des Rotarod-Versuchs

Für die Berechnung der ANOVA sowie der post-hoc-Analyse wurden die absoluten Werte für die Laufleistung in Sekunden verwendet. Zum besseren Verständnis und für eine übersichtlichere Darstellung wurden die Werte anschließend normiert, indem die Differenz zur Baseline-Messung (vor Beginn der Behandlung) der jeweiligen Maus berechnet wurde. Somit zeigen die Werte nur die Veränderung der Leistung im Lauf der Zeit, ohne die individuellen Unterschiede der Laufleistung zu beachten, die unabhängig von der Behandlung vorlagen.

Abb. 10 zeigt für alle Genlinien eine Übersicht der Laufleistung mit normierten Werten im Verlauf, während Abb. 11 die absolute Laufleistung der einzelnen Mäuse ohne Normierung zeigt.

Im Folgenden werden die Mittelwerte der normierten Laufleistung mit der zugehörigen Standardabweichung angegeben, wie auch die F- und p-Werte der ANOVA. Im Fall eines statistisch signifikanten Ergebnisses der ANOVA werden zusätzlich auch die p-Werte für die post-hoc-Analyse nach Dunnett genannt.

3.2.1 Wildtyp

Für die Tiere der Wildtyp-Gruppe konnte beobachtet werden, dass zunächst sowohl Kontroll- als auch Behandlungsgruppen ihre Laufzeiten im Durchschnitt verlängerten. Der größte Anstieg ist hierbei sowohl bei den behandelten als auch bei den nicht behandelten Tieren innerhalb des ersten Behandlungsmonates zu sehen (Kontrolle $22,7 \pm 28,4$ s; Rotenon $13,3 \pm 18,8$ s).

Anschließend blieben die Durchschnittswerte der Rotenon-Gruppe über zwei Monate fast unverändert (2 Monate $11,9 \pm 22,4$ s; 3 Monate $14,6 \pm 34,0$ s), bei der Kontrollgruppe ist über beide Monate ein leichter Anstieg zu sehen (2 Monate $26,9 \pm 29,4$ s; 3 Monate $30,2 \pm 35,6$ s). Nach vier Monaten Behandlung sind die Durchschnittswerte beider Gruppen fast wieder bis zur Baseline gefallen (Kontrolle $4,6 \pm 22,6$ s; Rotenon $1,6 \pm 31,9$ s). Der Unterschied zum vorherigen Monat ist hier in der Kontrollgruppe größer als in der Rotenon-Gruppe. Der Verlauf der Laufleistung beider Gruppen ist in Abb. 10 und Abb. 11 dargestellt.

In einer zweifaktoriellen ANOVA für wiederholte Messungen wurde für die Tiere vom Wildtyp keine statistisch signifikante Interaktion zwischen Behandlungsart und Behandlungsdauer gemessen (1–2 Monate: $F(2, 42) = 1,22$; $p = 0,305$; 3–4 Monate: $F(2, 18) = 0,50$; $p = 0,613$).

Für den Haupteffekt „Behandlung“ zeigte sich, dass sich die durchschnittliche Laufzeit zwischen Rotenon-behandelten Tieren und Tieren der Kontrollgruppe nicht statistisch signifikant unterschied (1–2 Monate: $F(1, 21) = 0,42$; $p = 0,525$; 3–4 Monate: $F(1, 9) < 0,01$; $p = 0,990$).

Für den Effekt der Behandlungsdauer ergab die ANOVA für die Behandlungsdauer von 1–2 Monaten einen statistisch signifikanten Unterschied ($F(1.83, 38,07) = 9,98$; $p = 0,001$), nicht jedoch für die Behandlungsdauer von 3–4 Monaten ($F(1.27, 11.41) = 4,31$; $p = 0,054$).

Daher wurde im Anschluss für die Messzeitpunkte 1 und zwei Monate eine post-hoc-Analyse mit Dunnett-Korrektur durchgeführt. Diese zeigte statistisch signifikante Unterschiede der Laufzeiten sowohl nach einem ($p = 0,043$) als auch nach zwei Monaten ($p = 0,023$) für die Tiere der Kontrollgruppe. Für die Rotenon-behandelten Tiere unterschieden sich die Laufzeiten weder nach einem ($p = 0,058$) noch nach zwei Monaten ($p = 0,158$) statistisch signifikant im Vergleich zur Baseline-Messung (Tab. 4 zeigt die zugehörigen p-Werte, mittleren Differenzen sowie die 95 %-Konfidenzintervalle).

Tab. 4: Wildtyp Post-hoc-Analyse des Rotarod-Tests

Wildtyp				
Behandlung	Behandlungsdauer	Adjustierter p-Wert	95 %-Konfidenzintervall	Mittlere Differenz
Kontrolle	1 Monat	* 0,043	[-44,6; -0,7]	-22,7
	2 Monate	* 0,023	[-49,7; -4,2]	-26,9
	3 Monate	0,211	[-82,8; 22,5]	-30,2
	4 Monate	0,865	[-38,1; 28,8]	-4,6
Rotenon	1 Monat	0,058	[-27,1; 0,4]	-13,3
	2 Monate	0,158	[-28,3; 4,4]	-11,9
	3 Monate	0,518	[-56,7; 27,5]	-14,6
	4 Monate	0,989	[-41,0; 37,8]	-1,6

3.2.2 LRRK2

Die Laufzeiten der LRRK2-Tiere zeigen einen ähnlichen Verlauf wie die der Wildtyp-Tiere. Auch hier steigen die durchschnittlichen Laufzeiten der Tiere beider Behandlungsgruppen innerhalb des ersten Monats im Vergleich zur Baseline am stärksten an (Kontrolle $16,8 \pm 26,9$ s; Rotenon $18,7 \pm 21,7$ s). Anschließend bleiben die Laufzeiten der Rotenon-behandelten Tiere bis zur Testung nach drei Monaten Behandlung annähernd konstant (2 Monate $19,8 \pm 24,3$ s; 3 Monate $18,6 \pm 27,7$ s), die Kontrollgruppe zeigt auch hier einen

geringen Anstieg über beide Monate (2 Monate $20,9 \pm 26,2$ s; 3 Monate $22,5 \pm 17,4$ s). Bis zur letzten Messung nach vier Monaten Behandlung fallen die Durchschnittswerte in beiden Gruppen ungefähr gleich stark ab (Kontrolle $14,4 \pm 17,1$ s; Rotenon $10,4 \pm 25,0$ s; siehe Abb. 10).

Für die LRRK2-Gruppe wurde keine statistisch signifikante Interaktion zwischen der Behandlung und der Behandlungsdauer errechnet (1–2 Monate: $F(2, 42) = 0,05$, $p = 0,95$; 3–4 Monate: $F(2, 18) < 0,01$; $p = 0,998$).

Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den durchschnittlichen Laufzeiten der mit Rotenon behandelten Tiere und der Tiere der Kontrollgruppe (1–2 Monate: $F(1, 21) = 0,88$, $p = 0,360$; 3–4 Monate: $F(1, 9) = 0,65$, $p = 0,440$).

Für den zweiten Haupteffekt Behandlungsdauer zeigte sich sowohl bei der Behandlungsdauer von 1–2 Monaten ($F(1,92, 40,39) = 9,94$, $p < 0,001$) als auch von 3–4 Monaten ($F(1,84, 16,56) = 5,43$, $p = 0,017$) ein statistisch signifikanter Unterschied. Um zu ermitteln, zu welchen Messzeitpunkten im Vergleich zur Baseline-Messung ein statistisch signifikanter Unterschied bestand, wurde hier ein paarweiser Test mittels post-hoc-Analyse mit Dunnett-Korrektur vorgenommen.

Hierbei zeigte sich für die Rotenon-behandelten Tiere ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Baseline-Messung für die Messzeitpunkte ein ($p = 0,031$) und zwei Monate ($p = 0,040$), nach drei ($p = 0,778$) und vier Monaten ($p = 0,147$) nicht mehr. Für die Kontrollgruppe war der Unterschied nur nach zwei Monaten Behandlung ($p = 0,033$) statistisch signifikant (1 Monat $p = 0,094$; 3 Monate $p = 0,779$; 4 Monate $p = 0,184$).

In Tabelle 5 sind die p-Werte, die mittleren Differenzen sowie die 95 %-Konfidenzintervalle angegeben.

Tab. 5: LRRK2 Post-hoc-Analyse des Rotarod-Tests

LRRK2				
Behandlung	Behandlungsdauer	Adjustierter p-Wert	95 %-Konfidenzintervall	Mittlere Differenz
Kontrolle	1 Monat	0,094	[-36,4; 2,9]	-16,8
	2 Monate	* 0,033	[-40,1; -1,8]	-20,9
	3 Monate	0,779	[-9,2; 13,9]	2,3
	4 Monate	0,184	[-6,0; 27,0]	10,5
Rotenon	1 Monat	* 0,031	[-35,6; -1,9]	-18,7
	2 Monate	* 0,040	[-38,6; -1,0]	-19,8
	3 Monate	0,778	[-11,6; 16,9]	2,6
	4 Monate	0,147	[-5,3; 27,0]	10,9

3.2.3 PINK1

Bei den PINK1-Gruppen steigen ähnlich wie bei den anderen Genlinien die Laufzeiten im ersten Monat der Behandlung an (Kontrolle $17,5 \pm 15,4$ s; Rotenon $13,1 \pm 16,5$ s), bis zur Messung nach zwei Monaten zeigen beide Gruppen weiterhin einen leichten Anstieg (Kontrolle $20,9 \pm 9,8$ s; Rotenon $18,7 \pm 15,7$ s). Die mit Rotenon behandelten Tiere verzeichnen dann weiterhin für einen Monat einen leichten Anstieg ($21,1 \pm 11,5$ s), erst innerhalb des letzten Monats fallen die Werte leicht ab ($13,8 \pm 13,9$ s). Die durchschnittlichen Laufzeiten der Kontrollgruppe nehmen bereits ab einer Behandlungsdauer von zwei Monaten kontinuierlich ab (3 Monate $11,6 \pm 28,6$ s), bis sie sich bei der letzten Messung wieder der Baseline nähern ($0,9 \pm 26,1$ s; siehe Abb. 10).

Auch bei den Tieren der PINK1-Gruppe zeigte die ANOVA mit Messwiederholung keine statistisch signifikante Interaktion zwischen den Hauptfaktoren Behandlungsart und -dauer (1–2 Monate: $F(2, 38) = 0,19$, $p = 0,824$; 3–4 Monate: $F(2, 20) = 0,78$, $p = 0,472$).

Die Rotenon-behandelten Tiere zeigten im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe statistisch signifikant unterschiedliche Laufzeiten für eine Behandlungsdauer von 1–2 Monaten ($F(1, 19) = 5,75$, $p = 0,027$), nicht aber für die späteren Messungen nach 3–4 Monaten ($F(1, 10) = 0,06$, $p = 0,810$).

Der Faktor der Behandlungsdauer ergab sowohl für die Messzeitpunkte 1–2 ($F(1,81, 34,30) = 17,26$, $p < 0,001$) sowie 3–4 Monate ($F(1,39, 13,85) = 4,68$, $p = 0,039$) statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Rotenon- und Kontrollgruppen.

Die post-hoc-Analyse mit Dunnett-Korrektur ergab statistisch signifikante Unterschiede für die Messzeitpunkte einen ($p = 0,034$), zwei ($p = 0,003$) und drei ($p = 0,011$) Monate bei den mit Rotenon behandelten Versuchstieren sowie für die Messzeitpunkte einen ($p = 0,017$) und zwei Monate ($p < 0,001$) bei den Tieren der Kontrollgruppe, nicht aber für drei ($p = 0,550$) und vier Monate ($p = 0,995$). Tabelle 6 zeigt einen Überblick über die p-Werte der post-hoc-Analyse inklusive der mittleren Differenzen und der 95 %-Konfidenzintervalle.

Tab. 6: Post-hoc-Analyse des Rotarod-Tests

PINK1				
Behandlung	Behandlungsdauer	Adjustierter p-Wert	95 %-Konfidenzintervall	Mittlere Differenz
Kontrolle	1 Monat	* 0,017	[-31,2; -3,8]	-17,5
	2 Monate	* < 0,001	[-29,7; -12,2]	-20,9
	3 Monate	0,550	[-47,0; 23,8]	-11,6
	4 Monate	0,995	[-33,3; 31,4]	-0,9
Rotenon	1 Monat	* 0,034	[-25,1; -1,0]	-13,1
	2 Monate	* 0,003	[-30,1; -7,2]	-18,7
	3 Monate	* 0,011	[-35,3; -6,9]	-21,1
	4 Monate	0,100	[-31,0; 3,4]	-13,8

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Verlauf der Laufleistung bei allen Genlinien vergleichbar ist. Bei jeweils beiden Behandlungsgruppen aller Genlinien fand ein Anstieg der Laufzeiten innerhalb des ersten und ein Abfall innerhalb des letzten Monats der Behandlung statt. Mit Ausnahme von einer Gruppe (PINK1 KO, Kontrolle) blieben die Werte zwischen dem ersten und dritten Behandlungsmonat entweder konstant oder zeigten einen leichten Anstieg.

