

Aus dem Institut für Neuropathologie
(Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung)
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. med. A. Giese

**Der Einfluss dreiwertiger Metallionen auf die Entwicklung des
Morbus Parkinson im transgenen Tiermodell**

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

vorgelegt von

Karin Schinke

aus

München

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. A. Giese
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Harald Steiner Prof. Dr. med. Kai Bötzel
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. med. J. Levin
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	14.04.2016

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	9
1.1. Neurodegenerative Erkrankungen.....	9
1.2. Der Morbus Parkinson.....	9
1.3. α -Synuclein.....	12
1.3.1. Die Proteinfamilie der Synucleine.....	13
1.3.2. Die Struktur von α -Synuclein.....	13
1.3.3. Die Funktion von α -Synuclein.....	15
1.3.4. Aggregationsverhalten von α -Synuclein.....	16
1.3.5. Mögliche Toxizitätsmechanismen von α -Synuclein.....	17
1.4. Die Rolle von dreiwertigen Metallionen in der Pathogenese des Morbus Parkinson.....	19
1.4.1. Mit Metallionen assoziierte neurodegenerative Erkrankungen.....	19
1.4.2. Der Eisenmetabolismus.....	19
1.4.3. Die Rolle von Eisen in der Pathogenese des Morbus Parkinson.....	20
1.4.4. Mögliche Interaktionsmechanismen zwischen Metallionen und α - Synuclein.....	21
1.4.5. Die Rolle von weiteren dreiwertigen Metallionen in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen.....	23
1.5. Tiermodelle für den Morbus Parkinson.....	24
1.6. Fragestellung.....	25
2. MATERIAL UND METHODEN.....	27
2.1. Materialien.....	27
2.2. Tierversuch.....	31
2.2.1. Versuchstiere.....	33
2.2.2. Tierhaltung.....	33
2.2.3. Futtermittel.....	34
2.2.4. Versuchsgruppen.....	35
2.2.5. klinische Verlaufsbeobachtungen.....	35
2.2.5.1. Motorische Leistungsüberprüfung (RotaRod-Messung).....	36
2.2.5.2. Gewichtskontrollen.....	37
2.2.5.3. Überleben.....	38
2.2.5.4. Krankheitsfreies Überleben.....	38

2.2.5.5. Ausschluss aus dem Versuch	38
2.3. Molekulargenetische Untersuchungen.....	38
2.3.1. DNA-Isolierung	39
2.3.2. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	40
2.3.2.1. Primer.....	40
2.3.2.2. Reaktionsbedingungen.....	41
2.3.2.3. Reaktionsablauf der PCR.....	41
2.3.3. Agarose-Gelelektrophorese.....	41
2.3.3.1. Agarosegel	42
2.3.3.2. Probenansatz für die Gelelektrophorese	42
2.3.3.3. Elektrophorese	42
2.4. Bestimmung der Metallionenkonzentration in Futtermitteln und Gewebeproben	43
2.4.1. Hochdruckveraschung.....	43
2.4.2. Probenvorbereitung	43
2.4.2.1. Futtermittelproben	43
2.4.2.2. Gewebeproben.....	43
2.4.3. Druckaufschluss	44
2.4.4. Induktiv-gekoppelte Plasma-Massenspektroskopie (ICP-MS)	44
2.5. Histopathologische und immunhistochemische Untersuchungen.....	45
2.5.1. Sektion der Versuchstiere	45
2.5.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung	46
2.5.3. immunhistochemische Färbung.....	46
2.5.3. Qualitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung	47
2.5.4. Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung	48
2.6. statistische Analyse	49
2.6.1. statistische Analyse der Laufleistung der Versuchstiere	50
2.6.2. statistische Analyse der Gewichtsentwicklung der Versuchstiere	51
2.6.3. statistische Analyse des Überlebens der transgenen Versuchstiere.....	52
2.6.4. statistische Analyse des krankheitsfreien Überlebens der transgenen Versuchstiere	52
2.6.5. statistische Analyse der cerebralen α -Synuclein-Ablagerungen	52
3. ERGEBNISSE.....	53
3.1. Messung der Metallionenkonzentrationen	53

3.1.1. Bestimmung der Metallionenkonzentration im Basisexperimentfutter für Versuchstiere	53
3.1.2. Bestimmung der Metallionenkonzentration im Spezialfuttermittel	53
3.1.3. Bestimmung der Metallionenkonzentration im Blut und Gehirngewebe von Wildtypversuchstieren	54
3.1.3.1. Wildtypversuchstiere im Alter von 12 Wochen	54
3.1.3.2. Wildtypversuchstiere im Alter von 28 Wochen	55
3.2. Genotypisierung	57
3.3. Vorzeitige Entnahme aus dem Tierversuch	58
3.4. Laufleistung der Versuchstiere	59
3.4.1. Laufleistung der Wildtypversuchstiere	59
3.4.1.1. Laufleistung der einzelnen Wildtypversuchstiere	59
3.4.1.2. Vergleich der Laufleistung zwischen den Wildtypversuchsgruppen	61
3.4.2. Laufleistung der transgenen Versuchstiere	62
3.4.2.1. Laufleistung der einzelnen transgenen Versuchstiere	62
3.4.2.2. Vergleich der Laufleistung der transgenen Versuchstiere mit der Laufleistung der Wildtypversuchstiere	65
3.4.2.3. Laufleistung der transgenen Referenzgruppe	65
3.4.2.4. Laufleistung der transgenen Eisengruppe	66
3.4.2.5. Laufleistung der transgenen Aluminiumgruppe	67
3.4.2.6. Laufleistung der transgenen Gadoliniumgruppe	69
3.5. Gewichtsentwicklung	70
3.5.1. Gewichtsentwicklung der Wildtypversuchstiere	70
3.5.1.1. Gewichtsentwicklung der einzelnen Wildtypversuchstiere	70
3.5.1.2. Vergleich der Gewichtsentwicklung zwischen den Wildtypversuchsgruppen	71
3.5.2. Gewichtsentwicklung der transgenen Versuchstiere	73
3.5.2.1. Gewichtsentwicklung der einzelnen transgenen Versuchstiere	73
3.5.2.2. Vergleich der Gewichtsentwicklung zwischen den transgenen Versuchsgruppen	74
3.5.2.3. Gewichtsentwicklung der transgenen Referenzgruppe	75
3.5.2.4. Gewichtsentwicklung der transgenen Eisengruppe	76
3.5.2.5. Gewichtsentwicklung der transgenen Aluminiumgruppe	77

3.5.2.6. Gewichtsentwicklung der transgenen Gadoliniumgruppe	78
3.6. Überleben	79
3.6.1. Überleben der Wildtypversuchstiere.....	79
3.6.2. Überleben der transgenen Versuchstiere	79
3.6.2.1. mittlere Überlebensdauer	79
3.6.2.2. Kaplan-Meier-Analyse	81
3.7. Krankheitsfreies Überleben.....	82
3.8. Neuropathologische Veränderungen im Hirnstamm und Cortex der transgenen Versuchstiere	83
3.8.1. Qualitative Auswertung der histopathologischen Untersuchungen im Hirnstamm und im Cortex der transgenen Versuchstiere	83
3.8.2. Quantitative Auswertung der histopathologischen Untersuchungen im Hirnstamm der transgenen Versuchstiere	86
3.8.2.1. α -Synuclein-Ablagerungen im Hirnstamm von transgenen Versuchstieren im Alter von 62 Wochen	86
3.8.2.2. α -Synuclein-Ablagerungen im Hirnstamm aller transgenen Versuchstiere	88
3.8.3. Quantitative Auswertung der histopathologischen Untersuchungen im Cortex der transgenen Versuchstiere.....	90
3.8.3.1. α -Synuclein-Ablagerungen im Cortex von transgenen Versuchstieren im Alter von 62 Wochen	90
3.8.3.2. α -Synuclein-Ablagerungen im Cortex aller transgenen Versuchstieren	92
4. DISKUSSION	95
4.1. Die Untersuchung des Einflusses von dreiwertigen Metallionen auf den Morbis Parkinson <i>in vivo</i>	95
4.2. Ausschluss von Deprivations- oder Toxizitätseffekten.....	100
4.3. Der Einfluss von Eisen auf die Pathogenese der Parkinsonerkrankung <i>in vivo</i>	101
4.4. Das A30P- α -Synuclein-Mausmodell als potentielles Tiermodell für die Neurodegeneration mit Eisenablagerung im Gehirn.....	104
4.5. Der Einfluss von Aluminium auf die Pathogenese der Parkinsonerkrankung <i>in vivo</i>	104

4.6. Der Einfluss von Gadolinium auf die Pathogenese der Parkinsonerkrankung <i>in vivo</i>	106
4. AUSBLICK.....	110
5. ZUSAMMENFASSUNG	112
6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	115
7. TABELLENVERZEICHNIS.....	118
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	120
9. LITERATURVERZEICHNIS	122
10. DANKSAGUNG.....	135
11. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	136

1. EINLEITUNG

1.1. Neurodegenerative Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen umfassen eine Gruppe von Krankheiten des zentralen Nervensystems, die durch eine fortschreitende Dysfunktion und Degeneration von Nervenzellen gekennzeichnet sind. Zu diesem Krankheitsspektrum gehören beispielsweise unter anderem der Morbus Alzheimer und der Morbus Parkinson (Ross, 2004).

Neurodegenerative Erkrankungen treten sporadisch oder familiär gehäuft auf. Sie sind durch eine zunehmende Inzidenz jenseits des 50. Lebensjahres gekennzeichnet. Aufgrund der demographischen Veränderungen in Deutschland und Europa steigt die Prävalenz stetig an (de Rijk, 2000). Neurodegenerative Erkrankungen manifestieren sich unter anderem durch Störungen des abstrakten Denkens und der Persönlichkeit und durch Einschränkungen der Bewegung oder der Koordination (J. B. Martin, 1999).

Ein gemeinsames Merkmal aller häufigen neurodegenerativen Erkrankungen sind krankheitsspezifische fibrilläre Proteinablagerungen im zentralen Nervensystem (Soto, 2003). Diese Proteinaggregate und ihre Aggregationsvorstufen, sogenannte Oligomere, werden in Zusammenhang mit dem neuronalen Zelluntergang bei neurodegenerativen Erkrankungen gebracht, weshalb ihnen eine zentrale Rolle in der Pathogenese zugesprochen wird (Aguzzi, 2003; Caughey, 2003; Haass, 2007). Im Falle des Morbus Parkinson, der Multisystematrophie und der Demenz mit Lewy-Körperchen handelt es sich bei diesen Proteinansammlungen im zentralen Nervensystem um α -Synuclein. Daher werden sie den Synucleinopathien, einer Untergruppe der neurodegenerativen Erkrankungen, zugeordnet (Glennner, 1984; Grundke-Iqbal, 1986; Ross, 2004). Die Variante der Alzheimer-Demenz mit Lewy-Körperchen und die Neurodegeneration mit cerebraler Eisenablagerung Typ 1 (engl.: *Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation, NBIA*) werden auch zu den Synucleinopathien gezählt (Marti, 2003; Spillantini, 1998; Spillantini, 2000).

1.2. Der Morbus Parkinson

Beim Morbus Parkinson handelt es sich um die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung und die häufigste neurodegenerative Bewegungsstörung (Forman, 2005; Tolosa, 2006). Die Erkrankungsprävalenz in Europa beträgt 100-200 Betroffene auf

EINLEITUNG

100.000 Einwohner und steigt mit dem Lebensalter an; demnach sind schätzungsweise 1 % der über 65-jährigen Bevölkerung betroffen (Veldman, 1998). In Bezug auf die Geschlechterpräferenz wird eine geringgradige männliche Dominanz beschrieben (Van Den Eeden, 2003).

1817 beschrieb James Parkinson erstmals diese Bewegungsstörung anhand des klassischen Symptomkomplexes Tremor, Rigor, Akinese und posturale Instabilität (Parkinson, 1817). Zu den präklinischen Symptomen gehören sowohl Störungen des Riechvermögens, des Schlafverhaltens und des Affekts als auch vegetative oder autonome Dysfunktionen (Becker, 2002). Im Krankheitsverlauf können neben der hypokinetisch-rigiden Bewegungsstörung zusätzliche neuropsychiatrische Symptome wie beispielsweise Demenz, Depression, Psychosen und Verhaltensauffälligkeiten auftreten.

Bei den Parkinson-Syndromen unterscheidet man zwischen den familiären, den idiopathischen und den symptomatischen Erkrankungsformen. Die familiären und hereditären Formen der Parkinsonerkrankung beruhen auf Genmutationen und sind durch einen zumeist frühen Erkrankungsbeginn gekennzeichnet (Simon-Sanchez, 2012; Winklhofer, 2008). Das idiopathische Parkinson-Syndrom (Morbus Parkinson) manifestiert sich meist ab der 6. Lebensdekade und macht den Großteil der Erkrankungsfälle aus. Die Ätiologie dieser Form bleibt noch unklar. Derzeit führt man sie am Ehesten auf eine Kombination aus einer genetischen Prädisposition und umweltbedingten Faktoren wie der Exposition gegenüber Neurotoxinen, beispielsweise Pestiziden, Herbiziden, Umweltgiften und Schwermetallen, zurück (Tanner, 1996; Winklhofer, 2008). Symptomatische Parkinson-Syndrome können beispielsweise medikamenteninduziert, toxisch, entzündlich oder vaskulär bedingt sein und ein sehr ähnliches klinisches Bild hervorrufen (Bohlega, 2013; Gupta, 2011).

Der Morbus Parkinson zeichnet sich durch die progrediente Degeneration dopaminergener Neurone im Mittelhirn, insbesondere im Bereich der Substantia nigra pars compacta, aus. Der dort synthetisierte Neurotransmitter Dopamin moduliert die Willkürmotorik durch ein subcortical gelegenes nigrostriatales Regulationssystem. Bei einem Dopaminmangel kommt es zu einem Ungleichgewicht in diesem Regulationssystem, das zu hypokinetisch-rigiden Bewegungsstörungen führt. Ab einem Zellverlust von 50-60 % im Bereich der Substantia nigra manifestiert sich der

EINLEITUNG

Dopaminmangel anhand der klassischen klinischen Symptome (Becker, 2002; BraakRub, 2003).

In histopathologischen Untersuchungen finden sich in den betroffenen, dopaminergen Neuronen der Substantia nigra pars compacta charakteristische filamentöse Einschlüsse: die Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten (Spillantini, 1997). Letztere sind filamentöse Proteinablagerungen in den efferenten Neuriten der Neuronen, die unter anderem das Protein α -Synuclein enthalten (Spillantini, 1998). Bei den Lewy-Körperchen handelt es sich um zytoplasmatische Einschlüsse, die erstmals 1912 von Friedrich H. Lewy beschrieben wurden (Lewy, 1912). Sie bestehen größtenteils aus aggregiertem α -Synuclein (Baba, 1998; Spillantini, 1997), wobei auch andere Proteine Bestandteile dieser Einschlüsse bilden können: 14-3-3 Proteine, Tau, Proteine des Ubiquitin-Proteasomen-Systems und Proteine für Signalwege, das Zytoskelett oder den Zellzyklus (Wakabayashi, 2007). Lichtmikroskopisch stellen sich die Lewy-Körperchen in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) als sphärische, eosinophile Körper mit einem dichten Kern und einem helleren Halo im Perikaryon dopaminergener Neuronen dar (Abbildung 1). In der elektronenmikroskopischen Darstellung zeigt sich ein Kern aus dichtem, filamentartigem und granulären Material, der von kreisförmig angeordneten Filamenten umgeben ist (Forno, 1996; Wakabayashi, 2007).

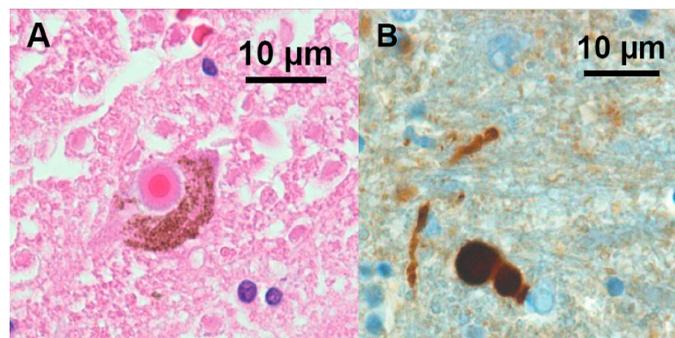


Abbildung 1: Histologische Darstellung eines Lewy-Körperchen und eines Lewy-Neuriten im Hirnstamm beim Morbus Parkinson mittels Lichtmikroskopie.

(A) Ein intrazelluläres zytoplasmatisches Lewy-Körperchen in einem Neuron im Hirnstamm (HE-Färbung). (B) Jeweils zwei, mit dem Antikörper 15G7 immunhistochemisch angefärbte α -Synuclein-positive Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten im Hirnstamm. (Bilder: Dr. med. T. Högen, Neurologische Klinik und Poliklinik der LMU München).

Voraussetzung für die histopathologische Diagnosestellung des Morbus Parkinson ist das Vorkommen von Lewy-Körperchen in der Substantia nigra und dem Locus coeruleus, die Prädilektionsstellen für neuronalen Verlust bei der Parkinsonerkrankung darstellen.

Die Einschlüsse betreffen im Laufe der Parkinsonerkrankung sequentiell verschiedene Gehirnregionen (BraakDel Tredici, 2003): Im Anfangsstadium werden diese zunächst vor allem im Nucleus vagus und Nucleus glossopharyngeus in der Medulla oblongata gefunden; im Verlauf kommen sie auch im Hirnstamm und im Mittelhirn vor. Später sind auch der entorhinale Cortex und der Neocortex betroffen. In anderen Hirnregionen wie beispielsweise im motorischen Kern des Nucleus vagus, Hypothalamus, Nucleus Basalis Meynert, Bulbus olfactorius und in Strukturen des autonomen Nervensystems wurden ebenfalls Lewy-Körperchen nachgewiesen (Forno, 1996; Iwai, 1995). Die topographische Verteilung und die Anzahl der Lewy-Körperchen korreliert dabei mit dem Krankheitsstadium der Parkinsonerkrankung: je mehr Gehirnregionen betroffen sind, desto schwerer manifestiert sich die Erkrankung (BraakDel Tredici, 2003).

1.3. α -Synuclein

α -Synuclein ist ein abundant im Gehirn vorkommendes Protein. Es macht etwa 0,5 bis 1 % aller zytoplasmatischen cerebralen Proteine aus und ist vor allem in Neuronen zu finden (Iwai, 1995). Außerhalb des Gehirns konnte α -Synuclein in Schwanzzellen des peripheren Nervensystems und in hämatopoietischen Zellen nachgewiesen werden (Mori, 2002; E. C. Shin, 2000).

Bei den Synucleinopathien kommt es zur pathologischen Ablagerung von α -Synuclein in Form von zytoplasmatischen Einschlüssen in den Perikaryen und Axonen von Nervenzellen (Forno, 1996; Goedert, 2001a; Spillantini, 2000). Hier ist das α -Synuclein bevorzugt in der Präsynapse und in der Nähe von synaptischen Vesikeln lokalisiert (Clayton, 1999). Die Einschlüsse lassen sich grob in fünf morphologische Strukturen unterteilen: die in 1.2 beschriebenen Lewy-Körperchen (Forno, 1996) und Lewy-Neuriten kommen in Neuronen beim Morbus Parkinson vor (Braak, 1999), gliale und neuronale zytoplasmatische Einschlüsse finden sich bei der Multisystematrophie (Nishie, 2004; Papp, 1989) und sphäroide Einschlüsse können bei der Demenz mit Lewy-Körperchen detektiert werden (Jellinger, 2003).

1.3.1. Die Proteinfamilie der Synucleine

Zur Proteinfamilie der Synucleine gehören drei strukturähnliche Proteine, die beim Menschen auf den Chromosomen 4q21 (α -Synuclein), 5q35 (β -Synuclein) und 10q23 (γ -Synuclein) kodiert sind. Diese drei Proteine haben eine Länge von 127 bis 140 Aminosäuren und stimmen in ihrer Sequenz zu 55 bis 62 % überein (Goedert, 2001b).

α -Synuclein wurde erstmals 1988 im elektrischen Organ des kalifornischen Zitterrochen (Torpedo californica) und im Gehirn von Ratten beschrieben (Maroteaux, 1988). Auf eine mögliche Rolle von α -Synuclein in der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen deuteten erstmals biochemische Analysen von Amyloidplaques aus Gehirnen von Patienten mit Morbus Alzheimer hin, in denen neben dem bekannten β -Amyloid ein zweites intrinsisches Peptid nachgewiesen wurde. Dieses 35 Aminosäuren-lange Peptid wurde Nicht-A β -Komponente (NAC) benannt und war Bestandteil eines 140 Aminosäuren langen Vorläuferproteins, das entsprechend Nicht-A β -Komponenten-Vorläuferprotein (NACP) benannt wurde (Ueda, 1993). Wenige Zeit später wurden zwei Proteine in cerebralen Gewebeproben von Patienten mit Morbus Alzheimer isoliert: Ein 140 Aminosäuren langes Peptid war identisch mit dem zuvor beschriebenen NACP in Amyloidplaques bei Morbus Alzheimer und wurde als α -Synuclein identifiziert. Das zweite und 134 Aminosäuren lange Peptid hatte eine starke Ähnlichkeit zu Phosphoneuroprotein-14, einem kurz zuvor beschriebenen gehirnspezifischen bovinen Protein, und wurde fortan als β -Synuclein bezeichnet (Jakes, 1994; Ueda, 1993).

Ein weiteres homologes Peptid wurde im Hinterwurzelganglion der Ratte und im menschlichen Brustdrüsengewebe gefunden. Als dazugehöriges Gen wurde das Brustkrebs-spezifische Gen identifiziert (Akopian, 1995; Ji, 1997). Aufgrund der Struktur- und Sequenzähnlichkeit mit α - und β -Synuclein wurde es γ -Synuclein benannt (Clayton, 1998).

1.3.2. Die Struktur von α -Synuclein

Das humane α -Synuclein hat ein molekulares Gewicht von 14 Kilodalton (kDa) und liegt im nativen Zustand in einer ungefalteten Form vor, weshalb es als intrinsisch ungeordnetes Protein bezeichnet wird (Breydo, 2011; Weinreb, 1996). Aufgrund von alternativen Splicings sind bisher drei Isoformen von α -Synuclein bekannt: α -Synuclein-112 (Deletion Exon 5, Aminosäuren 103-130), α -Synuclein-126 (Deletion

Exon 3, Aminosäuren 41-54) und Synuclein-140 als Volllängenprodukt (Beyer, 2006). Die Aminosäuresequenz von α -Synuclein kann in drei Hauptabschnitte mit jeweils unterschiedlichen Strukturmerkmalen und Eigenschaften unterteilt werden:

(i) Die N-terminale Region (Aminosäuren 1-60) beinhaltet vier, jeweils 11 Aminosäuren lange Wiederholungssequenzen mit dem Konsensusmotiv KTKEGV. Zwei weitere identische Wiederholungssequenzen finden sich außerdem im Übergang zur und innerhalb der zentralen sogenannten NAC-Region. Im N-terminalen Bereich liegen die bisher bekannten Punktmutation A30P, E46K, H50Q, G51D und A53T, die bei hereditären Formen des Parkinson-Syndroms nachweisbar sind (Kruger, 1998; Lesage, 2013; Li, 2001; Polymeropoulos, 1997; Proukakis, 2013; Zarranz, 2004).

(ii) Die zentral gelegene Peptidregion (Aminosäuren 61 bis 95), die mit der in 1.3.1 beschriebenen NAC identisch ist, zeichnet sich durch eine Vielzahl hydrophober Aminosäuren aus (Ueda, 1993). Sie verleiht dem α -Synuclein einen stark amyloidogenen und β -Faltblatt-fördernden Charakter. Außerdem spielt eine aus 11 hydrophoben Aminosäuren lange Sequenz (Aminosäuren 72-83) in dieser zentralen Peptidregion eine große Rolle bei der Aggregationsneigung von α -Synuclein (Giasson, 2001; Uversky, 2001b). β -Synuclein und γ -Synuclein weisen im Gegensatz eine andere Aminosäureabfolge in der zentralen Region auf und haben daher keine beziehungsweise nur eine schwache Aggregationstendenz (Biere, 2000; Kahle, 2002; Uversky, 2002).

(iii) Die C-terminale Peptidregion des α -Synucleins ist aufgrund der darin enthaltenen sauren Aminosäurereste negativ geladen. Die Aminosäuren Tyrosin und Serin, die häufig in dieser Peptidregion vorkommen, stellen mögliche Phosphorylierungs- und Nitrosylierungsstellen für posttranslationale Modifikationen von α -Synuclein dar (Okochi, 2000; Uversky, 2005). Die dadurch am C-Terminus induzierten Strukturveränderungen können die Funktion und das Aggregationsverhalten des Proteins beeinflussen. Weitere posttranslationale Modifikationen wie die Trunkierung von α -Synuclein am C-Terminus sind ebenfalls möglich und führen beispielsweise zu einer erhöhten Aggregationstendenz. Auch durch die Interaktion der C-terminalen Region mit Metallionen kann die Aggregation von α -Synuclein beschleunigt werden (Paik, 1999; Uversky, 2001b).

1.3.3. Die Funktion von α -Synuclein

Die physiologische Funktion von α -Synuclein ist trotz intensiver Grundlagenforschung noch nicht vollständig entschlüsselt worden. Derzeit wird sie vor allem in der Interaktion mit Membranen (i), im Einfluss auf den Vesikelkreislauf (ii) und in der Wechselwirkung mit anderen Proteinen (iii) vermutet.

(i) In Gegenwart von Phospholipidvesikeln und -membranen verändert die N-terminale Region von α -Synuclein ihre Konformation von einer ungeordneten Sekundärstruktur in eine gefaltete Struktur mit zwei amphiphilen α -Helices und ähnelt damit strukturell der Bindungsstelle von Apolipoproteinen (Davidson, 1998). Das helicale α -Synuclein interagiert vor allem mit Phospholipidmembranen, negativ geladenen Vesikeln, Fettsäuren und zellulären Membranen (Beyer, 2007; Uversky, 2007), was möglicherweise auch die in 1.3 beschriebene präsynaptische Lokalisation erklärt (Specht, 2005).

(ii) Aufgrund der zuvor beschriebenen Interaktionen mit Lipidmembranen spielt α -Synuclein auch eine wichtige Rolle in der Stabilisierung und Regulierung von Vesikeln und der damit verbundenen synaptischen Übertragungsfunktion (Beyer, 2007; Clayton, 1999; Kamp, 2006; Uversky, 2007). Im Bereich der präsynaptischen Nervenendigungen liegt das monomere α -Synuclein zu 15 % in Vesikel-beziehungsweise in an der Plasmamembran gebundener Form vor (Lee, 2002). Mittels Zellkulturstudien konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von α -Synuclein die Fusion mit der Plasmamembran und die Verschmelzung von Vesikeln in der Präsynapse behindert (Larsen, 2006). In einer weiteren Zellkulturstudie mit Hippocampus-Neuronen wurde die α -Synucleinexpression durch RNA-Interferenz quantitativ reduziert und eine damit verbundene verminderte Anzahl an Vesikeln, die nicht an der präsynaptischen Membran gebunden waren, beobachtet (Murphy, 2000). Bei der Untersuchung von α -Synuclein überexprimierenden Neuronen *in vitro* und der Untersuchung von α -Synuclein-Knockout-Mäusen konnte eine Veränderung der Membranfluidität, der zellulären Fettsäureaufnahme und des Fettsäuremetabolismus festgestellt werden, was auf eine mögliche Funktion von α -Synuclein als Stabilisator von Membranen hindeutet (Uversky, 2007).

(iii) Die Interaktionen von α -Synuclein mit zytosolischen und membrangebundenen Proteinen stellt möglicherweise eine weitere wichtige Funktion von α -Synuclein dar. Beispielsweise wurde eine inhibierende Wirkung von α -Synuclein auf die Phospholipase D2, die in der Nähe der Plasmamembran lokalisiert ist,

nachgewiesen. Die Phospholipase D2 hydrolysiert Phosphatidylcholin in die sekundären Botenstoffe Phosphatidsäure und Cholin und greift so in die Regulation des Zytoskeletts und die Endozytose ein. Die Interaktion von α -Synuclein mit Proteinen wie der Phospholipase D2 kann mittels Phosphorylierung von α -Synuclein durch verschiedene Kinasen vermindert werden (Goedert, 2001a).

Für α -Synuclein wurde zudem eine Struktur- und Funktionsähnlichkeit zu sogenannten 14-3-3-Proteinen nachgewiesen (Ostrerova, 1999). Bei 14-3-3-Proteinen handelt es sich um Chaperone, die die intrazelluläre Proteinfaltung überwachen und die Entsorgung fehlgefalteter Proteine einleiten. Außerdem üben 14-3-3-Proteine einen antiapoptotischen Effekt auf Zellen aus, indem sie proapoptotische Faktoren antagonisieren. Durch die Bindung von α -Synuclein an diese Proteine könnte sich ein Komplex bilden, der die Chaperonfunktion unterbindet und somit den Zelltod durch Akkumulation fehlgefalteter Proteine fördert (Recchia, 2004).

1.3.4. Aggregationsverhalten von α -Synuclein

Die Zusammenlagerung von Einzelmolekülen, sogenannten Monomeren, in große fibrilläre Proteinaggregate ist ausschlaggebend für die pathologische Ablagerung von krankheitsspezifischen amyloidartigen Proteinen in Neuronen im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen (Ross, 2004). Dies ist auch für α -Synuclein nachgewiesen worden (Soto, 2003). Der Aggregationsprozess von α -Synuclein verläuft dabei über die Bildung von intermediären Aggregaten, die in der Literatur uneinheitlich als Oligomere, Protofibrillen oder Protofilamente bezeichnet werden. Sie stellen instabile Zwischenstufen im Entstehungsprozess von α -Synuclein-Fibrillen dar (Conway, 2000; Kaye, 2003; Volles, 2001).

Die in 1.3.2 beschriebene hydrophobe Aminosäuresequenz im zentralen Peptidbereich spielt eine bedeutende Rolle in der Aggregationstendenz von α -Synuclein, indem sie zu einer Veränderung der Sekundärstruktur führt und die Aggregation initiiert (Weinreb, 1996). Der Aggregationsbeginn von α -Synuclein folgt dabei dem Keimbildungsprinzip: Durch die Anlagerung von vorbestehenden α -Synuclein-Oligomeren an α -Synuclein-Monomere entstehen in der sogenannten lag-Phase größere α -Synuclein-Aggregate. So kann der Beginn des Aggregationsprozesses beschleunigt werden (engl. „seed“) (Haass, 2007; Kostka, 2008; Wood, 1999). Die dabei entstehenden intermediären Oligomere liegen in

einem Gleichgewicht mit α -Synuclein-Monomeren im Zytosol vor und weisen einen im Vergleich zu monomeren α -Synuclein höheren Anteil an β -Faltblattstruktur vor. Sie zeigen zudem eine höhere Neigung zur Fibrillenbildung (Cole, 2002; Uversky, 2001a). Die darauffolgende Elongationsphase des Aggregationsprozesses beschreibt das weitere Wachstum der im ersten Schritt gebildeten α -Synuclein-Oligomere zu großen fibrillären Aggregaten. Die Aggregationsgeschwindigkeit folgt dabei einer Kinetik 1. Ordnung, indem sie von der Konzentration an löslichen α -Synuclein-Monomeren im Zytosol abhängig ist (Wood, 1999).

Die Aggregationstendenz von α -Synuclein wird durch verschiedene Faktoren wie der Phosphorylierung, der C-terminalen Trunkierung sowie der posttranslationalen und oxidativen Modifikationen moduliert (Uversky, 2007). Im Vergleich zu Wildtyp- α -Synuclein weist humanes mutiertes α -Synuclein eine veränderte Bildung von α -Synuclein-Fibrillen auf, was auf die Konformationsänderung durch die Punktmutation zurückgeführt wird (Conway, 1998). Außerdem konnte anhand von *in vitro*- und Zellkultur-Studien gezeigt werden, dass die Aggregationsrate von humanem α -Synuclein nach Zugabe von dreiwertigen Metallionen erhöht wird. Dieser Effekt konnte nicht nach Zugabe von zweiwertigen Metallionen nachgewiesen werden (Hillmer, 2010; Kostka, 2008; Levin, 2011).

1.3.5. Mögliche Toxizitätsmechanismen von α -Synuclein

In vitro Untersuchungen weisen darauf hin, dass nicht die fibrillären amyloidartigen α -Synuclein-Aggregate die molekularpathologische Ursache der Neurodegeneration bei der Parkinsonerkrankung darstellen, sondern sich vielmehr die α -Synuclein-Oligomere als die toxischen Moleküle in der Pathogenese des Morbus Parkinson erweisen (Abeliovich, 2000; Chandra, 2004; Haass, 2007; Kaye, 2003; Uversky, 2007; Winklhofer, 2008). Hierfür wurden mehrere potentielle molekulare Pathomechanismen dieser Oligomere postuliert:

(i) α -Synuclein-Oligomere besitzen porenbildende Eigenschaften (Lashuel, 2006). Sie können Poren in Lipidmembranen von Vesikeln und Zellorganellen bilden und führen aufgrund der veränderten intrazellulären Membranpermeabilität zu zellulären Dysfunktionen und letztendlich zum Zelltod (Kayed, 2004; Kostka, 2008; Lashuel, 2002; Lashuel, 2006; Volles, 2001). Die von α -Synuclein-Oligomeren gebildeten Poren in Lipiddoppelmembranen besitzen dabei spezifische elektrophysiologische Eigenschaften (Schmidt, 2012).

(ii) Ferner greifen α -Synuclein-Oligomere möglicherweise auch in die synaptische Übertragung ein. Bei α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure-Rezeptoren (AMPA-Rezeptoren) handelt es sich um eine im zentralen Nervensystem (ZNS) weit verbreitete Untergruppe von Glutamatrezeptoren für Neurotransmitter. In mit α -Synuclein-Oligomeren inkubierten Neuronenkulturen konnte eine erhöhte prä- und postsynaptische AMPA-Rezeptor-vermittelte Aktivität beobachtet werden. Hierüber kam es zu einer vermehrten exzitatorischen synaptischen Funktion mit erhöhter Glutamatausschüttung. Dies könnte zu einem intrazellulären Calciumungleichgewicht und somit zu einer zellulären Dysfunktion führen (Huls, 2011).

(iii) Andererseits können α -Synuclein-Oligomere auch mit Proteasomen interagieren. Das Proteasom ist eine zelluläre Struktur, die fehlgefaltete Proteine enzymatisch hydrolysiert und somit einen protektiven Effekt auf die Zelle ausübt. Durch eine Interaktion mit α -Synuclein könnte es zur Hemmung des regulären Proteinabbaus und zur vermehrten Ansammlung fehlgefalteter Proteine kommen. Die pathologischen Proteine und Proteinabbauprodukte könnten konsekutiv zu oxidativen Stress in der Zelle führen (Lindersson, 2004; Tanaka, 2001).

(iv) Wenn man von einer Toxizität von α -Synuclein-Oligomeren ausginge, könnten große fibrilläre α -Synuclein-Aggregate, wie sie beispielsweise in Lewy-Körperchen vorkommen, demnach eine protektive Wirkung auf die Zelle ausüben: die toxischen α -Synuclein-Oligomere würden sich im Rahmen des Aggregationsprozesses an diese anlagern und so dem Zytosol entzogen werden (vgl. 1.3.4). α -Synuclein-Oligomere könnten sich jedoch jederzeit wieder aus den großen Aggregaten lösen und einerseits über die oben beschriebenen Mechanismen in die Zellhomöostase eingreifen und andererseits die Bildung von weiteren toxischen α -Synuclein-Oligomeren fördern (vgl. 1.3.4) (Haass, 2007).

(v) Ein weiterer Toxizitätsmechanismus beruht möglicherweise auf der Verminderung von monomeren α -Synuclein im Zytosol. Durch Bildung von α -Synuclein-Aggregaten könnte das monomere α -Synuclein im Zytosol verbraucht werden und somit nicht mehr seine in 1.3.3 beschriebene physiologische Funktion erfüllen, was zur Zelldysfunktion mit konsekutivem Zelltod führen kann.

1.4. Die Rolle von dreiwertigen Metallionen in der Pathogenese des Morbus Parkinson

1.4.1. Mit Metallionen assoziierte neurodegenerative Erkrankungen

Der Einfluss von Metallionen auf die Entwicklung des Morbus Parkinson und andere neurodegenerative Erkrankungen wird schon lange intensiv diskutiert. Neurodegenerative Erkrankungen, die mit einer Dysregulation der Eisenkonzentration einhergehen, reichen vom Morbus Alzheimer, der Multisystematrophie, der Friedrich-Ataxie bis hin zu Prionerkrankungen (Sian-Hulsmann, 2011). Auch die Neurodegeneration mit Eisenablagerung im Gehirn zeichnet sich durch einen gestörten Eisenstoffwechsel aus (Arawaka, 1998). In den neuropathologischen Untersuchungen dieser Patienten konnten α -Synuclein-Ablagerungen in Form von Lewy-Körperchen detektiert werden (Galvin, 2000). Diese Erkenntnisse weisen auf einen Zusammenhang zwischen der Dysregulation des Eisenmetabolismus und der Akkumulation von Proteinen wie dem α -Synuclein hin (Neumann, 2000).