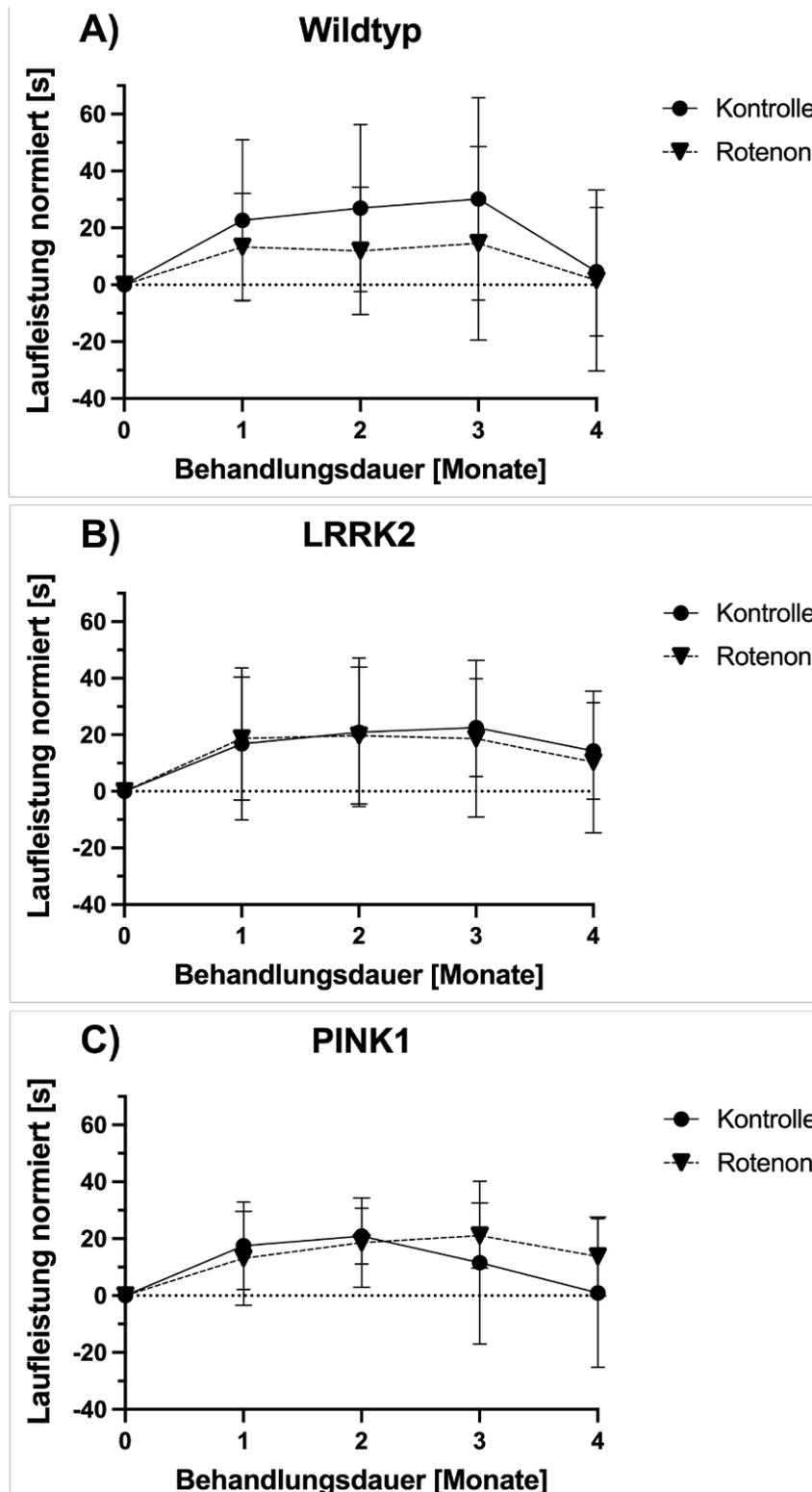


Abb. 12: Relative Laufleistung der Rotenon-behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe über die Behandlungsdauer. Gezeigt ist die durchschnittliche Laufleistung der Tiere in Abhängigkeit der Behandlungszeit für die Genlinien A) Wildtyp, B) LRRK2 und C) PINK1. Die Messwerte wurden durch Differenz zur Baseline-Messung der zugehörigen Maus normiert, um individuelle Unterschiede auszublenden. Bis zur ersten Messung nach einem Monat zeigt die Laufleistung in allen Gruppen die höchste Steigerung. Anschließend kann bis nach drei Monaten entweder ein leichter Anstieg oder ein Stagnieren beobachtet werden, nur in der PINK1-Kontrollgruppe nimmt die Leistung bereits nach zwei Monaten Behandlung ab. Nach drei Monaten Behandlung fällt die Laufleistung in allen Gruppen unterschiedlich stark ab (eigene Darstellung).

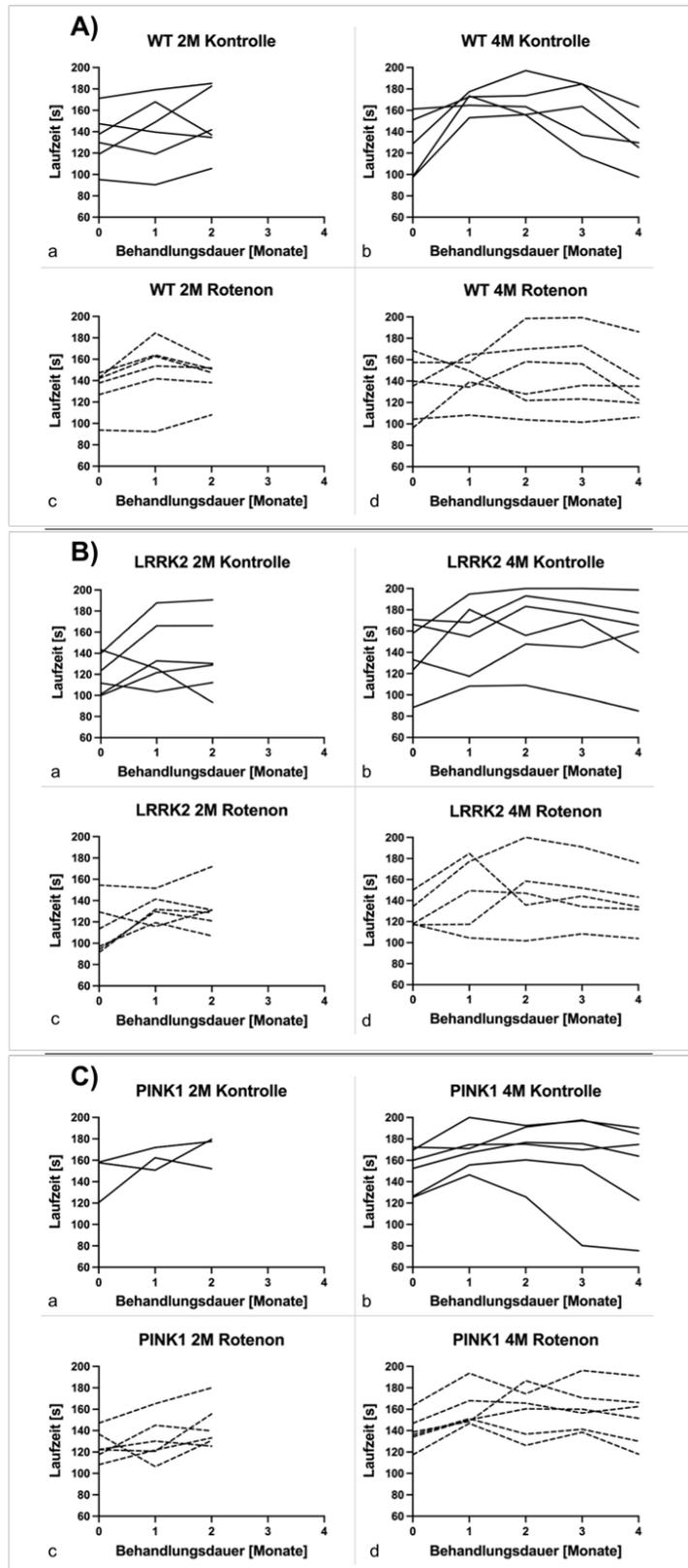


Abb. 13: Absolute Laufleistung der Versuchstiere in Abhängigkeit der Behandlungsdauer. Zu sehen ist die Laufleistung der einzelnen Versuchstiere im Verlauf der Behandlungsdauer. Jede Linie repräsentiert eine Maus, es werden die Genlinien A) Wildtyp, B) LRRK2 und C) PINK1 mit den Behandlungsgruppen a) zwei Monate Kontrolle, b) vier Monate Kontrolle, c) zwei Monate Rotenon und d) vier Monate Rotenon betrachtet. Trotz individueller Unterschiede ist der überwiegende Anstieg der Laufleistung innerhalb des ersten Monats sowie der Abfall nach drei Monaten Behandlungsdauer in fast allen Gruppen erkennbar (eigene Darstellung).

4 Diskussion

4.1 Immunhistochemie

4.1.1 Orale Rotenon-Gabe führt zu Neurodegeneration in der SNc

Obwohl die statistische Analyse der histologischen Daten mit Ausnahme einer Gruppe keine signifikanten Unterschiede zwischen den Rotenon- und Kontrollgruppen ergab, war die durchschnittliche Anzahl der dopaminergen Neurone in allen Rotenon-behandelten Gruppen niedriger als in den zugehörigen Kontrollgruppen. Diese Ergebnisse decken sich mit vorherigen Studien, die zeigten, dass die orale Rotenon-Exposition mit der typischen Parkinson-Pathologie in Form von einem Verlust der dopaminergen Neurone einhergeht. [71, 75]

In Tiermodellen mit intravenöser oder subkutaner anstatt von oraler Gabe von Rotenon wurden dagegen vereinzelt keine neuropathologischen Veränderungen, sondern nur das Auftreten von klinischen Symptomen beschrieben. [130, 131] Das Fehlen neuropathologischer Veränderungen könnte mit den anderen Formen der Exposition zusammenhängen und unterstützt die These der transsynaptischen Ausbreitung der pathologischen Veränderungen als Folge von oraler Aufnahme von Umwelttoxinen wie Rotenon. [79]

4.1.2 LRRK2-Mutation führt zu erhöhter Sensibilität gegenüber Rotenon-Exposition

Am deutlichsten war der neurotoxische Effekt der Rotenon-Behandlung bei den LRRK2-Tieren, hier war der Unterschied der durchschnittlichen Zellzahl zur Kontrollgruppe nach vier Monaten Behandlung statistisch signifikant ($p = 0,044^*$).

In der Gruppe der zwei Monate mit Rotenon behandelten Mäuse liegt die Zellzahl einer einzelnen Maus deutlich (Zellzahl = 15666) über denen der restlichen Mäuse (Mittelwert LRRK2 2M Rotenon = 9179). Da es aber keinen Hinweis darauf gibt, dass ein Fehler in der Behandlung oder Methode vorliegt, wird der Wert nicht als Ausreißer betrachtet und in die Auswertung mit einbezogen, obwohl er mehr als zwei Standardabweichungen vom Mittelwert der Gruppe abweicht. Ohne diesen Wert wäre der Unterschied zwischen Rotenon- und Kontrollgruppe auch bei zwei Monaten schon signifikant gewesen ($p = 0,010^*$).

Dass die Rotenon-Behandlung bei den LRRK2-Tieren den stärksten Effekt hat, zeigt darauf hin, dass Tiere mit LRRK2-Mutation anfälliger für eine Rotenon-Exposition sind als Tiere vom Wildtyp oder mit PINK1-KO. Möglicherweise ist der Effekt mit mehr Tieren pro Gruppe noch besser zu sehen. So könnte auch geklärt werden, ob der Effekt schon

nach zwei Monaten Behandlung messbar ist oder nicht. Wenn ja, würde das sogar auf eine noch stärkere Interaktion als erwartet hinweisen. Ansonsten wären die Ergebnisse auch passend zu vorherigen Studien, nach denen die neuropathologischen Veränderungen erst nach drei Monaten das ZNS erreichen. [75] Darüber hinaus wurde für die G2019S-LRRK2-Mutation bereits gezeigt, dass sie zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber dem Rotenon funktionell sehr ähnlichen MPTP führt. [124]

Außerdem spricht für die erhöhte Anfälligkeit bei LRRK2-Tieren, dass die Tiere mit 24 Wochen bei Behandlungsstart relativ jung waren und die Rotenon-Behandlung trotzdem die Parkinson-typische Pathologie zur Folge hatte. Vom Menschen ist bekannt, dass das Alter bei Parkinson-Syndromen eine wichtige Rolle spielt und vor allem Patienten mit einem Alter über 65 Jahren betroffen sind. [4] Während bei einem Jahr alten Mäusen der schädliche Effekt der Rotenon-Behandlung bekannt ist, [75, 132] zeigen die vorliegenden Ergebnisse aufgrund des Effektes schon bei erst sechs Monate alten Mäusen auf eine erhöhte Anfälligkeit hin. Das junge Alter der Versuchstiere könnte außerdem der Grund dafür sein, dass bei den Mäusen vom Wildtyp kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen messbar war.

4.1.3 Keine Gen-Umwelt-Interaktion zwischen PINK1-KO und Rotenon

Obwohl die durchschnittlichen Zellzahlen der mit Rotenon behandelten Tiere zu beiden Messzeitpunkten niedriger waren als die der Kontrollgruppe, konnte bei den Tieren mit PINK1-KO weder nach zwei noch nach vier Monaten Behandlung ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Daher weisen die vorliegenden Daten darauf hin, dass bei Individuen in diesem Alter mit PINK1-KO keine erhöhte Anfälligkeit für eine Rotenon-Exposition besteht.

Da sowohl Rotenon als auch PINK1 den mitochondrialen Komplex I der Atmungskette beeinträchtigen, wäre es möglich, dass bei PINK1-KO oder Mutation bereits Kompensationsmechanismen vorliegen, die den Rotenon-Effekt ausgleichen können. Eine weitere Möglichkeit ist, dass bei Fehlen oder Dysfunktion des PINK1-Proteins die mitochondriale Komplex I Funktion so stark beeinträchtigt sein könnte, dass die Exposition gegenüber Rotenon keinen schädigenden Effekt mehr hat. Zumindest ist bekannt, dass das intakte PINK1-Protein die mitochondriale Funktion unterstützt, wenn diese durch Rotenon beeinträchtigt wurde. [133] Außerdem wurde in Zellkulturen beobachtet, dass die Expression von PINK1 gegen Zelluntergang dopaminerger Neurone schützen kann, die MPTP ausgesetzt waren. [134] Eine Überexpression des Gens schützt die Zellen außerdem gegen mitochondriale Toxine wie Staurosporin, MPTP und Rotenon. [135] Passend dazu konnten andere Untersuchungen an Zellkulturen zeigen, dass dopaminerge Neurone bei

Exposition gegenüber MPTP und Rotenon eher degenerieren, wenn die Konzentration des PINK1-Proteins verringert wird. Dies deutet auf eine protektive Funktion von intaktem PINK1 in dopaminergen Neuronen hin. [136] Im Umkehrschluss könnte das Fehlen des Proteins somit zu einem stark dysfunktionalen Komplex I, womöglich sogar mit Kompensationsmechanismen führen, sodass die Rotenon-Gabe keinen Effekt mehr zur Folge haben kann.

4.2 Rotarod-Versuch

4.2.1 Orale Rotenon-Gabe führt zu motorischen Parkinson-Symptomen

Bei Betrachtung der Rotarod-Daten fällt auf, dass zwischen Rotenon- und Kontrollgruppen nur minimale Unterschiede bestehen. Insgesamt kann in allen Gruppen ein Anstieg der Laufleistung innerhalb des ersten Monats beobachtet werden, der am ehesten auf einen Trainingseffekt zurückzuführen ist. Im letzten Behandlungsmonat fallen dagegen die Laufleistungen in allen Gruppen, was wahrscheinlich ein Zeichen des höheren Alters der Versuchstiere darstellt. Da sich aber auch ansonsten die Laufleistungen der mit Rotenon behandelten Tiere kaum von denen der Kontrollgruppen unterscheidet, stellt sich die Frage, ob eine orale Rotenon-Gabe überhaupt motorische Symptome auslösen kann. Da die Datenlage aber überwiegend dafür spricht, [71, 73] liegt es näher, dass die vorliegenden Daten aufgrund von Schwachpunkten, die weiter unten (siehe Punkt 4.3) genannt werden, kein repräsentatives Bild zeigen.

4.2.2 Bei PINK1-KO führt Rotenon-Exposition nicht zu motorischen Symptomen

Bei den Tieren mit PINK1-KO scheint Rotenon wie bei den neuropathologischen Veränderungen auch auf die motorischen Fähigkeiten nicht den erwarteten Effekt zu haben. Hier zeigen die Laufleistungen der mit Rotenon behandelten Tiere sogar einen kontinuierlichen leichten Anstieg, bis sie wie in allen anderen Gruppen im letzten Monat abfallen (siehe Abb. 10). Diese Beobachtung passt wiederum zu der Hypothese, dass PINK1-KO-Individuen durch Rotenon-Exposition nicht beeinträchtigt werden, da sehr ähnliche Pathomechanismen vorliegen und daher womöglich bestehende Kompensationsmechanismen den schädigenden Rotenon-Effekt verhindern. Eine weitere Erklärung ist, dass bei PINK1-KO die Progression der motorischen Symptome im Vergleich zu sporadischen Formen ohnehin nur eine untergeordnete Rolle spielt und sie aufgrund der geringen Ausprägung nicht messbar war. [53]

4.2.3 Klinische und pathologische Parkinson-Merkmale stimmen nicht immer überein

Am weitesten auseinander liegen die durchschnittlichen Laufzeiten der Tiere der Rotenon- und Kontrollgruppen bei der Wildtyp-Linie, wobei die durchschnittliche Laufleistung der Kontrollgruppe immer über der der Rotenon-behandelten liegt (siehe Abb. 10). Dies ist insofern überraschend, als dass es sich nicht mit den Ergebnissen aus der Immunhistochemie deckt, bei der der größte Unterschied in der LRRK2-Linie festgestellt wurde. Eine mögliche Ursache dafür ist, dass die motorischen Symptome bei den genetischen PS-Formen insgesamt eine andere Ausprägung haben als bei Wildtyp-Tieren. [39, 53] Andererseits wurde auch schon an anderer Stelle beschrieben, dass die klinischen Symptome bei Rotenon-induzierten PS nicht immer mit pathologischen Merkmalen übereinstimmen, sondern diese auch ohne die typische Parkinson-Pathologie vorliegen können. [131]

4.3 Schwachpunkte

Wie bei jeder wissenschaftlichen Untersuchung bestehen auch für die vorliegenden Ergebnisse Schwachpunkte, die die Übertragbarkeit auf größere Populationen einschränken.

Dazu gehört zum einen die erniedrigte Rotenon-Konzentration, der die Versuchstiere exponiert wurden. Um die geplante Konzentration von 5 mg/kg Körpergewicht zu erreichen, wurde den Mäusen mit einem erwarteten Körpergewicht von 25 g jeweils 0,125 mg Rotenon verabreicht. Da die Mäuse im Lauf des Versuchs aber ein höheres Körpergewicht von 30 g erreichten, sinkt die verabreichte Konzentration damit auf 4,2 mg/kg. Dadurch könnte der neurotoxische Effekt von Rotenon abgeschwächt worden sein.

Weiterhin wurden mit dem für diese Versuche genutzten Rotarod-Gerät insgesamt deutlich höhere Laufzeiten gemessen als mit dem bisher im Institut genutzten Gerät (Vorgänger-Modell des gleichen Herstellers), das kurz vor Versuchsbeginn defektbedingt ausgetauscht werden musste. Das könnte an der strukturierten Beschichtung der Walze des Gerätes liegen (siehe Abb. 12), die den Mäusen ein Festhalten ermöglichte und die Methode damit weniger sensitiv macht.

Eine weitere Einschränkung stellt der geringe Stichprobenumfang dar, der trotz anderer Planung durch einen Berechnungsfehler entstand. Um aussagekräftige und übertragbare Ergebnisse zu produzieren, müssten die Versuche an einer größeren Stichprobe wiederholt werden.

Zuletzt bleibt wie bei allen Tiermodellen die Frage der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen offen.



Abb. 14: Rotarod Walze mit strukturierter Oberfläche. Das Foto zeigt eine Walze aus dem Rotarod-Gerät, das für die Versuche genutzt wurde. Zu sehen ist die geriffelte Oberflächenstruktur der Walze, die den Versuchstieren möglicherweise ein Festhalten an der Walze erleichterte und so zu längeren Laufzeiten geführt haben könnte (eigene Darstellung).

4.4 Konklusion

4.4.1 Gen-Umwelt-Interaktion zwischen LRRK2-Mutation und Rotenon wahrscheinlich

Die vorliegenden Ergebnisse weisen auf eine Gen-Umwelt-Interaktion zwischen LRRK2-R1441C-Mutation und Rotenon hin, da die Tiere mit LRRK2-Mutation anfälliger zu sein scheinen als die Tiere der Wildtyp- und PINK1-KO-Linie. Trotz der geringeren Rotenon-Konzentration von 4,2 mg/dl und des überschaubaren Stichprobenumfangs ist der Effekt der Rotenon-Behandlung in Form von Neurodegeneration deutlich sichtbar. Dass der Effekt ohne den einen Wert, der weit vom Mittelwert entfernt liegt, sogar nach nur zwei Monaten Behandlung bei relativ jungen Mäusen statistisch signifikant wäre, unterstützt diese These zusätzlich.

4.4.2 Gen-Umwelt-Interaktion zwischen PINK1-KO und Rotenon durch ähnlichen Pathomechanismus unwahrscheinlich

Für die PINK1-KO-Linie sprechen die vorliegenden Daten eher gegen eine Interaktion mit Rotenon, da sowohl die neuropathologischen als auch die klinischen Effekte nach Rotenon-Behandlung vergleichbar mit den Mäusen vom Wildtyp waren. Obwohl die durchschnittliche Zellzahl der dopaminergen Neurone in der SNc bei den mit Rotenon

behandelten Tieren zu beiden Messzeitpunkten geringer war als in den Kontrollgruppen, war kein statistisch signifikanter Unterschied messbar. Möglicherweise ist der Grund dafür, dass die PINK1-Mutation so wie die Rotenon-Exposition eine ähnliche Pathophysiologie zur Folge haben, nämlich die Dysfunktion des mitochondrialen Komplexes I. Wenn die Funktion des Komplexes I durch Mutation im PINK1-Gen bereits defizitär ist, kann sie durch Rotenon nicht weiter verschlechtert werden; oder aber es existieren bereits Kompensationsmechanismen, die die schädliche Rotenon-Wirkung ausgleichen können. Nicht auszuschließen sind aber auch eine Verschleierung des Effektes durch einen zu geringen Stichprobenumfang oder eine zu geringe Rotenon-Konzentration von weniger als 5 mg/kg Körpergewicht. Um diese Möglichkeit auszuschließen, sind weitere Studien mit mehr Versuchstieren notwendig.

4.4.3 Zunehmende Bedeutung der Prävention bei der Parkinson-Krankheit

Durch den erwarteten Anstieg der Inzidenz der PK [6] erlangt die Frage nach neuen präventiven und therapeutischen Möglichkeiten zukünftig noch mehr Gewicht. Vor allem bei familiär belasteten oder anderweitig prädisponierten Personen können präventive Maßnahmen eine entscheidende Rolle spielen. Eine dieser Maßnahmen könnte auch der Verzehr von Lebensmitteln aus biologischer Landwirtschaft ohne den Einsatz von Pestiziden sein, für die eine Gen-Umwelt-Interaktion belegt ist. Nachfolgende Studien müssen zeigen, ob eine Interaktion zwischen der LRRK2-R1441C-Mutation und Rotenon wiederholbar ist und eventuell auch für andere Parkinson-begünstigende Mutationen und Umweltfaktoren besteht.

4.5 Zusammenfassung

Die Ätiologie der Parkinson-Erkrankung gilt trotz intensiver Forschung bis heute als nicht vollständig geklärt. Mutationen in den Genen LRRK2 und PINK1 gehören ebenso wie das Pestizid Rotenon zu der wachsenden Anzahl nachweislich Parkinson-begünstigender Einflussfaktoren. Doch obwohl inzwischen zahlreiche Autoren von einer multifaktoriellen Genese ausgehen, gibt es bisher nur wenige Untersuchungen zu Gen-Umwelt-Interaktionen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, bestehende Gen-Umwelt-Interaktionen zwischen dem Pestizid Rotenon und den Mutationen LRRK2-R1441C und PINK1-KO zu identifizieren. Dazu wurden Mäuse der LRRK2-, der PINK1- und einer Wildtyp-Linie für zwei oder vier Monate oral mit Rotenon behandelt und jeweils mit einer Kontrollgruppe verglichen. Neuropathologische Veränderungen und motorische Symptome wurden mithilfe

von immunhistochemischen Verfahren und der Laufleistung auf dem Rotarod gemessen, um die Krankheitsprogression zu messen.

Es konnte gezeigt werden, dass die mit Rotenon behandelten Tiere in allen Gruppen durchschnittlich weniger dopaminerge Neurone in der SNc aufweisen als die der Kontrollgruppen. Bei den vier Monate behandelten LRRK2-Mäusen war dieser Unterschied statistisch signifikant. Die Laufleistungen der Versuchstiere verliefen dagegen über alle Genlinien und Behandlungsgruppen hinweg ähnlich.

Die ausgeprägte neuropathologische Auswirkung der Behandlung auf die LRRK2-Tiere spricht für eine erhöhte Anfälligkeit dieser Genlinie gegenüber Rotenon. Ebenfalls darauf hinweisend ist, dass der neurotoxische Effekt bereits bei den vergleichsweise jungen Versuchstieren sichtbar war. Zudem war der Unterschied der Zellzahlen in der LRRK2-Linie bereits nach zwei Monaten Behandlung deutlich sichtbar.

Für die PINK1-Linie scheint eine Gen-Umwelt-Interaktion mit Rotenon unwahrscheinlich, da weder neuropathologische noch klinische Hinweise auf eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Rotenon bestehen. Eine mögliche Erklärung ist die Ähnlichkeit der Pathomechanismen von Rotenon und PINK1-KO. So könnten bestehende Kompensationsmechanismen des dysfunktionalen mitochondrialen Komplex I bei PINK1-KO die Rotenon-Wirkung ausgleichen.