1.4.2. Der Eisenmetabolismus

Eisen gehört zu den Spurenelementen und muss obligat über die Nahrung aufgenommen werden. Im menschlichen Organismus übernimmt es viele wichtige zelluläre Funktionen. Es wird für die DNA-Synthese benötigt, ist als Bestandteil von Hämoglobin am Sauerstofftransport und von Cytochrom C in der mitochondrialen Atmungskette beteiligt und wird für die Neurotransmittersynthese und Myelinisierung im Gehirn benötigt. Als Coenzym der Tyrosinhydroxylase (TH) ist es in die Dopaminsynthese involviert (Crichton, 2011; Kell, 2010).

Eisen kann je nach Funktion in seiner zwei- oder dreiwertigen Form im Körper vorliegen. Die Resorption von Eisen im Duodenum erfolgt ausschließlich in der zweiwertigen Form (Fe^{2+}). In der Nahrung liegt Eisen jedoch größtenteils in der dreiwertigen Form (Fe^{3+}) vor. Daher wird es zunächst mit Hilfe der im Magen sezernierten Salzsäure aus der Nahrung freigesetzt. Mit Hilfe von reduzierenden Substanzen in der Nahrung und einer Ferrireduktase im Bürstensaum des Duodenums wird das aus der Nahrung freigesetzte Fe^{3+} in Fe^{2+} reduziert. Anschließend kann es über einen Fe^{2+} , H^+ -Symporter (Typ DMT1) über die apikale Zellmembran der Enterozyten aufgenommen werden. Die Expression dieses Transporters wird an den Eisenspiegel des Organismus über Eisen-gesteuerte Elemente (engl.: iron-responsive elements, IRE) angepasst. An der basolateralen

Membran der Enterozyten wird Fe^{2+} über den Transporter Ferroportin aufgenommen und nach Oxidation durch eine kupferhaltige Ferroxidase (Hephaestin) zu Fe^{3+} an das Transportmolekül Transferrin im Blut gebunden. Überschüssiges Eisen wird in den Enterozyten unter Bildung von Ferritin an Apoferritin gebunden und dort gespeichert. Sowohl der Durchtritt von Eisen durch die Blut-Hirn-Schranke als auch die periphere zelluläre Aufnahme erfolgt über Transferrinrezeptor-vermittelte Endocytose. Intrazellulär wird das Eisen an das Metalloprotein Ferritin oder an Neuromelanin gebunden. Somit wird gewährleistet, dass kein freies Eisen in der Zelle vorliegt. Der gesamte zuvor beschriebene Eisenmetabolismus unterliegt dabei der Regulation durch die IRE (Crichton, 2011; Mills, 2010; Sian-Hulsmann, 2011).

Bei einem Überschuss an freiem Eisen, der die zellulären Bindungskapazitäten von Ferritin und Neuromelanin übersteigt, kommt es zu Eisen-induzierten zytotoxischen Effekten. Freies Eisen, das nicht proteingebunden vorliegt, kann die Bildung von reaktiven Sauerstoffmolekülen vorantreiben. Diese können daraufhin intrazellulären oxidativen Stress erzeugen, der letztendlich über verschiedene Mechanismen im zellulären Zelltod mündet (Kehrer, 2000; Wardman, 1996; Zecca, 2004).

1.4.3. Die Rolle von Eisen in der Pathogenese des Morbus Parkinson

Die berufliche oder umweltbedingte Exposition gegenüber Schwermetallen und deren Kombinationen führt zu einer erhöhten Inzidenz der Parkinsonerkrankung (Gorell, 1997; Logroscino, 2005; van der Mark, 2012). Insbesondere dreiwertiges Eisen scheint dabei eine zentrale Rolle in der Entwicklung der Parkinsonerkrankung zu spielen. Epidemiologische Studien konnten nachweisen, dass eine hohe dietätische Eisenaufnahme und niedrige Zufuhr an Vitamin C mit einer erhöhten Krankheitsinzidenz für Morbus Parkinson assoziiert ist (Logroscino, 2008). Im Rahmen von Tierversuchen konnten eine verminderte Dopaminsynthese und eine Potenzierung von Neurotoxin-induzierten Bewegungsstörungen durch die Injektion von Eisen beobachtet werden (Fredriksson, 2000; Wesemann, 1994).

Am ehesten ist der Einfluss von Eisen auf die Pathogenese der Parkinsonerkrankung von der Menge des vorhandenen Eisens abhängig. In zahlreichen *post-mortem* Analysen von Gehirngeweben von an Morbus Parkinson erkrankten Patienten konnte eine erhöhte Konzentration an Metallionen, allen voran Eisen, in der Substantia nigra festgestellt werden. Zudem war das Verhältnis von Fe^{3+} zu Fe^{2+} zu Gunsten der dreiwertigen Form verschoben (Dexter, 1989; Popescu, 2009; Sofic, 1988). Auch wurden eine erhöhte Konzentration des Eisenbindungsproteins Ferritin und eine

erniedrigte Konzentration des Antioxidans Glutathion in den betroffenen Hirnregionen beobachtet (Dexter, 1991; Riederer, 1989). In Hinblick auf die intracerebrale Verteilung fällt eine physiologische Konzentrierung von Eisen in den Basalganglien auf (Dexter, 1993). Der Eisengehalt ist dabei vor allem in der Substantia nigra sehr hoch und macht 10 bis 20 % der gesamten cerebralen Eisenmenge aus. Die cerebrale Eisenkonzentration liegt bei 200 ng/mg. In Patienten mit Morbus Parkinson aber wurden um 30-35 % erhöhte Eisenspiegel in der Substantia nigra nachgewiesen. Dies wird auf einen veränderten Eisenmetabolismus mit gesteigerter Eisenablagerung in den betroffenen Gebieten zurückgeführt (Gaeta, 2005; Oakley, 2007).

Auch mit bildgebenden Verfahren konnte eine erhöhte Eisenkonzentration in der Substantia nigra von Patienten mit Morbus Parkinson festgestellt werden. Im transkraniellen Ultraschall beispielsweise zeigte sich eine Hyperechogenität der Substantia nigra, die mit dem beschriebenen erhöhten Eisengehalt dieser Gehirnregion in Verbindung gebracht wurde. Eine erhöhte Eisenkonzentration im Bereich der Substantia nigra ließ sich auch anhand von Untersuchungen mit Magnetresonanztomographien nachweisen (Michaeli, 2007). Diese Beobachtungen in der Substantia nigra können auch schon bei präklinischen Patienten aus Familien, in denen hereditäre Formen der Parkinsonerkrankungen vorkommen, gemacht werden, was auf eine mögliche, der Parkinsonerkrankung vorangehende, vermehrte Eisenablagerung in diesem Areal schließen lässt (Berg, 2007).

1.4.4. Mögliche Interaktionsmechanismen zwischen Metallionen und α -Synuclein

Die genauen Pathomechanismen, über die Eisen und andere dreiwertige Metallionen in den Aggregationsprozess von α -Synuclein eingreifen und die damit verbundenen zytotoxischen Effekte beeinflussen können, sind bisher nicht ausreichend geklärt worden. Neueste Erkenntnisse deuten auf eine komplexe Interaktion zwischen α -Synuclein, oxidativen Stress und dreiwertigen Metallionen hin, die letztlich zur Aggregation von α -Synuclein führt (Levin, 2011). Derzeit werden verschiedene Interaktionsmechanismen diskutiert.

(i) Eine Möglichkeit stellt eine direkte Interaktion mit nachfolgender Konformationsänderung von α -Synuclein durch die Entstehung von spezifischen Metallproteinkomplexen dar (Binolfi, 2006; Kostka, 2008; Paik, 1999; Uversky, 2001b). Die Metallionen-induzierte Konformationsänderung von α -Synuclein geht

dabei mit der Anregung der Bildung von α -Synuclein-Fibrillen einher. Einerseits könnte dieser Effekt auf der Neutralisierung von negativ geladenen Aminosäureresten durch die Metallionen beruhen. Andererseits könnte der Effekt der Stabilisierung von löslichen, teilweise gefalteten α -Synuclein-Oligomeren zugrunde liegen (Paik, 1999; Uversky, 2001b). Metallionen binden bevorzugt an das C-terminale Ende von α -Synuclein und können eine temporäre Dimerisierung von α -Synuclein-Monomeren induzieren und stabilisieren (Binolfi, 2006).

Zahlreiche posttranslationale Modifikationen nehmen auf die soeben beschriebene Interaktion zwischen Metallionen und α -Synuclein Einfluss: Die Phosphorylierung von α -Synuclein und deren Lokalisation in der Aminosäureabfolge bestimmt die Bindungsspezifität und -fähigkeit von dreiwertigem Eisen an α -Synuclein und die nachfolgende Konformationsänderung (Liu, 2007). Außerdem kann beispielsweise die Bildung von Oligomeren aus nitrosyliertem α -Synuclein nicht durch Metallionen induziert werden, was möglicherweise auf eine durch die Nitrosylierung veränderte Metallbindungsstelle zurückzuführen ist (Souza, 2000; Uversky, 2005).

(ii) Im Rahmen der Parkinsonerkrankung kommt es möglicherweise aber auch zu einer indirekten Interaktion von α -Synuclein und Metallionen über chemische Veränderungen von α -Synuclein durch redoxchemische Reaktionen. Bei Patienten mit Morbus Parkinson kommt es zu einem zellulären Redoxungleichgewicht im Bereich der Substantia nigra: hierzu tragen beispielsweise der veränderte Dopaminstoffwechsel, die Autooxidation von Dopamin, die erhöhte Eisenkonzentration, die verringerte Menge des Antioxidans Glutathion und die Bildung von reaktiven Sauerstoffmolekülen bei (Chinta, 2008). Letztere entstehen zum Beispiel wenn H_2O_2 und reduziertes Eisen (Fe^{2+}) über die Eisen-katalysierte Fenton-Reaktion miteinander reagieren und dabei Hydroxylradikale und oxidiertes Eisen (Fe^{3+}) bilden (Buettner, 1996). Das nun oxidierte Eisen kann über den sogenannten Haber-Weiss-Kreis durch Antioxidantien und reduzierende Substanzen wie beispielsweise Glutathion oder Vitamin C zu Fe^{2+} reduziert werden und steht somit erneut für die Fenton-Reaktion zur Verfügung.

Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie-Messungen haben gezeigt, dass reaktive Sauerstoffradikale wie H_2O_2 die Aggregation von α -Synuclein nicht direkt induzieren können. Nach Zugabe von zweiwertigem Eisen konnte jedoch eine Bildung von α -Synuclein-Oligomeren festgestellt werden (Levin, 2011). Diese Beobachtungen stellen den oxidativen Stress in einen indirekten kausalen Zusammenhang mit der

Entstehung von α -Synuclein-Oligomeren: Oxidativer Stress in Form von Sauerstoffradikalen katalysiert die Bildung von oxidiertem Eisen über die Fenton-Reaktion und damit die zuvor beschriebene Eisen-induzierte Bildung von α -Synuclein-Oligomeren.

Oxidativer Stress wird schon lange als mögliche Ursache für das pathologische Aggregationsverhalten von α -Synuclein beim Morbus Parkinson in Betracht gezogen (Chinta, 2008; Jenner, 2003). Durch die Autooxidation von Dopamin in den bei der Parkinsonerkrankung betroffenen dopaminergen Neuronen werden Quinone, Semiquinone und reaktive Sauerstoffradikale gebildet, die oxidativen Stress auslösen können (Stokes, 1999). Der durch den Dopaminmetabolismus induzierte oxidative Stress könnte die Bildung von oxidiertem Eisen vorantreiben. Das vermehrt anfallende dreiwertige Eisen kann die Aggregation von α -Synuclein fördern und somit zur Entstehung der Parkinsonerkrankung führen.

(iii) Die in vielen Studien beobachtete mitochondriale Dysfunktion unterstreicht die Rolle von oxidativen Stress in der Pathogenese der Parkinsonerkrankung (Hashimoto, 1999; Hsu, 2000; L. J. Martin, 2006). Im transgenen Mausmodell können mitochondriale Neurotoxine das klinische Bild der Parkinsonerkrankung auslösen, indem sie den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette durch verminderte Bereitstellung von Adenosintriphosphat (ATP) inhibieren (Terzioglu, 2008). Über die mitochondriale Dysfunktion kann es zu einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen kommen (Lin, 2006). Dies kann durch die oben beschriebene Fenton-Reaktion mit einer erhöhten Konzentration an oxidiertem Eisen einhergehen und in einer vermehrten Bildung von α -Synuclein-Oligomeren münden. Hereditäre Formen der Parkinsonerkrankung, die auf mitochondrialen Mutationen beruhen, liefern Hinweise auf diesen Pathomechanismus (Hofer, 2004).

1.4.5. Die Rolle von weiteren dreiwertigen Metallionen in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen

Auch die Rolle von weiteren dreiwertigen Metallionen in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen wird derzeit intensiv untersucht. Eine epidemiologische Studie konnte einen kausalen Zusammenhang zwischen der Exposition gegenüber Aluminium über das Trinkwasser und der Erkrankung an Morbus Alzheimer herstellen (McLachlan, 1996). *In vitro* und *in vivo* Studien weisen auf einen bedeutenden Einfluss von dreiwertigen Metallionen in der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer hin. So konnte

zum Beispiel *in vitro* eine durch Aluminium ausgelöste vermehrte Aggregation von Tau, einem krankheitsspezifischen Protein beim Morbus Alzheimer, beobachtet werden (Oshima, 2013; Zatta, 2009). Das Spurenelement und dreiwertige Metallion Gadolinium hat neurotoxische Effekte und kann ebenfalls zur Ablagerung von amyloidartigen Proteinen führen. Es wird beispielsweise mit der nephrogenen systemischen Fibrose in Verbindung gebracht. Bei dieser Erkrankung kommt es nach Gabe von Gadolinium-haltigem Kontrastmittel im Rahmen von Magnetresonanztomographien zu einer vermehrten Ablagerung von Amyloidproteinen in der Haut (Cowper, 2000).

1.5. Tiermodelle für den Morbus Parkinson

Es wurden bisher verschiedene Tiermodelle, allen voran transgene Mausmodelle, entwickelt, die einen der Parkinsonerkrankung beim Menschen sehr ähnlichen Phänotyp entwickeln können. Bei den Mausmodellen, die in den letzten Jahren für die Erforschung von Synucleinopathien entwickelt wurden, unterscheidet man vor allem zwischen toxisch-induzierten und transgenen Mausmodellen.

Die toxisch-induzierten Mausmodelle basieren auf der lokalen oder systematischen Einbringung eines Toxins. Meist werden Neurotoxine wie beispielsweise 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) oder 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP) verwendet. Diese verursachen im Falle von MPTP über die Inhibierung des Komplexes I der mitochondrialen Atemkette und einer verminderten ATP-Bereitstellung oxidativen Stress, der letztlich in einer nigrostriatalen Läsion und der Ausbildung von Parkinson-ähnlichen Symptomen mündet. Weitere toxisch-induzierte Mausmodelle verwenden das Herbizid Paraquat oder das Insektizid Rotenon (Schober, 2004; Terzioglu, 2008).

Transgene Mausmodelle hingegen modellieren andere Aspekte der molekularen Mechanismen der Pathogenese (Blandini, 2012). Man unterscheidet zwischen sogenannten Knockout-Mäusen, bei denen bestimmte Gene deaktiviert oder entfernt wurden, und transgenen Mauslinien, die bestimmte Gene überexprimieren.

Bei den transgenen Mäusen werden verschiedene Promoter wie beispielsweise die im ZNS exprimierte Tyrosinhydroxylase (TH) oder Thy1 verwendet. Hierdurch wird eine Überexpression von Wildtyp-Synuclein oder mutiertem α -Synuclein, das mit hereditären Formen der Parkinsonerkrankung assoziiert ist, erzielt. Je nach Mausmodell sind die dabei beobachteten Veränderungen in Form von α -Synuclein-positiven Einschlusskörperchen in den neuropathologischen Untersuchungen,

motorischen Leistungseinschränkungen und veränderten Dopaminspiegeln unterschiedlich stark ausgeprägt (Kahle, 2008).

Das in dieser Arbeit verwendete transgene Mausmodell wurde 2001 erstmals beschrieben (Kahle, 2001). Es überexprimiert unter Einsatz eines ZNS-spezifischen Thy1-Promotors humanes α -Synuclein mit der Punktmutation A30P (A30P- α -Synuclein), welches in die Pathophysiologie einer hereditären Form der Parkinsonerkrankung beim Menschen involviert ist (Kruger, 1998). Durch die Überexpression von A30P- α -Synuclein entwickelt dieses transgene Mausmodell einen altersabhängigen Phänotyp, welcher die Parkinsonerkrankung beim Menschen hinsichtlich der neuropathologischen Veränderungen und des klinischen Krankheitsbildes gut modelliert. Es kommt dabei zu einer altersabhängigen pathologischen Ablagerung von α -Synuclein im zentralen Nervensystem (Neumann, 2002). Ab einem Lebensalter von 50-70 Wochen entwickelt dieses transgene Mausmodell außerdem motorische Ausfallerscheinungen, die sich in Form von Zittern, verlangsamten Bewegungen, Paresen und einer Fallneigung äußern. Neben den Bewegungsstörungen wird für dieses transgene Mausmodell auch eine mit dem Alter auftretende Gewichtsabnahme beschrieben (Wagner, 2013).

1.6. Fragestellung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss dreiwertiger Metallionen auf die Entstehung und Entwicklung des Morbus Parkinson in einem transgenen Mausmodell *in vivo* zu untersuchen. Aufgrund der in 1.4.4 beschriebenen Aggregations-induzierenden Wirkung von Eisen, Aluminium und Gadolinium sollte der Effekt dieser Metallionen *in vivo* in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden.

Im Einzelnen wurden folgende Arbeitsschritte und Untersuchungen geplant:

- Vor Versuchsbeginn sollte die Genotypisierung aller transgenen Versuchstiere erfolgen, um den transgenen Status der Versuchstiere zu überprüfen.
- Anhand von Spezialfutter, das je nach Versuchsgruppe eine erhöhte Konzentration verschiedener Metallionen enthielt, sollten die Versuchstiere langfristig einer erhöhten Menge an dreiwertigen Metallionen exponiert werden. Durch Hochdruckveraschung mit anschließender induktiv-gekoppelter Plasma-Massenspektroskopie sollten die Metallionenkonzentrationen im Spezialfuttermittel überprüft werden.

- Die Effekte der mit einem hohen Metallionengehalt versetzten Spezialfutter auf die Metallionenkonzentrationen *in vivo* sollten näher untersucht werden. Hierzu sollten Blut- und Gehirnproben mittels Hochdruckveraschung und anschließender induktiv-gekoppelter Plasma-Massenspektroskopie untersucht werden.
- Es sollte der Effekt der Exposition gegenüber dreiwertigen Metallionen über die Nahrungsaufnahme auf die klinische Entwicklung der Parkinsonerkrankung *in vivo* erfasst werden. Hierzu sollte in regelmäßigen Abständen der klinische Zustand anhand der Messung der motorischen Leistungsfähigkeit und anhand von Gewichtskontrollen untersucht werden. Außerdem sollten das krankheitsfreie Überleben sowie das Gesamtüberleben der Versuchstiere analysiert werden.
- Die Ablagerung von α -Synuclein-Aggregaten im zentralen Nervensystem der transgenen Versuchstiere sollte durch histopathologische und immunhistochemische Untersuchungen näher charakterisiert werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Materialien

Im Folgenden sind die Bezugsquellen der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Materialien und Versuchstiere aufgeführt. Alle verwendeten Chemikalien besitzen die höchste kommerziell erhältliche Reinheit. Einmal verwendbare Materialien (Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen) wurden vor Verwendung autoklaviert. Basis der verwendeten Lösungen und Puffer ist mit einem Milli-Q Synthesis A10 System (Millipore, MA, USA) aufbereitetes Wasser.

Chemikalien, Lösungen und Reagenzien	Hersteller
6x Loading Dye Farbstoff	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Agarose	Serva Elektrophoresis (Heidelberg, Deutschland)
Aqua dest.	Merck (Darmstadt, Deutschland)
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
Borsäure	Acros organics (New Jersey, USA)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt, Deutschland)
BRIJ35	Serva Elektrophoresis (Heidelberg, Deutschland)
Complete Mini (EDTA-frei)	Roche (Unterhaching, Deutschland)
Diaminobenzidin (iVIEW DAB Detection Kit)	Roche (Unterhaching, Deutschland)
Ethanol pro analysi	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Eosin alkoholisch	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
Formaldehydlösung 4 %	Microcos GmbH (Garching, Deutschland)
Glycin	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
Hämalaun nach P. Mayer	Apotheke Klinikum Innenstadt der LMU (München, Deutschland)
HotMaster Mix	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid pro analysi	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Paraffin	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
Proteinase K	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
RNase A	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)

MATERIAL UND METHODEN

Salpetersäure 65 % rauchend	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
Salzsäure (HCl) 20 %	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
Salzsäure (HCl) 37 % rauchend	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
SYBR® Gold Farbstoff	Invitrogen Molecular Probes (Eugene, USA)
Tris	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
Tris-HCl	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
Xylol	VWR International (Darmstadt, Deutschland)

Geräte	Hersteller
ChemiLux-Kamerasystem	Intas Science Imaging Instruments (Göttingen, Deutschland)
Gelelektrophorese-Aparatur	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
Gleichspannungsgenerator E385	Consort (Turnhout, Belgien)
HPA-S High Pressure Asher	Anton Paar (Graz, Österreich)
Kamera Syngene	Syngene (Cambridge, Großbritannien)
Magnetrührer Hei-Mix D	Heidolph Instruments (Schwabach, Deutschland)
Mikroskop Olympus BX 50	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Mikroskopkamera Olympus U-TV1 X	Olympus (Hamburg, Deutschland)
MP R0 pH Meter	Mettler Toledo (Gießen, Deutschland)
Research® Pipetten (Volumen 10/20/200/1000 µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
RotaRod advanced for five mice V4.1.1	TSE Systems (Chesterfield, USA)
UV-Spektralphotometer NanoDrop™ 1000	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Ultraschallbad	VWR (Darmstadt, Deutschland)
UV-Transilluminator (λ=254 nm)	Syngene (Cambridge, Großbritannien)
VENTANA BenchMark	Roche (Unterhaching, Deutschland)
Vortex-Schüttler	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Waage	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Zentrifuge Eppendorf 5415 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Materialien	Firma
Cellstar PP-Test Tubes 15 ml steril	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Cellstar Tubes 50 ml	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Einmal-Injektions-Kanüle Sterican® 0,45x12 mm 26Gx1/2“	Braun Melsungen (Melsungen, Deutschland)
Erlenmeyerkolben	Duran (Wertheim/Main, Deutschland)
Eukitt® quick-hardening mounting medium for microscopy	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
Glaspipette 10 ml in 1/10 ml	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Glaspipetten 2ml x 1/50 ml	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
Leukoplast	BSN medical GmbH (Hamburg, Deutschland)
O'RangeRuler 100 bp DNA-Leiter	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging (Chicago, USA)
PerfectBind DNA Säulen	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
peqGOLD Tissue DNA Mini Kit	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
Petrischale	Nunc A/S (Roskilde, Dänemark)
epT.I.P.S.® Pipettenspitzen (0,1- 10µl; 50-1000 µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
PTFE-Klebeband	Anton Paar GmbH (Graz, Österreich)
Quarzglasröhrchen und -deckel	Anton Paar GmbH (Graz, Österreich)
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäß LoBind 1,5 ml	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Safety-Multifly-Set	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Skalpell	Bruno Bayha (Tuttlingen, Deutschland)
Spritzen 2 ml	Becton Dickinson (Frage, Spanien)
Wiegeschalen	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)

Puffer für den DNA-Aufschluss	Hersteller
Equilibrierungspuffer	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
Waschpuffer	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
Elutionspuffer	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)

Reaktionsansatz für die Polymerasekettenreaktion	Zusammensetzung
HotMaster Mix (VWR International)	50 U/ml Taq-DNA-Polymerase, Taq-Puffer pH 8,5 mit 6,25 mM Mg(Oac) ₂ , 500 µM von jedem Desoxyribonukleotidtriphosphat (dNTP), Stabilisatoren

Puffer für die Gelelektrophorese	Zusammensetzung
TBE 10x Stammpuffer	0,45 M Tris, 0,45 M Borsäure, 16 mM EDTA, 500 ml Millipore Wasser

Puffer für die immunhistochemische Färbung	Zusammensetzung
Verdaupuffer	10 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 0,1 % BRIJ35, pH 7,8
Proteinkinase K Stammlösung, rekombinant	Roche (Unterhaching, Deutschland)

Biologische Materialien	Hersteller
15G7-Primärantikörper	Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung (München, Deutschland)
Primer	MWG Eurofins Operon (Ebersberg, Deutschland)

Futtermittel	Hersteller
Sniff Experimentalfutterdiät M Spezialfutter	Ssniff Spezialdiäten GmbH (Soest, Deutschland) Ssniff Spezialdiäten GmbH (Soest, Deutschland)

Medizinische Produkte	Hersteller
Heparin	Ratiopharm (Ulm, Deutschland)
Isofluran	Drägerwerk (Lübeck, Deutschland)
Ketamin 10 %	WDT (Garbsen, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl) 0,9 %	Braun Melsungen (Melsungen, Deutschland)
Rompun 2 % (Xylazin)	Bayer (Leverkusen, Deutschland)
Vetranquil 1 % (Azepromazin)	Ceva Tiergesundheit (Düsseldorf, Deutschland)

Versuchstiere	Hersteller
C57BL/6 Wildtypiere (Thy1)-h[A30P] α -Syn- Mausmodell	Harlan Winkelmann (Eystrup, Deutschland) Institutseigene Züchtung, Zentrum für Neuropathologie der LMU München, Deutschland

Auswertungsprogramme	Firma
Cell [^] D-Programm	Cell* Soft Imaging System (Münster, Deutschland)
Prism 5 for Mac OS X Version 5.0b	GraphPad Software (La Jolla, USA)
Microsoft® Excel 2008 für Mac Version 12.2.0	Microsoft Corporation (Redmond, USA)

2.2. Tierversuch

Um den Effekt von dreiwertigen Metallionen auf die Entwicklung des Morbus Parkinson in einem transgenen Mausmodell *in vivo* zu untersuchen, wurde ein Langzeitterversuch nach den geltenden Tierschutzrichtlinien entworfen und von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

Als Versuchstiere wurden C57Bl/6-Wildtypmäuse und ein etabliertes transgenes Mausmodell für Synucleinopathien eingesetzt (Kahle, 2001). Die Versuchstiere wurden über Spezialfutter, die je nach Versuchsgruppe mit einem erhöhten Metallionengehalt versetzt waren, langfristig und kontinuierlich gegenüber erhöhten Metallionenkonzentration exponiert (vgl. 2.2.3).

MATERIAL UND METHODEN

Aufgrund der in 1.4.4 beschriebenen Aggregations-induzierenden Wirkung von Eisen (Fe), Aluminium (Al) und Gadolinium (Gd) auf α -Synuclein *in vitro* wurden diese drei Metallionen in dem vorliegenden Versuch untersucht.

Das Studienkonzept sah vier Versuchsgruppen, die sich jeweils aus Wildtypversuchstieren und transgenen Versuchstieren zusammensetzte, vor: Die erste Versuchsgruppe erhielt ab dem 36. Lebenstag ein Spezialfutter mit einer niedrigen Eisenkonzentration und diente im Folgenden als Referenzgruppe. Die anderen drei Versuchsgruppen erhielten ab dem 36. Lebenstag ein Spezialfutter, das jeweils entweder eine hohe Konzentration an FeCl_3 (Eisengruppe), AlCl_3 (Aluminiumgruppe) oder GdCl_3 (Gadoliniumgruppe) enthielt (vgl. Abbildung 2).

Um mögliche Auswirkungen der Spezialdiäten auf die Krankheitsentwicklung in dem hier verwendeten transgenen Synucleinopathie-Mausmodell *in vivo* zu erfassen, wurden ab der 20. Lebenswoche in regelmäßigen Abständen klinische Verlaufskontrollen zur Erfassung des Allgemeinzustandes und der motorischen Leistungsfähigkeit durchgeführt (vgl. Abbildung 2).

Die Metallionenkonzentrationen in Blut- und Gehirngewebeproben von Wildtypversuchstieren wurde bestimmt, um Effekte der Spezialfutter auf die Gewebespiegel der untersuchten Metallionen *in vivo* zu erfassen.

Zum Nachweis von unlöslichen α -Synuclein-Ablagerungen im zentralen Nervensystem wurden die Gehirne aller Versuchstiere *post mortem* histopathologisch und immunhistochemisch ausgewertet.

Zusätzlich wurden pro Versuchsgruppe jeweils drei männliche und drei weibliche transgene Versuchstiere, die vor Versuchsbeginn randomisiert ausgewählt wurden, im Alter von 62 Wochen aus dem Versuch entnommen und für qualitative und quantitative Untersuchungen hinsichtlich der α -Synuclein-Ablagerungen im zentralen Nervensystem herangezogen (vgl. Abbildung 2).

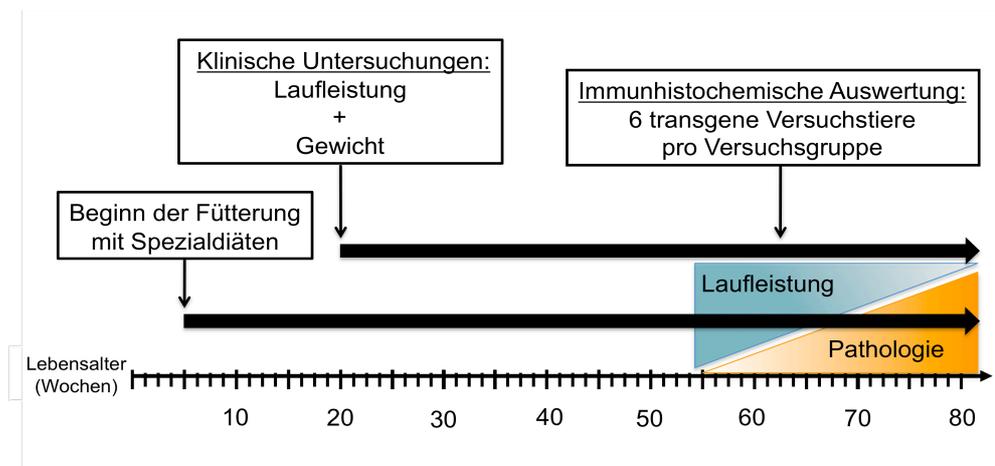


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Tierversuchaufbaus im Zeitverlauf.

2.2.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Wildtyp-Mäuse (*Mus musculus*) aus dem C57Bl/6-Stamm und das transgene α -Synucleinopathie-Mausmodell (Thy1)-h[A30P] α -Syn gewählt (Neumann, 2002). Der Wildtyp C57Bl/6 Stamm (wt) ist bei diesem transgenen Mausmodell der genetische Hintergrund (tg). Bei Thy1 handelt es sich um einen gehirnspezifischen Promoter, der in Neuronen exprimiert wird. Hierunter ist eine moderate α -Synuclein-Expression beschrieben (Kahle, 2000). Das exprimierte humane α -Synuclein trägt die Punktmutation A30P, wodurch es zu einem Austausch von Alanin durch Prolin an Position 30 in der Aminosäurenkette kommt. Diese Mutation ist auch bei einer der familiären Formen des Morbus Parkinson nachweisbar (Kahle, 2001). Dieses hier verwendete transgene Mausmodell entwickelt aufgrund der Überexpression von A30P- α -Synuclein den in 1.5 beschriebenen Phänotyp und eignete sich somit für die vorliegende klinisch-experimentelle Studie.

Die Zucht der Versuchstiere fand unter Berücksichtigung der Tierschutzrichtlinien im Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) statt.

2.2.2. Tierhaltung

Die Versuchstiere wurden nach den Richtlinien zur Versorgung und Behandlung von Labortieren der LMU gehalten. Die Untersuchungen wurden am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der LMU durchgeführt, wo sich die Versuchstiere während des gesamten Versuchsverlaufes unter spezifisch

pathogenfreien Bedingungen in der institutseigenen Tierhaltung befanden.

Die Versuchstiere wurden in Käfigen mit bis zu 5 geschlechtsgleichen Geschwistertieren gehalten und erhielten das jeweilige Spezialfutter und Wasser *ad libitum*. Die Temperatur im Käfig betrug circa 20 °C; die Luftfeuchtigkeit in den Käfigen variierte zwischen 30 und 50 %.

Während der täglichen Kontrollen durch die Tierpfleger wurden die Versuchstiere hinsichtlich klinischer Auffälligkeiten, Verhaltensänderungen und des Gesundheitszustandes untersucht.

2.2.3. Futtermittel

Die Versuchstiere beziehungsweise die Muttertiere erhielten bis zum Lebensalter von 35 Tagen (5 Lebenswochen) das Experimentalfutter M des Herstellers SSNIFF. Ab einem Lebensalter von 36 Tagen erhielten die Versuchstiere bis zum Versuchsende ausschließlich ein Spezialfutter auf Grundlage des Experimentalfutters M des Herstellers SSNIFF mit folgenden definierten Metallionenkonzentrationen:

- a. Spezialfutter Referenzgruppe: 60 mg/kg FeCl₃
- b. Spezialfutter Eisengruppe: 600 mg/kg FeCl₃
- c. Spezialfutter Aluminiumgruppe: 600 mg/kg AlCl₃ + 60 mg/kg FeCl₃
- d. Spezialfutter Gadoliniumgruppe: 600 mg/kg GdCl₃ + 60 mg/kg FeCl₃

Die Eisenkonzentration im Referenzfutter lag mit 60 mg/kg Trockenfutter an der unteren Grenze des Normbereiches der benötigten alimentären Eisenzufuhr, um Deprivationseffekte zu vermeiden. Die Eisenkonzentration im Spezialfutter der Eisengruppe lag mit 600 mg/kg an der oberen Konzentrationsgrenze des Normbereiches der benötigten Eisenzufuhr, um Toxizitäten durch zu hohe Konzentrationen zu vermeiden. Die Höhe der Konzentrationen von Aluminium und Gadolinium in den jeweiligen Spezialfuttern der Aluminium- und Gadoliniumgruppe wurden auf jeweils 600 mg/kg festgesetzt, um eine Vergleichbarkeit mit der Eisengruppe zu ermöglichen. Das Spezialfutter der Aluminium- und Gadoliniumgruppe enthielt aufgrund der Notwendigkeit von Eisen für physiologische Prozesse und zur Vergleichbarkeit zur Referenzgruppe eine Eisenkonzentration von 60 mg/kg.

Die Metallionenkonzentrationen im Spezialfutter wurden vor der Verfütterung mit Hilfe der induktiv-gekoppelten Plasma-Massenspektroskopie (ICP-MS) im Institut für Wasserqualität der Technischen Universität München auf Korrektheit der Konzentrationsangaben des Herstellers überprüft (siehe 2.4).

2.2.4. Versuchsgruppen

Der Tierversuch umfasste eine Gesamtanzahl von 140 Versuchstieren, davon 80 transgene und 60 Wildtypversuchstiere. Die Versuchstiere wurden gleichmäßig auf 4 Versuchsgruppen, die jeweils ein anderes Spezialfutter erhielten, aufgeteilt. Jede Versuchsgruppe setzte sich jeweils 10 weiblichen und 10 männlichen transgenen Versuchstieren und 15 Wildtypversuchstieren zusammen (Tabelle 1).

Jede Versuchsgruppe erhielt ab dem 36. Lebenstag bis zum Versuchsende jeweils eine Spezialdiät (entweder Referenz-, Eisen-, Aluminium- oder Gadoliniumspezialfutter).

Versuchsgruppe	Transgene Versuchstiere		Wildtypversuchstiere	
	Männlich	Weiblich	Männlich	weiblich
Referenz	10	10	-	15
Eisen	10	10	-	15
Aluminium	10	10	-	15
Gadolinium	10	10	-	15

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der Versuchsgruppen

Jede Versuchsgruppe bestand aus 15 Wildtypversuchstieren (weiblich) und 20 transgenen Versuchstieren (je 10 weiblich und 10 männlich).

Weitere transgene Versuchstiere des gleichen Mausmodells, die in der institutseigenen Tierhaltung als Zuchttiere verwendet wurden, wurden als weitere Vergleichsgruppe herangezogen. Sie erhielten im Rahmen der regulären Haltung Basisexperimentfutter. Ihre Überlebensdaten wurden aus bestehenden Datensätzen extrahiert und mit dem Überleben der transgenen Versuchstiere aus diesem Tierversuch verglichen.