Insgesamt sprechen die vorliegenden Daten somit für eine Interaktion von Rotenon mit der LRRK2-Mutation, nicht jedoch mit der PINK1-Mutation. Zukünftige Studien müssen zeigen, ob die vorliegenden Ergebnisse wiederholbar sind und ob weitere Gen-Umwelt-Interaktionen bestehen. Präventive Ansätze könnten so individuell angewandt werden und prädisponierte Personen vor der Erkrankung schützen.

Literaturverzeichnis

1. Parkinson, J., *An essay on the shaking palsy*. The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences, 2002. **14**(2): p. 223-236.
2. Deuschl, G., W. Oertel, and H. Reichmann, *S3-Leitlinie Idiopathisches Parkinson-Syndrom* 2016, Deutsche Gesellschaft für Neurologie.
3. von Campenhausen, S., et al., *Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe*. Eur Neuropsychopharmacol, 2005. **15**(4): p. 473-90.
4. de Rijk, M.C., et al., *Prevalence of Parkinson's disease in the elderly: the Rotterdam Study*. Neurology, 1995. **45**(12): p. 2143-6.
5. Dorsey, E.R., et al., *Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016*. The Lancet Neurology, 2018. **17**(11): p. 939-953.
6. Dorsey, E.R. and B.R. Bloem, *The Parkinson Pandemic—A Call to Action*. JAMA Neurology, 2018. **75**(1): p. 9-10.
7. Ceballos-Baumann, A., *Idiopathisches Parkinson-Syndrom (IPS)*, in *Klinische Neurologie*, P. Berlit, Editor. 2020, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1293-1324.
8. Takahashi, H. and K. Wakabayashi, *The cellular pathology of Parkinson's disease*. Neuropathology, 2001. **21**(4): p. 315-22.
9. Spillantini, M.G., et al., *Alpha-synuclein in Lewy bodies*. Nature, 1997. **388**(6645): p. 839-40.
10. Baba, M., et al., *Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies*. Am J Pathol, 1998. **152**(4): p. 879-84.
11. Braak, H., et al., *Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology*. Cell Tissue Res, 2004. **318**(1): p. 121-34.
12. Siegenthaler, W. and B. Amann-Vesti, *Klinische Pathophysiologie*. 2006, Stuttgart [u.a.]: Thieme. XLI, 1178 S.
13. Winklhofer, K.F. and C. Haass, *Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1802**(1): p. 29-44.
14. Rocha, E.M., B. De Miranda, and L.H. Sanders, *Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease*. Neurobiol Dis, 2018. **109**(Pt B): p. 249-257.
15. Di Maio, R., et al., *α -Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease*. Sci Transl Med, 2016. **8**(342): p. 342ra78.
16. Ludtmann, M.H., et al., *Monomeric Alpha-Synuclein Exerts a Physiological Role on Brain ATP Synthase*. J Neurosci, 2016. **36**(41): p. 10510-10521.
17. Kamp, F., et al., *Inhibition of mitochondrial fusion by alpha-synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1*. EMBO J, 2010. **29**(20): p. 3571-89.

18. Gasser, T., *Molecular pathogenesis of Parkinson disease: insights from genetic studies*. Expert Rev Mol Med, 2009. **11**: p. e22.
19. Ryan, B.J., et al., *Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease*. Trends Biochem Sci, 2015. **40**(4): p. 200-10.
20. Esteves, A.R., R.H. Swerdlow, and S.M. Cardoso, *LRRK2, a puzzling protein: insights into Parkinson's disease pathogenesis*. Experimental neurology, 2014. **261**: p. 206-216.
21. Usmani, A., F. Shavarebi, and A. Hiniker, *The Cell Biology of LRRK2 in Parkinson's Disease*. Mol Cell Biol, 2021. **41**(5).
22. Higashi, S., et al., *Expression and localization of Parkinson's disease-associated leucine-rich repeat kinase 2 in the mouse brain*. Journal of neurochemistry, 2007. **100**(2): p. 368-381.
23. Han, B.S., et al., *Expression of the LRRK2 gene in the midbrain dopaminergic neurons of the substantia nigra*. Neurosci Lett, 2008. **442**(3): p. 190-4.
24. Higashi, S., et al., *Localization of Parkinson's disease-associated LRRK2 in normal and pathological human brain*. Brain Research, 2007. **1155**: p. 208-219.
25. Sen, S., P.J. Webber, and A.B. West, *Dependence of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) kinase activity on dimerization*. J Biol Chem, 2009. **284**(52): p. 36346-56.
26. Schulte, C. and T. Gasser, *Genetic basis of Parkinson's disease: inheritance, penetrance, and expression*. Appl Clin Genet, 2011. **4**: p. 67-80.
27. Lewis, P.A., *Leucine rich repeat kinase 2: a paradigm for pleiotropy*. J Physiol, 2019. **597**(14): p. 3511-3521.
28. Komori, T. and T. Kuwahara, *An Update on the Interplay between LRRK2, Rab GTPases and Parkinson's Disease*. Biomolecules, 2023. **13**(11).
29. Berg, D., et al., *Type and frequency of mutations in the LRRK2 gene in familial and sporadic Parkinson's disease*. Brain, 2005. **128**(12): p. 3000-3011.
30. Di Fonzo, A., et al., *Comprehensive analysis of the LRRK2 gene in sixty families with Parkinson's disease*. European Journal of Human Genetics, 2006. **14**(3): p. 322.
31. West, A.B., et al., *Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005. **102**(46): p. 16842-16847.
32. Lewis, P.A., et al., *The R1441C mutation of LRRK2 disrupts GTP hydrolysis*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **357**(3): p. 668-71.
33. Di Fonzo, A., et al., *A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease*. The Lancet, 2005. **365**(9457): p. 412-415.
34. Nichols, W.C., et al., *Genetic screening for a single common LRRK2 mutation in familial Parkinson's disease*. The Lancet, 2005. **365**(9457): p. 410-412.
35. Gilks, W.P., et al., *A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease*. The Lancet, 2005. **365**(9457): p. 415-416.

36. Madureira, M., N. Connor-Robson, and R. Wade-Martins, "*LRRK2: Autophagy and Lysosomal Activity*". *Front Neurosci*, 2020. **14**: p. 498.
37. Giesert, F., et al., *The pathogenic LRRK2 R1441C mutation induces specific deficits modeling the prodromal phase of Parkinson's disease in the mouse*. *Neurobiol Dis*, 2017. **105**: p. 179-193.
38. Weng, Y.H., et al., *(R1441C) LRRK2 induces the degeneration of SN dopaminergic neurons and alters the expression of genes regulating neuronal survival in a transgenic mouse model*. *Exp Neurol*, 2016. **275 Pt 1**: p. 104-15.
39. Healy, D.G., et al., *Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study*. *The Lancet Neurology*, 2008. **7(7)**: p. 583-590.
40. Oosterveld, L.P., et al., *Greater motor progression in patients with Parkinson disease who carry LRRK2 risk variants*. *Neurology*, 2015. **85(12)**: p. 1039-1042.
41. Pont-Sunyer, C., et al., *Sleep disorders in parkinsonian and nonparkinsonian LRRK2 mutation carriers*. *PLoS One*, 2015. **10(7)**: p. e0132368.
42. Valente, E.M., et al., *Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1*. *Science*, 2004. **304(5674)**: p. 1158-60.
43. Barodia, S.K., R.B. Creed, and M.S. Goldberg, *Parkin and PINK1 functions in oxidative stress and neurodegeneration*. *Brain Res Bull*, 2017. **133**: p. 51-59.
44. Kawajiri, S., et al., *Genetic mutations and functions of PINK1*. *Trends Pharmacol Sci*, 2011. **32(10)**: p. 573-80.
45. Taymans, J.M., C. Van den Haute, and V. Baekelandt, *Distribution of PINK1 and LRRK2 in rat and mouse brain*. *J Neurochem*, 2006. **98(3)**: p. 951-61.
46. Valente, E.M., et al., *PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism*. *Ann Neurol*, 2004. **56(3)**: p. 336-41.
47. Rohé, C.F., et al., *Homozygous PINK1 C-terminus mutation causing early-onset parkinsonism*. *Ann Neurol*, 2004. **56(3)**: p. 427-31.
48. Marongiu, R., et al., *Whole gene deletion and splicing mutations expand the PINK1 genotypic spectrum*. *Hum Mutat*, 2007. **28(1)**: p. 98.
49. Pridgeon, J.W., et al., *PINK1 protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1*. *PLoS Biol*, 2007. **5(7)**: p. e172.
50. Morais, V.A., et al., *Parkinson's disease mutations in PINK1 result in decreased Complex I activity and deficient synaptic function*. *EMBO Mol Med*, 2009. **1(2)**: p. 99-111.
51. Lazarou, M., et al., *The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy*. *Nature*, 2015. **524(7565)**: p. 309-314.
52. Albanese, A., et al., *The PINK1 phenotype can be indistinguishable from idiopathic Parkinson disease*. *Neurology*, 2005. **64(11)**: p. 1958-60.
53. Ricciardi, L., et al., *Phenotypic variability of PINK1 expression: 12 Years' clinical follow-up of two Italian families*. *Mov Disord*, 2014. **29(12)**: p. 1561-6.

54. Ephraty, L., et al., *Neuropsychiatric and cognitive features in autosomal-recessive early parkinsonism due to PINK1 mutations*. *Mov Disord*, 2007. **22**(4): p. 566-9.
55. Tanner, C.M., *Epidemiology of Parkinson's disease*. *Neurol Clin*, 1992. **10**(2): p. 317-329.
56. Langston, J.W., *The MPTP Story*. *J Parkinsons Dis*, 2017. **7**(s1): p. S11-s19.
57. Langston, J.W., et al., *Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis*. *Science*, 1983. **219**(4587): p. 979-980.
58. Ramsay, R.R., et al., *Interaction of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) and its analogs with the rotenone/piericidin binding site of NADH dehydrogenase*. *Journal of neurochemistry*, 1991. **56**(4): p. 1184-1190.
59. Bové, J., et al., *Toxin-induced models of Parkinson's disease*. *NeuroRx*, 2005. **2**(3): p. 484-94.
60. Burke, D., P. Gasdaska, and L. Hartwell, *Dominant effects of tubulin overexpression in Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 1989. **9**(3): p. 1049-1059.
61. Marshall, L.E. and R.H. Himes, *Rotenone inhibition of tubulin self-assembly*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1978. **543**(4): p. 590-594.
62. Ren, Y., J. Zhao, and J. Feng, *Parkin binds to α/β tubulin and increases their ubiquitination and degradation*. *Journal of Neuroscience*, 2003. **23**(8): p. 3316-3324.
63. Merck KGaA. *Rotenon*. 2021 [2021, November 24]; Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/sial/45656>.
64. Pezzoli, G. and E. Cereda, *Exposure to pesticides or solvents and risk of Parkinson disease*. *Neurology*, 2013. **80**(22): p. 2035-2041.
65. Gorell, J.M., et al., *The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living*. *Neurology*, 1998. **50**(5): p. 1346-50.
66. Tanner, C.M. and S.M. Goldman, *Epidemiology of Parkinson's disease*. *Neurologic clinics*, 1996. **14**(2): p. 317-335.
67. Pan-Montojo, F. and H. Reichmann, *Considerations on the role of environmental toxins in idiopathic Parkinson's disease pathophysiology*. *Transl Neurodegener*, 2014. **3**: p. 10.
68. Furlong, M., et al., *Protective glove use and hygiene habits modify the associations of specific pesticides with Parkinson's disease*. *Environ Int*, 2015. **75**: p. 144-50.
69. Betarbet, R., et al., *Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease*. *Nat Neurosci*, 2000. **3**(12): p. 1301-6.
70. Di Monte, D.A., M. Lavasani, and A.B. Manning-Bog, *Environmental factors in Parkinson's disease*. *Neurotoxicology*, 2002. **23**(4-5): p. 487-502.
71. Tanner, C.M., et al., *Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease*. *Environ Health Perspect*, 2011. **119**(6): p. 866-72.

72. Alam, M., A. Mayerhofer, and W.J. Schmidt, *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): p. 117-24.
73. Höglinger, G.U., et al., *Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats*. J Neurochem, 2003. **84**(3): p. 491-502.
74. Drolet, R.E., et al., *Chronic rotenone exposure reproduces Parkinson's disease gastrointestinal neuropathology*. Neurobiol Dis, 2009. **36**(1): p. 96-102.
75. Pan-Montojo, F., et al., *Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8762.
76. Shannon, K.M., et al., *Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease*. Mov Disord, 2012. **27**(6): p. 709-15.
77. Holmqvist, S., et al., *Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats*. Acta Neuropathol, 2014. **128**(6): p. 805-20.
78. Sauerbier, A., et al., *New concepts in the pathogenesis and presentation of Parkinson's disease*. Clin Med (Lond), 2016. **16**(4): p. 365-70.
79. Klingelhofer, L. and H. Reichmann, *Pathogenesis of Parkinson disease--the gut-brain axis and environmental factors*. Nat Rev Neurol, 2015. **11**(11): p. 625-36.
80. Fasano, A., et al., *Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease*. Lancet Neurol, 2015. **14**(6): p. 625-39.
81. Braak, H., et al., *Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease*. Neurobiol Aging, 2003. **24**(2): p. 197-211.
82. Braak, H. and K. Del Tredici, *Neuropathological Staging of Brain Pathology in Sporadic Parkinson's disease: Separating the Wheat from the Chaff*. J Parkinsons Dis, 2017. **7**(s1): p. S71-s85.
83. Tanner, C.M., et al., *The disease intersection of susceptibility and exposure: Chemical exposures and neurodegenerative disease risk*. Alzheimer's & Dementia, 2014. **10**(3, Supplement): p. S213-S225.
84. Kamel, F., et al., *Dietary fat intake, pesticide use, and Parkinson's disease*. Parkinsonism Relat Disord, 2014. **20**(1): p. 82-7.
85. Ascherio, A. and M.A. Schwarzschild, *The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention*. The Lancet Neurology, 2016. **15**(12): p. 1257-1272.
86. Breckenridge, C.B., et al., *Association between Parkinson's Disease and Cigarette Smoking, Rural Living, Well-Water Consumption, Farming and Pesticide Use: Systematic Review and Meta-Analysis*. PLoS One, 2016. **11**(4): p. e0151841.
87. Fazzini, E., J. Fleming, and S. Fahn, *Cerebrospinal fluid antibodies to coronavirus in patients with Parkinson's disease*. Mov Disord, 1992. **7**(2): p. 153-8.

88. Fishman, P.S., et al., *Infection of the basal ganglia by a murine coronavirus*. Science, 1985. **229**(4716): p. 877-879.
89. Méndez-Guerrero, A., et al., *Acute hypokinetic-rigid syndrome following SARS-CoV-2 infection*. Neurology, 2020. **95**(15): p. e2109-e2118.
90. Cohen, M.E., et al., *A case of probable Parkinson's disease after SARS-CoV-2 infection*. The Lancet Neurology, 2020. **19**(10): p. 804-805.
91. Faber, I., et al., *Covid-19 and Parkinsonism: A non-post-encephalitic case*. Movement Disorders, 2020.
92. Brundin, P., A. Nath, and J.D. Beckham, *Is COVID-19 a Perfect Storm for Parkinson's Disease?* Trends Neurosci, 2020. **43**(12): p. 931-933.
93. McAlpine, L.S., A. Fesharaki-Zadeh, and S. Spudich, *Coronavirus disease 2019 and neurodegenerative disease: what will the future bring?* Curr Opin Psychiatry, 2021. **34**(2): p. 177-185.
94. Li, W.-S., et al., *Parkinson's disease following COVID-19: causal link or chance occurrence?* Journal of Translational Medicine, 2020. **18**(1): p. 493.
95. Gonzalez-Latapi, P., et al., *Parkinson's disease and COVID-19: do we need to be more patient?* Movement Disorders, 2021. **36**(2): p. 277.
96. Trepel, M., *Neuroanatomie*. 2017, München: Elsevier. 1 Online-Ressource (XII, 419 Seiten).
97. Hawkes, C.H., *The prodromal phase of sporadic Parkinson's disease: does it exist and if so how long is it?* Movement Disorders, 2008. **23**(13): p. 1799-1807.
98. Postuma, R.B., J.-F. Gagnon, and J.Y. Montplaisir, *REM sleep behavior disorder and prodromal neurodegeneration—where are we headed?* Tremor and Other Hyperkinetic Movements, 2013. **3**.
99. Todorova, A., P. Jenner, and K.R. Chaudhuri, *Non-motor Parkinson's: integral to motor Parkinson's, yet often neglected*. Practical neurology, 2014. **14**(5): p. 310-322.
100. Cersosimo, M.G., et al., *Gastrointestinal manifestations in Parkinson's disease: prevalence and occurrence before motor symptoms*. J Neurol, 2013. **260**(5): p. 1332-8.
101. Jacob, E.L., et al., *Occurrence of depression and anxiety prior to Parkinson's disease*. Parkinsonism Relat Disord, 2010. **16**(9): p. 576-81.
102. Bonuccelli, U., et al., *Orthostatic hypotension in de novo Parkinson disease*. Arch Neurol, 2003. **60**(10): p. 1400-4.
103. Pont-Sunyer, C., et al., *The onset of nonmotor symptoms in Parkinson's disease (the ONSET PD study)*. Mov Disord, 2015. **30**(2): p. 229-37.
104. Amboss. *Parkinson-Syndrom und Morbus Parkinson*. October 26, 2021 November 26, 2021]; Available from: <https://next.amboss.com/de/article/C30qkf>.
105. Mollenhauer, B., et al., *Monitoring of 30 marker candidates in early Parkinson disease as progression markers*. Neurology, 2016. **87**(2): p. 168-177.

106. Delenclos, M., et al., *Biomarkers in Parkinson's disease: Advances and strategies*. Parkinsonism & related disorders, 2016. **22**: p. S106-S110.
107. Visanji, N.P., et al., *Colonic mucosal a-synuclein lacks specificity as a biomarker for Parkinson disease*. Neurology, 2015. **84**(6): p. 609-16.
108. Arnhold, M., et al., *Changes in the sympathetic innervation of the gut in rotenone treated mice as possible early biomarker for Parkinson's disease*. Clin Auton Res, 2016. **26**(3): p. 211-22.
109. Athauda, D. and T. Foltynie, *The ongoing pursuit of neuroprotective therapies in Parkinson disease*. Nat Rev Neurol, 2015. **11**(1): p. 25-40.
110. Beitz, J.M., *Parkinson's disease: a review*. Front Biosci (Schol Ed), 2014. **6**: p. 65-74.
111. Heras-Garvin, A., et al., *Anle138b modulates alpha-synuclein oligomerization and prevents motor decline and neurodegeneration in a mouse model of multiple system atrophy*. Mov Disord, 2019. **34**(2): p. 255-263.
112. Wagner, J., et al., *Anle138b: a novel oligomer modulator for disease-modifying therapy of neurodegenerative diseases such as prion and Parkinson's disease*. Acta Neuropathol, 2013. **125**(6): p. 795-813.
113. Toyoda, Y., et al., *Products of the Parkinson's disease-related glyoxalase DJ-1, D-lactate and glycolate, support mitochondrial membrane potential and neuronal survival*. Biol Open, 2014. **3**(8): p. 777-84.
114. Jankovic, J. and E.K. Tan, *Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2020. **91**(8): p. 795-808.
115. Ding, X. and F. Ren, *Leucine-rich repeat kinase 2 inhibitors: a patent review (2014-present)*. Expert opinion on therapeutic patents, 2020. **30**(4): p. 275-286.
116. Mullin, S., et al., *Ambroxol for the treatment of patients with Parkinson disease with and without glucocerebrosidase gene mutations: a nonrandomized, noncontrolled trial*. JAMA neurology, 2020. **77**(4): p. 427-434.
117. Hu, Q., et al., *Baicalein inhibits alpha-synuclein oligomer formation and prevents progression of alpha-synuclein accumulation in a rotenone mouse model of Parkinson's disease*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1862**(10): p. 1883-90.
118. Axelsen, T.M. and D.P.D. Woldbye, *Gene Therapy for Parkinson's Disease, An Update*. J Parkinsons Dis, 2018. **8**(2): p. 195-215.
119. Marras, C., C.G. Canning, and S.M. Goldman, *Environment, lifestyle, and Parkinson's disease: Implications for prevention in the next decade*. Mov Disord, 2019. **34**(6): p. 801-811.
120. Fleming, S.M., *Mechanisms of Gene-Environment Interactions in Parkinson's Disease*. Curr Environ Health Rep, 2017. **4**(2): p. 192-199.
121. Pang, S.Y., et al., *The interplay of aging, genetics and environmental factors in the pathogenesis of Parkinson's disease*. Transl Neurodegener, 2019. **8**: p. 23.
122. Greenamyre, J.T., R. Betarbet, and T.B. Sherer, *The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environment and mitochondria*. Parkinsonism Relat Disord, 2003. **9 Suppl 2**: p. S59-64.

123. Casarejos, M.J., et al., *Susceptibility to rotenone is increased in neurons from parkin null mice and is reduced by minocycline*. J Neurochem, 2006. **97**(4): p. 934-46.
124. Karuppagounder, S.S., et al., *LRRK2 G2019S transgenic mice display increased susceptibility to 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP)-mediated neurotoxicity*. Journal of chemical neuroanatomy, 2016. **76**: p. 90-97.
125. Sarkar, S., *Mechanism of Gene-Environment Interactions Driving Glial Activation in Parkinson's Diseases*. Curr Environ Health Rep, 2021. **8**(3): p. 203-211.
126. Nuber, S., et al., *Environmental neurotoxic challenge of conditional alpha-synuclein transgenic mice predicts a dopaminergic olfactory-striatal interplay in early PD*. Acta neuropathologica, 2014. **127**(4): p. 477-494.
127. Goldman, S.M., et al., *Genetic modification of the association of paraquat and Parkinson's disease*. Mov Disord, 2012. **27**(13): p. 1652-8.
128. Fitzmaurice, A.G., et al., *Aldehyde dehydrogenase inhibition as a pathogenic mechanism in Parkinson disease*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(2): p. 636-641.
129. MBF Bioscience. Stereo Investigator User Guide. 2019; Available from: https://www.mbfbioscience.com/help/stereo_investigator/Default.htm#Stereology/Equations/OF_IVF_Eq.htm.
130. Greene, J.G., A.R. Noorian, and S. Srinivasan, *Delayed gastric emptying and enteric nervous system dysfunction in the rotenone model of Parkinson's disease*. Exp Neurol, 2009. **218**(1): p. 154-61.
131. Richter, F., M. Hamann, and A. Richter, *Chronic rotenone treatment induces behavioral effects but no pathological signs of parkinsonism in mice*. J Neurosci Res, 2007. **85**(3): p. 681-91.
132. Pan-Montojo, F.J. and R.H. Funk, *Oral administration of rotenone using a gavage and image analysis of alpha-synuclein inclusions in the enteric nervous system*. J Vis Exp, 2010(44).
133. Peng, K., et al., *Mutual antagonism of PINK1/Parkin and PGC-1 α contributes to maintenance of mitochondrial homeostasis in rotenone-induced neurotoxicity*. Neurotoxicity research, 2019. **35**(2): p. 331-343.
134. Haque, M.E., et al., *Cytoplasmic Pink1 activity protects neurons from dopaminergic neurotoxin MPTP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(5): p. 1716-21.
135. Petit, A., et al., *Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations*. J Biol Chem, 2005. **280**(40): p. 34025-32.
136. Deng, H., et al., *Small interfering RNA targeting the PINK1 induces apoptosis in dopaminergic cells SH-SY5Y*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **337**(4): p. 1133-8.

Anhang

Anhang A: Rohdaten Histologie

Tab. 7: Rohdaten der Immunhistochemie. Angegeben sind die Brain Number der jeweiligen Maus sowie Genlinie, Behandlungsdauer, Behandlungsart und die zugehörige Anzahl der dopaminergen Neurone in der SNc.

Brain Number	Genotyp	Behandlungsdauer	Behandlung	Zellzahl
1260	Wildtyp	4 Monate	Kontrolle	9434
1367	Wildtyp	4 Monate	Kontrolle	14309
1375	Wildtyp	4 Monate	Kontrolle	13011
1405	Wildtyp	4 Monate	Kontrolle	13422
1368	Wildtyp	4 Monate	Kontrolle	12188
1271	Wildtyp	4 Monate	Rotenon	10605
1267	Wildtyp	4 Monate	Rotenon	10257
1220	Wildtyp	4 Monate	Rotenon	7344
1291	Wildtyp	4 Monate	Rotenon	13897
1309	Wildtyp	4 Monate	Rotenon	11554
1354	Wildtyp	4 Monate	Rotenon	6933
1163	Wildtyp	2 Monate	Kontrolle	13232
1165	Wildtyp	2 Monate	Kontrolle	15923
1153	Wildtyp	2 Monate	Kontrolle	11175
1172	Wildtyp	2 Monate	Kontrolle	11618
1217	Wildtyp	2 Monate	Kontrolle	14593
1227	Wildtyp	2 Monate	Kontrolle	5508
1129	Wildtyp	2 Monate	Rotenon	14182
1138	Wildtyp	2 Monate	Rotenon	7819
1191	Wildtyp	2 Monate	Rotenon	9877
1192	Wildtyp	2 Monate	Rotenon	5666
1237	Wildtyp	2 Monate	Rotenon	13422
1295	Wildtyp	2 Monate	Rotenon	10003
1239	LRRK2	4 Monate	Kontrolle	10700
1240	LRRK2	4 Monate	Kontrolle	12472
1250	LRRK2	4 Monate	Kontrolle	13770
1219	LRRK2	4 Monate	Kontrolle	17026
1230	LRRK2	4 Monate	Kontrolle	9811
1232	LRRK2	4 Monate	Kontrolle	11931
1221	LRRK2	4 Monate	Rotenon	8832