2.2.5. klinische Verlaufsbeobachtungen

Um die Auswirkungen der Spezialfutter auf die Krankheitsentwicklung zu erfassen, erfolgten in regelmäßigen Abständen klinische Verlaufsbeobachtungen, bei denen folgende Parameter erhoben wurden:

- Motorische Leistungsfähigkeit
- Gewicht
- Überlebenszeit

2.2.5.1. Motorische Leistungsüberprüfung (RotaRod-Messung)

Zur klinischen Verlaufskontrolle wurde regelmäßig mit Hilfe eines Laufrades (RotaRod) die motorische Leistungsfähigkeit der Versuchstiere geprüft.

Das RotaRod stellt ein etabliertes Messinstrument dar, um die motorische Leistung und Koordination von Mäusen zu erfassen (Collier, 1991). Es besteht aus einer Walze (3 cm Durchmesser, 15 cm Länge), die 14,7 cm über einem metallischen Gitter angebracht ist. Die Höhe der Walze ist dabei so gewählt, dass die Versuchstiere sich einerseits beim Sturz von der Walze nicht verletzen und andererseits auch nicht freiwillig herunterspringen. Auf dem Boden des RotaRods ist eine Lichtschranke angebracht, die mit einem digitalen Zählwerk verbunden ist. Die Walze ist durch Kunststofftrennwände in 5 gleichgroße Kompartimente unterteilt, sodass bis zu 5 Versuchstiere zeitgleich untersucht werden können. Für die Bestimmung der motorischen Leistungsfähigkeit werden die Versuchstiere auf die Walze gesetzt, die sich je nach voreingestelltem Programm unterschiedlich schnell beschleunigen lässt. Sobald das Versuchstier von der Walze fällt, durchbricht es die Lichtschranke und die Zeitmessung wird gestoppt. Die Laufzeit berechnet sich aus der Differenz zwischen Beginn der Messung und Unterbrechung der Lichtschranke.

In der vorliegenden Studie erfolgten die klinischen Kontrollen ab der 20. Lebenswoche zunächst in vierwöchigem Abstand. Ab der 62. Lebenswoche wurden die motorischen Leistungsüberprüfungen im Abstand von zwei Wochen durchgeführt, um klinische Veränderungen und einen möglichen Beginn von motorischen Defiziten, der bei dem hier verwendeten transgenen Mausmodell zwischen der 50. und 70. Lebenswoche eintritt, zeitlich besser eingrenzen zu können (Abbildung 2).

Um die motorische Leistungsfähigkeit der Versuchstiere zu untersuchen, wurde das etablierte Protokoll nach Masliah in modifizierter Version angewendet (Masliah, 2000).

Eine Messeinheit beinhaltete jeweils eine Trainingseinheit an zwei konsekutiven Tagen und eine Testeinheit am darauffolgenden Tag. Bei den Trainingseinheiten wurden die Tiere in jeweils drei Laufdurchgängen an das RotaRod gewöhnt, dabei beschleunigte das RotaRod von 0 auf maximal 30 Umdrehungen pro Minute (engl.: rounds per minute, rpm) innerhalb von 180 Sekunden. Bei der Testeinheit am dritten Tag beschleunigte das RotaRod von 0 auf 50 Umdrehungen pro Minute innerhalb von 300 Sekunden.

MATERIAL UND METHODEN

Ein Lauf wurde ab einer effektiven Laufzeit von 10 Sekunden als gültig befunden, bei Unterschreiten diesen Wertes wurde der Lauf wiederholt, wobei maximal 6 Läufe pro Versuchstier durchgeführt wurden. Die Latenz zwischen den einzelnen Läufen betrug jeweils mindestens 40 Sekunden.

Messeinheit	Maximale Umdrehungen pro Minute	Maximale Laufzeit (in Sekunden)
1. Trainingseinheit	30	180
2. Trainingseinheit	30	180
Testeinheit	50	300

Tabelle 2: Messprotokoll für die Überprüfung der motorischen Leistungsfähigkeit der Versuchstiere.

Die durchschnittliche Laufzeit der drei Durchgänge am Testtag (Mittelwert) sowie der beste Laufwert aus den drei Durchgängen am Testtag wurden für die weiteren Auswertungen herangezogen.

Die Kriterien für die Entnahme der Versuchstiere aus dem Tierversuch wurden wie folgt definiert:

1. Wenn die Leistungsfähigkeit der Versuchstiere eine Schwelle unterschritt, sodass von einem Vollbild des klinischen Phänotyps auszugehen war und die Versuchstiere aus tierschutzrechtlichen Gründen aus dem Experiment entnommen wurden. Die Leistungsfähigkeit wurde für den vorliegenden Versuch wie folgt bestimmt: Wenn das Versuchstier innerhalb der maximal 6 Laufversuche nicht mindestens drei Laufzeiten über 10 Sekunden, davon eine über 20 Sekunden, vorweisen konnte.
2. Ausgeprägte motorische Defizite, die nach Tierschutzrichtlinien nicht mehr tolerabel waren und von einem Leiden des Versuchstieres auszugehen war.
3. Andere Erkrankungen oder Umstände, die die motorische Leistungsfähigkeit beeinflusst haben oder nach Tierschutz-Gesichtspunkten nicht vertretbar waren.

2.2.5.2. Gewichtskontrollen

Aufgrund der in 1.5 beschriebenen Gewichtsabnahme für das transgene Mausmodell wurde das Gewicht der Versuchstiere zeitgleich zu den Messungen der motorischen Leistungsfähigkeit in regelmäßigen Abständen erfasst. Hierfür wurde jedes

Versuchstier zwischen der 20. und der 60. Lebenswoche in vierwöchigem Abstand gewogen; ab der 62. Lebenswoche erfolgte die Gewichtskontrolle in zweiwöchigem Abstand.

2.2.5.3. Überleben

Das Lebensalter der Versuchstiere wurde ebenfalls als klinischer Vergleichsparameter herangezogen und war durch den natürlichen Tod der Versuchstiere oder der Entnahme aus dem Versuch aufgrund der in 2.2.5.1 beschriebenen Gründe definiert. Die Versuchstiere wurden nach der Entnahme aus dem Versuch durch cervicale Dislokation getötet.

2.2.5.4. Krankheitsfreies Überleben

Als krankheitsfreies Überleben wurde der Zeitraum definiert, in dem die transgenen Versuchstiere eine motorische Leistungsfähigkeit oberhalb eines anhand der Laufleistung der Wildtypversuchstiere berechneten Schwellenwertes vorwiesen. Dieser Schwellenwert lag drei Standardabweichungen unter dem Mittelwert der maximalen relativen Laufleistung aller Wildtypversuchstiere im Zeitraum von 24 bis 40 Wochen (in Prozent). Sobald ein transgenes Versuchstier erstmals eine relative Laufleistung unterhalb diesen Schwellenwertes vorwies, wurde das Versuchstier als motorisch auffällig definiert.

2.2.5.5. Ausschluss aus dem Versuch

Sofern Versuchstiere aufgrund von nicht Transgen-assoziierten Erkrankungen vorzeitig aus dem Versuch entnommen wurden oder durch pathologische Untersuchungen nachweislich an anderen Erkrankungen verstorben waren, wurden ihre Daten zensiert und nur bis zu ihrem Ausscheiden aus dem Versuch für die Auswertungen herangezogen. Dies galt auch für jene Versuchstiere, die für die regelmäßig stattfindenden Hygieneuntersuchungen der Tierhaltung entnommen wurden.

2.3. Molekulargenetische Untersuchungen

Das verwendete transgene Mausmodell basiert auf der gentechnischen Insertion des humanen A30P- α -Synucleins in das murine Genom einer C57Bl/6 Wildtypmaus (Kahle, 2001). Daher wurden vor Versuchsbeginn alle verwendeten transgenen Versuchstiere genotypisiert, um das Vorliegen des Genlocus für humanes A30P- α -Synuclein zu überprüfen.

Auf molekulargenetischer Ebene stehen verschiedene Methoden, die sich hinsichtlich der Methodik und der benötigten DNA-Menge unterscheiden, zur Überprüfung des genetischen Status zur Verfügung. Dabei kann das DNA-Material aus verschiedenen Geweben, entweder invasiv oder nicht invasiv, gewonnen werden.

In diesem Versuch wurden die Schwanzspitzen (maximal 5 mm Länge) der transgenen Versuchstiere zwischen dem 14. und 21. Lebenstag unter sterilen Bedingungen gewonnen und für die weitere Analytik kontaminationsfrei in Reaktionsgefäßen bei - 20°C aufbewahrt.

2.3.1. DNA-Isolierung

Die genomische DNA aus den Schwanzspitzen der Versuchstiere wurde nach einem standardisierten Protokoll mit dem peqGOLD Tissue DNA Mini Kit, das nach dem Prinzip der enzymatischen Lyse der Zellen mittels Proteinkinase K arbeitet, gewonnen.

Für die Homogenisierung und Lyse der Proben wurden diese in je 400 µl DNA-Lysepuffer gegeben und je Probe 20 µl Proteinase K und 15 µl RNase A hinzugefügt. Die Probenansätze wurden anschließend 10 Sekunden mit einem Vortex-Schüttler gemischt und daraufhin für 12 Stunden bei 50°C und 550 rpm in einem Thermoblock inkubiert.

Für die Aufreinigung der Proben wurden PerfectBind DNA Säulen verwendet, deren Silikamatrix die DNA reversibel bindet, sodass in den folgenden Waschschrritten zelluläre Bestandteile und weitere Kontaminationen entfernt werden. Zunächst wurden hierfür die Proben 2 Minuten bei 3700 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß übertragen. Nach Zugabe von 400 µl Equilibrierungspuffer wurden die Probenansätze 10 Sekunden mit einem Vortex-Schüttler gemischt, auf PerfectBind DNA Säulen geladen und anschließend 2 Minuten bei 3700 rpm zentrifugiert. Für den Waschvorgang wurden 550 µl DNA Waschpuffer hinzugefügt und die Probenansätze 2 Minuten bei 3700 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Anschließend wurden die Probenansätze ohne Puffer 2 Minuten bei 3700 rpm trocken zentrifugiert. Zur Elution wurden im nächsten Schritt 200 µl Elutionspuffer, der die DNA von der Silikamatrix löst, hinzugegeben und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Proben 2 Minuten bei 3700 rpm zentrifugiert.

Abschließend wurde die Qualität der isolierten DNA mit einem UV-Spektralphotometer überprüft. Hierbei wird ein Quotient aus den Werten der optischen Dichte der Probe bei 260 nm und 280 nm (A_{260}/A_{280}) erstellt. Der Quotient stellt ein Maß für die Verunreinigung der DNA durch RNA oder Proteine dar. Die Proben wurden anschließend bis zur weiteren Analyse bei 4 °C kühl gelagert.

2.3.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde von Kary Mullis erstmals 1985 beschrieben und ermöglicht den qualitativen Nachweis von DNA-Abschnitten (Saiki, 1988). Die PCR beruht auf der exponentiellen Amplifikation von definierten DNA-Fragmenten, die von komplementären Oligonukleotiden (sogenannten Primern) flankiert werden und unter Einsatz einer hitzestabilen DNA-Polymerase synthetisiert werden. Sie verläuft je nach Protokoll in mehreren, sich wiederholenden Zyklen, die aus drei verschiedenen Temperaturschritten bestehen: Im ersten Schritt wird bei 95°C die DNA in der Probe denaturiert, anschließend lagern sich die Primer bei einer für die jeweiligen Primer spezifischen Temperatur an die DNA an (engl.: Annealing) und anschließend erfolgt, von den Primern ausgehend, mittels der DNA-Polymerase die Synthetisierung des komplementären DNA-Stranges (sogenannte Elongation).

2.3.2.1. Primer

Die Primer, die für die Amplifizierung des humanen A30P- α -Synucleins aus der isolierten DNA der transgenen Versuchstiere verwendet wurden, wurden basierend auf die in der GeneBank-Datenbank veröffentlichten Sequenzen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/genes-expression/>) des humanen α -Synuclein-Gens entworfen. Die optimale Annealing-Temperatur wurde mit dem oben genannten Programm bestimmt. Die verwendeten Primer hatten folgende Sequenzen und amplifizierten das Synuclein auf einer Länge von 248 Basenpaaren (bp).

Primer	Sequenz von 5' nach 3'
Sense-Primer FWD-H-SYNCA	TGT AGG CTC CAA AAC CAA GG
Antisense-Primer REV-H-SYNCA	TGT CAG GAT CCA CAG TGC ATA

Tabelle 3: Basensequenzen der für die PCR verwendeten Primer.

2.3.2.2. Reaktionsbedingungen

Der PCR-Reaktionsansatz enthielt pro Probenansatz 25 µl Reaktionsvolumen:

- 10 µl HotMaster Mix
- 0,25 µl Sense-Primer FWD-H-SYNCA (Konzentration 100 pmol/µl)
- 0,25 µl Antisense-Primer REV-H-SYNCA (Konzentration 100 pmol/µl)
- 2 µl isolierter DNA-Ansatz (wie in 2.3.1 beschrieben)
- 12,5 µl Aqua dest.

2.3.2.3. Reaktionsablauf der PCR

Folgendes PCR-Protokoll wurde standardgemäß für die Amplifizierung des durch die Primer begrenzten DNA-Fragmentes verwendet:

Arbeitsschritt	Zyklen	Temperatur	Dauer
1. Denaturierung der DNA	1x	95 °C	5 Minuten
2.1 Aufschmelzen der DNA-Stränge	30x	95 °C	0,5 Minuten
2.2 Anlagern der Primer (Annealing)		62 °C	1 Minute
2.3 Synthese des Doppelstranges (Elongation)		72 °C	1,5 Minuten
3. abschließende Extension	1x	72 °C	8 Minuten

Tabelle 4: PCR-Protokoll zur Amplifizierung des durch die Primer begrenzten DNA-Fragmentes.

Nach der Abkühlung wurden die Proben bei -20°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

2.3.3. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Identifizierung von in der PCR amplifizierten DNA-Fragmenten gemäß ihrer Größe und Ladung in einem elektrischen Gleichstromfeld (Schwartz, 1984). Hierzu werden die PCR-Produkte in ein Agarosegel eingebracht und eine definierte Spannung angelegt, sodass sich die negativ geladenen DNA-Fragmente aus der PCR in Richtung der Kathode bewegen. Ihre Laufgeschwindigkeit ist dabei von ihrer Fragmentgröße abhängig. Kleinere Fragmente durchlaufen das Gel, dessen Porengröße und somit Durchlässigkeit für Moleküle durch die genaue Zusammensetzung des Agarosegels bestimmt wird,

schneller als längere Fragmente. Als Größenstandard zur Bestimmung der Länge der PCR-Produkte diente eine 100 bp-DNA-Leiter.

2.3.3.1. Agarosegel

Für die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente wurde ein 2% Agarosegel verwendet. Hierzu wurden 3 g Agarose mit 150 ml TBE 1x Puffer (1/10 Verdünnung des TBE 10x Stammpuffer) in einem Erlenmeyerkolben gemischt und anschließend erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Zur späteren Visualisierung der DNA-Fragmente wurden 3 µl SYBR-Gold-Farbstoff zu dem Gelansatz hinzugefügt. Der Farbstoff interkaliert in die DNA-Stränge und ist unter UV-Licht sichtbar, sodass hierdurch die DNA-Fragmente detektiert werden können. Der schlierenfreie Agarosegelansatz wurde in eine Gusskammer mit Taschenkämmen gegossen. Nach Aushärtung des Gels wurden die Taschenkämme entfernt und das Gel in die Elektrophorese-Apparatur, die mit TBE 1x Puffer gefüllt war, eingetaucht.

2.3.3.2. Probenansatz für die Gelelektrophorese

Die PCR-Probenansätze mit einem Volumen von jeweils 25 µl mit den darin enthaltenden amplifizierten DNA-Fragmenten wurden mit jeweils 5 µl 6x Loading Dye Farbstoff vermengt. Durch den Farbstoff sinken die Proben in die Taschen des Agarosegels ab. Außerdem wandert der Farbstoff, wie die DNA auch, in das Agarosegel und markiert somit die Wanderung der DNA im Agarosegel, sodass die Gelelektrophorese rechtzeitig beendet werden kann.

2.3.3.3. Elektrophorese

Die Geltaschen wurden mit jeweils 1 µl Gelelektrophorese-Probenansatz beladen. Pro Taschenreihe wurde eine 100 bp DNA-Leiter für den Größenvergleich aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 250 V und 300 mA für 90 Minuten durchgeführt. Im Anschluss wurde das Agarosegel aus der Elektrophorese-Apparatur entnommen und die aufgetrennten DNA-Fragmente mit Hilfe eines UV-Transilluminators ($\lambda=254$ nm) und einer Digitalkamera dokumentiert.

2.4. Bestimmung der Metallionenkonzentration in Futtermitteln und Gewebeproben

Die Messung der Metallionenkonzentration in den verwendeten Futtermitteln und verschiedenen Gewebeproben erfolgte mittels Hochdruckveraschung und anschließender induktiv-gekoppelter Massenspektroskopie.

2.4.1. Hochdruckveraschung

Um die Proben zunächst von organischen Bestandteilen zu befreien, wurde eine Hochdruckveraschung durchgeführt (Schramel P., 1980). Hierbei handelt es sich um eine nasschemische Aufschlussmethode, die unter Verwendung von hochkonzentrierten Salz- und Salpetersäuren als Oxidationsmitteln Proben bis auf die anorganischen Komponenten auflöst. Hierfür werden die Proben in spezielle Quarzreagenzgläser gefüllt, sorgfältig verschlossen und in den Heizblock des Hochdruckveraschers platziert. Nach Verschließen des Gerätes wird unter konstantem Einstrom von Stickstoff ein definierter Druck aufgebaut während die Proben gleichzeitig im Thermoblock erhitzt werden.

2.4.2. Probenvorbereitung

2.4.2.1. Futtermittelproben

Von jeder Futtermittelcharge wurden exemplarische Futtermittelproben kontaminationsfrei asserviert, zerkleinert und anschließend untersucht.

2.4.2.2. Gewebeproben

Für die Bestimmung der Metallionenkonzentrationen *in vivo* wurden 4 Wildtypversuchstiere pro Versuchsgruppe vor Versuchsbeginn randomisiert ausgewählt. Davon wurden jeweils zwei Versuchstiere im Alter von 12 Wochen und zwei Versuchstiere im Alter von 28 Wochen untersucht, um eine zeitliche Veränderung der Metallionenkonzentration im Gewebe zu erfassen. Die Entnahme der Gewebeproben von den Versuchstieren erfolgte direkt im Anschluss an die Entnahme aus dem Versuch.

Die Narkoseeinleitung erfolgte durch die intraperitoneale Injektion einer gewichtsadaptierten Kombination aus Xylazin, Ketamin und Promazin (circa jeweils 390 µl, 390 µl und 170 µl; durchgeführt von Herrn Dr. Felix Schmidt). Während des Eingriffes wurde die Narkose mit Isofluran, das über ein Schlauchsystem an das Maul der Versuchstiere geleitet wurde, aufrechterhalten. Während der gesamten

Versuchsdurchführung wurde die Narkosetiefe kontinuierlich mittels Zwischenzehenreflexes überprüft.

Die Probenentnahme wurde durch Herrn Dr. Felix Schmidt durchgeführt. Die Versuchstiere wurden hierfür nach Narkoseeinleitung in Rückenlage mit Leukoplast-Klebeband auf einer Styroporplatte fixiert. Nach Überprüfung der Narkosetiefe wurden zunächst Abdomen und Thorax eröffnet und die Vena cava caudalis stumpf frei präpariert. Nach Durchtrennung der Vena cava caudalis unterhalb des Herzens wurden Vollblutproben mit einer Pasteurpipette aus dem Thorax gewonnen und bei Raumtemperatur zur Vermeidung der Hämolyse gelagert. Nach 30 Minuten wurde das Vollblut bei 1500 g und 4°C 15 Minuten zentrifugiert und das Serum abgetrennt. Anschließend wurde das Herz am kaudalen Pol mit einer Kanüle punktiert und eine Spülapparatur angeschlossen. Dann wurde das Versuchstier mit einer heparinisierten Kochsalzlösung (10 IE Heparin/ml NaCl 0,9 %) perfundiert bis klare Flüssigkeit aus der durchtrennten Vena cava caudalis trat. Abschließend wurde das Versuchstier durch zervicale Dislokation getötet und nach Standardprotokoll präpariert (siehe 2.5.1). Das Gehirn wurde hierbei mit einem Kunststoffskalpell in zwei Hemisphären geteilt und in heparinisiertem Kochsalz (10 IE Heparin/ml NaCl 0,9 %) gewaschen und anschließend in Kunststoff-Reaktionsgefäßen asserviert. Alle Gewebeproben wurden bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

2.4.3. Druckaufschluss

Die Futtermittel- und Gewebeproben wurden unter kontaminationsfreien Bedingungen eingewogen und mit Kunststoffpipetten in Quarzröhrchen gefüllt. Anschließend wurden pro Probe 2 ml 65 % Salpetersäure und 500 µl 20 % HCl hinzugegeben und die Quarzglasröhrchen mit einem PTFE-Klebeband verschlossen. Im Anschluss wurden die Proben bei 250 °C und circa 100 bar 90 Minuten im Anschluss hochdruckverascht. Nach Abkühlen der Proben wurden diese mit einer Glasküvette in Test-Tubes umgefüllt und mit Milipore-Wasser auf ein Endvolumen von 5 ml aufgefüllt. Bis zur weiteren Analyse wurden die Proben bei 4°C aufbewahrt.

2.4.4. Induktiv-gekoppelte Plasma-Massenspektroskopie (ICP-MS)

Die Bestimmung der Metallionenkonzentration wurde im Anschluss im Institut für Wasserchemie und chemische Balneologie der Technischen Universität München durchgeführt. Als Analysetechnik wurde hierfür die Massenspektroskopie mit induktiv-gekoppeltem Plasma herangezogen (Houk, 1980). Diese Methode aus dem

Bereich der anorganischen Elementanalytik kann gleichzeitig verschiedene Metallionen innerhalb einer Probe bis zum nanomolaren Bereich detektieren und deren Konzentration bestimmen.

2.5. Histopathologische und immunhistochemische Untersuchungen

Alle Versuchstiere wurden nach der Entnahme aus dem Versuch für histopathologische und immunhistochemische Untersuchungen seziiert und in 4 %-igem Formaldehyd fixiert (vgl. 2.5.1).

Um die Unterschiede der neuropathologischen Veränderungen zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen besser erfassen zu können, wurden pro Versuchsgruppe jeweils drei männliche und drei weibliche Versuchstiere randomisiert ausgewählt. Diese Versuchstiere wurden in der 62. Lebenswoche aus dem Versuch entnommen und für die weiteren vergleichenden Untersuchungen herangezogen.

2.5.1. Sektion der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden nach Entnahme aus dem Versuch durch zervikale Dislokation getötet und der Tod durch das Fehlen des Zwischenzehreflexes überprüft. Anschließend wurde der Kopf mit einer scharfen Schere abgetrennt und der Schädel von dorsal in sagittaler Schnittführung aufgeschnitten. Die Schädelplatten wurden mit einer chirurgischen Pinzette abgehoben und verworfen. Nach Freilegen des Gehirns erfolgte die Durchtrennung des Gehirns mit einem Skalpell in sagittaler Schnittführung. Eine Gehirnhälfte wurde mit einer stumpfen Pinzette herauspräpariert, in ein Reaktionsgefäß gefüllt und bei -80°C bis zur weiteren Auswertung asserviert. Die andere Gehirnhälfte wurde *in situ* belassen und der gesamte Schädel in 4 %-igem Formaldehyd fixiert.

Die Präparation der Organe erfolgte durch die stumpfe Durchtrennung der Haut und des subkutanen Fettgewebes von kaudal am Anus nach kranial zum Sternum. Anschließend wurde das Peritoneum und der Thorax mit einer spitzen Schere eröffnet. Anschließend wurde das gesamte innere Organpaket (Herz, Lunge, Magen, Darm, Leber, Pankreas, Milz, Niere, Genitalien) mit einer stumpfen Schere herauspräpariert und in 4 %-igem Formaldehyd fixiert.

Für die Präparation des Rückenmarks wurden der Schwanz sowie die Rippen paravertebral und die Bauchdecke mit einer stumpfen Schere abgetrennt. Das

Rückenmark wurde in der Wirbelsäule belassen und in 4%-igem Formaldehyd fixiert. Das in Formaldehyd fixierte Gehirn wurde in Parafin eingebettet.

2.5.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ermöglicht die Unterscheidung feingeweblicher Strukturen unter dem Lichtmikroskop und basiert auf zwei verschiedenen Einzelfärbungen. Durch die Hämalaun-Färbung werden saure basophile Strukturen, wie beispielsweise Zellkerne mit der darin enthaltenen DNA oder das raue endoplasmatische Retikulum bläulich gefärbt. Eosin ist ein synthetischer Farbstoff, der basische acidophile Gewebestrukturen wie zum Beispiel Plasmaproteine rötlich färbt. In der vorliegenden Arbeit wurde die HE-Färbung nach folgendem Standardprotokoll der LMU München (Stand 08.08.2011) durchgeführt:

Zunächst wurden aus den Parafinblöcken 1 μm Schnitte angefertigt und diese mit Xylol zweimal 10 Minuten entparaffiniert. Dann wurden die Schnitte jeweils 5 Minuten in eine absteigende Alkoholreihe (2x100 %, 96 % und 70 %) eingetaucht und mit Aqua dest. gespült. Im Anschluss erfolgte die Färbung mit Hämalaun für 10 Minuten. Danach wurden die Schnitte 20 Minuten mit fließend kaltem Leitungswasser gewässert. Im Anschluss erfolgte das 3-malige Eintauchen in 70 % Alkohol. Anschließend wurden die Schnitte zwei Minuten mit Eosin alkoholisch gefärbt und schnell in 70 % und 96 % Alkohol getaucht. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte zweimal für jeweils 5 Minuten in 100 % Alkohol und anschließend in Xylol getaucht. Abschließend erfolgte das Eindecken mit Eukitt.

Es wurden HE-Färbungen von Schnitten folgender Regionen angefertigt:

1. Großhirn: Frontalschnitt auf Höhe des Ammonshorns, sodass sowohl der Cortex als auch der Thalamus angeschnitten waren
2. Hirnstamm: Frontalschnitt auf Höhe der Pedunculi cerebelli mit angrenzendem Kleinhirn

2.5.3 immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemische Färbung der verschiedenen Schnitte aus dem zentralen Nervensystem diente dem Nachweis von unlöslichen α -Synuclein-Aggregaten, die mit dem Antikörper 15G7 detektiert werden können. Bei 15G7 handelt es sich um einen monoklonalen unkonjugierten Antikörper aus der Ratte, der spezifisch an humanes α -Synuclein bindet (Neumann, 2002).

Um an 15G7 gebundenes α -Synuclein zu detektieren wurde ein sogenanntes ABC-System zur Signalverstärkung herangezogen. Dabei wird im Rahmen der immunhistochemischen Färbung nach Zugabe des Primärantikörpers, im Falle des vorliegenden Versuches 15G7, ein biotinylierter Sekundärantikörper hinzugegeben. Der mit Biotin gekoppelte Sekundärantikörper bindet die im nächsten Schritt hinzugegebenen Streptavidin-Peroxidase-Komplexe über Biotin-Avidin-Bindungen. Anschließend erfolgt die Zugabe von Diaminobenzidin (DAB). Die an Avidin gekoppelte Peroxidase verwendet DAB als Substrat und produziert dabei ein bräunliches Präzipitat. Hierdurch werden die an 15G7 gebundenen α -Synuclein-Aggregate markiert und können lichtmikroskopisch detektiert und untersucht werden. Folgendes Protokoll wurde für die immunhistochemische Färbung verwendet:

Aus dem in Formaldehyd fixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden 1 μ m breite Schnitte angefertigt, entparaffiniert und mit 0,2 M Borsäure bei pH 9 und 63°C für 25 Minuten behandelt. Dann wurden die Schnitte im gleichen Medium 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie mit deionisiertem gereinigtem Wasser gewaschen und mit Hämalan gefärbt. Um Proteinase-sensibles α -Synuclein zu entfernen, wurde danach ein Proteinkinaseverdau (PK-Verdau) durchgeführt. Hierfür wurden zunächst 50 mg/ml Proteinkinase-Stammlösung 1/500 mit Verdau-puffer verdünnt. Der PK-Verdau wurde daraufhin für 10 Minuten bei 37°C durchgeführt. Nach dem Waschen wurden die Schnitte zunächst für 32 Minuten mit dem 15G7-Primärantikörper in einer 1/4000 Verdünnung und dann mit einem biotinyliertem Sekundärantikörper in einer 1/300 Verdünnung für 20 Minuten behandelt. Anschließend wurden Streptavidin-Peroxidase-Komplexe und DAB hinzugegeben (iView DAB Detection Kit). Danach wurde die Färbung mit Hämalan für 2 Minuten wiederholt. Abschließend wurden die Schnitte 5 Minuten mit Leitungswasser gespült.

Folgende Regionen wurden immunhistochemisch gefärbt:

1. Großhirn
2. Hirnstamm und Kleinhirn

2.5.3. Qualitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Zur qualitativen Auswertung der histopathologischen Schnitte erfolgte zunächst eine Begutachtung unter dem Mikroskop mit 2- und 10-facher Vergrößerung und Beschreibung der immunhistochemisch angefärbten α -Synuclein-Ablagerungen. Zur Quantifizierung der verschiedenen morphologischen α -Synuclein-Ablagerungen

wurden pro Gewebeschnitt vier lichtmikroskopische Bilder (Vergrößerung 10x) an jeweils verschiedenen, nicht überlappenden Stellen angefertigt. Es wurde zwischen den folgenden morphologischen Ablagerungsarten unterschieden:

- Granuläre Ablagerungen
- Perlschnurartig angeordnete Ablagerungen
- Ablagerungen entlang von Neuriten
- Ablagerungen entlang dystropher Neuriten
- Zellkörper-nahe Ablagerungen

Die quantitative Einteilung erfolgte nach Häufigkeit der morphologischen Ablagerungen pro Bild nach dem folgenden Prinzip:

Vorkommen 1x pro Bild → 1 Punkt

Vorkommen 2-5x pro Bild → 2 Punkte

Vorkommen >5x pro Bild → 3 Punkte

Im Anschluss erfolgte eine graphische Darstellung der quantitativen Auswertung der verschiedenen morphologischen α -Synuclein-Ablagerungen.

2.5.4. Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Die quantitative Auswertung erfolgte anhand des Cell[^]D Programmes. Um die mit dem 15G7-Antikörper immunhistochemisch angefärbten α -Synuclein-Aggregate im Hirnstamm und Cortex quantifizieren zu können, wurden zunächst pro Gewebeschnitt vier lichtmikroskopische Bilder (Vergrößerung 10x) an jeweils verschiedenen, nicht überlappenden Stellen angefertigt. Für die anschließende quantitative Bildanalyse wurde das Prinzip der Binarisierung nach dem Schwellenwertverfahren herangezogen. Hierbei werden die Bildpunkte jeder farbigen Aufnahme, Pixel genannt, zunächst nach ihrem Anteil an den drei Grundfarben Rot, Grün und Blau definiert. Anschließend werden die Bildpunkte mit einem Schwellenwert verglichen (Abbildung 3). Im Falle der vorliegenden Arbeit handelt es sich um einen Wertebereich. Je nachdem, ob der Wert innerhalb oder außerhalb des vorher festgesetzten Wertebereiches liegt, nehmen die Bildpunkte die Farbe Schwarz (außerhalb des Wertebereiches) oder Weiß (innerhalb des Wertebereiches) an und werden entsprechend mit den Zahlen 0 oder 1 kodiert. In einem dann angefertigten Histogramm kann man die absolute Häufigkeit der weißen und schwarzen Pixel ablesen und so anhand der Gesamtzahl an Bildpixeln die relative Häufigkeit der weißen und schwarzen Pixel berechnen.

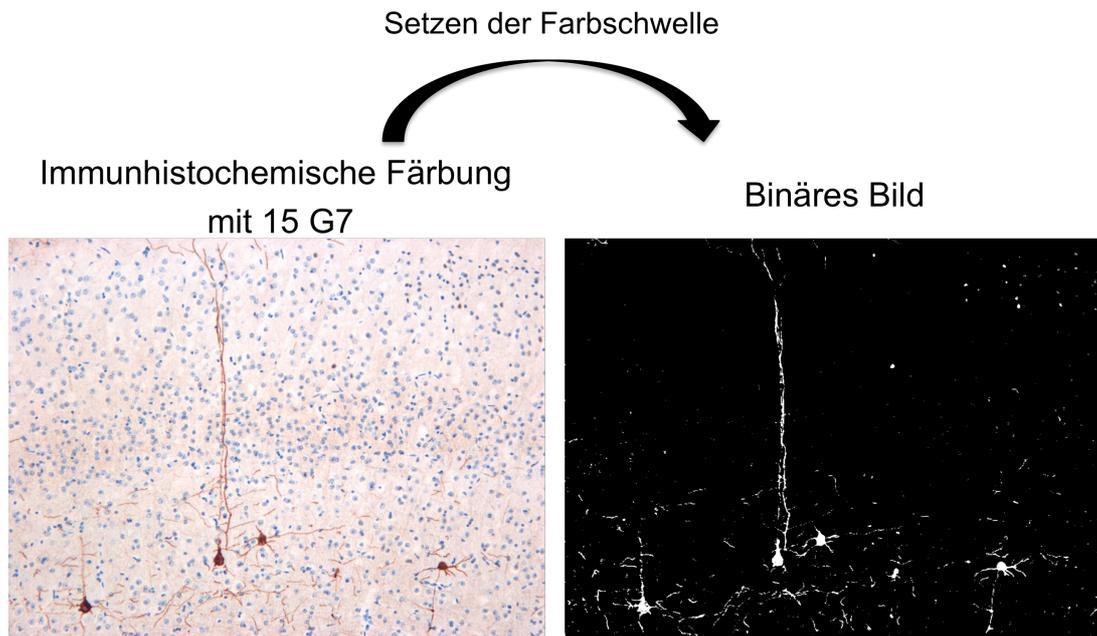


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Binarisierungsprinzips.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Wertebereiche für die Grundfarben Rot, Grün und Blau für die Binarisierung verwendet:

Rot 40 – 255

Grün 0 – 180

Blau 0 – 150

Die Wertebereiche wurden dabei so gewählt, dass die weißen Pixel nach der Binarisierung die immunhistochemisch angefärbten unlöslichen α -Synuclein-Aggregate darstellten.

2.6. statistische Analyse

Alle Daten wurden mit Hilfe des Statistikprogrammes Graph Pad Prism Version 5.0 for Mac OS X ausgewertet.

Die Beschreibung der erhobenen Parameter erfolgte mittels deskriptiver Statistik. Dabei wurden der Mittelwert, der Median, Minimum und Maximum, Standardabweichung, Standardfehler und Konfidenzintervalle berechnet und dargestellt.

Die Prüfung von möglichen statistischen Zusammenhängen zwischen den einzelnen Messwerten erfolgte mit Methoden der induktiven/schließenden Statistik. Zunächst wurden die Messwerte mit Hilfe des D'Angostino-Pearson-Tests auf

Normalverteilung geprüft. Sofern eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ vorlag, wick die Verteilung der Messwerte der einzelnen Versuchsgruppen von einer Normalverteilung ab, sodass bei Vorliegen von nicht gepaarten Stichproben folglich der Man-Whitney-U-Test zur Überprüfung von signifikanten Unterschieden angewandt wurde. Dieser nicht-parametrische Test dient der Überprüfung von statistischen Unterschieden zwischen zwei nicht gepaarten Stichproben, indem die einzelnen Messwerte der mindestens intervallskalierten Stichproben der Größe nach angeordnet und ihnen Rangnummern zugewiesen werden. Der Test vergleicht daraufhin den Median der Rangnummern der einzelnen Stichproben. Bei Vorliegen einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wurde eine Signifikanz der Unterschiede angenommen.

Zur vergleichenden Überlebenszeitanalyse diente die Kaplan-Meier-Statistik, ein nicht-parametrisches Verfahren, bei dem die Wahrscheinlichkeit berechnet wird, dass bis zu einem bestimmten Zeitpunkt ein Ereignis nicht eingetroffen ist. Anhand der Kaplan-Meier-Statistik lässt sich zudem die bedingte Überlebenswahrscheinlichkeit für ein bestimmtes Zeitintervall berechnen. Zur Untersuchung auf Vorliegen signifikanter Unterschiede zwischen zwei Überlebenskurven dienten der Log-Rank-Test (auch Mantel-Cox-Test genannt) und Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test, wobei letzterer frühere Ereignisse stärker gewichtet (Ziegler, 2007). Zur Untersuchung des krankheitsfreien Überlebens wurden ebenfalls die Kaplan-Meier-Analyse sowie die dazugehörigen Tests auf Signifikanz verwendet.