Brain Number	Genotyp	Behandlungsdauer	Behandlung	Zellzahl
1222	LRRK2	4 Monate	Rotenon	11016
1223	LRRK2	4 Monate	Rotenon	8199
1235	LRRK2	4 Monate	Rotenon	10634
1236	LRRK2	4 Monate	Rotenon	13577
1126	LRRK2	2 Monate	Kontrolle	14372
1124	LRRK2	2 Monate	Kontrolle	14150
1155	LRRK2	2 Monate	Kontrolle	10858
1161	LRRK2	2 Monate	Kontrolle	11270
1154	LRRK2	2 Monate	Kontrolle	12153
1156	LRRK2	2 Monate	Kontrolle	6488
1131	LRRK2	2 Monate	Rotenon	8167
1145	LRRK2	2 Monate	Rotenon	7534
1150	LRRK2	2 Monate	Rotenon	7946
1136	LRRK2	2 Monate	Rotenon	8355
1140	LRRK2	2 Monate	Rotenon	7406
1137	LRRK2	2 Monate	Rotenon	15666
1226	PINK1	2 Monate	Kontrolle	15543
1285	PINK1	2 Monate	Kontrolle	12093
1377	PINK1	4 Monate	Kontrolle	13580
1403	PINK1	4 Monate	Kontrolle	12314
1406	PINK1	4 Monate	Kontrolle	10130
1181	PINK1	4 Monate	Kontrolle	11899
1184	PINK1	4 Monate	Kontrolle	15602
1369	PINK1	4 Monate	Kontrolle	12121
1198	PINK1	4 Monate	Rotenon	10447
1355	PINK1	4 Monate	Rotenon	12504
1396	PINK1	4 Monate	Rotenon	12093
1394	PINK1	4 Monate	Rotenon	13830
1196	PINK1	4 Monate	Rotenon	11836
1332	PINK1	4 Monate	Rotenon	10064
1284	PINK1	2 Monate	Kontrolle	14119
1280	PINK1	2 Monate	Rotenon	9972
1297	PINK1	2 Monate	Rotenon	10035
1266	PINK1	2 Monate	Rotenon	10858
1279	PINK1	2 Monate	Rotenon	15064
1205	PINK1	2 Monate	Rotenon	11741
1242	PINK1	2 Monate	Rotenon	13988

Anhang B: Rohdaten Rotarod

Tab. 8: Rohdaten des Rotarod-Versuchs. Gezeigt sind für alle Genlinien und Behandlungsgruppen die Laufzeiten der Versuchstiere auf dem Rotarod-Gerät in Sekunden. Es gibt fünf Messzeitpunkte (t1-t5), für die pro Maus jeweils ein Mittelwert aus neun Messungen errechnet wurde. Für jeden Messzeitpunkt wurde für jedes Versuchstier an drei aufeinanderfolgenden Tagen (d1-d3) jeweils drei Mal die Laufleistung gemessen (m1-m3).

Wildtyp 4 Monate Kontrolle								
Brain Number			1260	1226	1368	1375	1405	1367
t1	d1	m1/d1/t1	50	98,7	67,2	120,4	126,5	20,7
		m2/d1/t1	40,4	100,6	19,6	144	106,7	113,7
		m3/d1/t1	57	75,2	52,9	132	190,5	46,2
	d2	m1/d2/t1	103,5	105,3	56	183	195	114,9
		m2/d2/t1	150,5	123,6	61,6	186,3	195,8	76,9
		m3/d2/t1	200	74,4	138,9	114	198,3	55,9
	d3	m1/d3/t1	156,7	135,9	141,9	195	141,3	162
		m2/d3/t1	200	114	151	139,6	144,9	132
		m3/d3/t1	200	132,3	187,2	143,6	151,8	160,2
t2	d1	m1/d1/t2	97,5	81,3	141,8	191,2	152,8	148,6
		m2/d1/t2	156,7	108,4	151,2	200	163,5	188,7
		m3/d1/t2	180	122,2	167,5	178,6	157,6	159,3
	d2	m1/d2/t2	166,7	111	183,1	170,6	181,9	149,3
		m2/d2/t2	200	125,8	147,7	150,4	139,4	154,3
		m3/d2/t2	200	132,7	123,8	151,6	200	200
	d3	m1/d3/t2	200	139,1	163,7	133	200	193
		m2/d3/t2	200	180,3	153,4	178,3	138,8	190,5
		m3/d3/t2	195,4	198,4	144,5	199,7	148,5	176,9
t3	d1	m1/d1/t3	200		136,5	200	134	155
		m2/d1/t3	200		143,1	200	170,4	167,7
		m3/d1/t3	200		137,8	134,7	166,5	150,8
	d2	m1/d2/t3	200		155,9	185,2	183,3	131,5
		m2/d2/t3	200		162,3	143,2	153,4	162,3
		m3/d2/t3	200		200	178,9	172,5	166
	d3	m1/d3/t3	200					
		m2/d3/t3	198,2					
		m3/d3/t3	176,3					
t4	d1	m1/d1/t4	200		180	191,5	163,5	175,4

Wildtyp 4 Monate Kontrolle								
Brain Number			1260	1226	1368	1375	1405	1367
		m2/d1/t4	200		175	173,8	150,2	100,3
		m3/d1/t4	137,2		71,5	200	143,5	51,9
		m1/d2/t4	200		175,1	131,8	111,5	161,3
	d2	m2/d2/t4	200		155,4	168,5	159,1	159,1
		m3/d2/t4	200		177,3	194,6	104	150,6
		m1/d3/t4	158,6		160,5	200	112,8	131,9
	d3	m2/d3/t4	194,9		178,1	200	147	68,3
		m3/d3/t4	170,1		200	200	140,3	58,7
t5	d1	m1/d1/t5	176,6		51,9	184,3	92,8	146,6
		m2/d1/t5	122,6		129,2	136,6	102,5	53,9
		m3/d1/t5	157,3		110,8	158,1	106	80,9
	d2	m1/d2/t5	197		151,7	164,8	121,8	104,8
		m2/d2/t5	79,1		141,3	181,8	166,4	98,4
		m3/d2/t5	165		95,1	180,8	133,8	137,5
	d3	m1/d3/t5	55,8		127,9	145,6	144,8	66,8
		m2/d3/t5	200		133,1	174,5	148,4	80,8
		m3/d3/t5	138,3		187,4	143,5	150,7	108

Wildtyp 4 Monate Rotenon								
Brain Number			1354	1220	1267	1271	1309	1291
t1	d1	m1/d1/t1	30,9	37,3	29,8	82,5	34,6	126,5
		m2/d1/t1	172,1	125	114,8	96,9	119,3	156,3
		m3/d1/t1	20,3	133,4	82,5	130,4	101,1	158,3
	d2	m1/d2/t1	153,6	101,3	107,5	192,8	162,2	194
		m2/d2/t1	174,5	80,3	97	163,4	147,8	180,4
		m3/d2/t1	185,2	81,3	102,4	151,1	158,7	139,3
	d3	m1/d3/t1	183,5	134,8	119,3	200	181,3	200
		m2/d3/t1	188,7	130,1	99,9	200	181,7	185
		m3/d3/t1	151,1	116,4	113,6	200	130,9	176,9
t2	d1	m1/d1/t2	146,7	127,6	135,4	175,4	121,7	156,9
		m2/d1/t2	156,7	139,8	143,2	200	158	130,1
		m3/d1/t2	163	162,5	125,9	200	147,3	180,3
	d2	m1/d2/t2	141	106,3	108,5	171,9	163,5	
		m2/d2/t2	166,4	119,2	145,1	200	174,9	

Wildtyp 4 Monate Rotenon								
Brain Number			1354	1220	1267	1271	1309	1291
	d3	m3/d2/t2	135,8	105,9	200	111	184,6	
		m1/d3/t2	100,3	77,5	142,7	111,3	177,7	131,8
		m2/d3/t2	138,6	41,3	131,5	117,8	172,6	148,8
		m3/d3/t2	61	93,7	120,2	128,1	182,4	149,4
t3	d1	m1/d1/t3	118,3	107,4	125,3	200	154,5	95,8
		m2/d1/t3	111,2	113,4	130,8	186,5	182,6	131,8
		m3/d1/t3	165,7	129,4	158,4	200	179,2	151,9
	d2	m1/d2/t3	200	132,6	118	200	145,6	113,8
		m2/d2/t3	178,9	65,6	106	200	159,2	131,6
		m3/d2/t3	175,1	120,5	137,2	200	197,9	106,4
	d3	m1/d3/t3		75,1	120,2	200		
		m2/d3/t3		90	122,7	200		
		m3/d3/t3		100	132,2	200		
	t4	d1	m1/d1/t4	160,5	102,6	170,7	200	176,9
m2/d1/t4			187,6	94,6	195	200	183	72,5
m3/d1/t4			174,1	122,6	191,6	194,3	187,3	45,4
d2		m1/d2/t4	133,6	76,8	108,7	200	112,8	131,3
		m2/d2/t4	173,4	102,4	99,8	200	182,6	175,4
		m3/d2/t4	132,4	113,3	100,4	200	181,6	142,3
d3		m1/d3/t4	181,9	76	124,5	200	135,8	99,6
		m2/d3/t4	111,6	119,1	120,5	200	197	117
		m3/d3/t4	149,6	107,3	113	200	200	180,8
t5	d1	m1/d1/t5	177,1	116,1	166,3	200	150,8	128,6
		m2/d1/t5	77,1	88,9	130	200	137,5	61,1
		m3/d1/t5	168,4	161,8	145,2	200	119,9	133,1
	d2	m1/d2/t5	127,4	102,2	133	170,1	97,4	125,8
		m2/d2/t5	148,5	123,1	170,1	155,2	121,7	152,8
		m3/d2/t5	95,9	113,6	98	158,9	200	117,8
	d3	m1/d3/t5	119,2	82,9	108,2	199,9	200	91
		m2/d3/t5	71	104,1	111,6	200	89,7	129,7
		m3/d3/t5	118,2	63,6	154	190,9	161,2	136

Wildtyp 2 Monate Kontrolle								
Brain Number			1227	1153	1172	1163	1217	1165
t1	d1	m1/d1/t1	0,1	78,1	83,2	102,7	97,8	156,5
		m2/d1/t1	158,8	43,1	17,9	134,9	89,6	200
		m3/d1/t1	164,4	133	116	185,4	61,3	188,4
	d2	m1/d2/t1	135,9	63,1	139,9	199,3	120,8	200
		m2/d2/t1	128,5	91,4	182,3	157,1	169,2	83,8
		m3/d2/t1	156,1	77,1	116	140,2	155,2	200
	d3	m1/d3/t1	165,8	112,8	121,9	141,8	150,1	200
		m2/d3/t1	116,1	127,8	156	115,6	200	112
		m3/d3/t1	143,6	131,7	137,5	149,7	194,8	200
t2	d1	m1/d1/t2	105,5	52,5	122,8	132,7	105,5	140
		m2/d1/t2	136,8	73,6	165,6	136,8	145,3	200
		m3/d1/t2	136,6	80,6	49,6	138,1	195,2	72,7
	d2	m1/d2/t2	131	129,2	134,7	138,6	200	200
		m2/d2/t2	128,8	94,7	166,6	158,1	144,2	200
		m3/d2/t2	117,8	116,8	156,7	125,5	188,4	200
	d3	m1/d3/t2	114,5	77,5	164,1	159,3	161	200
		m2/d3/t2	97,7	94,8	198	126,1	198	200
		m3/d3/t2	103	93,9	182,4	141,5	174,8	200
t3	d1	m1/d1/t3	115,1	75,6	200	171,9	167,5	200
		m2/d1/t3	115,5	75,5	200	199,8	152,8	200
		m3/d1/t3	152,5	92,8	184,3	134	145,2	200
	d2	m1/d2/t3	159	135,1	151,8	128,2	121,6	200
		m2/d2/t3	146	109,9	164,5	101,1	127,9	110,8
		m3/d2/t3	118	144,8	162	73	139,8	200
	d3	m1/d3/t3	124,2		200		154,4	
		m2/d3/t3	177,2		181,5		70,2	
		m3/d3/t3	168,4		200		154,4	

Wildtyp 2 Monate Rotenon								
Brain Number			1192	1138	1191	1295	1237	1129
t1	d1	m1/d1/t1	88,4	54,5	24,6	82,7	112,8	54,6
		m2/d1/t1	165	108,9	98,2	159,7	0,2	115,3
		m3/d1/t1	170,8	139,6	134,4	200	164,2	31,2
	d2	m1/d2/t1	181,2	120,4	149,6	55,1	200	98,2

Wildtyp 2 Monate Rotenon									
Brain Number			1192	1138	1191	1295	1237	1129	
		m2/d2/t1	105,3	164,4	146,8	184,8	200	97,4	
		m3/d2/t1	115	126,1	192,2	181,3	200	113,3	
	d3	m1/d3/t1	162,1	157,5	156,9	145,7	26,6	107,6	
		m2/d3/t1	142,5	152,6	166,7	176,3	200	131,6	
		m3/d3/t1	147,6	117,8	171,1	139,5	180,8	95,4	
t2	d1	m1/d1/t2	48,2	151,4	148,2	173	200	88,9	
		m2/d1/t2	131,4	159,1	156,8	176,6	200	121,4	
		m3/d1/t2	171	147,7	158,3	167,9	59,6	85,8	
	d2	m1/d2/t2	186	106	127	164,4	200	95,9	
		m2/d2/t2	171,8	140,8	123	159,6	200	104,1	
		m3/d2/t2	198	145,7	181,9	150,4	200	86,1	
	d3	m1/d3/t2	162,4	143,9	156,1	165,5	200	29,2	
		m2/d3/t2	200	145,1	168,4	153,9	200	119,7	
		m3/d3/t2	195,9	136,9	163,3	164	200	100,4	
	t3	d1	m1/d1/t3	161,9	133,8	163,7	132,5	137,6	95,7
			m2/d1/t3	133	161,2	147,5	168,4	174,8	107,7
			m3/d1/t3	156	132,3	125,5	147,5	162	135,5
d2		m1/d2/t3	134,7	107	200	134,2	179,7	62,5	
		m2/d2/t3	193,6	167,1	148	121,5	127,3	116,8	
		m3/d2/t3	132,1	126,9	126,9	123,5	172,6	129,6	
d3		m1/d3/t3	146			165,8	75,3		
		m2/d3/t3	155,1			185,7	200		
		m3/d3/t3	115,3			180,4	200		

LRRK2 4 Monate Kontrolle								
Brain Number			1230	1239	1232	1240	1250	1219
t1	d1	m1/d1/t1	29,8	167,2	44,3	155,9	134,4	126,8
		m2/d1/t1	81,5	200	37,3	146	33,7	19
		m3/d1/t1	108,6	200	114,7	163,4	193,2	153,8
	d2	m1/d2/t1	66	189,3	146,2	157,8	200	167,3
		m2/d2/t1	51,7	99,3	146,4	190,8	200	52
		m3/d2/t1	139,3	169,7	170,1	163,1	60,9	200
	d3	m1/d3/t1	127,6	153,3	162,7	155	200	130,9
		m2/d3/t1	91,5	161,4	200	164	200	200

LRRK2 4 Monate Kontrolle								
Brain Number			1230	1239	1232	1240	1250	1219
		m3/d3/t1	98	198,4	176,1	200	200	60,9
t2	d1	m1/d1/t2	102	165,7	139	177	200	138,7
		m2/d1/t2	105,2	131,4	157,5	176,1	199,4	192,5
		m3/d1/t2	94,9	167,9	146,9	186,1	183,3	173,5
	d2	m1/d2/t2	111,9	152,9	117,6	157,4	191,1	177,4
		m2/d2/t2	109,3	139,5	129,4	200	200	182,9
		m3/d2/t2	116,2	187,4	100,5	145	200	200
	d3	m1/d3/t2	111,7	167,9	93,3	128,8	179,2	157,9
		m2/d3/t2	114,9	200	82,8	62,4	200	200
		m3/d3/t2	109	200	90,6	160,5	200	200
t3	d1	m1/d1/t3	97,9	173	153,7	181,2	199,9	122,9
		m2/d1/t3	108	180,5	105,3	200	200	161,8
		m3/d1/t3	96,7	200	160,6	200	200	122,4
	d2	m1/d2/t3	110,8	184,3	114,8	141	200	159,7
		m2/d2/t3	108	200	148,4	200	200	172,7
		m3/d2/t3	110,2	200	139,2	182,1	200	174,3
	d3	m1/d3/t3	113,3	200	158,7	145,8	200	141,7
		m2/d3/t3	81,8	200	161,8	200	200	172,5
		m3/d3/t3	154,6	200	188,1	200	200	174,4
t4	d1	m1/d1/t4	102,5	200	145,1	156,6	200	183,5
		m2/d1/t4	111,3	200	136,3	200	200	188,3
		m3/d1/t4	113,2	200	153,1	191,7	200	145,3
	d2	m1/d2/t4	86,9	186,5	139,3	167,9	200	114
		m2/d2/t4	118,4	200	141,7	200	200	187,6
		m3/d2/t4	97,5	152	129,5	199,6	200	194
	d3	m1/d3/t4	66,4	145	106,1	134,7	200	138,5
		m2/d3/t4	87,3	192,6	162,4	157,3	200	200
		m3/d3/t4	95,4	200	189,9	172,2	200	186,3
t5		m1/d1/t5	85,2	146,1	165,6	192,8	200	166,4
		m2/d1/t5	89	200	168,2	177,6	200	189,5
		m3/d1/t5	102,7	161,3	164,2	192,6	200	173,4
		m1/d2/t5	91,1	197,3	168,3	154,3	200	123,7
		m2/d2/t5	81,1	200	180,6	167,9	200	118,5
		m3/d2/t5	98,6	187,8	163,4	160	200	125,3

LRRK2 4 Monate Kontrolle								
Brain Number			1230	1239	1232	1240	1250	1219
		m1/d3/t5	55,5	120,1	93,7	94,8	188,1	94,7
		m2/d3/t5	71,3	197,2	154,3	177,7	200	151,5
		m3/d3/t5	89,7	186,2	180	170,8	200	115,8

LRRK2 4 Monate Rotenon							
Brain Number			1223	1221	1235	1222	1236
t1	d1	m1/d1/t1	67,6	79	62,3	3,6	142,2
		m2/d1/t1	128,4	123,1	91	113,4	37
		m3/d1/t1	97,5	92,8	77,9	126,2	89
	d2	m1/d2/t1	154	106,1	150,9	106,8	163,2
		m2/d2/t1	170,5	120,3	200	38,9	58,4
		m3/d2/t1	199	129,3	200	135,8	157,2
	d3	m1/d3/t1	151,7	118,8	175,3	169,7	118,1
		m2/d3/t1	40,7	149,4	193,3	166,6	165
		m3/d3/t1	200	139,9	200	199,4	121,6
t2	d1	m1/d1/t2	134	80,5	159,9	106,8	143,8
		m2/d1/t2	110,9	97,8	200	154,8	92,8
		m3/d1/t2	158,1	112,9	184,5	147,6	66
	d2	m1/d2/t2	192	88,8	195,5	160	108,7
		m2/d2/t2	200	94,1	200	169,3	153,2
		m3/d2/t2	200	109,6	200	156,2	111
	d3	m1/d3/t2	200	111,3	145	166,9	118,5
		m2/d3/t2	200	117,8	178	133,3	115,6
		m3/d3/t2	200	128,1	200	149,8	145,9
t3	d1	m1/d1/t3	200	103,5	119,1	127,8	160,4
		m2/d1/t3	200	93,5	200	152,3	110,6
		m3/d1/t3	200	114,3	177,9	145,6	144
	d2	m1/d2/t3	200	83,4	167,2	148,8	148,7
		m2/d2/t3	200	104,1	186,8	158,5	164,9
		m3/d2/t3	200	90,5	129,5	110,8	166,5
	d3	m1/d3/t3	200	96,1	91,2	144,6	184,5
		m2/d3/t3	200	114,2	120,1	182,2	200
		m3/d3/t3	200	115,3	30,6	152,3	147,3
t4	d1	m1/d1/t4	165,8	93,2	144,7	124,8	163,1

LRRK2 4 Monate Rotenon							
Brain Number			1223	1221	1235	1222	1236
		m2/d1/t4	200	123,2	186,9	121,5	154
		m3/d1/t4	200	129,7	140,8	166,2	164,2
		m1/d2/t4	200	99,1	166,8	159,3	138,2
	d2	m2/d2/t4	200	117	116,9	142,7	142,2
		m3/d2/t4	183,2	106,1	158,6	139,3	142,9
		m1/d3/t4	169,3	79,9	126,1	117,3	134,1
	d3	m2/d3/t4	200	123,3	152,7	140,9	170,8
		m3/d3/t4	200	104,3	105,5	96,9	157,9
t5	d1	m1/d1/t5	188,6	108,2	127,2	159,1	137,8
		m2/d1/t5	178,7	82,6	140,1	157,7	171,5
		m3/d1/t5	194,8	108,4	94,1	166,5	135,6
	d2	m1/d2/t5	194	103,5	151,3	132,1	93,6
		m2/d2/t5	177,7	112,5	109,4	116,4	124,7
		m3/d2/t5	167,9	108,9	183,1	72,1	154,8
	d3	m1/d3/t5	143,2	79	118,7	97,6	130,4
		m2/d3/t5	175,5	123,3	150	159,1	142,4
		m3/d3/t5	162	108,4	133,8	122,6	198,7

LRRK2 2 Monate Kontrolle								
Brain Number			1156	1155	1161	1154	1124	1126
t1	d1	m1/d1/t1	75,1	140,8	17,2	21,3	94,6	71,3
		m2/d1/t1	91,9	161	93,7	11,6	88,8	125,3
		m3/d1/t1	69,7	186,2	61	142,7	46,9	171,7
	d2	m1/d2/t1	126,1	87,8	95,6	179,8	107,5	27,7
		m2/d2/t1	28,7	102,4	110,3	188	128,8	78,4
		m3/d2/t1	136	174,6	180,1	138	39,6	95,4
	d3	m1/d3/t1	74,9	120,4	189	200	132,1	140,3
		m2/d3/t1	129,4	159	191,3	178,2	130,8	128,9
		m3/d3/t1	167,2	157,9	172	200	143,7	165,9
t2	d1	m1/d1/t2	109,4	109,1	129,9	200	119	162,5
		m2/d1/t2	96,5	171,7	130,7	200	138,9	121,2
		m3/d1/t2	105,1	109,1	131	195,8	121,8	50,6
	d2	m1/d2/t2	111,3	106,2	158,6	141,8	139,4	57,3
		m2/d2/t2	138,6	144,6	171	160,4	154,6	78,3

LRRK2 2 Monate Kontrolle								
Brain Number			1156	1155	1161	1154	1124	1126
	d3	m3/d2/t2	146,7	142,2	195,4	190,9	164	63,3
		m1/d3/t2	69,2	125,5	197,6	200	86,5	73,1
		m2/d3/t2	160,9	70,7	189,2	200	118,8	168,5
		m3/d3/t2	156,6	149,2	191	200	152,8	157,8
t3	d1	m1/d1/t3	146,7	43,3	137,1	159,1	125,7	140,4
		m2/d1/t3	137,2	77,9	200	200	120	114
		m3/d1/t3	127,9	129,3	63	200	131,2	100,7
	d2	m1/d2/t3	102,9	145,2	200	199,5	122,3	107,7
		m2/d2/t3	133,5	69,5	196,4	185	121,7	72,6
		m3/d2/t3	125,2	95,2	200	200	160,8	137,5
	d3	m1/d3/t3						
		m2/d3/t3						
		m3/d3/t3						

LRRK2 2 Monate Rotenon								
Brain Number			1140	1145	1150	1131	1136	1137
t1	d1	m1/d1/t1	65,8	102,5	37	118,3	93,3	15,6
		m2/d1/t1	88,9	16,6	13,3	110,9	108,5	79,6
		m3/d1/t1	135,8	28,4	66,2	106,8	145,7	70,5
	d2	m1/d2/t1	103	95,3	95,7	122,6	149,8	81,6
		m2/d2/t1	103,8	151,6	88,6	123,1	157,3	132,4
		m3/d2/t1	129,6	23,8	84,3	133,1	184,2	86,8
	d3	m1/d3/t1	127,4	125,4	158,6	164,7	188,7	165,6
		m2/d3/t1	125,1	160,1	150,9	130,8	188,2	127,3
		m3/d3/t1	141,7	118	152	153,5	174,8	114,2
t2	d1	m1/d1/t2	136,8	145,1	129	87,9	153,4	116,3
		m2/d1/t2	126,5	145,3	144	101,2	141,3	108,3
		m3/d1/t2	149,3	116,5	140,6	98,6	158,1	124,5
	d2	m1/d2/t2	97,5	107,7	133,1	82,3	94,8	74,3
		m2/d2/t2	160,6	122,5	127,5	148,9	145,1	150,3
		m3/d2/t2	131,3	152,5	139,5	150,6	172,5	165,6
d3	m1/d3/t2	150,1	125,2	150,7	155,2	143,9	112,3	
	m2/d3/t2	161,8	131,3	100,8	102,9	174,1	118,3	
	m3/d3/t2	159	140,2	102	113,7	180,5	104	

LRRK2 2 Monate Rotenon								
Brain Number			1140	1145	1150	1131	1136	1137
t3	d1	m1/d1/t3	124,4	131	136,1	153,1	141,8	86,1
		m2/d1/t3	122,8	86,6	123,7	144,9	186,7	77,1
		m3/d1/t3	127,6	154,1	108,4	106,6	184,6	116,3
	d2	m1/d2/t3	143,4	153,2	114,1	97,2	156,1	110,7
		m2/d2/t3	128,8	132,9	90,4	147,2	192,3	125,9
		m3/d2/t3	140	114,9	153	137,6	169,1	125,9
	d3	m1/d3/t3						
		m2/d3/t3						
		m3/d3/t3						

PINK1 4 Monate Kontrolle								
Brain Number			1406	1181	1369	1403	1377	1184
t1	d1	m1/d1/t1	66,4	38,1	94,9	150,9	162,8	167,1
		m2/d1/t1	134,5	48	40,5	142,7	135,1	85,5
		m3/d1/t1	183,3	114,3	108,7	115,5	123,8	199,8
	d2	m1/d2/t1	145,6	109,6	124,7	148,2	197,5	200
		m2/d2/t1	195,7	168,6	125,9	200	200	172,6
		m3/d2/t1	191,2	197,1	121,5	176,5	200	191,7
	d3	m1/d3/t1	161,1	163,6	181,3	199,8	199,7	191
		m2/d3/t1	156,3	140,8	155,5	137,1	171,5	177,6
		m3/d3/t1	136,4	157	175,3	169,9	136,4	165,2
t2	d1	m1/d1/t2	168,2	124,7	131,8	175,4	200	166,5
		m2/d1/t2	124,4	178,1	127,2	200	200	200
		m3/d1/t2	182,5	121,1	192,3	200	200	180,9
	d2	m1/d2/t2	164,1	171,3	134,1	188,7	200	196,9
		m2/d2/t2	177,9	171,9	135,9	188,5	200	168,6
		m3/d2/t2	200	157,7	107,5	159	200	161,7
d3	m1/d3/t2	129,8	150,4	170,4	106,3	200	129,9	
	m2/d3/t2	187,1	182,5	142,9	165,3	200	137,8	
	m3/d3/t2	170,2	143	175,4	188,7	200	196,5	
t3	d1	m1/d1/t3	182,7	172,2	152,3	88	200	177,8
		m2/d1/t3	193,9	162,1	117,4	196,4	183,1	191
		m3/d1/t3	185,8	136,3	149,5	200	200	
	d2	m1/d2/t3	192,2	153,7	148	198,9	171,6	186,7