2.6.1. statistische Analyse der Laufleistung der Versuchstiere

Für die Auswertungen der Laufleistungen der Versuchstiere wurde der beste Lauf aus den ersten drei gültigen Läufen am Testtag herangezogen. Die Laufleistungen von Versuchstieren, die aufgrund der Entwicklung des für das Mausmodell beschriebenen motorischen Syndroms aus dem Versuch entnommen wurden, wurden ab dem Entnahmezeitpunkt auf 0 Sekunden gesetzt und in die konsekutiven Auswertungen miteinbezogen. Die Daten der Versuchstiere, die aufgrund anderer Gründe aus dem Versuch entnommen wurden, wurden zensiert.

Für den Vergleich zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurden sowohl die absoluten als auch die normierten Laufleistungen der Versuchstiere herangezogen. Der Vergleich der normierten Laufleistungen ermöglichte es, Unterschiede in der individuellen Laufleistungen besser zu erfassen.

Die absolute Laufleistung ergab sich aus der gemessenen Laufzeit in Sekunden. Hierfür wurde der jeweils beste Lauf aus den drei Läufen am Testtag verwendet („best of“). Die normierte Laufleistung errechnete sich durch die Relation der absoluten Laufleistung zu einem bestimmten Messzeitpunkt mit einem Referenzwert. Für die Bestimmung dieses Referenzwertes wurde der Messzeitraum 24-40 Lebenswochen gewählt, da sowohl die Wildtyp- als auch die transgenen Versuchstiere in diesem Zeitraum stabile Laufleistungen zeigten. Für jedes Versuchstier wurde der Mittelwert der Laufleistung im Zeitraum von 24-40 Wochen als Referenzwert errechnet und als 100 % definiert.

Zur Gegenüberstellung der Laufleistungen der einzelnen Versuchstiere und Versuchsgruppen wurden die in 2.6 erwähnten Parameter herangezogen. Bei den Wildtypversuchstieren wurde zudem der Mittelwert der Laufleistungen aller Wildtypversuchstiere, unabhängig von der Versuchsgruppe, errechnet und mit der Laufleistung der transgenen Versuchstiere verglichen.

2.6.2. statistische Analyse der Gewichtsentwicklung der Versuchstiere

Die statistische Auswertung der Gewichtsentwicklung der Versuchstiere erfolgte in Anlehnung an die statistische Analyse der Laufentwicklung (vgl. 2.6.1).

Das Gewicht von Versuchstieren, die aufgrund der Entwicklung des für das Mausmodell beschriebenen motorischen Syndroms aus dem Versuch entnommen wurden, wurde ab dem Entnahmezeitpunkt auf 0 Gramm gesetzt und in die konsekutiven Auswertungen miteinbezogen. Die Gewichtsdaten der Versuchstiere, die aufgrund anderer Gründe aus dem Versuch entnommen wurden, wurden zensiert.

Aufgrund des unterschiedlichen geschlechtsspezifischen Gewichtes wurde das normierte Gewicht zur Gegenüberstellung der Gewichtsentwicklung der einzelnen Versuchstiere und –gruppen verwendet. Die normierte Gewichtsentwicklung errechnete sich analog der normierten Laufleistung, indem das absolute Körpergewicht im Vergleich zu einem Referenzwert gesetzt wurde (vgl. 2.6.1). Für die Bestimmung dieses Referenzwertes wurde ebenfalls der Zeitraum 24-40 Lebenswochen gewählt.

2.6.3. statistische Analyse des Überlebens der transgenen Versuchstiere

Für den Vergleich der mittleren Überlebensdauer zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurden die Mittelwerte sowie die zugehörigen Standardfehler herangezogen.

Zur vergleichenden Überlebenszeitanalyse diente die Kaplan-Meier-Statistik. Zur Untersuchung auf Vorliegen signifikanter Unterschiede zwischen zwei Überlebenskurven dienten der Log-Rank-Test (auch Mantel-Cox-Test genannt) und Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test.

2.6.4. statistische Analyse des krankheitsfreien Überlebens der transgenen Versuchstiere

Das krankheitsfreie Überleben wurde anhand des Mittelwerts sowie der zugehörigen Standardfehler verglichen. Zur weiteren Analyse wurde eine Kaplan-Meier-Statistik durchgeführt. Zur Untersuchung auf Vorliegen signifikanter Unterschiede zwischen den Kurven zum krankheitsfreien Überleben dienten der Log-Rank-Test (auch Mantel-Cox-Test genannt) und Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test.

2.6.5. statistische Analyse der cerebralen α -Synuclein-Ablagerungen

Für den quantitativen Vergleich der α -Synuclein-Ablagerungen wurden der Mittelwert sowie die dazugehörige Standardabweichung beziehungsweise der dazugehörige Standardfehler verwendet.

3. ERGEBNISSE

3.1. Messung der Metallionenkonzentrationen

3.1.1. Bestimmung der Metallionenkonzentration im Basisexperimentfutter für Versuchstiere

Vor Versuchsbeginn erfolgte die Bestimmung der Metallionenkonzentration in industriell angefertigten Trockenfuttermitteln, die als herkömmliches Basisexperimentfutter für die Tierzucht verwendet werden. Die mittels ICP-MS untersuchten Futtermittel wiesen Schwankungen der Eisenkonzentrationen und hohe Aluminiumkonzentrationen auf (Tabelle 5). Gadolinium war nur sehr niedrigkonzentriert in den herkömmlichen Basisexperimentfuttermittelproben zu finden.

Metallion	Eisen	Aluminium	Gadolinium
Probe 1	356,70	286,03	0,04
Probe 2	424,05	272,50	0,04

Tabelle 5: Metallionenkonzentration in mg pro kg Trockengewicht in industriell angefertigten Basisexperimentfuttermitteln.

3.1.2. Bestimmung der Metallionenkonzentration im Spezialfuttermittel

Die Zusammensetzung von industriell angefertigten Trockenfuttermitteln für Nagetiere variierte in den Vorversuchen bezüglich des Metallionengehaltes (vgl. 3.1.1), sodass Spezialfuttermittel für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Tierversuche angefertigt wurden. Hierdurch konnte ein definierter Metallionengehalt in den Futtermitteln sichergestellt werden.

Die Bestimmung der Metallionenkonzentration im hier verwendeten Futtermittel erfolgte im Vorfeld des Versuches. Hierfür wurden aus jeder Futtermittellieferung Futtermittelpellets entnommen und nach dem in 2.4 beschriebenen Protokoll aufgearbeitet. Die im Anschluss durchgeführte ICP-MS-Analyse bestätigten die in 2.2.3 beschriebenen Konzentrationserhöhungen für Eisen, Aluminium und Gadolinium im jeweiligen Spezialfutter. Aufgrund der Verarbeitung des Futtermittels in Pellets ist trotz Hochdruckveraschung eine Varianz der Metallionenkonzentrationen anzunehmen.

Futtermittel	Untersuchtes Metallion		
	Eisen	Aluminium	Gadolinium
Referenz	86,2681	3,2498	0,0141
Eisen	579,320	4,0719	0,0086
Aluminium	87,2462	519,4999	0,0918
Gadolinium	88,4460	3,2158	681,4810

Tabelle 6: Tabellarische Übersicht der in der ICP-MS-Analyse bestimmten Metallionenkonzentrationen in den Spezialfuttermitteln. Konzentrationsangaben in $\mu\text{g/g}$.

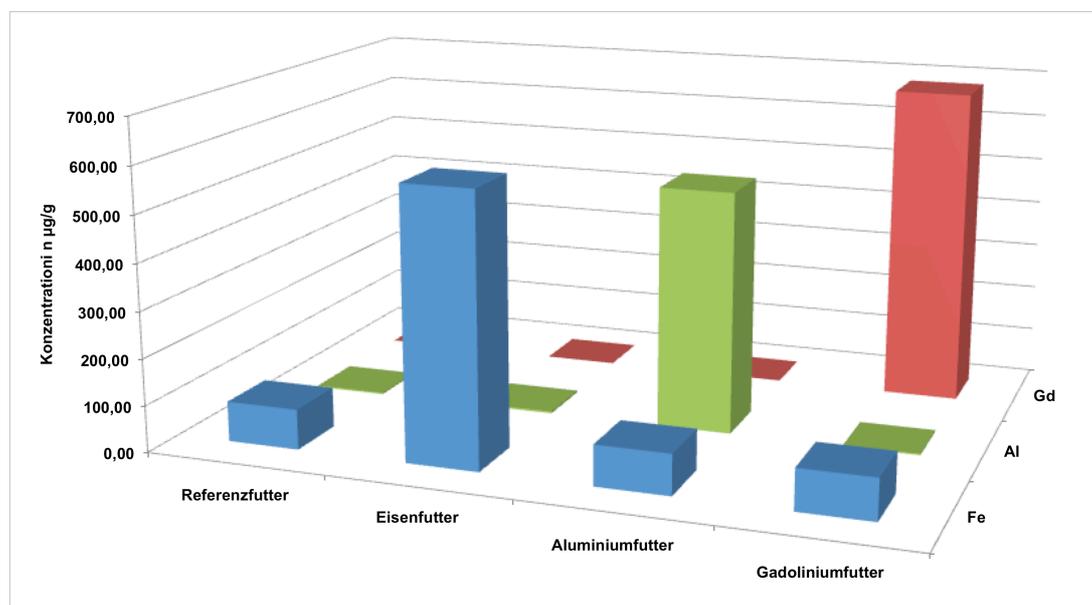


Abbildung 4: Graphische Darstellung der mittels ICP-MS-Analyse bestimmten Metallionenkonzentrationen in den Spezialfuttermitteln in μg pro g Trockengewicht.

3.1.3. Bestimmung der Metallionenkonzentration im Blut und Gehirngewebe von Wildtypversuchstieren

3.1.3.1. Wildtypversuchstiere im Alter von 12 Wochen

Um einen möglichen Effekt der Spezialfuttermittel auf die Metallionenspiegel *in vivo* zu messen, wurden das Serum und Gehirngewebeproben von jeweils zwei Wildtypversuchstieren aus der Referenzgruppe und der Eisengruppe im Alter von 12 Wochen mittels ICP-MS-Analyse untersucht (vgl. 2.4.2.2). Zu diesem Zeitpunkt wurden diese Versuchstiere seit 7 Wochen ausschließlich mit dem jeweiligen Spezialfuttermittel versorgt.

Die mittlere Eisenkonzentration im Gehirngewebe betrug $7,93 \mu\text{g/g}$ in der Referenzgruppe und $7,92 \mu\text{g/g}$ in der Eisen-Gruppe und zeigte keinen signifikanten Unterschied. Im Serum zeigte sich in der Referenzgruppe eine mittlere

ERGEBNISSE

Eisenkonzentration von 1,38 µg/g, wohingegen die mittlere Eisenkonzentration im Serum der Eisengruppe mit 3,53 µg/g deutlich höher war.

Die durchschnittliche Aluminiumkonzentration in den Gehirnproben war mit 1,75 µg/g in der Referenzgruppe höher als in der Eisengruppe, die eine mittlere Aluminiumkonzentration von 0,94 µg/g aufwies. Die Aluminiumkonzentration im Serum variierte mit 0,58 µg/g in der Referenzgruppe und 0,65 µg/g in der Eisengruppe nicht stark zwischen den Versuchsgruppen. Gadolinium war nicht nachweisbar (Tabelle 7).

Versuchsgruppe	Untersuchtes Metallion	Mittelwert		Varianz	
		Gehirn	Serum	Gehirn	Serum
Referenz	Eisen	7,93	1,38	0,57	0,25
	Aluminium	1,75	0,58	1,55	1,66
Eisen	Eisen	7,92	3,53	0,66	0,12
	Aluminium	0,94	0,65	0,21	0,01

Tabelle 7: Übersicht über die mittels ICP-MS Analyse bestimmten Metallionenkonzentrationen in den Serum- und Gehirngewebeproben der Wildtypversuchstiere im Alter von 12 Wochen. Konzentrationsangaben in µg/g.

3.1.3.2. Wildtypversuchstiere im Alter von 28 Wochen

Um den Effekt der Spezialfuttermittel auf die Metallionenkonzentration im Blut und Gehirn im zeitlichen Verlauf zu untersuchen, wurden pro Versuchsgruppe zwei Wildtypversuchstiere im Alter von 28 Wochen untersucht.

In den Gehirnproben der Referenzgruppe zeigte sich eine mittlere Eisenkonzentration von 12,69 µg/g; in der Eisengruppe lag die Eisenkonzentration mit 15,34 µg/g höher (Abbildung 5 A). Die Eisenkonzentrationen zwischen den beiden Versuchsgruppen variierte auch im Vollblut: in der Referenzgruppe zeigte sich eine mittlere Eisenkonzentration von 394,61 µg/g, in der Eisengruppe betrug die Eisenkonzentration durchschnittlich 444,02 µg/g und war damit deutlich höher (Abbildung 5 D).

In der Aluminium- und Gadoliniumgruppe zeigten sich im Vergleich zur Referenzgruppe deutlich höhere Futtermittel-spezifische Metallionenkonzentrationen (Tabelle 8): In den Gehirnproben der Referenzgruppe zeigte sich eine mittlere Aluminiumkonzentration von 1,21 µg/g; in der Aluminiumgruppe lag die durchschnittliche Aluminiumkonzentration bei 1,89 µg/g (Abbildung 5 B). Die

ERGEBNISSE

Gadoliniumgruppe zeigte mit einer durchschnittlichen Gadoliniumkonzentration von 1,88 ng/g den höchsten Wert, in der Referenzgruppe lag die Gadoliniumkonzentration bei 0,84 ng/g (Abbildung 5 D).

Beim Vergleich der Gewebeproben der Wildtypversuchstiere im Alter von jeweils 12 und 28 Wochen zeigte sich im zeitlichen Verlauf ein deutlicher Anstieg der Eisenkonzentration, der in der Eisengruppe stärker ausfiel.

Versuchsgruppe	Untersuchtes Metallion	Mittelwert		Varianz	
		Gehirn	Vollblut	Gehirn	Vollblut
Referenz	Eisen	12,69 µg/g	394,61 µg/g	0,29 µg/g	64,61 µg/g
	Aluminium	1,21 µg/g	0,98 µg/g	0,42 µg/g	0,01 µg/g
	Gadolinium	0,84 µg/g			
Eisen	Eisen	15,34 µg/g	444,02 µg/g	2,68 µg/g	3,92 µg/g
Aluminium	Aluminium	1,89 µg/g		0,42 µg/g	
Gadolinium	Gadolinium	1,88 ng/g		0,39 ng/g	

Tabelle 8: Tabellarische Darstellung der Konzentrationen von Eisen, Aluminium und Gadolinium in Gewebeproben von Wildtypversuchstieren im Alter von 28 Wochen.

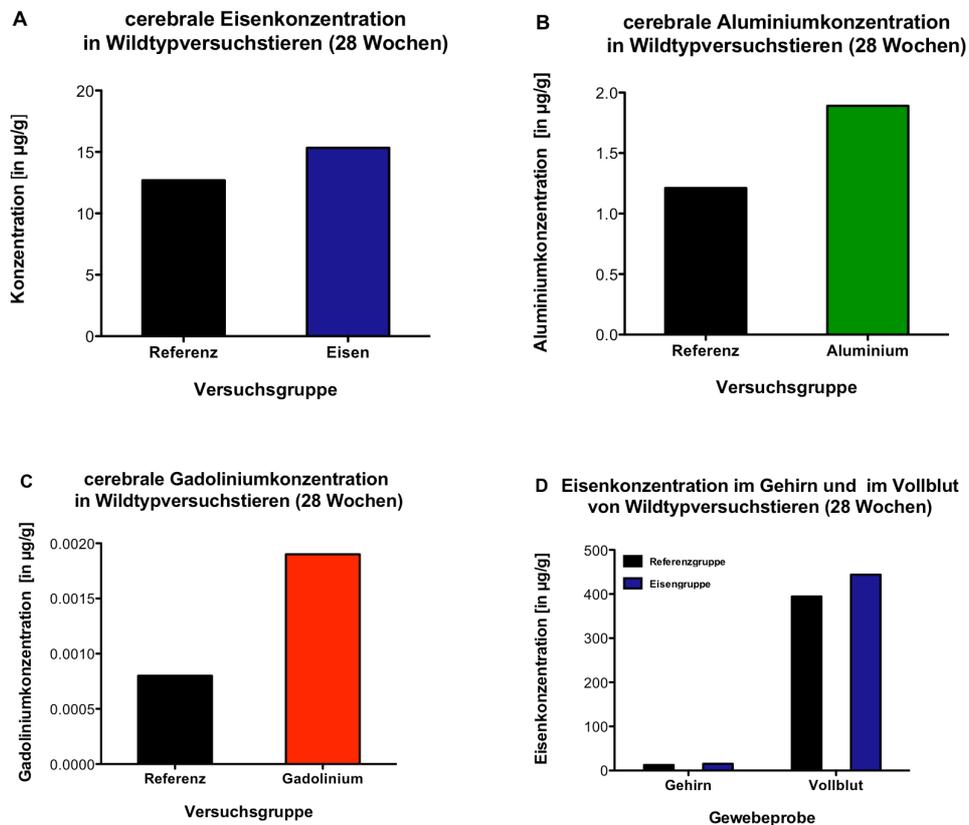


Abbildung 5: Graphische Darstellung der in der ICP-MS-Analyse bestimmten Metallionenkonzentrationen in Gewebeproben von Wildtypversuchstieren im Alter von 28 Wochen.

3.2. Genotypisierung

Die DNA-Isolierung aus den Schwanzspitzen der Versuchstiere erfolgte nach dem in 2.3.1 beschriebenen Protokoll. Die Reinheit der isolierten DNA wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers überprüft. Dabei lag der A_{260}/A_{280} -Quotient in allen Proben im optimalen Qualitätsbereich zwischen 1,8 und 2,0. In der anschließend durchgeführten Agarose-Gelelektrophorese konnten in allen Proben DNA-Fragmente im Längenbereich von 250 Basenpaaren (bp) nachgewiesen werden (Abbildung 6). Da murines α -Synuclein aufgrund einer anderen Basensequenz nicht mit den verwendeten Primern amplifiziert werden konnte, handelt es sich bei der isolierten und im Anschluss amplifizierten DNA um Fragmente der DNA-Sequenz von humanem α -Synuclein.

ERGEBNISSE

Ein Test auf Homozygotität für humanes α -Synuclein wurde bei den transgenen Versuchstieren nicht durchgeführt, da ausschließlich homozygote Elternpaare für die Zucht der Versuchstiere verwendet wurden.

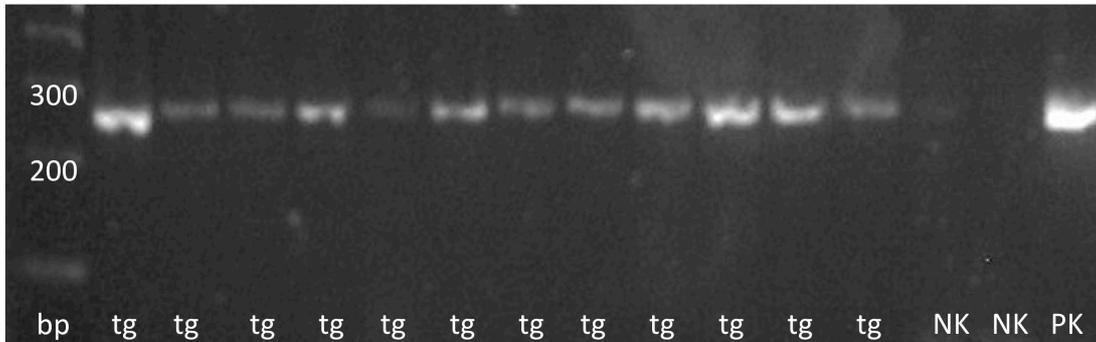


Abbildung 6: Exemplarische gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten PCR-Produkte der aus den Schwanzspitzen der transgenen Versuchstiere isolierten DNA.

Als Größenstandard wurde eine 100 bp Leiter verwendet. In allen Proben wurden DNA-Fragmente in einem Längenbereich von 200 bis 300 bp nachgewiesen. Da murines α -Synuclein mit den verwendeten Primern nicht amplifiziert werden kann, handelt es sich bei den DNA-Fragmenten um Ausschnitte aus humanem α -Synuclein. (bp=Basenpaare; tg=transgen; NK=Negativkontrolle; PK=Positivkontrolle).

3.3. Vorzeitige Entnahme aus dem Tierversuch

Während des Langzeitterversuches wurden insgesamt sieben Versuchstiere vorzeitig aus dem Versuch entnommen, davon fünf Wildtypversuchstiere und zwei transgene Versuchstiere. Die Gründe für die vorzeitige Versuchsentnahme sind Tabelle 9 und Tabelle 10 zu entnehmen. Die Entnahmekriterien wurden in 2.2.5.5 definiert. Alle Daten dieser Versuchstiere wurden für die weitere Auswertung zensiert.

Versuchsgruppe	Tiernummer	Entnahmealter	Entnahmegrund
Eisen	11	63,29 Wochen	Zur Infektionskontrolle
	48	72,14 Wochen	Hautläsionen
Aluminium	21	67,14 Wochen	Hautläsionen
Gadolinium	33	60,43 Wochen	Hautläsionen
	34	88,43 Wochen	Hautläsionen

Tabelle 9: Tabellarische Übersicht der vorzeitig aus dem Versuch entnommenen Wildtypversuchstiere.

Versuchsgruppe	Tiernummer	Entnahmealter	Entnahmegrund
Eisen	163	43,14 Wochen	Hautläsionen
Gadolinium	224	55,57 Wochen	Hautläsionen

Tabelle 10: Tabellarische Übersicht der vorzeitig aus dem Versuch entnommenen transgenen Versuchstiere.

3.4. Laufleistung der Versuchstiere

Die Laufleistung der Versuchstiere wurde anhand von RotaRod-Messungen erfasst und in den in 2.2.5.1 beschriebenen zeitlichen Abständen durchgeführt. Die Messungen dienten der Erfassung möglicher Deprivations- oder Toxizitätseffekte der Spezialfutter auf die motorische Leistungsfähigkeit. Außerdem sollte eine potenziell beschleunigte Krankheitsprogression bei den transgenen Versuchstieren überprüft werden. Die Auswertung der motorischen Leistung wurde wie in 2.6.1 beschrieben durchgeführt.

3.4.1. Laufleistung der Wildtypversuchstiere

3.4.1.1. Laufleistung der einzelnen Wildtypversuchstiere

Für jede Versuchsgruppe wurde die Laufleistung der einzelnen Versuchstiere zu jedem Messzeitpunkt erfasst und graphisch im Zeitverlauf dargestellt (Abbildung 7). Im Anschluss wurde der Mittelwert der Laufleistung der Versuchsgruppen berechnet und dargestellt (jeweils die rote Kurve in den Kurvendiagrammen). Die Laufleistung der einzelnen Versuchstiere fluktuierte im zeitlichen Verlauf nur geringfügig. In der Gadoliniumgruppe verstarben zwei Versuchstiere an Altersschwäche vor der 94. Lebenswoche, sodass deren Laufleistung für die Auswertung wie in 2.6.1 beschrieben ab dem Todeszeitpunkt auf 0 Sekunden gesetzt wurde. Beim Vergleich der normierten Laufleistungen der einzelnen Versuchstiere mit dem Mittelwert der jeweiligen Versuchsgruppe zeigte sich, dass die jeweiligen Laufleistungen durchgehend in einem Bereich von maximal drei Standardabweichungen um den Mittelwert lagen und zu keinem Zeitpunkt signifikant von diesem Bereich abwichen.

ERGEBNISSE

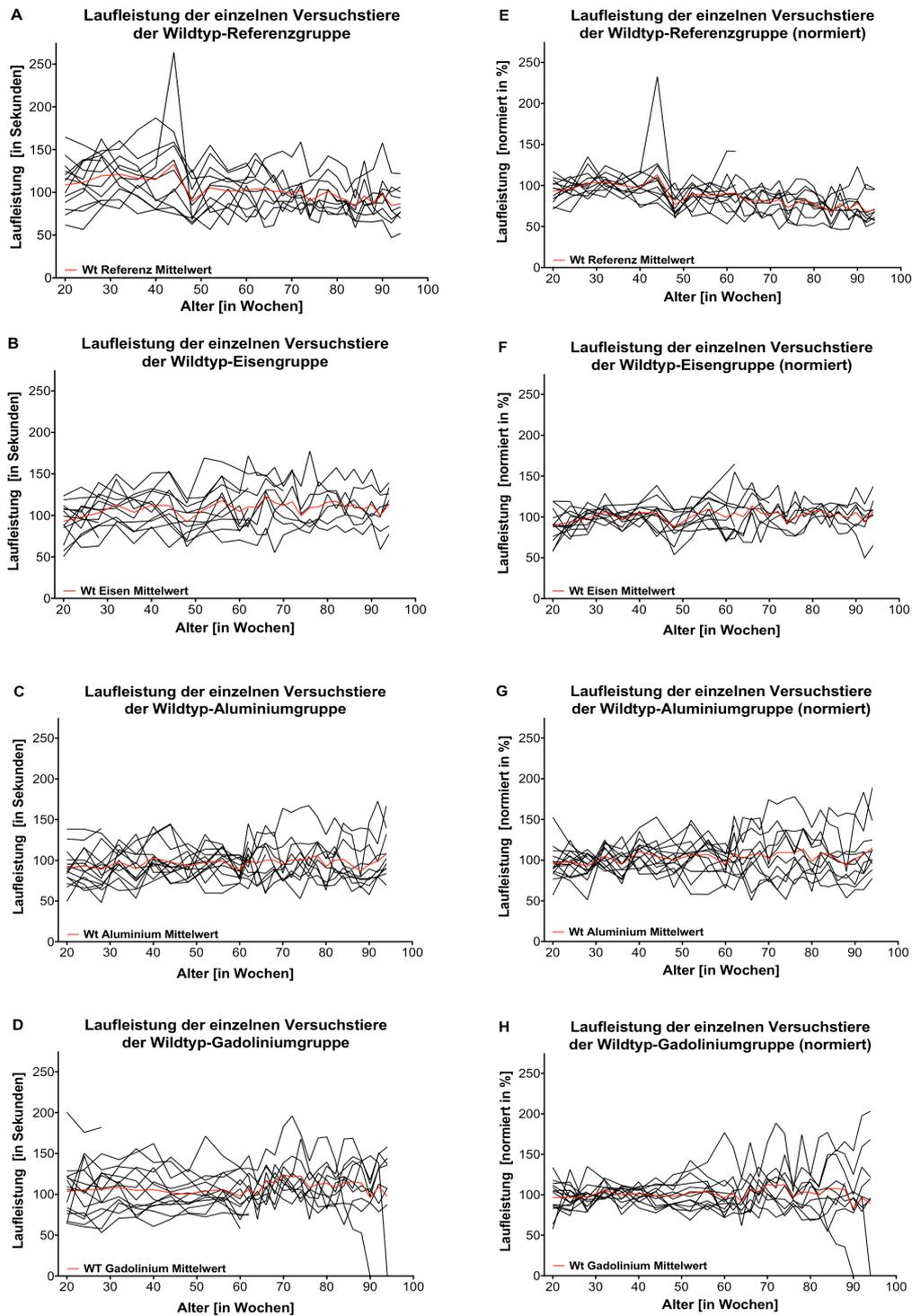


Abbildung 7: Graphische Darstellung der maximalen Laufleistungen der einzelnen Versuchstiere in den verschiedenen Wildtypversuchsgruppen.

Die Abbildungen 2A-D stellen die absoluten Werte der maximalen Laufleistungen in Sekunden dar. Die Abbildungen 2E-H stellen die relativen Laufleistungen in Prozent dar. In Rot wurde der Mittelwert der maximalen Laufleistung für die jeweilige Versuchsgruppe dargestellt. Dieser wurde für die weiteren vergleichenden Auswertungen herangezogen.

3.4.1.2. Vergleich der Laufleistung zwischen den Wildtypversuchsgruppen

Die deskriptive Statistik der absoluten Laufleistungen der Wildtypversuchsgruppen ist in Tabelle 11 dargestellt. Der Mittelwert der maximalen Laufleistung aller Wildtypversuchstiere lag bei 103,7 Sekunden.

Versuchsgruppe	Referenz	Eisen	Aluminium	Gadolinium	Alle Wildtypversuchstiere
Minimum	82,7	92,2	86,9	96,0	94,0
Median	101,3	110,4	98,2	107,0	103,6
Maximum	132,5	122,9	107,9	123,9	110,1
Mittelwert	101,6	109,0	97,0	108,5	103,7
SD	11,92	7,50	5,35	7,46	4,16
Standardfehler	2,25	1,42	1,01	1,41	0,79

Tabelle 11: Deskriptive Statistik der maximalen Laufleistung der Wildtypversuchsgruppen.
Die Parameter der absoluten Laufleistung bezogen auf den gesamten Untersuchungszeitraum sind in Sekunden angegeben. SD = Standardabweichung.

In allen Versuchsgruppen waren die maximalen Laufleistungen im Zeitverlauf konstant, insbesondere fand sich in keiner Versuchsgruppe eine altersabhängige Verschlechterung der motorischen Leistung (Abbildung 8). Im Vergleich zur mittleren Laufleistung aller Wildtypversuchstiere zeigte die Wildtyp-Referenzgruppe keine signifikant abweichenden Laufleistungen im Versuchsverlauf. Die Eisen-, Aluminium- und Gadoliniumgruppen wichen im Zeitverlauf zwar signifikant von der mittleren Laufleistung aller Wildtypversuchstiere ab, zeigten jedoch gruppenintern einen konstanten Verlauf der motorischen Leistung (Abbildung 8).

Im Vergleich zur Referenzgruppe zeigten die Eisengruppe und die Gadoliniumgruppe signifikant abweichende Laufleistungen; die Laufleistung der Aluminiumgruppe wich nicht signifikant im Vergleich zur Referenzgruppe ab.

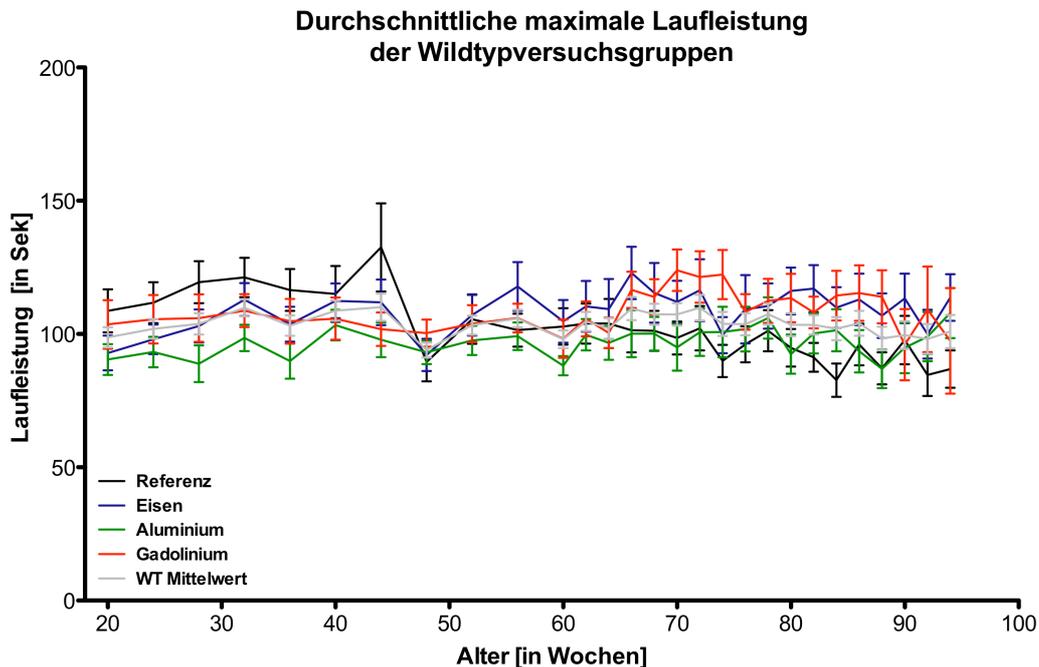


Abbildung 8: Graphische Darstellung der durchschnittlichen Laufleistung der Wildtypversuchsgruppen im zeitlichen Verlauf.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Laufleistungen pro Versuchsgruppe in Sekunden und der dazugehörige Standardfehler in Sekunden. Die durchschnittliche Laufleistung der Wildtypversuchstiere (WT Mittelwert) errechnet sich aus dem Mittelwert der Laufleistungen aller Wildtypversuchstiere.

Für die Definition des krankheitsfreien Überlebens wurde, wie in 2.6.4 beschrieben, die normierte Laufleistung der Wildtypversuchstiere herangezogen. Hierzu wurde der Mittelwert der normierten Laufleistung aller Wildtypversuchstiere im Zeitraum von 24 bis 40 Wochen berechnet und per Definition auf 100 % gesetzt. Sofern die normierte Laufleistung der transgenen Versuchstiere innerhalb von drei Standardabweichungen ($SD=13,67\%$) von diesem Mittelwert und somit oberhalb von 59 % lag, wurde die Laufleistung als krankheitsfrei bewertet.

3.4.2. Laufleistung der transgenen Versuchstiere

3.4.2.1. Laufleistung der einzelnen transgenen Versuchstiere

Die Mittelwerte der absoluten und normierten Laufleistungen der einzelnen transgenen Versuchstiere aus den vier Versuchsgruppen wurden errechnet und dargestellt (Abbildung 9). Im Anschluss wurde der Mittelwert der Laufleistung der jeweiligen Versuchsgruppe errechnet.

Die graphischen Darstellungen der normierten Laufleistungen in Abbildung 9 E-H zeigen die konstanten Laufleistungen bis zur 50. Lebenswoche. Durch den Vergleich

ERGEBNISSE

der Laufleistungen der einzelnen Versuchstiere mit dem Mittelwert der jeweiligen Versuchsgruppe wurde deutlich, dass es ab der 50. Lebenswoche bei allen transgenen Versuchstieren zu deutlichen intraindividuellen und interindividuellen Fluktuationen der motorischen Leistungsfähigkeit kam.

ERGEBNISSE

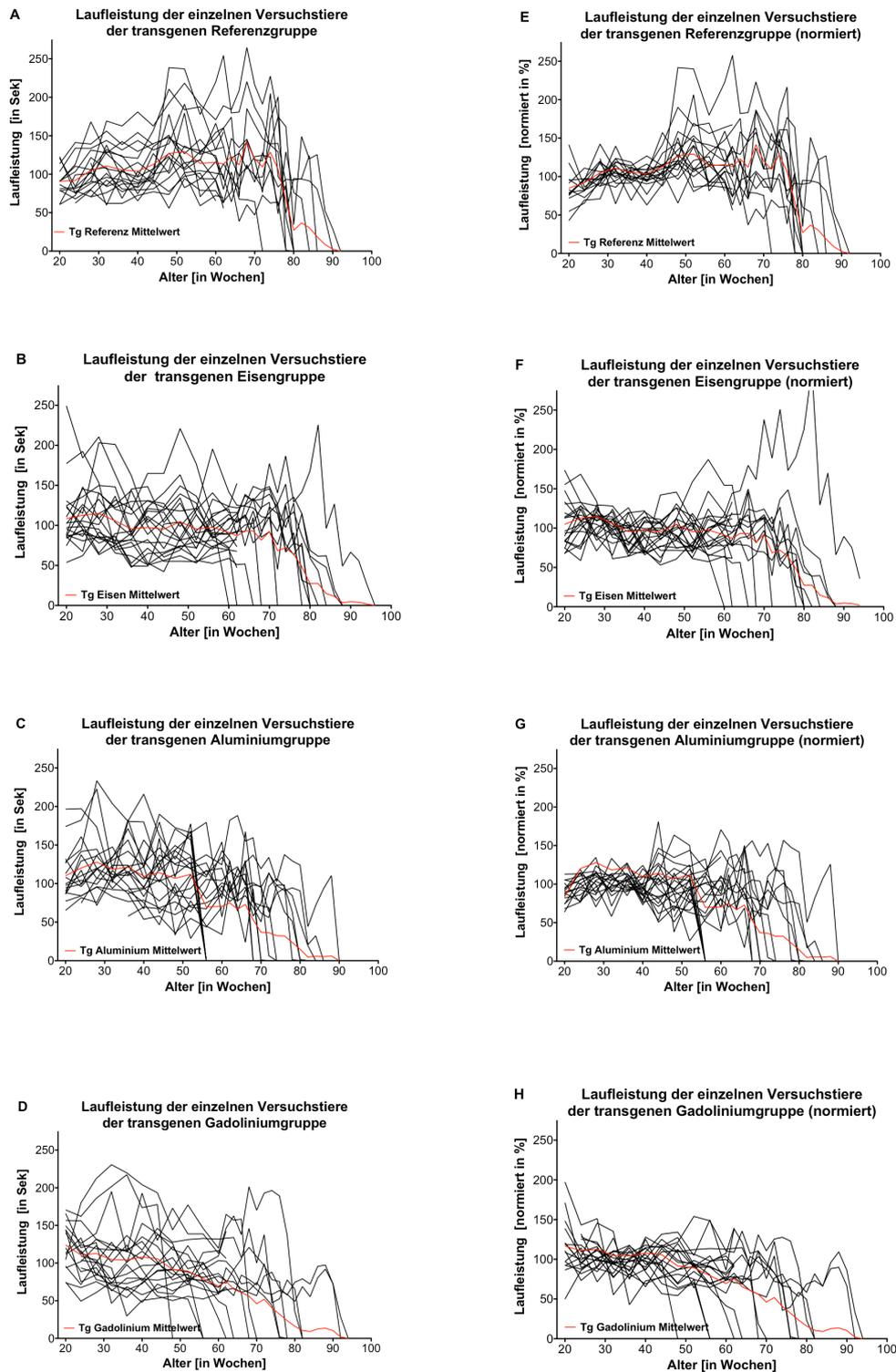


Abbildung 9: Graphische Darstellung der Laufleistungen der einzelnen Versuchstiere aus den verschiedenen transgenen Versuchsgruppen.