PINK1 4 Monate Kontrolle								
Brain Number			1406	1181	1369	1403	1377	1184
		m2/d2/t3	148,4	163,8	63,9	190,4	200	200
		m3/d2/t3	157,3	174,3	123,6	176,7	200	200
	d3	m1/d3/t3						
		m2/d3/t3						
		m3/d3/t3						
t4	d1	m1/d1/t4	184,1	157,8	171,8	162,6	200	200
		m2/d1/t4	191,4	160,1	125,6	194,7	200	200
		m3/d1/t4	168,3	180,8	48	200	200	200
	d2	m1/d2/t4	150,4	146,6	35,2	166,6	200	200
		m2/d2/t4	167,6	196,6	55,1	192,3	200	200
		m3/d2/t4	200	112,8	95	172,5	200	200
	d3	m1/d3/t4	163,3	190,9	54,9	127,2	172,2	200
		m2/d3/t4	170,7	158	70,9	125,8	200	
		m3/d3/t4	184,6	92,4	65,8	186,3	200	181,2
t5	d1	m1/d1/t5	191,4	120,2	107,4	190,5	200	200
		m2/d1/t5	143,1	101,4	45,3	199,5	200	200
		m3/d1/t5	163,5	62,6	39,9	172,9	180,1	179,8
	d2	m1/d2/t5	124,4	181	51,3	119,6	200	196,1
		m2/d2/t5	156,6	130	171	165,6	200	114,3
		m3/d2/t5	169	116,3	59,4	160,4	200	188,2
	d3	m1/d3/t5	160,4	103,9	84,7	164,6	200	195,9
		m2/d3/t5	181,4	120,1	87,6	200	194,9	192,4
		m3/d3/t5	185,6	168,5	33,1	200	135,7	193,9

PINK1 4 Monate Rotenon								
Brain Number			1332	1198	1196	1396	1355	1394
t1	d1	m1/d1/t1	137,8	35,6	90,9	159,8	126	156
		m2/d1/t1	71,6	67,6	94,6	152,7	157,7	58,5
		m3/d1/t1	125,3	171,5	42,1	142	200	183,8
	d2	m1/d2/t1	178,6	178,9	109,8	54,9	51,7	152
		m2/d2/t1	112,3	153,7	178,9	191,9	176,5	117
		m3/d2/t1	154,3	185,6	124,5	102,3	200	158,6
	d3	m1/d3/t1	183,3	129,1	123,3	138,6	200	127
		m2/d3/t1	179	121,5	128,4	130,8	198,4	121,6

PINK1 4 Monate Rotenon								
Brain Number			1332	1198	1196	1396	1355	1394
		m3/d3/t1	179,5	162,2	165,2	150,7	161,6	174,2
t2	d1	m1/d1/t2	179,3	133,5	149,8	160	200	101,2
		m2/d1/t2	179,3	30,5	135,9	109,9	200	95,6
		m3/d1/t2	174,9	167	159,3	125,8	200	104,8
	d2	m1/d2/t2	185,2	179,6	171,3	150,7	173,3	168,2
		m2/d2/t2	200	200	141,8	142,4	200	200
		m3/d2/t2	153,5	140,7	151,9	200	169,6	170,7
	d3	m1/d3/t2	119,1	161,6	153,4	155,6	200	150,2
		m2/d3/t2	157,3	178,5	97,6	167,1	200	173,6
		m3/d3/t2	163,7	160,2	159,3	149,3	200	173
t3	d1	m1/d1/t3	116,3	97,9	118,4	124,4	200	172,5
		m2/d1/t3	178,1	157,5	103,7	96,8	200	184,5
		m3/d1/t3	158,2	167,4	116,1	141,5	157,5	185,8
	d2	m1/d2/t3	194,2	165,2	123,3	156,3	171,6	200
		m2/d2/t3	171,3	189,8	113,1	161,6	200	200
		m3/d2/t3	175,5	184,7	182,3	139,8	117,5	176,8
	d3	m1/d3/t3						
		m2/d3/t3						
		m3/d3/t3						
t4	d1	m1/d1/t4	161,3	142,6	131,3	143,6	200	150,5
		m2/d1/t4	147,9	146,1	116,7	135,1	200	132,6
		m3/d1/t4	150,1	180	128,1	154,3	168,5	182,8
	d2	m1/d2/t4	150,9	200	126,5	165,6	200	200
		m2/d2/t4	161,1	156,7	156,1	121,1	200	117,4
		m3/d2/t4	183,5	167,7	149,9	139,7	197,6	170,4
	d3	m1/d3/t4	122	151	123,4	113,6	200	200
		m2/d3/t4	164,7	166,9	148,3	154,6	200	200
		m3/d3/t4	166,8	129	165,6	144,1	200	182,1
t5	d1	m1/d1/t5	147,6	190,5	138,9	135,6	200	189,9
		m2/d1/t5	150,4	169,4	21	142,7	170	189,2
		m3/d1/t5	164,5	167,7	145,8	134,7	200	164,5
	d2	m1/d2/t5	159,3	133,4	121	125,6	178,8	182,6
		m2/d2/t5	183,1	178,7	134,8	127	184,1	117,4
		m3/d2/t5	154,8	142,1	111,1	113,7	187,4	178,9

PINK1 4 Monate Rotenon								
Brain Number			1332	1198	1196	1396	1355	1394
	d3	m1/d3/t5	170,7	132,7	140,2	132,3	200	161,5
		m2/d3/t5	193,9	113,6	126,3	151,9	200	171,9
		m3/d3/t5	138,1	135,3	123,3	106,5	200	139,5

PINK1 2 Monate Kontrolle					
Brain Number			1226	1285	1284
t1	d1	m1/d1/t1	25,1	143,9	43,7
		m2/d1/t1	193,3	96	106,4
		m3/d1/t1	85,5	200	135
	d2	m1/d2/t1	191,2	186,2	141,2
		m2/d2/t1	200	167,8	178,3
		m3/d2/t1	133,5	173,5	137,9
	d3	m1/d3/t1	196,3	142,3	119,7
		m2/d3/t1	194,4	154,9	87,2
		m3/d3/t1	200	159	135,4
t2	d1	m1/d1/t2	136,9	186,9	162
		m2/d1/t2	177,8	169,7	160
		m3/d1/t2	177,1	150,7	162,4
	d2	m1/d2/t2	165,3	200	196,1
		m2/d2/t2	47,7	196	178,5
		m3/d2/t2	136,5	160,5	169,9
	d3	m1/d3/t2	163,4	134,4	144,6
		m2/d3/t2	166,7	188,4	157,2
		m3/d3/t2	184,7	160,2	130,8
t3	d1	m1/d1/t3	140	173,7	143,2
		m2/d1/t3	168,6	187,4	158,6
		m3/d1/t3	200	200	174,5
	d2	m1/d2/t3	163,3	183,8	144,3
		m2/d2/t3	171,9	158,3	110,3
		m3/d2/t3	171,5	148,3	124
	d3	m1/d3/t3	200	147,2	170,3
		m2/d3/t3	200	200	174,4
		m3/d3/t3	200	200	169,7

PINK1 2 Monate Rotenon								
Brain Number			1280	1297	1266	1205	1242	1279
t1	d1	m1/d1/t1	64,5	57,5	26	66	18,4	90
		m2/d1/t1	187,3	115,6	71,2	146,5	0,1	132,8
		m3/d1/t1	133,6	127,2	145,4	102	92,7	176
	d2	m1/d2/t1	98,9	146,4	193,2	101,9	166,5	175,6
		m2/d2/t1	144,1	121,5	155,6	89	166,8	174
		m3/d2/t1	131,3	117,2	200	119,9	151,1	191,6
	d3	m1/d3/t1	100,7	139,4	156,9	74	121,8	120,5
		m2/d3/t1	106,6	131	136,4	149,1	151,8	133,9
		m3/d3/t1	135	144	146	125,4	189,6	129,8
t2	d1	m1/d1/t2	118,7	128,1	113,9	121,9	161,6	168,4
		m2/d1/t2	129,9	119,7	117,8	107,7	127,8	179,4
		m3/d1/t2	136	92,6	145,6	171,7	147,8	179,4
	d2	m1/d2/t2	102,6	95,5	137,8	124,6	144	158,5
		m2/d2/t2	100,7	159,7	129,9	109,6	176,7	166
		m3/d2/t2	184,7	118	115	150	117,5	115,2
	d3	m1/d3/t2	115,2	95,2	60,3	87,8	94,2	149,1
		m2/d3/t2	130,9	131,2	27,9	103,2	198	187
		m3/d3/t2	152,7	146,6	109,3	120,7	137,2	183,6
t3	d1	m1/d1/t3	100,3	169,6	134,2	108,6	195,1	184,2
		m2/d1/t3	105	189	134	134,2	104,9	190,1
		m3/d1/t3	141,5	170,1	132,8	120,5	68	182,2
	d2	m1/d2/t3	153,4	150,1	109,1	104,8	172,2	158,3
		m2/d2/t3	118,5	75,3	134,1	130,7	113,8	176,2
		m3/d2/t3	137,6	178,6	125,1	136	126,8	134,6
	d3	m1/d3/t3	107,7	139,6	110,3	159,2	154,6	194,3
		m2/d3/t3	137,4	146,6	149,6	155	200	200
		m3/d3/t3	128	181,1	147,6	149,9	122,2	200

Danksagung

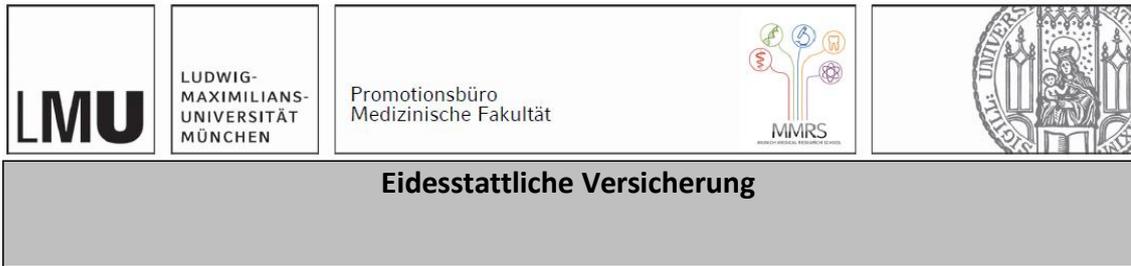
Zunächst möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. med. Francisco Pan-Montojo sowie bei meinem initialen Doktorvater Prof. Dr. med. Armin Giese für ihre Zeit, ihre Betreuung und die Möglichkeit, diese Arbeit überhaupt durchführen zu dürfen, bedanken. Bei Herrn Prof. Dr. med. Johannes Levin möchte ich mich dafür bedanken, dass er im Verlauf die Betreuung meiner Arbeit übernommen hat, sowie für seine nützlichen Hinweise und Korrekturen, die die Arbeit sicherlich aufgewertet haben. Außerdem gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Helmholtzzentrums sowie des ZNPs, allen voran dem Team aus der Tierhaltung, ohne die die Durchführung meiner Versuche nicht möglich gewesen wäre.

Für die geduldige Einarbeitung sowie ein offenes Ohr für alle Fragen, die im Labor aufkamen, möchte ich zudem ein großes Dankeschön an Yanina Dening, Qi Shang und meinen Mitdoktorandinnen Victoire Jouin-Genton und Theresa Straßl aussprechen. Die gute Zusammenarbeit lässt mich die Zeit im Labor in guter Erinnerung behalten.

Für ihre durchgehende Unterstützung danke ich meiner Familie, insbesondere meiner Schwester Katharina für die künstlerische Unterstützung bei der Aufbereitung der Abbildungen, die zahlreichen Tipps und Ratschläge und für die emotionale Unterstützung rund um diese Doktorarbeit.

Mein größter Dank gilt abschließend meinen Eltern, die mir letztlich meine gesamte Ausbildung ermöglicht haben und die mir mit ihrem Vertrauen und ihrer Geduld auf meinem Weg immer eine große Unterstützung waren.

Affidavit



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

„Untersuchung der Gen-Umwelt-Interaktion bei der Entstehung der Parkinson-Krankheit: Besteht eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Rotenon bei Tieren mit Parkinson-assoziierten Mutationen (PTEN-induzierte Kinase 1 und Leucine-Rich Repeat Kinase 2) im Vergleich zu Wildtyp?“

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, 30.06.2025

Ort, Datum

Magdalena Fischer

Unterschrift Doktorandin