Abbildungen A-D stellen die absoluten Laufleistungen im Verlauf in Sekunden dar. Die Abbildungen E-H stellen die normierten Laufleistungen in Prozent dar. In Rot wurde der Mittelwert der Laufleistung für die jeweilige Versuchsgruppe gekennzeichnet.

3.4.2.2. Vergleich der Laufleistung der transgenen Versuchstiere mit der Laufleistung der Wildtypversuchstiere

Bis zu einem Lebensalter von 44 Lebenswochen zeigten alle transgenen Versuchstiere im Vergleich zu den Wildtypversuchstieren ähnliche Laufleistungen. Bei allen transgenen Versuchstieren kam es dann im Verlauf zu einer altersabhängigen Verminderung der Laufleistung, deren Beginn zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen stark variierte (Abbildung 10). Die transgene Referenzgruppe zeigte ab der 78. Lebenswoche eine signifikant verminderte Laufleistung. Die motorische Leistungsfähigkeit der transgenen Eisengruppe war ab der 76. Lebenswoche signifikant vermindert. In der transgenen Aluminium- und der transgenen Gadoliniumgruppe kam es ab einem Alter von 56 beziehungsweise 48 Lebenswochen zu einer signifikant verminderten Laufleistungen im Vergleich zu den Wildtypversuchstieren.

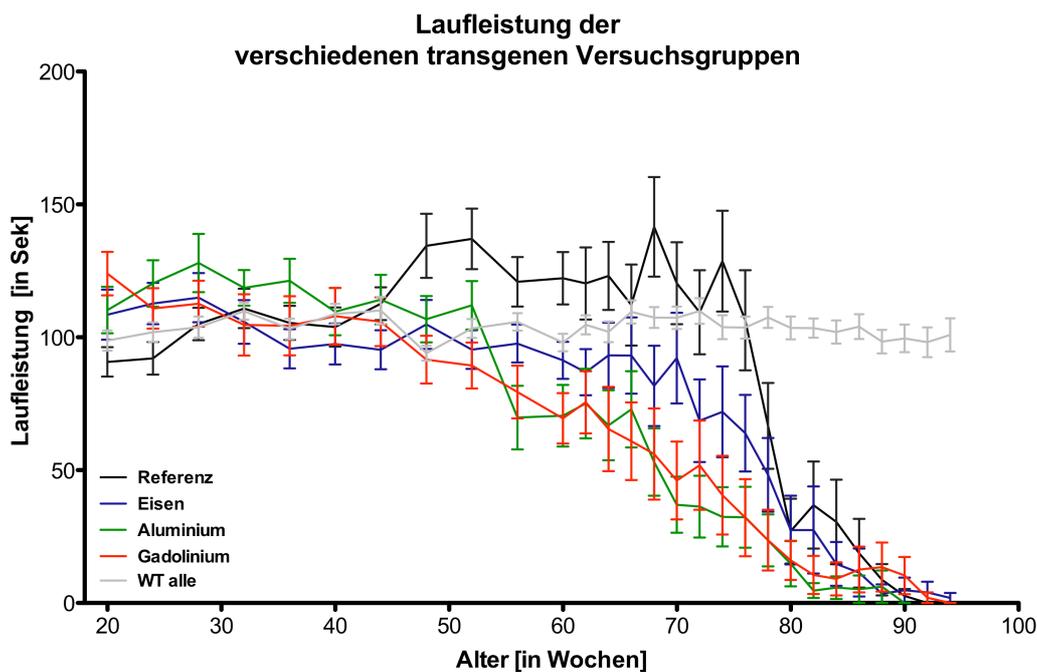


Abbildung 10: Graphische Darstellung der absoluten Laufleistung der transgenen Versuchsgruppen und der gesamten Wildtypversuchsgruppe (WT Mittelwert) im zeitlichen Verlauf.

Dargestellt sind die durchschnittlichen Laufleistungen zum jeweiligen Messzeitpunkt und der dazugehörige Standardfehler in Sekunden.

3.4.2.3. Laufleistung der transgenen Referenzgruppe

Eine graphische Übersicht der Laufleistung der Referenzgruppe ist in Abbildung 11 dargestellt. Bis zu einem Alter von 76 Lebenswochen zeigte die Referenzgruppe eine

ERGEBNISSE

konstante motorische Leistungsfähigkeit mit einer durchschnittlichen Laufleistung von 117,6 Sekunden. Im Zeitraum von 48 bis 76 Lebenswochen zeigte sie eine bessere Laufleistung als die Wildtyp-Referenzgruppe und wich im Alter von 48 und 52 Lebenswochen signifikant von dieser ab. Ab einem Alter von 78 Lebenswochen kam es zu einem steilen Abfall der Laufleistung, die im Vergleich zur Laufleistung der Wildtypversuchstiere signifikant vermindert war.

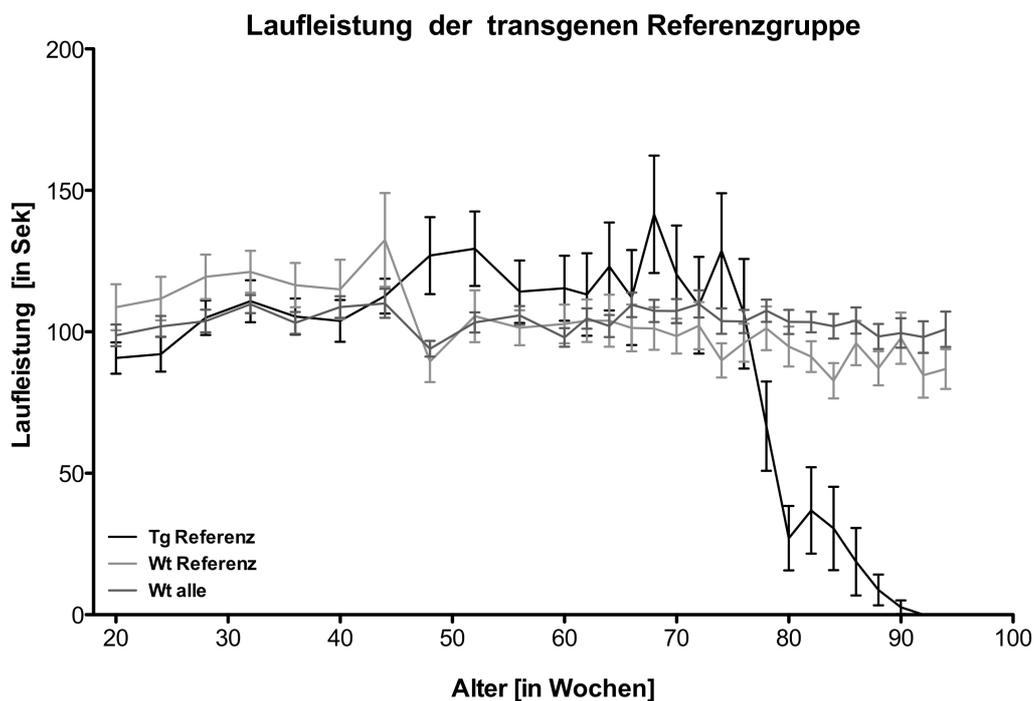


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Laufleistung der transgenen Referenzgruppe, der Wildtyp-Referenzgruppe und der gesamten Wildtypversuchsgruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte und der dazugehörige Standardfehler der maximalen Laufleistung der verschiedenen Versuchsgruppen zum jeweiligen Messzeitpunkt in Sekunden.

3.4.2.4. Laufleistung der transgenen Eisengruppe

Die motorische Leistungsfähigkeit der transgenen Eisengruppe ist in Abbildung 12 dargestellt. Die transgene Eisengruppe zeigte ab Versuchsbeginn bis zu einem Lebensalter von 74 Wochen durchgehend konstante Laufleistungen mit einem Mittelwert von 106,0 Sekunden. Die Laufleistung war im Vergleich zur Wildtyp-Eisengruppe und gesamten Wildtypversuchsgruppe etwas niedriger, es zeigten sich jedoch keine signifikanten Abweichungen. Bei der transgenen Eisengruppe kam es

ERGEBNISSE

ab einem Lebensalter von 76 Wochen zu einem deutlichen Leistungsabfall, der signifikant unterhalb der Laufleistung der Wildtypversuchsgruppe lag (Abbildung 12). Der zeitliche Verlauf der Laufleistung der transgenen Eisengruppe ähnelte dem Verlaufsmuster der Laufleistung der transgenen Referenzgruppe: in beiden Gruppen kam es zu einer langen konstanten Laufleistung und dann zu einem altersabhängigen Leistungsabfall. Nur zu zwei Messzeitpunkten, jeweils im Alter von 52 beziehungsweise 60 Lebenswochen, wichen die Laufleistungen dieser beiden Versuchsgruppen signifikant voneinander ab. Der motorische Leistungsabfall trat im Vergleich zur Wildtypversuchsgruppe in der transgenen Eisengruppe zwei Wochen vor der transgenen Referenzgruppe ein.

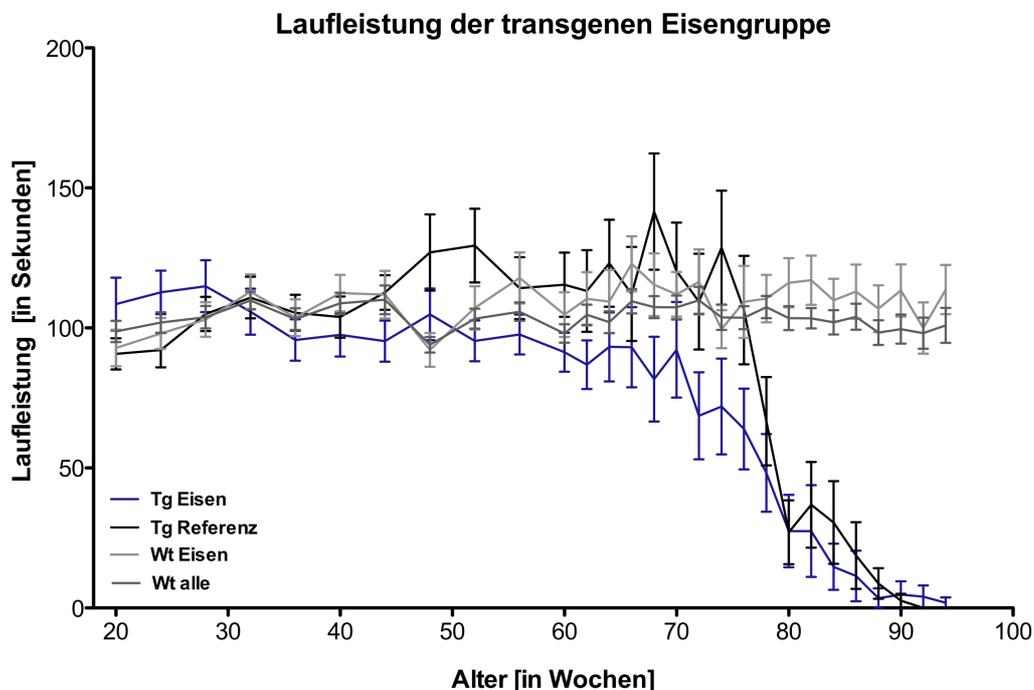


Abbildung 12: Graphische Darstellung der Laufleistung der transgenen Eisengruppe, der Wildtyp-Eisengruppe und der gesamten Wildtypversuchsgruppe.

Dargestellt sind die Mittelwerte und der dazugehörige Standardfehler der maximalen Laufleistung der Versuchsgruppen zum jeweiligen Messzeitpunkt in Sekunden.

3.4.2.5. Laufleistung der transgenen Aluminiumgruppe

Der zeitliche Verlauf der Laufleistung der transgenen Aluminiumgruppe ist in Abbildung 13 graphisch dargestellt. Die Laufleistung der transgenen Aluminiumgruppe zeigte bis zu einem Alter von 52 Lebenswochen einen konstanten Verlauf und betrug durchschnittlich 115,7 Sekunden. Sie lag durchgehend oberhalb der Laufleistung der Wildtyp-Aluminiumgruppe und der gesamten

ERGEBNISSE

Wildtypversuchsgruppe. Ab einem Lebensalter von 56 Wochen kam es zu einem Abfall der motorischen Leistungsfähigkeit. Im Vergleich zur gesamten Wildtypversuchsgruppe wichen die Laufleistungen der transgenen Aluminiumgruppe zunächst vereinzelt zum Zeitpunkt 56 und 64 Lebenswochen signifikant ab. Ab einem Alter von 68 Lebenswochen waren die Laufleistungen durchgehend signifikant schlechter als die Laufleistungen der gesamten Wildtypversuchsgruppe.

Im Vergleich zur Laufleistung der transgenen Referenzgruppe zeigte sich ein ähnliches zeitliches Muster: die Laufleistungen der transgenen Aluminiumgruppe wichen zunächst punktuell zu den Messzeitpunkten 56 und 60 Lebenswochen ab. Von der 68. Bis zur 78. Lebenswoche kam es zu einer durchgehenden signifikanten Verminderung der Laufleistung im direkten Vergleich zur transgenen Referenzgruppe. Ab einem Alter von 78 Lebenswochen wichen die Laufleistungen beider transgener Versuchsgruppen nicht mehr signifikant voneinander ab.

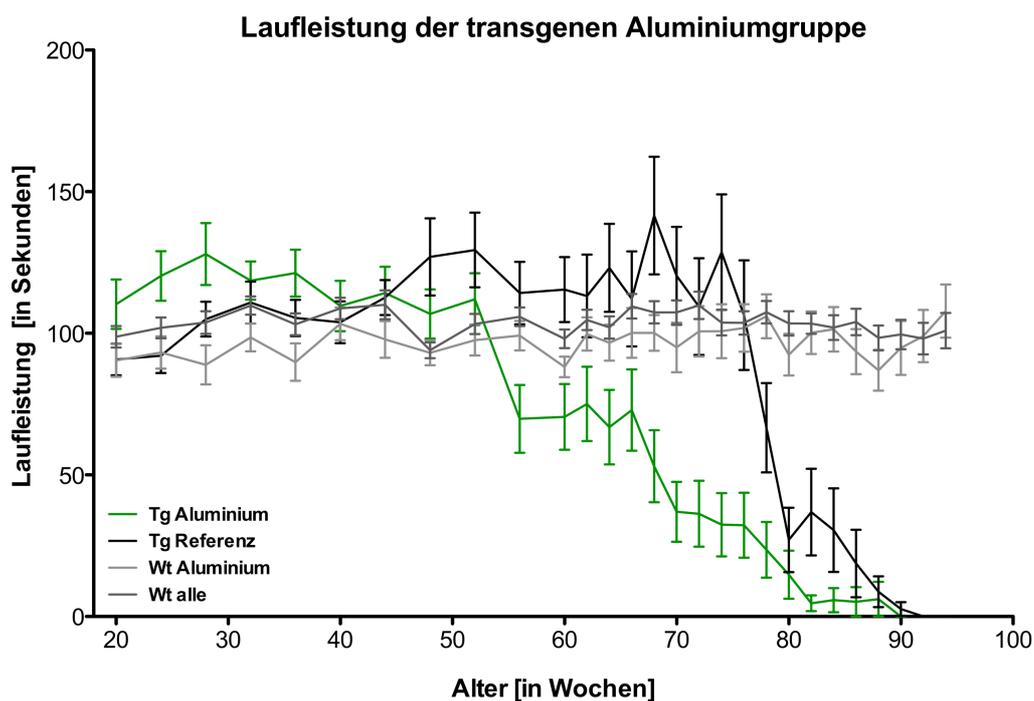


Abbildung 13: Graphische Darstellung der Laufleistung der transgenen Aluminiumgruppe, der transgenen Referenzgruppe, der Wildtyp-Aluminiumgruppe und der gesamten Wildtypversuchsgruppe.

Dargestellt sind die Mittelwerte und der dazugehörige Standardfehler der maximalen Laufleistung der Versuchsgruppen zum jeweiligen Messzeitpunkt in Sekunden.

3.4.2.6. Laufleistung der transgenen Gadoliniumgruppe

Die motorische Leistungsfähigkeit der transgenen Gadoliniumgruppe ist in Abbildung 14 graphisch dargestellt. Die Laufleistung der transgenen Gadoliniumgruppe war ab Versuchsbeginn bis zu einem Alter von 48 Lebenswochen konstant. Sie betrug in diesem Zeitraum durchschnittlich 108,4 Sekunden und lag im Bereich der Laufleistungen sowohl der Wildtyp-Gadoliniumgruppe als auch der gesamten Wildtypversuchsgruppe. Ab der 52. Lebenswoche war die motorische Leistungsfähigkeit der transgenen Gadoliniumgruppe durchgehend bis zum Versuchsende im Vergleich zur Laufleistung der gesamten Wildtypversuchsgruppe signifikant vermindert.

Im direkten Vergleich zur transgenen Referenzgruppe war die Laufleistung der transgenen Gadoliniumgruppe durchgehend im Alter von 48 bis 60 Lebenswochen, sowie punktuell im Alter von 64 Lebenswochen und wieder durchgehend von der 68. bis zur 78. Lebenswoche signifikant vermindert. Ab der 80. Lebenswoche wichen die Laufleistungen beider Versuchsgruppen bis zum Versuchsende nicht mehr signifikant voneinander ab (Abbildung 14).

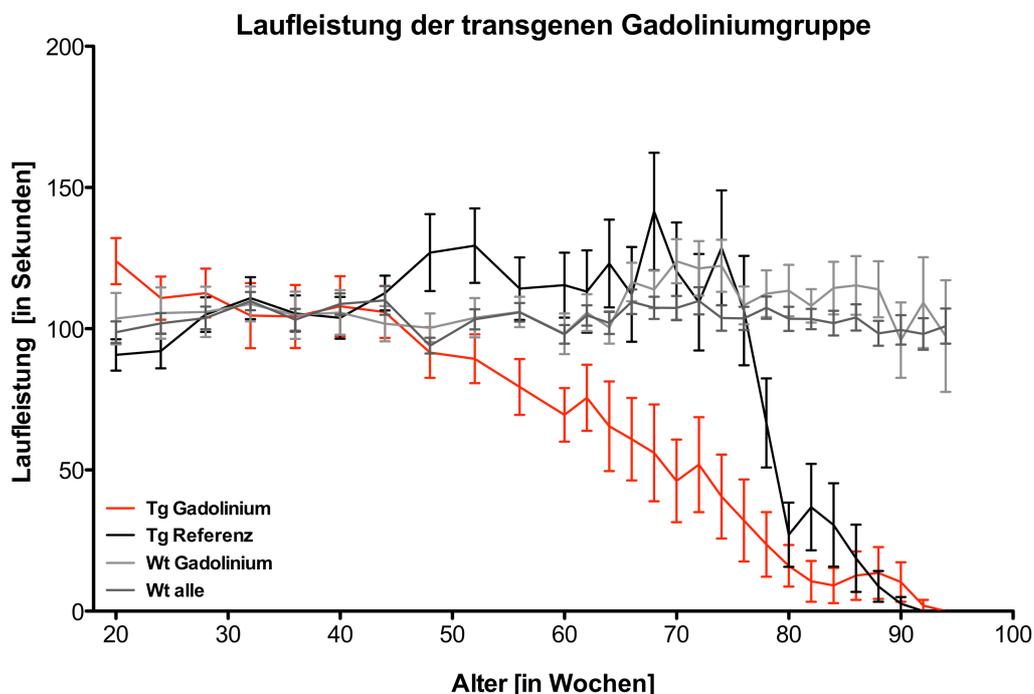


Abbildung 14: Graphische Darstellung der Laufleistung der transgenen Gadoliniumgruppe, der Wildtyp-Gadoliniumgruppe und der gesamten Wildtypversuchsgruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte und der dazugehörige Standardfehler der maximalen Laufleistung der verschiedenen Versuchsgruppen zum jeweiligen Messzeitpunkt in Sekunden.

3.5. Gewichtsentwicklung

Das Körpergewicht der Versuchstiere wurde wie in 2.2.5.2 beschrieben in regelmäßigen Abständen erhoben und analysiert. Wie in 2.6.2 beschrieben wurde für die Gegenüberstellung der einzelnen Versuchsgruppen das normierte Gewicht herangezogen. Es diente als klinischer Parameter zur Erfassung von möglichen Deprivations- oder Toxizitätseffekten durch das mit Metallionen versetzte Spezialfutter. Weiterhin markierte die Verminderung des Körpergewichtes den Entwicklungsbeginn des klinischen Phänotyps (vgl. 1.5).

3.5.1. Gewichtsentwicklung der Wildtypversuchstiere

3.5.1.1. Gewichtsentwicklung der einzelnen Wildtypversuchstiere

In Abbildung 15 ist die zeitliche Entwicklung des normierten Gewichtes der einzelnen Wildtypversuchstiere aus den vier Versuchsgruppen graphisch dargestellt und der Mittelwert des Gewichtes der jeweiligen Versuchsgruppe aufgetragen. Bei allen Wildtypversuchstieren kam es im zeitlichen Verlauf zu einer Gewichtszunahme. Bis zu einem Lebensalter von 50 Wochen lagen die Gewichte bis auf einige Ausreißer in der Aluminiumgruppe sehr nah am Mittelwert der jeweiligen Versuchsgruppe. Im Anschluss kam es zu interindividuellen Gewichtsunterschieden in allen Versuchsgruppen, die mit dem Alter an Spannbreite zunahmen.

Die Gewichtsentwicklung der einzelnen Wildtypversuchstiere aus der Referenz- und Eisengruppe zeigten keine erheblichen intra- und interindividuellen Schwankungen und es kam zu keinen signifikanten Abweichungen vom Mittelwert der jeweiligen Versuchsgruppe. Bei den Wildtypversuchstieren aus der Aluminium- und Gadoliniumgruppe kam es im zeitlichen Verlauf zu Fluktuationen des Körpergewichtes, ein signifikanter Abfall des Körpergewichtes trat nicht auf. Das Gewicht der zwei Versuchstiere aus der Wildtyp-Aluminiumgruppe, das in etwa ab der 70. Lebenswoche abfiel, ging nicht mit einem Abfall der Laufleistung in der RotaRod-Messung einher. In der Wildtyp-Gadoliniumgruppe kam es vor Versuchsende zu zwei Todesfällen durch Altersschwäche, weshalb das Gewicht dieser beiden Versuchstiere wie in 2.6.2 definiert auf 0 % gesetzt wurde.

ERGEBNISSE

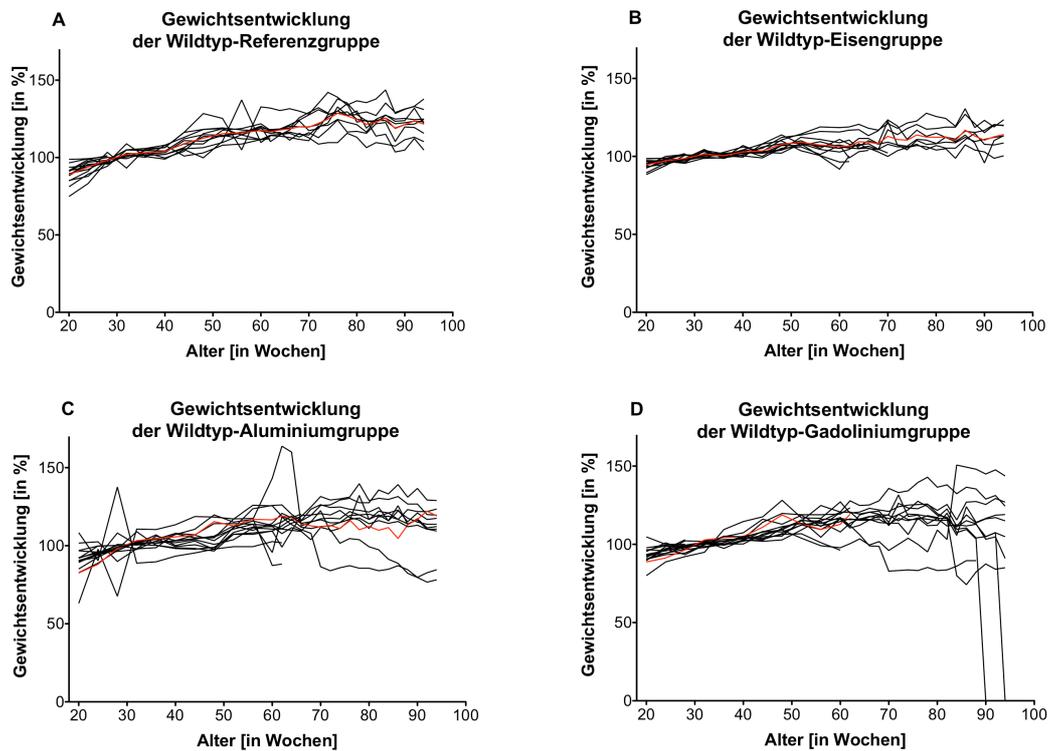


Abbildung 15: Graphische Darstellung der Entwicklung des normierten Gewichtes der einzelnen Wildtypversuchstiere pro Versuchsgruppe.

In Rot ist der Mittelwert der jeweiligen Wildtypversuchsgruppe dargestellt. Die Gewichtsangaben sind in Prozent des Referenzgewichtes. Als Referenzgewicht diente der Mittelwert der Gewichtsmessungen im Zeitraum von 24 bis 40 Lebenswochen der einzelnen Versuchsgruppen.

3.5.1.2. Vergleich der Gewichtsentwicklung zwischen den Wildtypversuchsgruppen

Der Mittelwert des normierten Gewichtes aller Wildtypversuchstiere betrug 110,9 % im zeitlichen Verlauf. Das mittlere Gewicht aller Wildtypversuchstiere stieg von einem Ausgangswert von 91,7 % im Alter von 20 Lebenswochen auf ein maximales Gewicht von 113,2 % im Alter von 60 Lebenswochen an. Dann zeigte der Mittelwert des Gewichtes einen konstanten Verlauf. Das durchschnittliche Gewicht aller Wildtypversuchstiere lag ab der 32. Lebenswoche oberhalb des in 2.6.2 definierten Referenzgewichtes.

Die Referenz-Wildtypversuchsgruppe zeigte mit 115,6 % das höchste mittlere Gewicht aller Versuchsgruppen. Der niedrigste Mittelwert des normierten Gewichtes war mit 108,0 % des Referenzgewichtes in der Wildtyp-Eisengruppe zu finden. Das mittlere normierte Gewicht der Wildtyp-Gadoliniumgruppe war mit 109,4 % nur unwesentlich höher. In der Wildtyp-Aluminiumgruppe betrug der Mittelwert für das

ERGEBNISSE

normierte Gewicht 110,3 %. Im Vergleich zum mittleren normierten Gewicht aller Wildtypversuchstiere wichen die Wildtyp-Referenzgruppe und Wildtyp-Eisengruppe im zeitlichen Verlauf signifikant ab. Die Wildtyp-Aluminiumgruppe und Wildtyp-Gadoliniumgruppe zeigten im Vergleich zum Gewichtsverlauf aller Wildtypversuchstiere keine signifikanten Abweichungen (Abbildung 16).

Versuchsgruppe	Referenz	Eisen	Aluminium	Gadolinium	Mittelwert
Minimum	88,9	94,6	90,3	91,0	91,7
Median	118,6	109,3	113,4	113,0	113,2
Maximum	128,5	116,9	118,9	116,9	119,7
Mittelwert	115,6	108,0	110,3	109,4	110,9
SD	10,35	5,57	7,35	7,87	7,38
Standardfehler	1,96	1,05	1,39	1,49	1,39

Tabelle 12: Deskriptive Statistik des normierten Gewichtes der Wildtypversuchstiere.

Die Gewichtsangaben sind in Prozent des Referenzgewichtes. Als Referenzgewicht diente der Mittelwert der Gewichte im Zeitraum von 24 bis 40 Lebenswochen der einzelnen Versuchsgruppen.

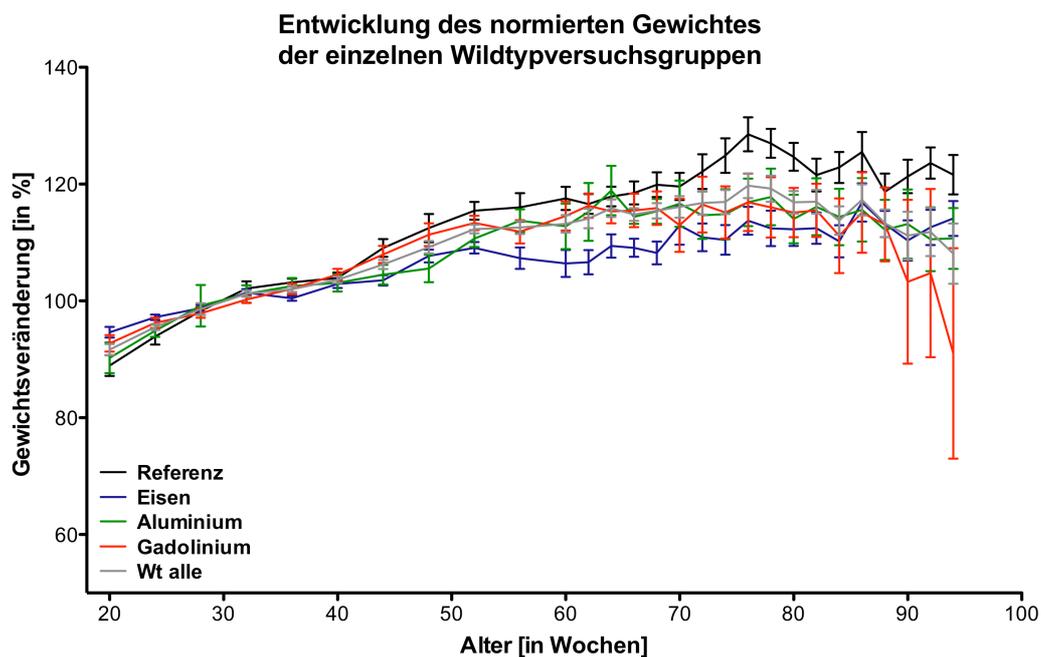


Abbildung 16: Graphische Darstellung der Entwicklung des normierten Gewichtes der einzelnen Versuchsgruppen in Zeitverlauf.

Als Referenzgewicht dient der Mittelwert der Gewichte im Zeitraum von 24 bis 40 Lebenswochen der einzelnen Versuchsgruppen.

3.5.2. Gewichtsentwicklung der transgenen Versuchstiere

Der Vergleich der Gewichtsentwicklung der transgenen Versuchstiere erfolgte wie in 2.6.2 beschrieben anhand des normierten Gewichtes. Hierzu wurde die gleiche Herangehensweise wie bei der Auswertung der motorischen Leitungsfähigkeit der transgenen Versuchstiere verwendet (vgl. 2.2.5.1): das Gewicht der Versuchstiere, die terminal erkrankt oder verstorben waren, wurde auf 0 gesetzt und in den weiteren Analysen berücksichtigt. Anders als beim Vergleich der motorischen Leistungsfähigkeit, bei dem die Laufzeit bei terminaler Erkrankung deutlich eingeschränkt ist, fällt der Gewichtsabfall bei terminaler Erkrankung in Relation zum Ausgangsgewicht nicht so ausgeprägt aus. Daher kommt es bei der Analyse der Gewichtsveränderungen mit zunehmendem Alter zu einer bimodalen Verteilung des Gewichtes (entweder die Versuchstiere wiegen noch fast ihr Ausgangsgewicht oder das Gewicht wird bei Ausschluss aus dem Versuch auf 0 gesetzt). Zur Visualisierung der Gewichtsentwicklung analog zur motorischen Leistung erfolgte dennoch die oben beschriebene Herangehensweise. Die Daten sind jedoch entsprechend nur bedingt aussagekräftig und entsprechend zurückhaltend zu interpretieren.

3.5.2.1. Gewichtsentwicklung der einzelnen transgenen Versuchstiere

Alle transgenen Versuchstiere zeigten bis zu einem Lebensalter von 50 Lebenswochen eine konstante und den Wildtypversuchstieren ähnliche Gewichtsentwicklung (Abbildung 17). Danach zeigten alle Versuchsgruppen ausgeprägte intra- und interindividuelle Gewichtsschwankungen, die sich jedoch zwischen den einzelnen Versuchsgruppen deutlich unterschieden. In der Referenzgruppe kam es ab einem Lebensalter von 70 Lebenswochen zu ausgeprägten Gewichtsschwankungen. In der Eisengruppe begannen die intra- und interindividuellen Gewichtsschwankungen mit 60 Lebenswochen deutlich früher. In der Aluminiumgruppe kamen die Gewichtsschwankungen ab der 50. Lebenswoche vor und hatten im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen die größte Spannbreite. Am frühesten begannen die Fluktuationen in der Gadoliniumgruppe, in der sie ab der 40. Lebenswoche auftraten.

ERGEBNISSE

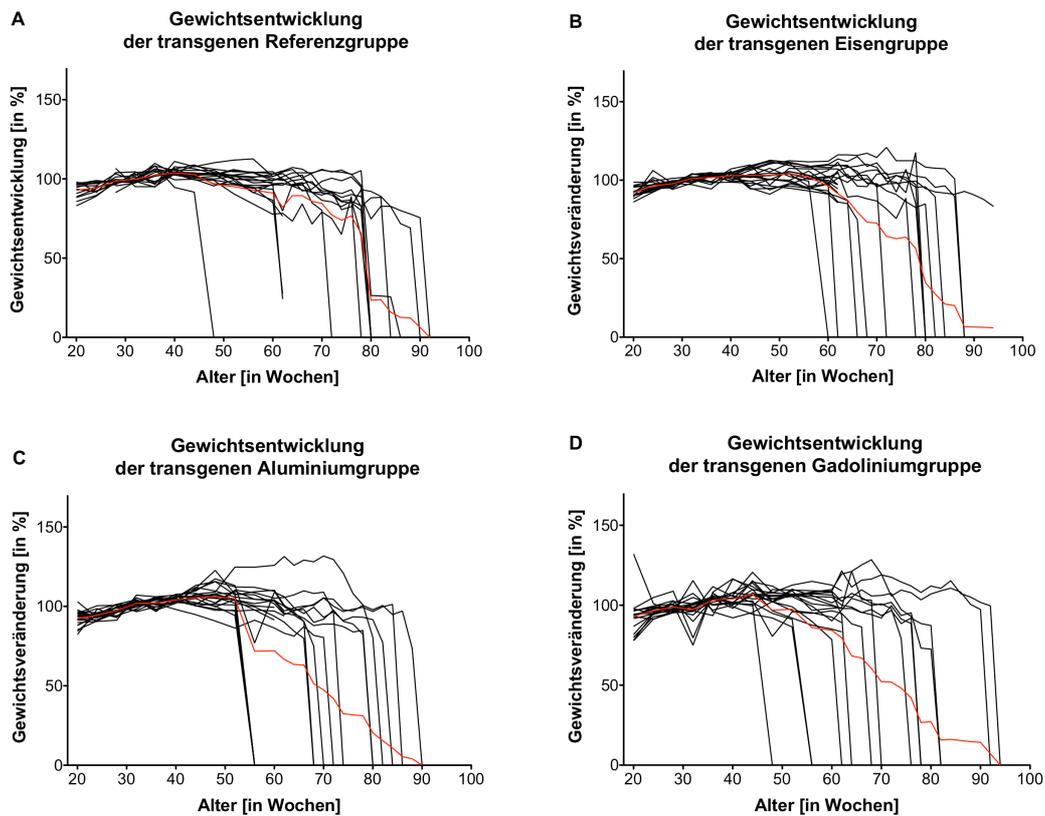


Abbildung 17: Graphische Darstellung der Entwicklung des normierten Gewichtes der einzelnen Versuchstiere aus den transgenen Versuchsgruppen. Die Gewichtsangaben sind in Prozent des Referenzgewichtes. Als Referenzgewicht diente der Mittelwert der Gewichte im Zeitraum von 24 bis 40 Lebenswochen.

3.5.2.2. Vergleich der Gewichtsentwicklung zwischen den transgenen Versuchsgruppen

Die Entwicklung des Körpergewichtes unterschied sich im Gegensatz zur Entwicklung der motorischen Leistungsfähigkeit nicht wesentlich zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (vgl. 3.4.2). In allen vier transgenen Versuchsgruppen kam es gemessen an den berechneten Mittelwerten des Gewichtes mit zunehmenden Alter zu einem Abfall des Körpergewichtes (Abbildung 18). Tendenziell zeigte sich in den Eisen-, Aluminium- und Gadoliniumgruppe ein früherer Abfall der berechneten Gewichtsmittelwerte.

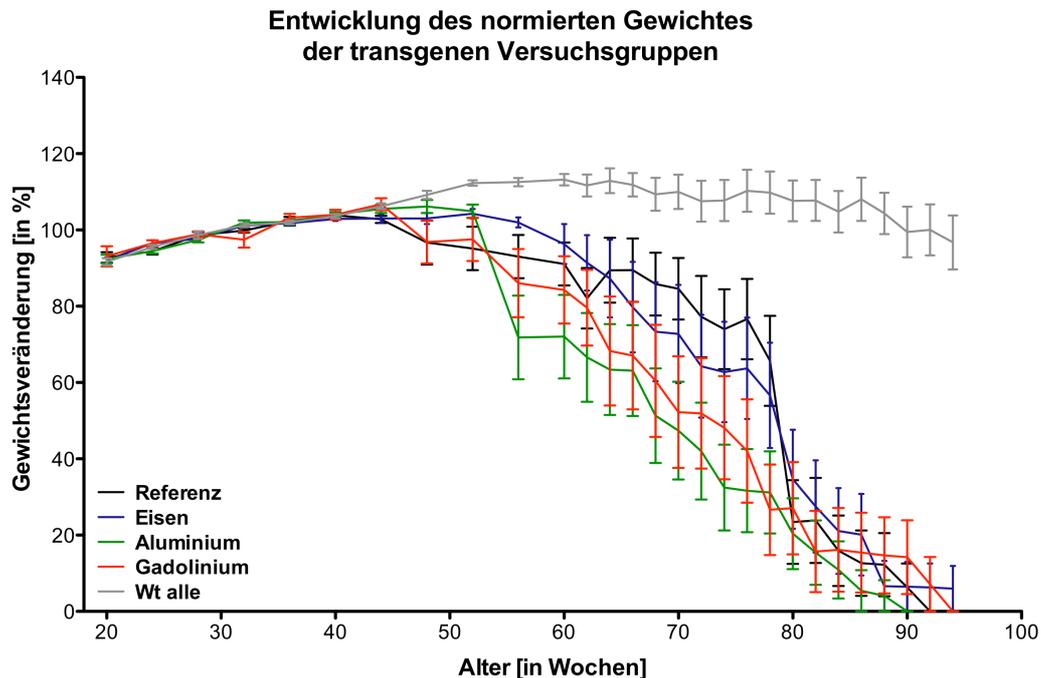


Abbildung 18: Graphische Darstellung der Entwicklung des normierten Gewichtes der transgenen Versuchsgruppen im Zeitverlauf.

Das normierte Gewicht ist in Prozent des errechneten Referenzgewichtes angegeben. Als Referenzgewicht dient der Mittelwert der Gewichte im Zeitraum von 24 bis 40 Lebenswochen.

3.5.2.3. Gewichtsentwicklung der transgenen Referenzgruppe

Bis zu einem Lebensalter von 40 Lebenswochen kam es zu einer konstanten Zunahme des gemäß 3.5.2 errechneten Mittelwertes des Gewichtes in der transgenen Referenzgruppe. Anschließend sank der errechnete Mittelwert der Gewichte der transgenen Referenzversuchstiere bis zur 78. Lebenswoche und war nicht von motorischen Leistungsabfällen begleitet (vgl. 3.4.2.1). Ab einem Alter von 78 Wochen ging der Abfall des errechneten mittleren Gewichts der transgenen Referenzgruppe mit einem Abfall der motorischen Leistungsfähigkeit in der RotaRod-Messung einher (vgl. 3.4.2.1).

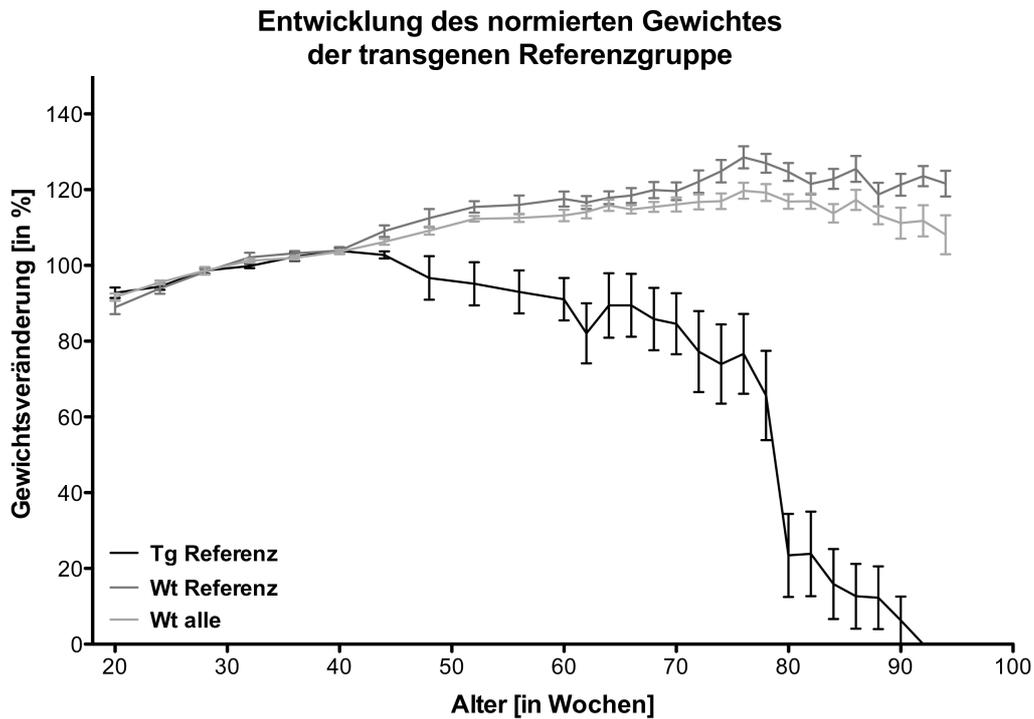


Abbildung 19: Graphische Darstellung der Entwicklung des normierten Gewichtes der transgenen Referenzgruppe.

Darstellung im Vergleich zur Wildtyp-Referenzgruppe und der durchschnittlichen Gewichtsentwicklung aller Wildtypversuchstiere. Angaben des normierten Gewichtes in Prozent des errechneten Referenzgewichtes.

3.5.2.4. Gewichtsentwicklung der transgenen Eisengruppe

Der gemäß 3.5.2 errechnete Mittelwert für das Gewicht stieg in der transgenen Eisengruppe bis zu einem Lebensalter von 52 Wochen kontinuierlich an. Ab der 48. Lebenswoche lag das mittlere Gewicht der transgenen Eisengruppe unterhalb der Gewichtsentwicklung der Wildtyp-Eisengruppe und der Wildtypversuchstiere. Im Zeitraum der 56. bis zur 78. Lebenswoche fiel der gemäß 3.5.2 errechnete Mittelwert des Gewichtes ab, was zeitlich mit motorischen Leistungseinbußen in der RotaRod-Messung einherging (vgl. 3.4.2.4).

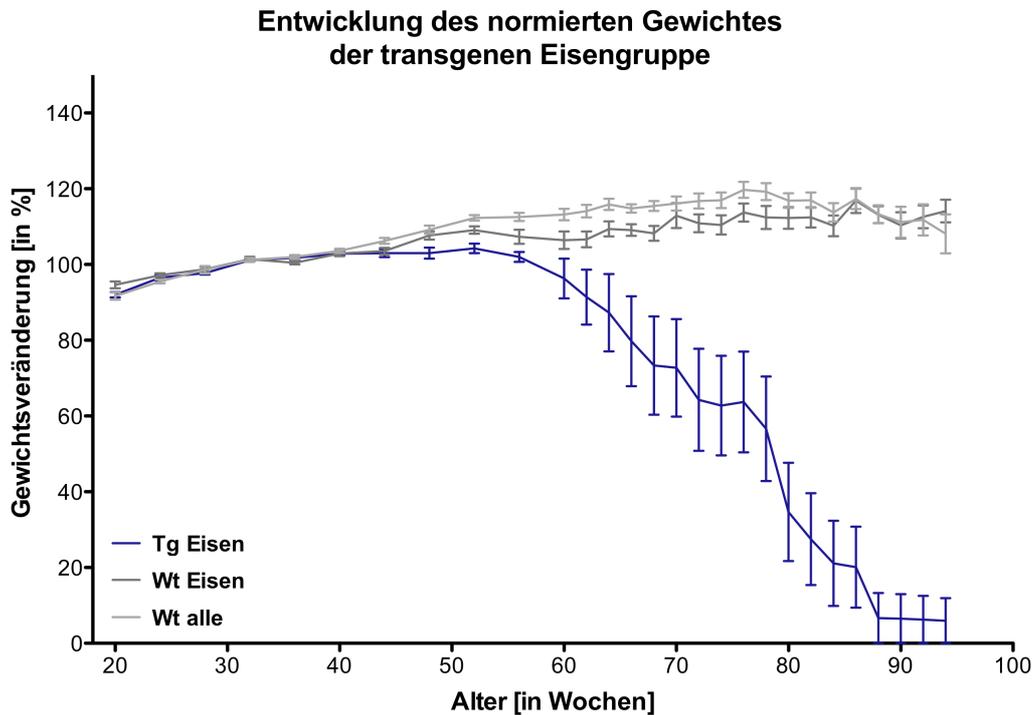


Abbildung 20: Graphische Darstellung der Entwicklung des normierten Gewichtes der transgenen Eisengruppe.

Darstellung im Vergleich zur Wildtyp-Eisengruppe und allen Wildtypversuchstieren. Angaben des normierten Gewichtes in Prozent des errechneten Referenzgewichtes.

3.5.2.5. Gewichtsentwicklung der transgenen Aluminiumgruppe

Der gemäß 3.5.2 errechnete Mittelwert des Gewichtes für die Versuchstiere aus der transgenen Aluminiumversuchsgruppe stieg bis zur 52. Lebenswoche konstant an. Ab der 52. Lebenswoche war der Mittelwert im Vergleich zur Wildtyp-Aluminiumgruppe und den Wildtypversuchstieren vermindert. Ab einem Lebensalter von 56 Wochen kam es zu einem deutlichen Abfall des errechneten Mittelwertes, der zeitlich mit der Verminderung der motorischen Leistungsfähigkeit einherging (3.4.2.5). Der steile Abfall des errechneten Mittelwertes für das Gewicht im Bereich von 52- 56 Lebenswochen ist dem Versterben von 6 Versuchstieren aus dieser Versuchsgruppe zuzuschreiben, die aufgrund terminaler Erkrankungserscheinungen aus dem Versuch entnommen wurden.

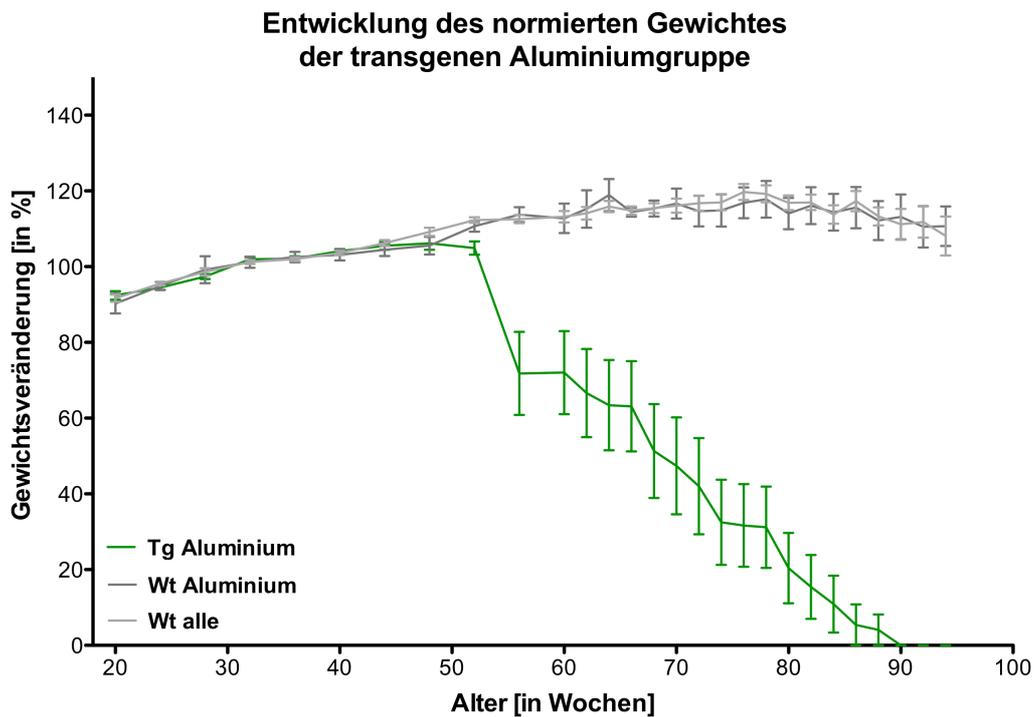


Abbildung 21: Graphische Darstellung der Entwicklung des normierten Gewichtes der transgenen Aluminiumgruppe.

Darstellung im Vergleich zur Wildtyp-Aluminiumgruppe und allen Wildtypversuchstieren. Angaben des normierten Gewichtes in Prozent des errechneten Referenzgewichtes.

3.5.2.6. Gewichtsentwicklung der transgenen Gadoliniumgruppe

Das gemäß 3.5.2 errechnete mittlere Gewicht der transgenen Gadoliniumgruppe stieg bis zur 44. Lebenswoche konstant und parallel zur Wildtyp-Gadoliniumgruppe und zu allen Wildtypversuchstieren an. Ab der 48. Lebenswoche war das mittlere Körpergewicht der transgenen Gadoliniumgruppe im Vergleich zur Wildtyp-Gadoliniumgruppe und allen Wildtypversuchstiere vermindert. Der Abfall des errechneten mittleren Gewichtes ging zeitlich mit einer Verschlechterung der motorischen Leistungsfähigkeit in dieser Versuchsgruppe einher (3.4.2.6).

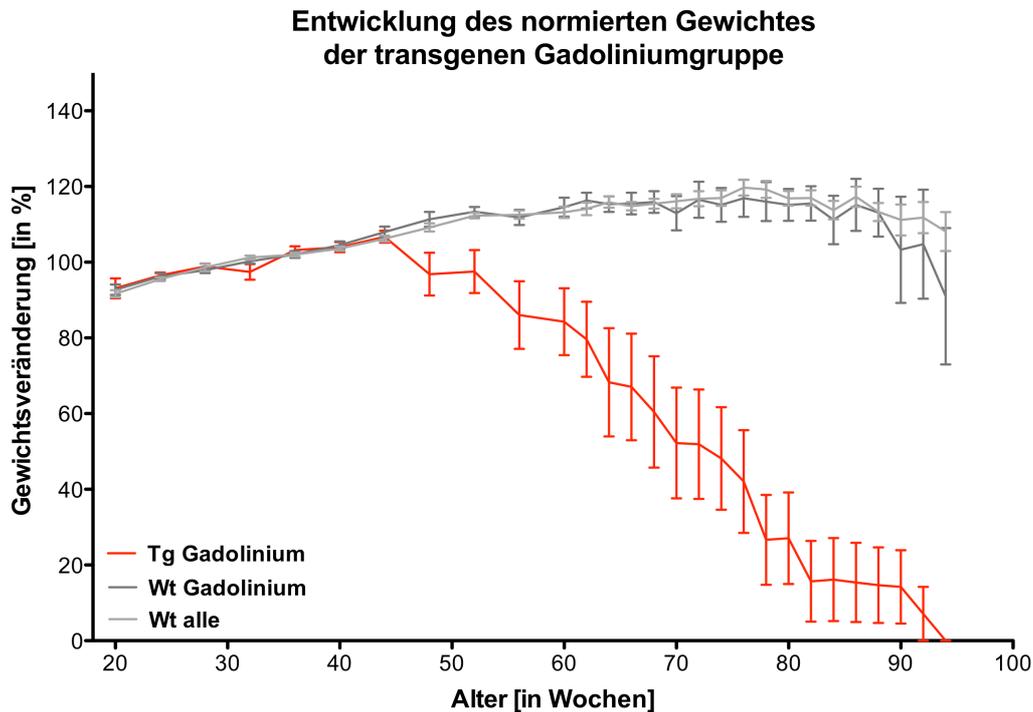


Abbildung 22: Graphische Darstellung der Entwicklung des normierten Gewichtes der transgenen Gadoliniumgruppe.

Darstellung im Vergleich zur Wildtyp-Gadoliniumgruppe und allen Wildtypversuchstieren. Das normierte Gewicht ist in Prozent des errechneten Referenzgewichtes angegeben.

3.6. Überleben

3.6.1. Überleben der Wildtypversuchstiere

Wie in 3.3 beschrieben wurden insgesamt 5 Wildtypversuchstiere vorzeitig aus dem Versuch entnommen. Zwei Versuchstiere verstarben vor Versuchsende eines natürlichen Todes. Alle anderen Wildtypversuchstiere überlebten bis einschließlich der 94. Lebenswoche und damit bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes. Sie wurden anschließend aus dem Versuch entnommen und durch cervicale Dislokation getötet.

3.6.2. Überleben der transgenen Versuchstiere

3.6.2.1. mittlere Überlebensdauer

Der Überlebenszeitraum der transgenen Versuchstiere wurde durch die in 2.2.5.1 definierten Kriterien bestimmt. Wie in 2.2.4 beschrieben wurden für die bessere Beurteilung des Überlebens der transgenen Versuchstiere die Überlebenszeiten der institutseigenen transgenen Zuchttiere dieses Mausmodells als zusätzliche Daten herangezogen.

ERGEBNISSE

Das durchschnittliche Überlebensalter war mit 564,9 Tagen in der transgenen Referenzgruppe am längsten. Das kürzeste durchschnittliche Überleben zeigte die transgene Aluminiumgruppe mit 485,4 Tagen. Die mittlere Überlebenszeit der transgenen Gadoliniumgruppe war mit 496,8 Tagen ebenfalls sehr niedrig. In der Eisengruppe betrug die durchschnittliche Überlebenszeit 532,9 Tage. Die transgenen Zuchttiere zeigten mit 554,2 Tagen eine längere durchschnittliche Überlebenszeit als die transgene Referenzgruppe (Tabelle 13 und Abbildung 23).

Versuchsgruppe	Referenz	Eisen	Aluminium	Gadolinium	Transgene Zuchttiere
Minimum	494,0	400,0	394,0	321,0	393,0
Median	557,5	549,0	485,0	507,0	555,5
Maximum	638,0	666,0	623,0	650,0	693,0
Mittelwert	564,9	532,9	485,4	496,8	554,2
SD	37,53	74,10	78,25	99,08	72,27
Standardfehler	11,87	19,80	18,44	26,48	20,86

Tabelle 13: Deskriptive Statistik des durchschnittlichen Überlebens der transgenen Versuchsgruppen und der transgenen Zuchttiere.
Alle Angaben in Tagen.

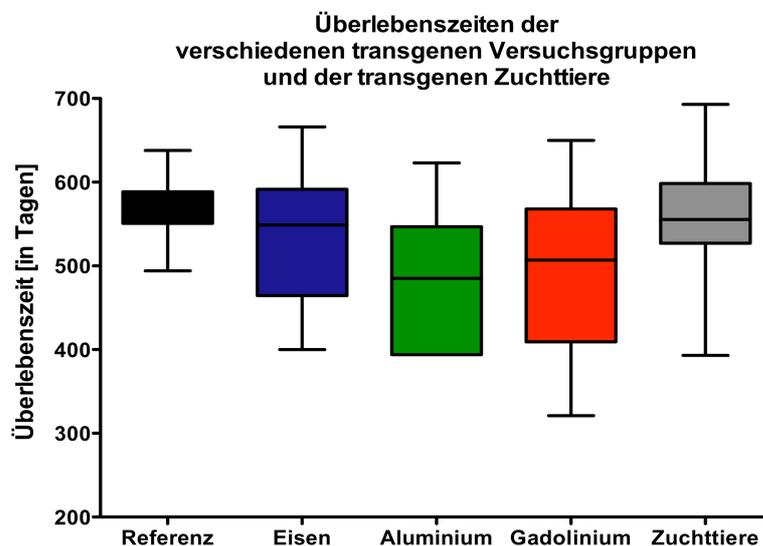


Abbildung 23: Box-Whisker-Plot der Überlebenszeiten der transgenen Versuchsgruppen und der transgenen Zuchttiere.

Innerhalb der Box liegen 50 % der Überlebenszeiten der jeweiligen Versuchsgruppen; die waagerechte Linie in der Box markiert den medianen Überlebenszeitraum der Versuchsgruppe. Die Whisker zeigen jeweils die minimale und die maximale Überlebenszeit innerhalb der Versuchsgruppe an. Das niedrigste mediane Überleben zeigte sich in der transgenen Aluminiumgruppe; die transgene Referenzgruppe überlebte durchschnittlich am längsten.

3.6.2.2. Kaplan-Meier-Analyse

Um Unterschiede zwischen den Überlebenszeiten der verschiedenen Versuchsgruppen zu überprüfen, wurde eine Kaplan-Meier-Analyse mit dazugehörigem Log-Rank-Test und Gehan-Beslow-Wilcoxon-Test auf Signifikanz durchgeführt. Die durchschnittliche Überlebenszeit der transgenen Eisengruppe war deutlich niedriger als in der Referenzgruppe, wich jedoch nicht signifikant von dieser ab. Beide Tests auf Signifikanz zeigten bei der Aluminiumgruppe im Vergleich mit der Referenzgruppe eine signifikant verminderte Überlebenszeit. Für die transgene Gadoliniumgruppe ergab der Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test eine signifikant verminderte Überlebenszeit, der Log-Rank-Test zeigte hingegen keine signifikante Abweichung (Abbildung 24).

Die durchschnittlichen Überlebenszeiten der vier transgenen Versuchsgruppen wichen in beiden Tests nicht signifikant von der Überlebenszeit der institutseigenen transgenen Zuchttiere aus diesem Mausmodell ab.

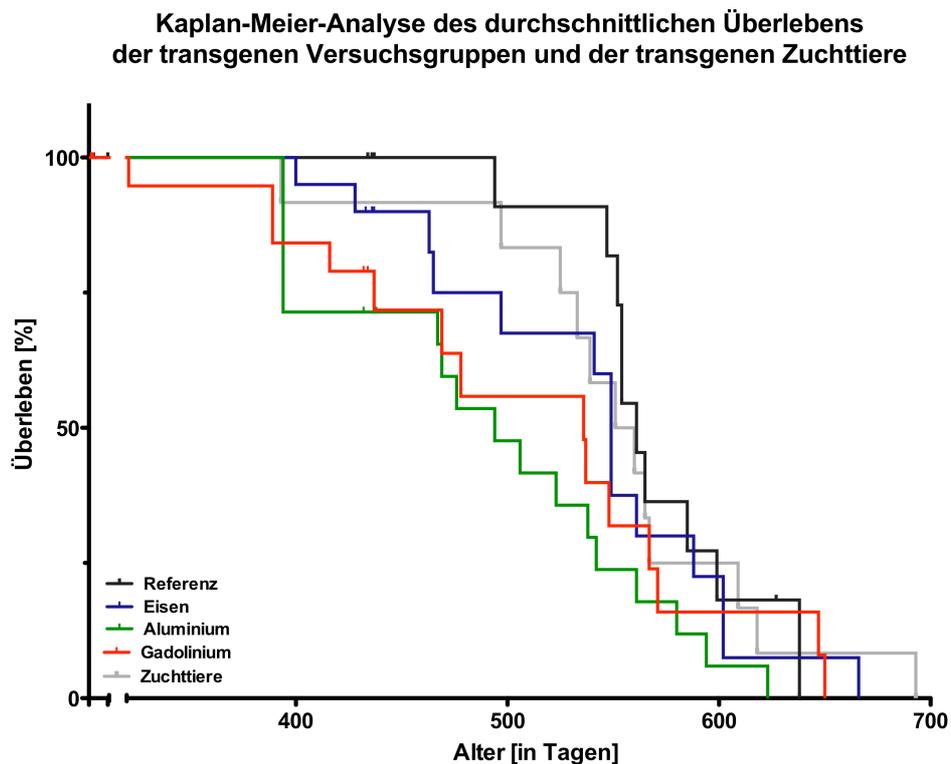


Abbildung 24: Kaplan-Meier-Analyse der Überlebenszeiten der transgenen Versuchstiere und der transgenen Zuchttiere.

Die Überlebenszeit ist in Tagen auf der X-Achse aufgetragen, der prozentuale Anteil, der die jeweiligen Überlebenszeiten erreicht hat, ist in Prozent auf der Y-Achse angegeben.

3.7. Krankheitsfreies Überleben

Das krankheitsfreie Überleben der transgenen Versuchstiere wurde in 2.6.4 definiert. Der Vergleich des krankheitsfreien Überlebens zwischen den einzelnen transgenen Versuchsgruppen ergab ein ähnliches Muster wie bei der Überlebensdauer (vgl. 3.6). Ab einem Lebensalter von 78 Wochen war ein nicht signifikanter Unterschied zwischen dem krankheitsfreien Überleben der transgenen Referenz- und der Eisengruppe erkennbar, der zeitlich mit einer deutlichen Abnahme der motorischen Leistungsfähigkeit bei der Eisengruppe einherging (vgl. 3.4.2). Sowohl die transgene Aluminiumgruppe als auch die transgene Gadoliniumgruppe zeigten im Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test im Vergleich zur transgenen Referenzgruppe ein signifikant vermindertes krankheitsfreies Überleben (Abbildung 25). Diese Beobachtung korrelierte zeitlich mit einer deutlichen Verschlechterung der Laufleistung in der RotaRod-Messung (3.4.2).

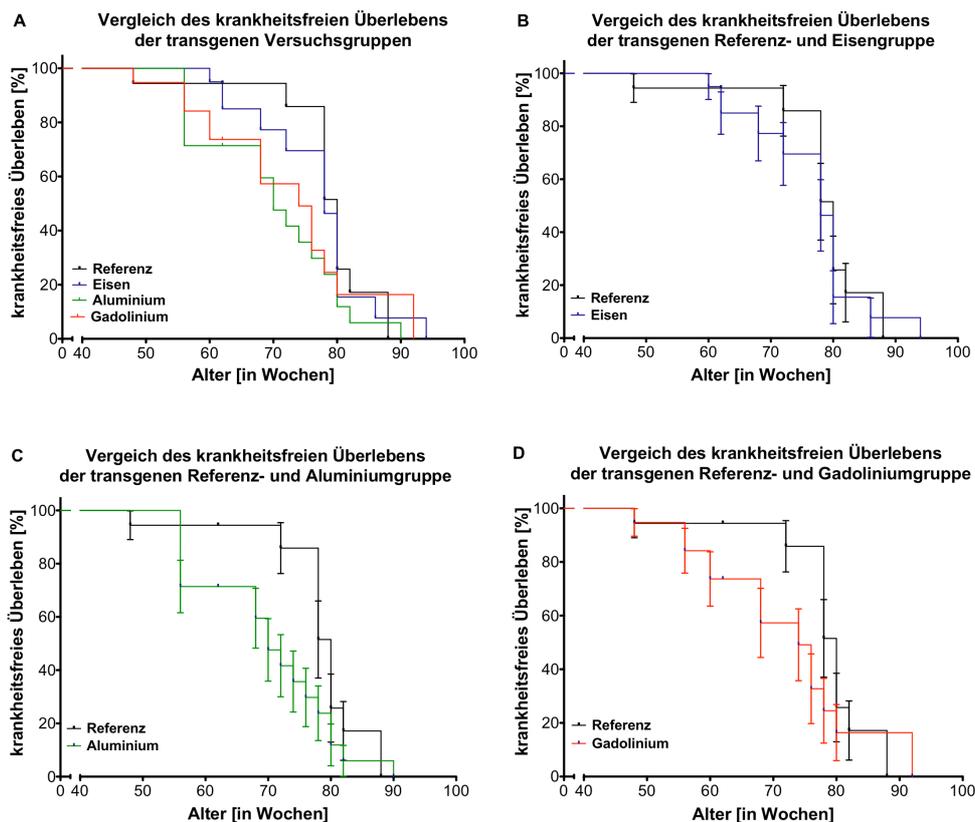


Abbildung 25: Graphische Darstellung des krankheitsfreien Überlebens der transgenen Versuchsgruppen.

Das krankheitsfreie Überleben ist in Wochen auf der X-Achse aufgetragen, der prozentuale Anteil, der die jeweiligen krankheitsfreien Überlebenszeiten erreicht hat, ist in Prozent auf der Y-Achse angegeben.

3.8. Neuropathologische Veränderungen im Hirnstamm und Cortex der transgenen Versuchstiere

3.8.1. Qualitative Auswertung der histopathologischen Untersuchungen im Hirnstamm und im Cortex der transgenen Versuchstiere

In den immunhistochemischen Untersuchungen von Gewebeproben aus dem Hirnstamm und Cortex der transgenen Versuchstiere konnten verschiedene morphologische Proteinase-resistente α -Synuclein-Ablagerungen detektiert werden. Zum Einen zeigten sich rundliche, glatt begrenzte, nahe dem Zellkern lokalisierte α -Synuclein-Einschlüsse (Abbildung 27 A). Ferner konnten zahlreiche α -Synuclein-Ablagerungen entlang der Neuriten beobachtet werden (Abbildung 27 B, Pfeil). Im Bereich der Neuriten kam es vereinzelt zu länglichen α -Synuclein-Ablagerungen, die unregelmäßig begrenzt und einen aufgedunsenen Aspekt vorwiesen und am ehesten dystrophen Neuriten entsprachen (Abbildung 27 B, Sternchen). Außerdem konnten punktförmige granuläre α -Synuclein-Ablagerungen festgestellt werden, die am ehesten α -Synuclein im Bereich der Synapsen darstellten (Abbildung 27 C). Teilweise waren die granulären α -Synuclein-Ablagerungen auch Perlschnur-artig angeordnet (Abbildung 27 D).

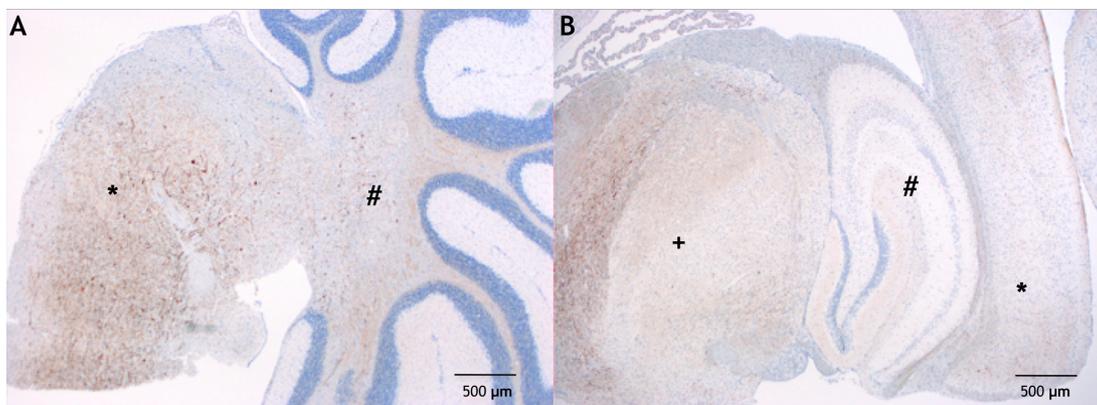


Abbildung 26: Exemplarische immunhistochemische Anfärbung des Hirnstammes (A) und Cortex (B) eines transgenen Versuchstieres.

Bei Abbildung A und B handelt es sich um eine immunhistochemische Anfärbung mit dem Antikörper 15G7, durch die α -Synuclein-Ablagerungen bräunlich markiert wird. Abbildung A zeigt einen Frontalschnitt des Hirnstammes (*) auf Höhe der Pedunculi cerebelli mit angrenzendem Kleinhirn (#). Eine Hälfte des Hirnstammes wurde vor der Asservierung in Formalin entfernt. Abbildung B zeigt einen Frontalschnitt durch das Großhirn auf Höhe des Ammonshorns (#). Rechts liegt der Cortex (*) an. Links liegt der Thalamus (+). Im Bereich des mit Sternchen (*) markierten Bereiches wurden die Aufnahmen zur qualitativen und quantitativen Auswertung der α -Synuclein-Ablagerungen im ZNS angefertigt.

ERGEBNISSE

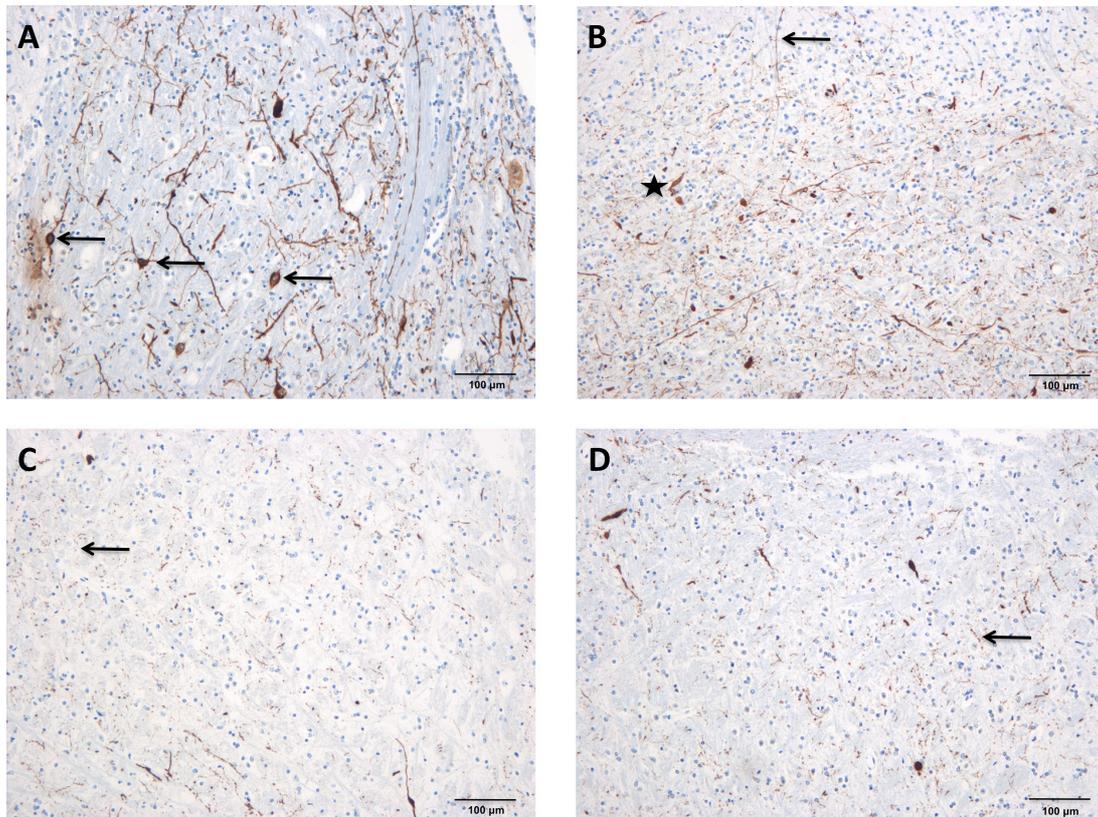


Abbildung 27: Darstellung der verschiedenen morphologischen α -Synuclein-Ablagerungen im Hirnstamm von transgenen Versuchstieren mittels immunhistochemischer Färbung mit dem Antikörper 15G7.

Zellkern-nahe α -Synuclein-Ablagerungen auf Bild A. Neuriten (Pfeil) und dystrophe Neuriten (Sternchen) auf Bild B. Granuläre α -Synuclein-Ablagerungen auf Bild C und Perlenschnur-artige Anordnung von α -Synuclein-Ablagerungen auf Bild D.

Beim Vergleich der Verteilung der verschiedenen morphologischen α -Synuclein-Ablagerungen im zentralen Nervensystem konnte ein Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen festgestellt werden. In der transgenen Eisen-, Aluminium- und Gadoliniumgruppe konnten tendenziell alle morphologischen α -Synuclein-Ablagerungen im Vergleich zur transgenen Referenzgruppe vermehrt beobachtet werden.

Insgesamt waren granuläre α -Synuclein-Ablagerungen am häufigsten zu beobachten, gefolgt von Neuriten, Zellkörper-nahen α -Synuclein-Ablagerungen und dystrophen Neuriten (Abbildung 28). Ein Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Morphologien der α -Synuclein-Ablagerungen und der motorischen Leistungsfähigkeit, dem Gewichtsverlust oder dem Todesalter der transgenen Versuchstiere konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden.

ERGEBNISSE

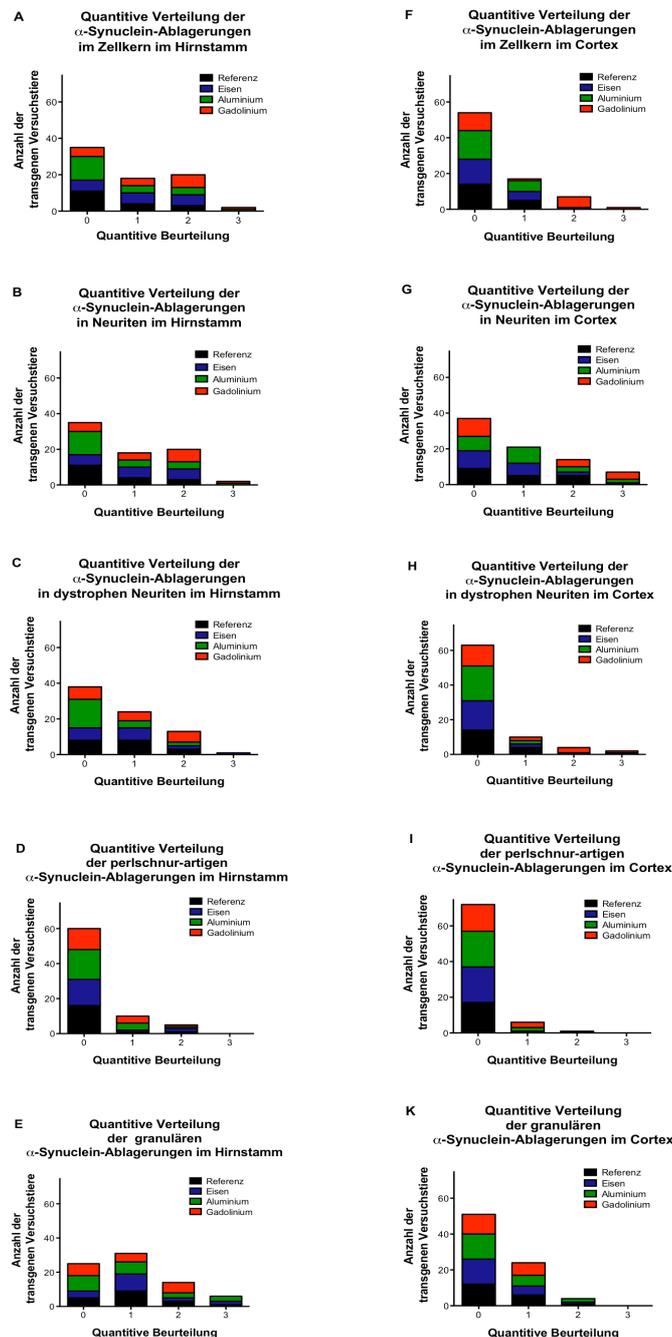


Abbildung 28: Graphische Darstellung der quantitativen Verteilung der verschiedenen morphologischen α -Synuclein-Ablagerungen im Hirnstamm und Cortex der transgenen Versuchstiere.

Auf der X-Achse ist die quantitative Beurteilung der Verteilung der morphologischen Ablagerungen wie in 2.5.3 definiert aufgeführt (Skala von 0-3), auf der Y-Achse die jeweilige Anzahl der transgenen Versuchstiere pro Versuchsgruppe aufgeführt, die diese Verteilung aufzeigen. Die verschiedenen morphologischen α -Synuclein-Ablagerungen im Hirnstamm sind in Abbildungen A-E dargestellt, Abbildungen F-K zeigen die graphische Darstellung der Verteilung im Cortex. Quantitativ sind am meisten granuläre α -Synuclein-Ablagerungen, α -Synuclein-Ablagerungen entlang von Neuriten und nahe Zellkernen vertreten.

3.8.2. Quantitative Auswertung der histopathologischen Untersuchungen im Hirnstamm der transgenen Versuchstiere

3.8.2.1. α -Synuclein-Ablagerungen im Hirnstamm von transgenen Versuchstieren im Alter von 62 Wochen

Drei der sechs vor Versuchsbeginn für diese Untersuchung randomisiert ausgewählten Versuchstiere aus der Aluminiumgruppe waren vor der 62. Lebenswoche aufgrund terminaler Erkrankung aus dem Versuch entnommen worden. Daher standen in der transgenen Aluminiumversuchsgruppe nur drei Versuchstiere für neuropathologische Untersuchungen zum Zeitpunkt von 62 Wochen zur Verfügung. In der Gadoliniumgruppe wurde eins der sechs Versuchstiere aufgrund terminaler Erkrankung vor Erreichen der 62. Lebenswoche entnommen, sodass fünf Versuchstiere in dieser Gruppe zur Verfügung standen. In der Referenz- und Eisengruppe standen alle sechs der vor Versuchsbeginn randomisiert ausgewählten Versuchstiere zur Verfügung. Die Auswertung erfolgte nach der in 2.6.5 beschriebenen Herangehensweise.

Die quantitative Auswertung der α -Synuclein-Ablagerungen im Hirnstamm von transgenen Versuchstieren im Alter von 62 Wochen ist der Tabelle 14 zu entnehmen. Der höchste durchschnittliche α -Synuclein-Anteil am Hirnstammgewebe zeigte sich mit 8,64 % der gefärbten Fläche in der Gadoliniumgruppe. Mit 0,72 % der gefärbten Fläche war der niedrigste durchschnittliche α -Synuclein-Anteil am Hirnstammgewebe in der transgenen Referenzgruppe zu finden. In der Eisengruppe betrug der durchschnittliche α -Synuclein-Anteil 1,81 % und in der transgenen Aluminiumgruppe 1,04 % der gefärbten Hirnstammfläche. Den höchsten Maximalwert zeigte mit 55,81 % der gefärbten Fläche die Gadoliniumgruppe. Auch die Eisengruppe wies mit 20,67 % der gefärbten Fläche einen hohen Maximalwert auf. In der Referenzgruppe lag das Maximum bei 2,20 % der gefärbten Fläche.

Die transgene Referenzgruppe wies beim Vergleich mit den anderen transgenen Versuchsgruppen tendenziell am wenigsten α -Synuclein-Ablagerungen im Hirnstamm auf (Abbildung 29). Die Maximalwerte und die Mittelwerte für die α -Synuclein-Ablagerung im Hirnstamm waren in der Eisen-, Aluminium- und Gadoliniumgruppe deutlich höher als in der Referenzgruppe. Es zeigte sich eine nicht signifikante Tendenz zu einer vermehrten Ablagerung von unlöslichem α -Synuclein in diesen Versuchsgruppen.

ERGEBNISSE

Versuchsgruppe	Referenz	Eisen	Aluminium	Gadolinium
Minimum	0,0008	0,0203	0,0068	0,0183
Median	0,6348	0,3988	0,4323	0,2794
Maximum	2,202	20,67	3,993	55,81
Mittelwert	0,7193	1,805	1,038	8,642
SD	0,7106	4,280	1,278	18,07
Standardfehler	0,1450	0,8737	0,3690	4,040

Tabelle 14: Deskriptive Statistik der α -Synuclein-Ablagerungen im Hirnstamm von transgenen Versuchstieren im Alter von 62 Wochen.

Angegeben ist der prozentuale Anteil der gefärbten Fläche am Gesamtgewebe in repräsentativen Hirnstammschnitten.

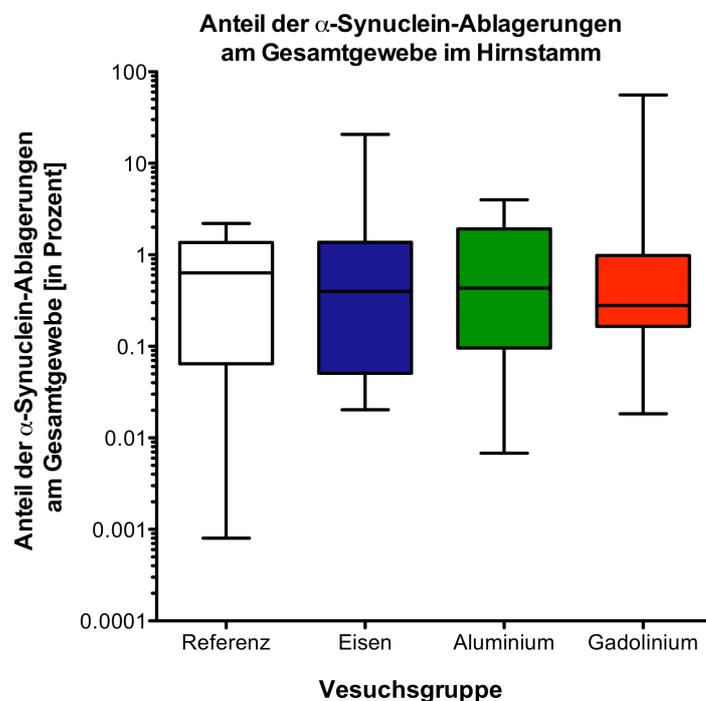


Abbildung 29: Box-Whisker-Plot des α -Synuclein-Anteils am Hirnstammgewebe in transgenen Versuchstieren im Alter von 62 Wochen.

Der Anteil der α -Synuclein-Ablagerungen ist in Prozent angegeben (Skala logarithmisch). Innerhalb der Box liegen 50 % der Werte der jeweiligen Versuchsgruppe, die waagerechte Linie in der Box markiert den medianen α -Synuclein-Anteil am Hirnstammgewebe der jeweiligen Versuchsgruppe. Die Whisker zeigen jeweils den minimalen und den maximalen Anteil von unlöslichem α -Synuclein am Hirnstammgewebe innerhalb der Versuchsgruppe an.

3.8.2.2. α -Synuclein-Ablagerungen im Hirnstamm aller transgenen Versuchstiere

Die quantitative Auswertung der α -Synuclein-Ablagerung im Hirnstamm aller transgenen Versuchstiere ist der Tabelle 15 zu entnehmen. Die niedrigste durchschnittliche Anteil an α -Synuclein am Hirnstammgewebe zeigte sich in der Gadoliniumgruppe mit 4,59 %. In der Eisengruppe war die durchschnittliche α -Synuclein-Ablagerung mit 7,65 % am höchsten. In der Aluminiumgruppe zeigte sich eine durchschnittliche α -Synuclein-Ablagerung von 7,18 % und lag damit über der durchschnittlichen α -Synuclein-Ablagerung von 6,52 % in der Referenzgruppe. Im Vergleich der Mediane zwischen den einzelnen Versuchsgruppen waren die Werte mit 3,41 % in der Eisen- und 3,91 % in der Aluminiumgruppe am höchsten. Die Referenzgruppe zeigte einen Median von 1,53 % und lag damit über dem Median der Gadoliniumgruppe, der bei 1,49 % lag.

Versuchsgruppe	Referenz	Eisen	Aluminium	Gadolinium
Minimum	0,0069	0,1587	0,0907	0,0160
Median	1,527	3,406	3,906	1,489
Maximum	27,481	29,293	43,897	17,833
Mittelwert	6,524	7,650	7,183	4,592
SD	9,178	9,717	11,11	5,964
Standardfehler	2,650	2,805	2,694	1,654

Tabelle 15: Quantitative Auswertung der α -Synuclein-Ablagerungen im Hirnstamm der transgenen Versuchsgruppen.

Angegeben ist der prozentuale Anteil der gefärbten Fläche am Gesamtgewebe in repräsentativen Hirnstammschnitten.

Aufgrund von höheren Mittel-, Minimum- und Maximumwerten in der Eisen- und Aluminium lässt sich in diesen Gruppen im Vergleich zur Referenzgruppe eine Tendenz zur vermehrten α -Synuclein-Ablagerung im Hirnstamm erkennen (Abbildung 30). Beim Vergleich der anteiligen α -Synuclein-Ablagerungen am Hirnstammgewebe zeigte sich zwischen den einzelnen Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied.

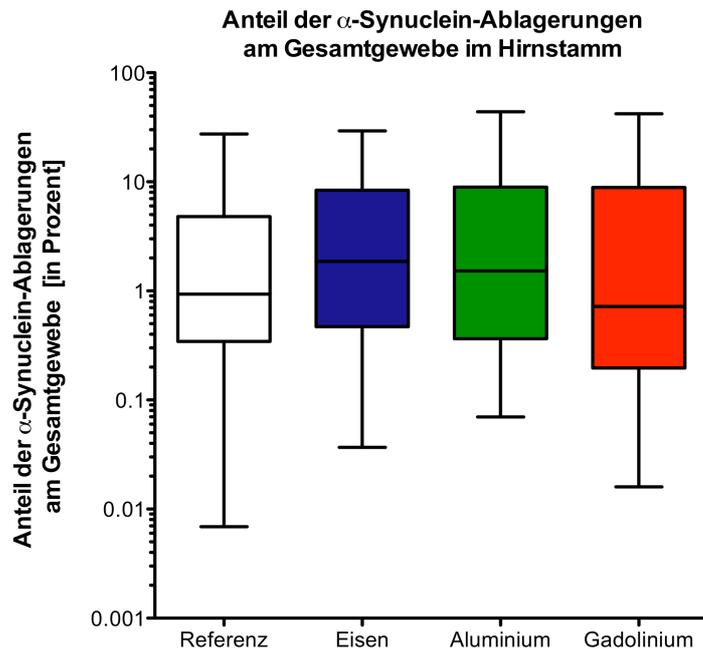


Abbildung 30: Box-Whisker-Plot zur anteiligen α -Synuclein-Ablagerung im Hirnstammgewebe in den transgenen Versuchsgruppen.

Der Anteil der α -Synuclein-Ablagerungen ist in Prozent angegeben (Skala logarithmisch). Innerhalb der Box liegen 50 % der Werte der jeweiligen Versuchsgruppe, die waagerechte Linie in der Box markiert den medianen α -Synuclein-Anteil am Hirnstammgewebe der jeweiligen Versuchsgruppe. Die Whisker zeigen jeweils den minimalen und den maximalen α -Synuclein-Anteil im Hirnstamm innerhalb der Versuchsgruppe an.

Der Logarithmus der anteiligen α -Synuclein-Ablagerungen im Hirnstamm jedes einzelnen Versuchstieres wurde mit dem dazugehörigen Sterbealter in einem Punktediagramm darstellt (Abbildung 31). Die Abbildung verdeutlicht die Beobachtung, dass es bei höherem Sterbealter zu einer zunehmenden anteiligen α -Synuclein-Ablagerungen im Hirnstamm kommt. Ein Unterschied in der Zunahme der α -Synuclein-Ablagerung zwischen den einzelnen Versuchsgruppen konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 31).

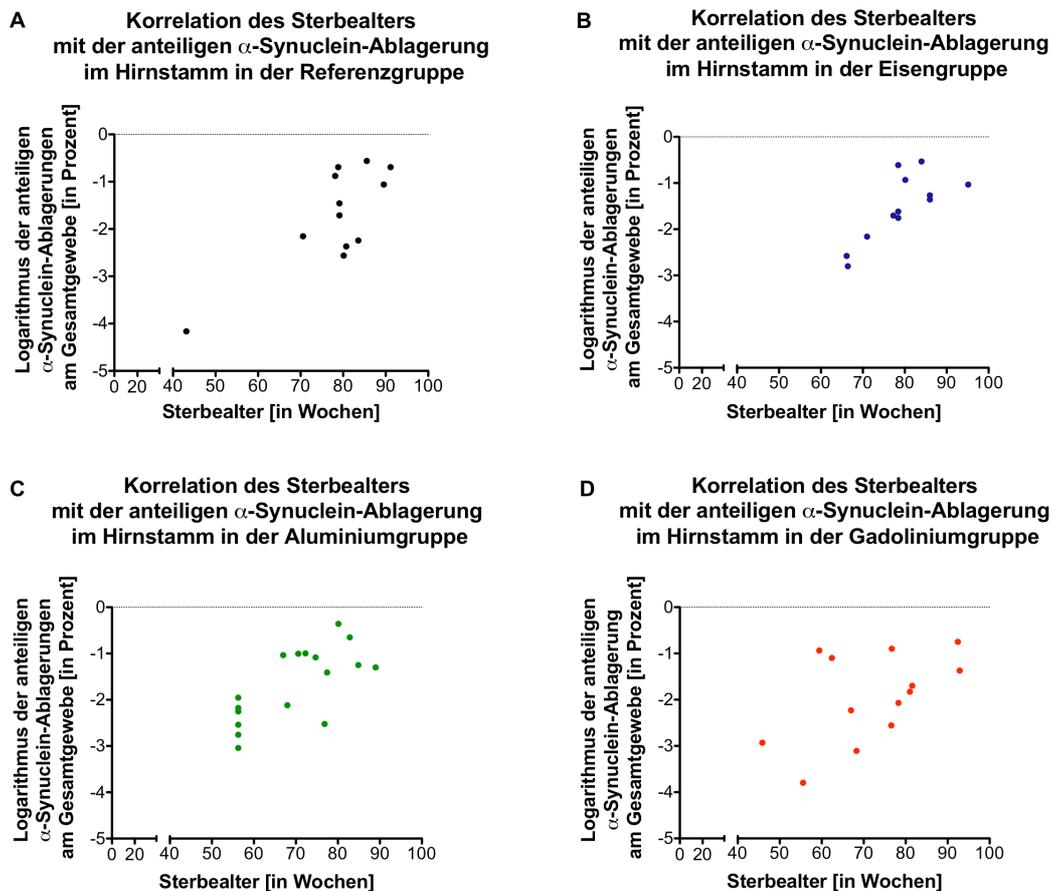


Abbildung 31: Punkt-Diagramm zur Darstellung des Sterbealters und den dabei beobachteten α -Synuclein-Ablagerungen im Hirnstamm.
 Der Anteil des α -Synucleins am Hirnstammgewebe ist in Prozent auf der Y-Achse angegeben. Das Sterbealter ist in Wochen auf der X-Achse angegeben.

3.8.3. Quantitative Auswertung der histopathologischen Untersuchungen im Cortex der transgenen Versuchstiere

3.8.3.1. α -Synuclein-Ablagerungen im Cortex von transgenen Versuchstieren im Alter von 62 Wochen

Vor Erreichen der 62. Lebenswoche wurden insgesamt vier Versuchstiere (drei Versuchstiere aus der Aluminiumgruppe und ein Versuchstier aus der Gadoliniumgruppe) aufgrund einer terminalen Erkrankung aus dem Versuch entnommen (vgl. 3.8.2.1).

Die quantitative Auswertung der α -Synuclein-Ablagerungen im Cortex der transgenen Versuchstiere im Alter von 62 Wochen ist Tabelle 16 zu entnehmen. Den höchsten Mittelwert der anteiligen α -Synuclein-Ablagerungen am Cortextgewebe wies

ERGEBNISSE

die Aluminiumgruppe mit 0,23 % auf. In der Referenzgruppe betrug der Mittelwert 0,03 % und war damit am niedrigsten. Die Mittelwerte der α -Synuclein-Ablagerungen im Cortex lagen bei 0,12 % in der Eisen- und 0,19 % in der Gadoliniumgruppe und lagen damit in beiden Versuchsgruppen deutlich über dem Mittelwert der Referenzgruppe.

Versuchsgruppe	Referenz	Eisen	Aluminium	Gadolinium
Minimum	0,0018	0,0	0,0833	0,0125
Median	0,0192	0,0840	0,1874	0,0798
Maximum	0,1030	0,5710	0,5936	1,2840
Mittelwert	0,0321	0,1175	0,2303	0,1903
Standardabweichung	0,0319	0,1498	0,1689	0,3072
Standardfehler	0,0071	0,0319	0,0597	0,0724

Tabelle 16: Deskriptive Statistik der α -Synuclein-Ablagerungen im Cortex von transgenen Versuchstieren im Alter von 62 Wochen.

Angegeben ist der prozentuale Anteil der gefärbten Fläche am Gesamtgewebe in repräsentativen Cortexschnitten.

Quantitativ war die α -Synuclein-Ablagerung im Cortex in der Aluminium- und Gadoliniumgruppe signifikant höher als in der Referenzgruppe. Zwischen der Eisengruppe und der Referenzgruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Menge von α -Synuclein im Cortex (Abbildung 32).

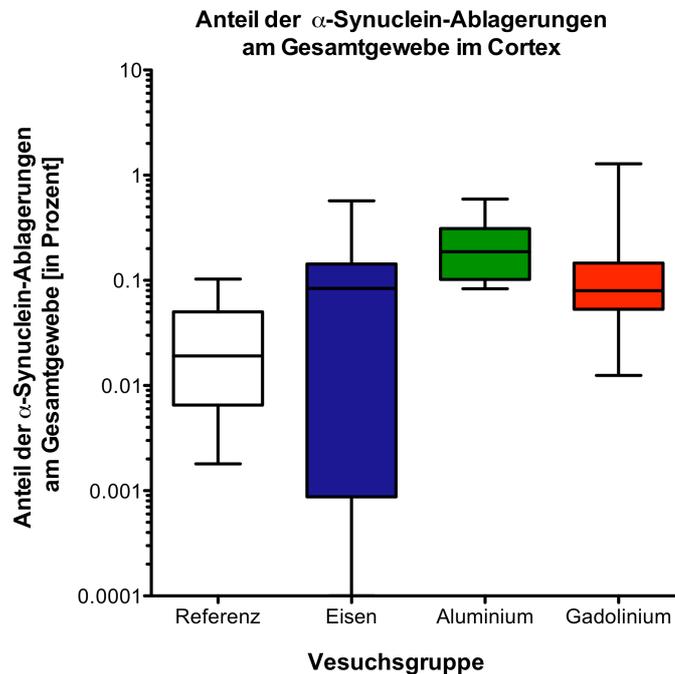


Abbildung 32: Box-Whisker-Plot zur Darstellung der α -Synuclein-Ablagerungen im Cortextgewebe von transgenen Versuchstieren im Alter von 62 Wochen.

Der Anteil der α -Synuclein-Ablagerungen ist in Prozent angegeben (Skala logarithmisch). Innerhalb der Box liegen 50 % der Werte der jeweiligen Versuchsgruppe, die waagerechte Linie in der Box markiert den medianen Anteil von α -Synuclein am Cortextgewebe der jeweiligen Versuchsgruppe. Die Whisker zeigen jeweils den minimalen und den maximalen Anteil von α -Synuclein im Cortex innerhalb der Versuchsgruppe an.

3.8.3.2. α -Synuclein-Ablagerungen im Cortex aller transgenen Versuchstieren

Die quantitative Auswertung der anteiligen α -Synuclein-Ablagerung im Cortex in den einzelnen Versuchsgruppen ist Tabelle 17 zu entnehmen. Den niedrigsten Mittelwert zeigte die Gadoliniumgruppe mit 0,0978 %. In der Eisengruppe betrug der Mittelwert für die α -Synuclein-Ablagerung am Cortextgewebe 0,1658 %. Die Referenzgruppe wies mit 0,8878 % einen höheren durchschnittlichen Anteil von α -Synuclein am Cortextgewebe vor. In der Aluminiumgruppe war der Mittelwert für die α -Synuclein-Ablagerung im Cortex mit 1,1230 % am höchsten.

Versuchsgruppe	Referenz	Eisen	Aluminium	Gadolinium
Minimum	0,0046	0,0036	0,0115	0,0022
Median	0,0295	0,1393	0,2303	0,0949
Maximum	7,7110	0,5135	11,0300	0,2886
Mittelwert	0,8878	0,1658	1,1230	0,0978
Standardabweichung	2,5590	0,1684	2,5500	0,0820
Standardfehler	0,8530	0,0508	0,6011	0,0228

Tabelle 17. Deskriptive Statistik der α -Synuclein-Ablagerungen im Cortex der einzelnen Versuchsgruppen.

Angegeben ist der prozentuale Anteil der gefärbten Fläche am Gesamtgewebe in repräsentativen Cortexschnitten.

Im Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen wies die Aluminiumversuchsgruppe im Vergleich zur Referenzgruppe signifikant mehr α -Synuclein-Ablagerungen im Cortex auf (Abbildung 33). Der Unterschied zwischen der Eisen- und Gadoliniumgruppe war im Vergleich zur Referenzgruppe nicht signifikant.

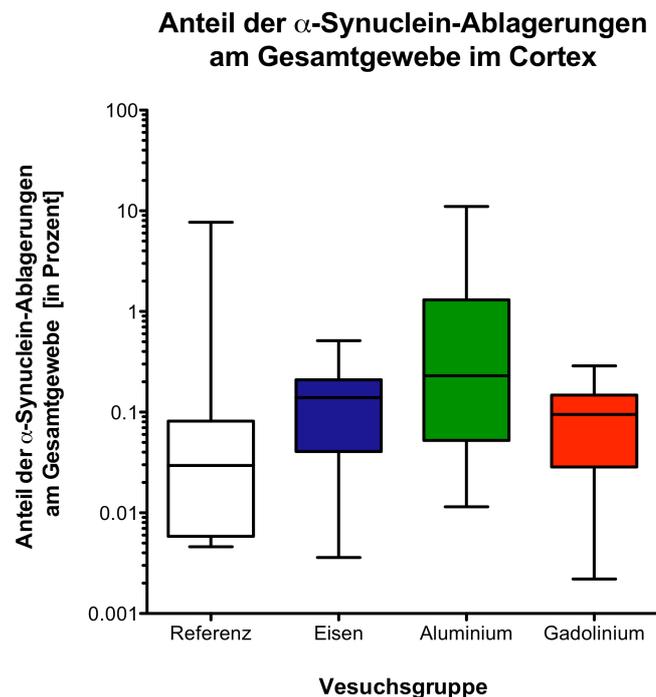


Abbildung 33: Graphische Darstellung der anteiligen α -Synuclein-Ablagerungen am Cortextgewebe der transgenen Versuchsgruppen.

Der Anteil der α -Synuclein-Ablagerungen ist in Prozent angegeben (Skala logarithmisch). Innerhalb der Box liegen 50 % der Werte der jeweiligen Versuchsgruppe, die waagerechte Linie in der Box markiert den medianen Anteil von α -Synuclein am Cortextgewebe der jeweiligen Versuchsgruppe. Die Whisker zeigen jeweils den minimalen und den maximalen Anteil von α -Synuclein im Cortex innerhalb der Versuchsgruppe an.

ERGEBNISSE

Um die Veränderungen der α -Synuclein-Ablagerungen im zeitlichen Verlauf zu quantifizieren, wurde das Sterbealter mit den α -Synuclein-Ablagerungen im Cortex zum Zeitpunkt des Todes in einem Punktediagramm aufgetragen. In der Eisen- und Gadoliniumgruppe zeigten sich bei höherem Sterbealter deutlich mehr α -Synuclein-Ablagerungen im Cortex als in der Referenzgruppe. In der Aluminiumgruppe fanden sich hingegen weniger α -Synuclein-Ablagerungen bei höherem Sterbealter. Allerdings konnten in einzelnen jung verstorbenen Versuchstieren große Mengen an α -Synuclein im Cortex festgestellt werden, sodass der Eindruck entsteht, dass bei höherem Sterbealter weniger α -Synuclein-Ablagerungen in der Aluminiumgruppe auftreten würden (Abbildung 34).

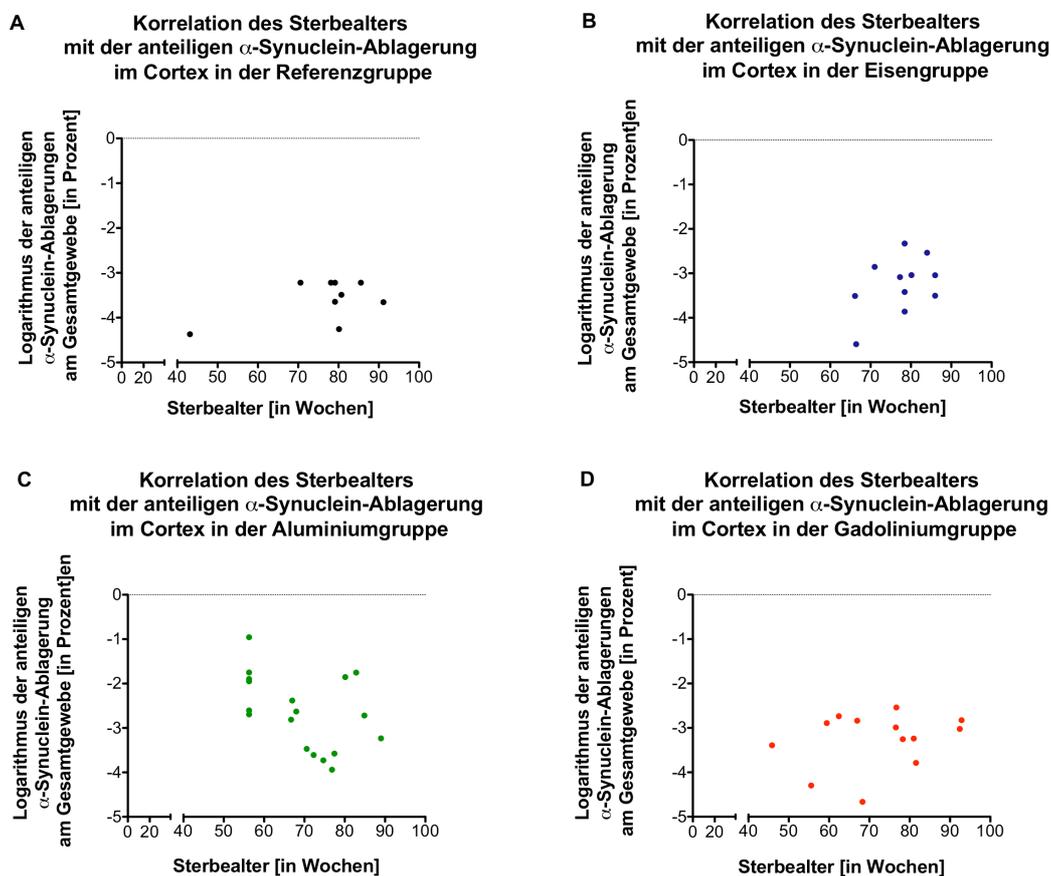


Abbildung 34: Punkt-Diagramm zur Darstellung des Sterbealters und der α -Synuclein-Ablagerungen im Cortex zum Zeitpunkt des Todes.

Angabe des Anteiligen α -Synucleins am Cortextgewebe in Prozent auf der Y-Achse. Das Sterbealter ist in Wochen auf der X-Achse angegeben.

4. DISKUSSION

4.1. Die Untersuchung des Einflusses von dreiwertigen Metallionen auf den Morbus Parkinson *in vivo*

Zahlreiche neurodegenerative Erkrankungen zeichnen sich durch die Entstehung von krankheitsspezifischen Proteinaggregaten und deren Ablagerung im zentralen Nervensystem aus (Soto, 2003). Die molekularen Ursachen für die Bildung dieser pathologischen Proteinkomplexe sind trotz intensiver Grundlagenforschung weiterhin noch nicht abschließend geklärt. Beim Morbus Parkinson deuten viele Studien auf einen komplexen Interaktionsmechanismus zwischen α -Synuclein, oxidativen Stress und Metallionen hin, der im Verlust dopaminerger Neurone in der Substantia nigra und in klinischen Ausfallerscheinungen mündet (Breydo, 2011; Levin, 2011).

Insbesondere Eisen und andere dreiwertige Metallionen scheinen in der Pathogenese der Parkinsonerkrankung eine ausschlaggebende Rolle zu spielen (Breydo, 2011; Santner, 2010). Epidemiologische Studien konnten einen möglichen kausalen Zusammenhang zwischen der umwelt- oder berufsbedingten Exposition gegenüber Metallen und der Entwicklung des Morbus Parkinson herstellen (Rybicki, 1993; Winklhofer, 2008). Außerdem zeigten sich in zahlreichen *in vitro*- und Zellkulturstudien eine vermehrte Aggregation und Toxizität von α -Synuclein in Anwesenheit von dreiwertigen Metallionen, insbesondere von Eisen und Aluminium (Hillmer, 2010; Kostka, 2008; Levin, 2011). Reaktive Sauerstoffradikale und andere oxidative Moleküle fördern, wie in 1.4.4 beschrieben, über die Fenton-Reaktion die Bildung von dreiwertigem Eisen, das daraufhin die Aggregation von α -Synuclein initiiert (Levin, 2011). Daher wird oxidativer Stress in einen indirekten kausalen Zusammenhang mit der Aggregation von α -Synuclein gebracht (Chinta, 2008; Jenner, 2003).

Bisher sind die komplexen Interaktionen zwischen α -Synuclein, oxidativen Stress und Metallionen ausschließlich in isolierten *in vitro*-Medien und in Zellkulturstudien untersucht worden. Allerdings unterliegen ganze Organismen und Säugetiere, insbesondere der Mensch, einer Vielfalt von komplexen physiologischen Regulationsmechanismen, die die bisher beschriebenen hypothetischen Interaktionsmechanismen beeinflussen könnten (vgl. 1.4.4). Metallionen, vor allem Eisen als Spurenelement, sind im Menschen in einen komplexen Stoffwechselkreislauf integriert. Die enterale Aufnahme und Distribution im

Körperkreislauf zwischen den einzelnen Organen sowie der Transport über die Blut-Hirn-Schranke werden dadurch stark reguliert (Crichton, 2011).

Um den Einfluss dreiwertiger Metallionen auf die Aggregation von α -Synuclein *in vivo* untersuchen und Rückschlüsse auf den Menschen ziehen zu können, wurde diese Fragestellung in einem Tierversuch untersucht. Tierversuche erlauben die Untersuchung der Relevanz und Validität von zuvor aus *in vitro*-Versuchen abgeleiteten Hypothesen, da Tiermodelle die anatomische und physiologische Strukturkomplexität des Menschen im Gegensatz zu *in vitro*- und Zellkulturstudien besser modellieren.

Für die Fragestellung wurde ein transgenes Mausmodell benötigt, das dem Morbus Parkinson beim Menschen ähnelt und sowohl neuropathologische Veränderungen in Form von α -Synuclein-Ablagerungen als auch damit einhergehende klinische Ausfallerscheinungen zeigt.

Für den Morbus Parkinson und andere Synucleinopathien wurden bisher viele verschiedene Mausmodelle entwickelt (Blandini, 2012). Diese können nach dem zugrunde liegenden Pathomechanismus eingeteilt werden (vgl. 1.5). Bei toxisch-induzierten Mausmodellen greifen die verwendeten Neurotoxine wie MPTP oder 6-OHDA in die mitochondriale Atmungskette ein und führen über verschiedene Mechanismen zur nigrostriatalen Neurodegeneration (Terzioglu, 2008). Die toxisch-induzierten Mausmodelle werden somit vor allem für Fragestellungen herangezogen, bei denen eine definitive und reproduzierbare nigrostriatale Schädigung benötigt wird. Mit ihnen lassen sich beispielsweise symptomatisch wirksame therapeutische Ansätze für den mit der Parkinsonerkrankung assoziierten Zelltod gut untersuchen (Blandini, 2012). Die Ausprägung der beobachteten Bewegungsstörungen variiert bei den toxisch-induzierten Mausmodellen stark und wurde in verschiedenen experimentellen Studien näher charakterisiert. Die Bewegungsstörungen korrelierten dabei mit der in den Körper eingebrachten Menge des Neurotoxins oder waren vom Ausmaß der zellulären Schädigung abhängig (Carvalho, 2013; Francardo, 2011). Toxisch-induzierte Mausmodelle eignen sich somit nicht für Untersuchungen von komplexen Interaktionsmechanismen zwischen der molekularen Pathologie der Parkinsonerkrankung und dem klinischen Krankheitsbild, wie sie in der vorliegenden Arbeit vorgesehen war.

Pharmakologisch-induzierte Mausmodelle sind für diese Fragestellung ebenfalls nicht geeignet, weil die dabei eingesetzten Medikamente wie beispielsweise der

DISKUSSION

Proteasom-Inhibitor Epoxomicin nicht zuverlässig eine Neurodegeneration im Bereich der Substantia nigra induzieren können und daher die Bewegungsstörungen variabel ausgeprägt sind (Terzioglu, 2008).

Transgene Mausmodelle hingegen spiegeln die molekularen Mechanismen der Pathogenese der Parkinsonerkrankung besser wider. Sie weisen genetische Veränderungen auf, die den genetischen Veränderungen bei den hereditären Parkinsonsyndromen ähnlich sind und zu vergleichbaren neuropathologischen Veränderungen führen. Unter den verschiedenen Linien transgener α -Synuclein-überexprimierender Mausmodelle gibt es allerdings erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Bildung von α -Synuclein-Ablagerungen im zentralen Nervensystem, der neurochemischen Veränderungen und des zeitlichen Verlaufes der motorischen und kognitiven Leistungsentwicklung (Kahle, 2008).

Man kann die α -Synuclein-überexprimierenden Mausmodelle nach dem dabei verwendeten Promotor und dem Transgen in verschiedene Gruppen unterteilen. Bei Mauslinien, die Tyrosinhydroxylase (TH) als Promotor verwenden, kommt es zwar zur pathologischen Ansammlung von α -Synuclein im zentralen Nervensystem, allerdings können je nach exprimiertem Transgen keine oder nur milde Bewegungsstörungen beobachtet werden (Rathke-Hartlieb, 2001; Richfield, 2002). Bei einer anderen Mauslinie mit Überexpression von C-terminal trunkiertem A53T- α -Synuclein kommt es zwar zur nigrostriatalen Neurodegeneration und zu Bewegungsstörungen, allerdings finden sich in den histopathologischen Untersuchungen keine α -Synuclein-Ablagerungen oder Lewy-Körperchen. Zudem erfolgt der Verlust der dopaminergen Neurone während der Embryogenese. Somit entwickelt diese Mauslinie keine altersabhängige pathologische Ablagerung von α -Synuclein, wie sie beim Morbus Parkinson vorkommt (Wakamatsu, 2008).

Eine andere große Gruppe von transgenen überexprimierenden Mauslinien verwenden Thy1, einen ZNS-spezifischen neuronalen Promotor. Sie weisen cerebrale α -Synuclein-Ablagerungen auf, unterscheiden sich jedoch vor allem in Hinblick auf die Entwicklung von motorischen Ausfallerscheinungen. Eine Mauslinie, die Wildtyp- α -Synuclein überexprimiert, zeigt bereits sehr früh sensomotorische Störungen und ist somit nicht für Langzeituntersuchungen geeignet (Fleming, 2004). Ebenfalls ungeeignet ist eine weitere Mauslinie, die A53T- α -Synuclein überexprimiert. Bei dieser Mauslinie kommt es zu einer schnellen Verschlechterung der motorischen Leistung und einem frühen Versterben, was auf dysfunktionale

DISKUSSION

neuromuskuläre Endplatten zurückgeführt wird. Es wird vermutet, dass α -Synuclein in den Vesikeltransport eingreift und so die Erregungsübertragung an der neuromuskulären Endplatte behindert (van der Putten, 2000).

Die in diesem Versuch verwendete A30P- α -Synuclein-Mauslinie mit Thy1-Promotor entwickelt hingegen einen altersabhängigen Phänotyp: mit zunehmendem Alter kommt es zu fibrillären α -Synuclein-Ablagerungen im zentralen Nervensystem, die Proteinkinase K resistent sind (Neumann, 2002). Diese neuropathologischen Veränderungen gehen zeitlich mit klinischen Ausfallerscheinungen in Form von Tremor, Ataxie und hypokinetischen Bewegungsstörungen einher. Außerdem ist für diese Mauslinie ein altersabhängiger Gewichtsverlust beschrieben worden (Wagner, 2013). Die regionale Verteilung der α -Synuclein-Ablagerungen im ZNS korreliert dabei auch mit den im Morris-Wasserlabyrinth-Test beobachteten kognitiven Verlusten bei dieser transgenen Mauslinie (Freichel, 2007).

Dieses Mausmodell eignet sich somit hervorragend für Fragestellungen bezüglich der Pathogenese des Morbus Parkinson, weil es neuropathologische Veränderungen mit der Ausbildung eines altersabhängigen klinischen Phänotyps vereint. Es erlaubt somit auch Untersuchungen zu komplexen Interaktionsmechanismen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit dieser transgenen Mauslinie der Effekt einer Langzeitexposition gegenüber dreiwertigen Metallionen auf die cerebrale α -Synuclein-Aggregation und einer damit verbundenen Veränderungen des klinischen Gesundheitszustandes der transgenen Versuchstiere untersucht. Durch die Langzeitexposition gegenüber Metallionen konnte die oftmals in epidemiologischen Studien untersuchte arbeits- oder umweltbedingte Exposition imitiert werden (Winklhofer, 2008). Die Exposition erfolgte dabei über die Ingestion von mit Metallionen angereicherten Futtermitteln, womit eine kontinuierliche und unausweichliche Exposition gegenüber Metallionen gewährleistet werden konnte. Die Konzentrationsuntersuchungen mittels ICP-MS-Analyse von Blut- und Gehirngewebeproben der Wildtypversuchstiere im Alter von 12 und 28 Wochen haben bestätigt, dass die orale Gabe von großen Mengen an Metallionen die Metallionenkonzentrationen *in vivo* beeinflussen können. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Metallionenkonzentrationen im zentralen Nervensystem im zeitlichen Verlauf ansteigen (vgl. 3.1.3). In der Eisen-, Aluminium- und Gadoliniumgruppe der Wildtypversuchstiere waren die Konzentrationen des jeweilig verabreichten Metallions im Vergleich zur Wildtyp-Referenzgruppe deutlich erhöht

DISKUSSION

(vgl. 3.1.3). Von einer vergleichbaren Erhöhung der Metallionenkonzentration ist auch in den transgenen Tieren auszugehen, da das Transgen A30P- α -Synuclein keine beschriebene Funktion im Bereich des Metabolismus oder Kreislaufes von Metallionen übernimmt (vgl. 1.3.3).

Die transgene Referenzgruppe entwickelte in der vorliegenden Arbeit einen altersabhängigen Phänotyp, wie er für das transgene A30P- α -Synuclein-Mausmodell beschrieben ist (Neumann, 2002). Bis zu einem Alter von etwa 80 Wochen zeigten sie eine ähnlich konstante Laufleistung wie die Wildtypversuchstiere; anschließend verschlechterte sich ihre motorische Leistung zunehmend und wich signifikant von der Laufleistung der Wildtypiere ab. Sie entwickelten in diesem Zeitraum das Vollbild des Morbus Parkinson in Form von Tremor, Rigor und Akinese wie es in 1.5 für erkrankte Menschen ebenfalls beschrieben ist.

Die bei der transgenen Referenzgruppe beobachtete Gewichtsentwicklung ist ebenfalls charakteristisch für dieses transgene Mausmodell (Wagner, 2013): Nach einer anfänglichen konstanten Gewichtszunahme kam es ab einem Lebensalter von 80 Wochen zu einer Gewichtsabnahme, die mit der Verschlechterung der Laufleistung zeitlich korrelierte. Die Gewichtsabnahme kann einerseits auf die Verschlechterung des Allgemeinzustandes und andererseits auf die verminderte Futtermittelaufnahme aufgrund der Bewegungsstörung zurückgeführt werden. Sie weist daher, wie der motorische Leistungsabfall, auf die Entwicklung des Phänotyps bei diesem Mausmodell hin.

Sowohl im Hirnstamm als auch im Cortex konnten zudem die für den Morbus Parkinson typischen α -Synuclein-Ablagerungen mittels immunhistochemischer Färbungen nachgewiesen werden (vgl. 3.8.2 und 3.8.3).

Anhand der transgenen Referenzgruppe zeigte sich, dass sich die Entwicklung des klinischen Phänotyps bei diesem transgenen Mausmodell sehr gut durch die Erfassung der motorischen Leistungsfähigkeit und durch die Bestimmung des Körpergewichts beurteilen lässt. Die neuropathologischen Veränderungen konnten durch immunhistochemische Methoden ebenfalls gut erfasst werden.

Somit eignet sich das hier verwendete Mausmodell sehr gut, um Untersuchungen zum Einfluss von dreiwertigen Metallionen auf den klinischen Krankheitsverlauf und die neuropathologischen Veränderungen im zentralen Nervensystem durchzuführen.

4.2. Ausschluss von Deprivations- oder Toxizitätseffekten

Die klinischen Untersuchungen der Wildtypversuchstiere, die wie die transgenen Versuchstiere über das Futtermittel entsprechend hohen Konzentrationen an Metallionen ausgesetzt waren, zeigten im Zeitverlauf eine konstante motorische Leistungsfähigkeit sowie eine physiologische Gewichtszunahme mit steigendem Lebensalter (vgl. 3.4.1 und 3.5.1). Eine mit dem Lebensalter zunehmende Fluktuation der Laufleistung, wie sie für das transgene Mausmodell beschrieben ist, konnte nicht beobachtet werden (Wagner, 2013). Im Vergleich der verschiedenen Wildtypversuchsgruppen ließen sich keine diätspezifischen Unterschiede in den klinischen Verlaufskontrollen finden.

In der Referenzgruppe wäre eine klinische Verschlechterung durch Eisendepletion aufgrund des Spezialfutters, dessen Eisenkonzentration an der unteren Normgrenze für die benötigte Eisenzufuhr lag, denkbar gewesen. Die Wildtyp-Referenzgruppe zeigte jedoch keine Veränderungen des klinischen Erscheinungsbildes und keine signifikant abweichenden Laufleistungen im Vergleich zu den anderen Wildtypversuchsgruppen (vgl. 3.4.1). Eine Eisendepletion durch die niedrigen Eisenkonzentrationen im Spezialfutter der Referenzgruppe kann daher als Ursache für die klinische Verschlechterung bei der transgenen Referenzgruppe ausgeschlossen werden.

Somit ist davon auszugehen, dass die mit dem Spezialfutter verabreichten hohen Mengen an Metallionen keine Toxizitäts-induzierten Effekte und keine Depletionseffekte durch zu niedrige Eisenzufuhr auf die Laufleistung und die Gewichtsentwicklung der Versuchstiere ausgeübt haben.

Zusammenfassend ist eine alleinige Exposition gegenüber Metallionen demnach nicht ursächlich für die bei den transgenen Versuchstieren beobachteten klinischen Veränderungen (vgl. 3.4.2 und 3.5.2). Vielmehr deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit daraufhin, dass es durch die Zufuhr an hohen Metallionenmengen über das Futter in den transgenen Versuchstieren zu einer Interaktion mit dem überexprimierten A30P- α -Synuclein gekommen ist und dies die klinischen und neuropathologischen Veränderungen in der transgenen Eisen-, Aluminium- und Gadoliniumgruppe bedingt hat.

4.3. Der Einfluss von Eisen auf die Pathogenese der Parkinsonerkrankung *in vivo*

In der vorliegenden Arbeit entwickelte die transgene Eisengruppe den für dieses Mausmodell typischen altersabhängigen Phänotyp. Allerdings traten die klinischen Veränderungen im Vergleich zur transgenen Referenzgruppe tendenziell früher ein. Das Gesamtüberleben der transgenen Eisengruppe war im Vergleich ebenfalls kürzer (vgl. 3.4.2.4 und 3.6.2). In den *post mortem* durchgeführten immunhistochemischen Auswertungen des Gehirngewebes der transgenen Eisengruppe zeigte sich zudem im Alter von 62 Jahren im Vergleich zur transgenen Referenzgruppe eine vermehrte Ablagerung von α -Synuclein-Aggregaten im Hirnstamm und im Cortex (vgl. 3.8.2.1 und 3.8.3.1). Da bei den Wildtypversuchstieren, die das murine α -Synuclein exprimierten und keine Überexpression vorwiesen, die Exposition gegenüber hohen Eisenkonzentrationen nicht zu entsprechenden Veränderungen führte (vgl. 3.4.1 und 3.5.1), konnte eine durch die Metallionen induzierte Toxizität bei den transgenen Versuchstieren daher nicht ursächlich für die klinischen und histopathologischen Veränderungen sein (vgl. 4.2).

Am ehesten beruht der Pathomechanismus für die zuvor beschriebenen klinischen und neuropathologischen Veränderungen somit auf einer Interaktion zwischen dreiwertigem Eisen und humanem α -Synuclein, was zu einer vermehrten α -Synuclein-Aggregation geführt hat.

In vitro kann man nur in Gegenwart von oxidiertem dreiwertigen Eisen und nicht von zweiwertigen Metallionen wie reduziertem Eisen eine α -Synuclein-Aggregation beobachten (Breydo, 2011; Kostka, 2008). Diese Beobachtung stellt den oftmals beim Morbus Parkinson beobachteten oxidativen Stress in einen indirekten kausalen Zusammenhang mit der α -Synuclein-Ablagerung im zentralen Nervensystem, indem die bei oxidativem Stress entstehenden Sauerstoffradikale über die Fenton-Reaktion zu einer vermehrten Bildung von oxidiertem Eisen und konsekutiv zu einer vermehrten Aggregation von α -Synuclein führen können (Levin, 2011).

Die Aggregations-induzierende Wirkung von Eisen hängt somit von seinem Oxidationszustand ab. Anhand der Fentonreaktion und des Haber-Weiss-Kreislaufes kann Eisen, je nach Vorhandensein von oxidierenden und reduzierenden Substanzen in seiner Umgebung, oxidiert und reduziert werden. Dass der Oxidationszustand und somit die Dreiwertigkeit von Eisen entscheidend für die

DISKUSSION

Aggregationstendenz von α -Synuclein ist, verdeutlichen *in vitro*-Versuche, die eine Aggregations-induzierende Eigenschaft für α -Synuclein in Gegenwart von oxidierenden Substanzen nachgewiesen haben.

Wenn man demnach von einer Eisen-abhängigen Aggregation von α -Synuclein ausgeht, kommt der Verfügbarkeit und Bereitstellung von dreiwertigem Eisen im zentralen Nervensystem für die zuvor beschriebene Interaktion zwischen Eisen und α -Synuclein eine bedeutende Rolle zu (Levin, 2011). Der erhöhte Gehalt an dreiwertigem Eisen im zentralen Nervensystem bei der transgenen Eisenversuchsgruppe kann zu einer stark beschleunigten Eisen-induzierten Aggregation von α -Synuclein geführt haben (Gaeta, 2005; Levin, 2011; Oakley, 2007; Popescu, 2009). Dies würde auch die vermehrte α -Synuclein-Ablagerung im Hirnstamm und Cortex in der transgenen Eisengruppe und den damit einhergehenden früheren Beginn der klinischen Symptome und dem verkürzten Überleben im Vergleich zur transgenen Referenzgruppe erklären.

Nicht nur die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf die bedeutende Rolle von hohen Eisenkonzentrationen in der Entwicklung der Parkinsonerkrankung hin. So konnten sowohl sonographisch als auch mittels Magnetresonanztomographie erhöhte Eisenkonzentrationen in der Substantia nigra von Patienten mit Morbus Parkinson beobachtet werden (Michaeli, 2007). Auch *post mortem* durchgeführte pathologische Untersuchungen des Hirnstammes haben bei betroffenen Parkinson-Patienten eine deutliche Erhöhung der Eisenkonzentration mit einer Verschiebung des $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ -Verhältnisses zugunsten der dreiwertigen Form gezeigt (Berg, 2007; Dexter, 1991). Es konnte ferner beobachtet werden, dass Patienten mit Schädelhirntrauma oder intracerebralen Blutungen in der Anamnese sowie ehemalige Profiboxer eine erhöhte Inzidenz der Parkinsonerkrankung vorweisen (Lolekha, 2010; Veldman, 1998). Möglicherweise ist dies durch den Übertritt von eisenhaltigem Blut in das Gehirnparenchym, der konsekutiven Erhöhung der cerebralen Eisenkonzentrationen und der Eisen-induzierten α -Synuclein-Aggregation bedingt.

Neben dem Morbus Parkinson wurden auch weitere neurodegenerative Erkrankung mit pathologischen Proteinablagerungen im zentralen Nervensystem in einen kausalen Zusammenhang mit Schädelhirntraumata gebracht (Costanza, 2011; McKee, 2009; Nowak, 2009). Möglicherweise beeinflusst Eisen nicht nur die

DISKUSSION

Aggregation von α -Synuclein, sondern ist auch in der Pathogenese anderer neurodegenerativer Erkrankungen und die Aggregation anderer Proteine involviert.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in der transgenen Referenzgruppe, die über das Futtermittel der niedrigsten Metallionenkonzentration ausgesetzt war, das längste durchschnittliche Überleben (vgl. 3.6.2). Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass eine verminderte Eisenkonzentration im Körper, zum Beispiel durch eine verminderte enterale Aufnahme, einen möglichen protektiven Effekt auf die Entwicklung der Parkinsonerkrankung darstellt, indem insgesamt weniger, im zentralen Nervensystem zur Verfügung stehendes Eisen zur einer verminderten α -Synuclein-Aggregation führt.

Diese Hypothese wird durch verschiedene *in vitro*-Studien und Tierversuche unterstützt. Eisenchelatoren können freies Eisen binden und somit über die Reduzierung der freien Eisenkonzentration im Serum einen protektiven Effekt ausüben. Die Zugabe von Eisenchelatoren zu einer Mischung aus α -Synuclein-Monomeren und dreiwertigem Eisen *in vitro* konnte die Aggregationsrate von α -Synuclein vermindern (Kostka, 2008). In Tierversuchsstudien konnten Eisenchelatoren einen mittels Proteasominhibitoren oder MPTP verursachten Neuronenverlust unterbinden (Kaur, 2003; Shachar, 2004). Polyphenole, natürliche Pflanzenextrakte aus grünem Tee, können die Bildung von α -Synuclein-Oligomeren *in vitro* vermindern (Caruana, 2011). Möglicherweise beruht dies darauf, dass Polyphenole und andere Pflanzenextrakte, ähnlich wie endogene oder pharmakologische Eisenchelatoren, freies Eisen binden und somit einen protektiven Effekt auf die Entstehung der Parkinsonerkrankung ausüben (Kell, 2010; Mandel, 2006). Auch *in vivo* konnten protektive Effekte durch den Einsatz von Eisenchelatoren beobachtet werden (Shachar, 2004; Zhu, 2007).

Bei Frauen wurde interessanterweise eine niedrigere Inzidenz der Parkinsonerkrankungen beschrieben, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass Frauen im gebärfähigen Alter durch die Menstruation in regelmäßigen Abständen etwa 15 mg Eisen verlieren und somit eine physiologisch im Vergleich zu gleichaltrigen Männern erniedrigte Eisenkonzentration vorweisen (Van Den Eeden, 2003).

Trotz der nachweislich protektiven Wirkung von Eisenchelatoren *in vitro* und *in vivo*, ist eine dauerhafte Erniedrigung des Eisenspiegels im Menschen aufgrund der unabdingbaren Funktion von Eisen bei einer Vielzahl von physiologischen Abläufen

im menschlichen Körper derzeit nicht möglich. Sie stellt jedoch einen interessanten Therapieansatz im Bereich der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen für die Zukunft dar (Mounsey, 2012).

4.4. Das A30P- α -Synuclein-Mausmodell als potentielles Tiermodell für die Neurodegeneration mit Eisenablagerung im Gehirn

Eisen spielt nicht nur im Rahmen der Pathogenese des Morbus Parkinson eine bedeutende Rolle. Auch bei der Neurodegeneration mit Eisenablagerung im Gehirn kommt es zu einer pathologischen Anreicherung von Eisen im cerebralen Gewebe. Zugleich findet man in neuropathologischen Untersuchungen dieser Patienten vermehrte α -Synuclein-Ablagerungen, was die Hypothese einer Eisen-induzierten Aggregation von α -Synuclein unterstützt (Galvin, 2000; Gregory, 2009; Neumann, 2000).

Bisher ist kein Mausmodell für die Neurodegeneration mit Eisenablagerung im Gehirn beschrieben worden (Kahle, 2008). Das in dieser Arbeit verwendete transgene A30P- α -Synuclein-Mausmodell könnte in Kombination mit der oralen Gabe von hohen Eisenmengen ein potentielles Tiermodell für diese Erkrankung im Gehirn darstellen, da es die Hauptcharakteristiken der Neurodegeneration mit Eisenablagerung im Gehirn vorweist. Durch den hochkonzentrierten Eisengehalt des Spezialfuttermittels würde es zu einer Erhöhung der Eisenkonzentration im Blut und im Gehirn der Versuchstiere kommen und somit Aspekte der Erkrankung imitieren. Im Verlauf käme es zu den neuropathologischen Veränderungen in Form von Ablagerungen von α -Synuclein-Aggregaten. Es könnte daher der Erforschung dieser Erkrankung und möglicher Therapieansätze als Tiermodell dienen.

4.5. Der Einfluss von Aluminium auf die Pathogenese der Parkinsonerkrankung *in vivo*

Neben Eisen spielen noch weitere dreiwertige Metallionen wie Aluminium eine bedeutende Rolle in der Pathogenese des Morbus Parkinson. Epidemiologische Studien deuten darauf hin, dass die Exposition gegenüber Aluminium mit einem erhöhten Risiko an Morbus Parkinson zu erkranken assoziiert ist (Gorell, 1999). Zudem hat man bei Patienten mit Morbus Parkinson erhöhte Aluminiumkonzentrationen im zentralen Nervensystem, unter anderem in der Substantia nigra, nachweisen können (Yasui, 1992). Wie für oxidiertes Eisen auch gezeigt wurde, lässt sich für α -Synuclein eine Aluminium-induzierte Aggregation *in*

vitro nachweisen (Kahle, 2008). Zuletzt konnten in verschiedenen Tierversuchen Veränderungen im Verhalten und der Expression von Tyrosinhydroxylase nach der chronischen Exposition gegenüber Aluminium nachgewiesen werden (Erazi, 2011; Walton, 2009). Tyrosinhydroxylase ist in die Synthese von Dopamin involviert, sodass ein verändertes Expressionsmuster auf eine Zelldysfunktion, möglicherweise dopaminergener Neurone in der Substantia nigra, hinweist.

Die klinischen und histopathologischen Untersuchungsergebnisse der transgenen Aluminiumgruppe aus der vorliegenden Arbeit ergänzen die bisherigen Erkenntnisse zum Einfluss von Aluminium auf die Pathogenese des Morbus Parkinson sehr gut. So kam es in der transgenen Aluminiumgruppe zu einer deutlich beschleunigten Verschlechterung der motorischen Leistung und des klinischen Allgemeinzustandes und zu einem verkürzten Überleben im Vergleich zur transgenen Referenzgruppe (vgl. 3.4.2.5). Außerdem konnte eine vermehrte Ablagerung von α -Synuclein-Aggregaten in den immunhistochemischen Untersuchungen des Hirnstammes und des Cortex festgestellt werden (vgl. 3.8.2 und 3.8.3).

Aufgrund der durchgehend stabilen Laufleistung der Wildtypversuchstiere, die ebenfalls das hochkonzentrierte Aluminium-Spezialfuttermittel erhielten (vgl. 3.4.1), können die klinischen und histopathologischen Veränderungen bei den transgenen Aluminiumversuchstieren nicht auf mögliche Toxizitätseffekte zurückgeführt werden. Somit begründet sich die klinische Leistungsverschlechterung am ehesten in einer Interaktion zwischen der Überexpression von humanem A30P- α -Synuclein und der hohen Aluminiumkonzentration im Blut und zentralen Nervensystem der transgenen Versuchstiere, wie es auch für dreiwertiges Eisen angenommen wird (vgl. 4.2). So kann die hohe Aluminiumkonzentration im zentralen Nervensystem der transgenen Aluminiumversuchstiere die Aggregation von α -Synuclein induziert und somit zur Neurodegeneration und zur klinischen Verschlechterung geführt haben. Die vorliegenden Ergebnisse bringen somit erstmals die chronische Aluminiumexposition mit einer beschleunigten Krankheitsprogression beim Morbus Parkinson in einen kausalen Zusammenhang.

Die deutlich schnellere Krankheitsprogression der transgenen Aluminium-Versuchsgruppe im Vergleich zur transgenen Eisen-Versuchsgruppe beruht möglicherweise auf den verminderten Regulationsmechanismen, denen Aluminium als Spurenelement im Vergleich zu Eisen unterliegt (vgl. 1.4.2). Die intrazelluläre Aufnahme von Aluminium sowie dessen Transport zwischen den einzelnen

intrazellulären Kompartimenten sind derzeit noch ungeklärt. Der Transport von Aluminium über die Blut-Hirn-Schranke ist ebenfalls nicht ausreichend untersucht worden. Man geht jedoch davon aus, dass große Mengen von Aluminium, die intracerebral aufgenommen werden, nur langsam dieses Kompartiment wieder verlassen, sodass von einer langfristigen cerebralen Akkumulation auszugehen ist (VanDuyn, 2013; Yokel, 2002, 2006). Somit ist auch denkbar, dass die durch Eisen-induzierten klinischen Veränderungen denen von Aluminium entsprechen würden, wenn die Aufnahme, Distribution und Speicherung von Eisen nicht hochgradig vom menschlichen Körper kontrolliert würden.

Auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer wird ein Einfluss von Aluminium auf die Krankheitsgenese diskutiert (Jellinger, 2013; Kawahara, 2011; Tomljenovic, 2011). Zahlreiche epidemiologische Studien stellen einen Zusammenhang zwischen der erhöhten Aluminiumaufnahme über das Trinkwasser und dem Erkrankungsrisiko für Morbus Alzheimer her (McLachlan, 1996). Sowohl *in vitro*- und Zellkulturstudien als auch Tierversuche haben einen Zusammenhang zwischen der Aggregation von Tau, einem krankheitsspezifischen Protein bei der Alzheimererkrankung, und Aluminium postuliert (Mizoroki, 2007; Shaw, 2009; R. W. Shin, 1994; Zatta, 2009). In einer *post-mortem* durchgeführten immunohistochemischen Untersuchung von Gehirngewebeproben von Dialysepatienten, die regelmäßig hohen Aluminiumkonzentrationen ausgesetzt sind, wurden beispielsweise mehr Tau-Aggregate gefunden als bei Nicht-Dialysepatienten (Harrington, 1994). Zuletzt konnte in einem transgenen Mausmodell für Taupathien durch die langfristige orale Gabe von hohen Aluminiummengen eine vermehrte Aggregation von Tau und eine damit einhergehende neurologische Dysfunktionen nachgewiesen werden (Oshima, 2013). Diese Erkenntnisse sind mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vergleichbar und unterstreichen die Hypothese einer Metallionen-induzierten Aggregation von Proteinen wie Tau und α -Synuclein im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen (Nubling, 2012).

4.6. Der Einfluss von Gadolinium auf die Pathogenese der Parkinsonerkrankung *in vivo*

In der vorliegenden Arbeit wurde neben dem Einfluss von Eisen und Aluminium auch der Effekt von Gadolinium auf die Krankheitsprogression von Morbus Parkinson *in vivo* untersucht. Bei Gadolinium handelt es sich um ein dreiwertiges Metallion, das als Spurenelement in minimalen Mengen über die Nahrung in den menschlichen

DISKUSSION

Körper aufgenommen wird. Derzeit findet es vor allem als Hauptbestandteil von Kontrastmitteln im Bereich der Magnetresonanztomographie Verwendung (Matsumura, 2013). Gadoliniumhaltige Kontrastmittel werden nach den darin enthaltenen Chelatoren in ionisch/nicht-ionische sowie lineare/makrozyklische Kontrastmittel eingeteilt.

Bisher galten sie als nebenwirkungsarme Kontrastmittel. Allerdings wird mittlerweile die nephrogene systemische Fibrose mit der Gabe von linearem nicht-ionischen gadoliniumhaltigen Kontrastmittel in Verbindung gebracht, weil es bei dessen Verwendung zu einer vermehrten Gadoliniumfreisetzung kommt. Bei dieser im Jahre 2000 erstmals dokumentierten Erkrankung kommt es zu Fibrosierungen, die sowohl die Haut als auch andere Organe betreffen können (Cowper, 2000). Die Patienten leiden meist an einem chronischen Nierenversagen mit einer herabgesetzten renalen Exkretionsfähigkeit, weshalb nach Gabe von Gadoliniumhaltigem Kontrastmittel von einer Gadoliniumakkumulation auszugehen ist. Das sich dadurch im Körper akkumulierende Gadolinium kann sich in Komplexen mit Anionen wie beispielsweise Phosphat in den Organen ablagern.

Gadolinium kann jedoch auch toxische Effekte im zentralen Nervensystem auslösen. In einigen *post-mortem* durchgeführten Untersuchungen an Patienten mit nephrogener systemischer Fibrose konnte eine Beteiligung des zentralen Nervensystems mit Amyloidablagerungen entlang der Dura mater nachgewiesen werden (Sanyal, 2011). Es ist bekannt, dass die Gadoliniumkonzentration im zentralen Nervensystem mit der Menge an Kontrastmittel ansteigt. Die Transportmechanismen, wie Gadolinium vom Blut in das Gehirn gelangt, sind bisher nicht erforscht worden (Levy, 2007). Neurotoxische Effekte durch Gadolinium sind jedoch bereits in einigen Tierversuchsstudien nachgewiesen worden (Ray, 1998; Roman-Goldstein, 1991). Passend dazu gibt es einen Fallbericht über eine Patientin mit akutem Nierenversagen, die nach der repetitiven Gabe von Gadoliniumhaltigem Kontrastmittel im Rahmen von Magnetresonanztomographien eine akute Enzephalopathie entwickelt hat (Maramattom, 2005).

Bisher unveröffentlichten Daten von *in vitro*-Versuchen aus unserer Arbeitsgruppe zufolge kann Gadolinium die Bildung von α -Synuclein-Oligomeren induzieren, weshalb der Einfluss von Gadolinium auf die Krankheitsprogression des Morbus Parkinson *in vivo* in der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollte. Die transgene Gadoliniumgruppe in der vorliegenden Arbeit zeigte einen ähnlichen klinischen

Verlauf wie die transgene Aluminiumgruppe: es kam zu einem altersabhängigen Abfall der motorischen Leistungsfähigkeit (vgl. 3.4.2.6). Die Veränderungen traten dabei zeitlich deutlich früher als in der transgenen Referenzgruppe auf. Bei den entsprechenden Wildtypversuchstieren, die das gleiche hochkonzentrierte Gadoliniumspezialfutter erhielten und nachweislich erhöhte Gadoliniumkonzentrationen im zentralen Nervensystem vorwiesen, waren keine Veränderungen der Laufleistung oder des Gewichtes nachweisbar (vgl. 3.4.1 und 3.5.1). Außerdem zeigte sich ein verkürztes Überleben sowie eine vermehrte Ablagerung von α -Synuclein im zentralen Nervensystem (vgl. 3.6.2, 3.8.2 und 3.8.3). Die Ergebnisse der transgenen Gadoliniumgruppe aus der vorliegenden Arbeit sind somit weniger auf einen akuten Intoxikationseffekt zurückzuführen, sondern beruhen womöglich auf einer komplexen Interaktion zwischen Gadolinium und α -Synuclein.

Man hat zeigen können, dass die bei der systemischen Fibrose entstehenden Hautläsionen morphologische Eigenschaften mit Hautamyloidosen teilen (Grobner, 2006). Bei den Hautamyloidosen kommt es zur Ablagerung von verschiedenen Amyloidproteinen, die sich auf molekularer Ebene durch eine Betafaltblatt- und Fibrillenstruktur auszeichnen und sich mit Kongorot in histopathologischen Untersuchungen anfärben lassen. Da es sich bei α -Synuclein ebenfalls um ein Amyloidprotein handelt, lässt es die Vermutung zu, dass dreiwertige Metallionen wie Gadolinium die Bildung und Ablagerung amyloidartiger Proteine fördert.

Wie für Eisen und Aluminium bereits postuliert, ist eine durch Gadolinium induzierte Aggregation von α -Synuclein mit nachfolgender Neurodegeneration und damit einhergehender klinischer Verschlechterung denkbar. Unterstützend für diese Hypothese ist der immunhistochemische Nachweis einer vermehrten α -Synuclein-Aggregation im zentralen Nervensystem der transgenen Gadoliniumgruppe im Vergleich zur transgenen Referenzgruppe (vgl. 3.8.2 und 3.8.3).

Wenn man demnach von einer durch Gadolinium deutlich beschleunigten Krankheitsprogression beim Morbus Parkinson ausginge, kommt der Auswahl des Kontrastmittels im Rahmen der Durchführung von Magnetresonanztomographien eine große Bedeutung zu. Da gadoliniumhaltiges Kontrastmittel bisher als nebenwirkungsarm betrachtet wurde, ist dessen Einsatz in der Diagnostik in der Medizin und insbesondere im Bereich der cerebralen Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie aufgrund der besseren Schnittbildauflösung weit verbreitet. Allerdings kommt es im Rahmen der Kontrastmittelgabe zu einer erheblich

DISKUSSION

höheren Zufuhr an Gadolinium als der Mensch in der Regel über die Nahrung aufnimmt, sodass es zu einer bedeutend höheren Exposition kommt. Bei Patienten mit einem hereditären Parkinsonsyndrom oder bei Patienten mit einem beginnenden Morbus Parkinson wäre ein Progress der Erkrankung durch die erhöhte Gadoliniumzufuhr denkbar, indem es zu einer vermehrten α -Synuclein-Aggregation und damit einhergehenden klinischen Verschlechterungen käme. Hierdurch kommt der Indikation zur Kontrastmittelgabe und der Auswahl des gadoliniumhaltigen Kontrastmittels eine große Bedeutung zu und sollte vor jeder Gabe kritisch hinterfragt werden.

4. AUSBLICK

Die Versuche aus der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass die langfristige Exposition gegenüber erhöhten Metallionenkonzentrationen die Progression der Parkinsonerkrankung und möglicherweise auch anderer neurodegenerativer Erkrankungen deutlich beschleunigen kann.

Es bleibt derzeit noch offen, ob eine langfristige Exposition gegenüber hohen Metallionenkonzentrationen, wie sie in diesem Versuch durchgeführt wurde, ausschlaggebend ist für die Krankheitsprogression. Möglicherweise wäre eine kurzfristige Exposition gegenüber sehr hohen Metallionenkonzentrationen bereits ausreichend. Andererseits ist auch eine vulnerable Phase in der Entwicklung des Morbus Parkinson denkbar: Eine Exposition gegenüber hohen Metallionenkonzentrationen in diesem Zeitraum könnte die Progression der Erkrankung fördern, weil zelluläre Regulationsmechanismen beispielsweise die durch die Metallionen induzierte α -Synuclein-Aggregation nicht mehr bewältigen könnten. Die verschiedenen Expositionsszenarien gegenüber Metallionen müssen in Zukunft in weiteren Tierversuchen noch näher charakterisiert werden, da dies eine entscheidende Rolle in der Entwicklung einer kausalen Therapie des Morbus Parkinson darstellen könnte.

Durch die vorliegende Arbeit rückt die Bedeutung der potentiell protektiven Wirkung einer verminderten Eisenkonzentration noch weiter in den Vordergrund der Erforschung neuer Therapiemöglichkeiten für den Morbus Parkinson und andere neurodegenerative Erkrankungen. Sofern man von einer Eisen- oder Metallionen-induzierten Progression des Morbus Parkinson ausginge, wäre eine prophylaktische Verminderung der Eisenkonzentration beispielsweise für Angehörige aus Familien mit hereditären Formen der Parkinsonerkrankung denkbar, um eine Progression der Erkrankung zu verzögern oder möglicherweise gar aufhalten zu können. Je nachdem, ob sich eine kurz- oder langfristige Exposition gegenüber Metallionen als ausschlaggebend für die Entwicklung der Parkinsonerkrankung herausstellt, wäre eine dauerhafte oder intermittierende Verminderung der Eisenkonzentration zu erwägen. Auch der Vermeidung einer Exposition gegenüber anderen dreiwertigen Metallionen, wie Aluminium und Gadolinium, käme in diesem Zusammenhang eine Bedeutung zu. Insbesondere im Rahmen diagnostischer Untersuchungen und therapeutischer Maßnahmen im Bereich der Medizin wäre eine Expositionsreduktion

gegenüber dreiwertigen Metallionen denkbar. Aber auch die Exposition gegenüber Metallionen in der Umwelt, sei diese arbeits- oder umweltbedingt verursacht, sollte kritisch betrachtet, überwacht und, wenn möglich, reduziert werden.

Eisenchelatoren, Polyphenole und andere Moleküle, die Einfluss auf die Konzentration von Metallionen nehmen können, stellen somit potentiell wirksame Therapiemöglichkeiten in der Behandlung neurodegenerativer Erkrankung in der Zukunft dar und sollten in weiteren Studien mit Tierversuchen, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, näher untersucht werden.

Sofern sich Chelatoren und Polyphenole auch in klinischen Studien als protektiv erweisen, wäre eine Kombination mit pharmakologischen Molekülen wie Anle138b, wie sie zuletzt von Wagner et al 2013 entwickelt wurden, denkbar. Anle138 kann sowohl die Aggregation von α -Synuclein bei der Parkinsonerkrankung als auch die Aggregation von Prionprotein bei der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit unterbinden. Die Kombination aus der prophylaktischen Verminderung der Eisenkonzentration im Körper und der Gabe von Aggregations-inhibierenden Molekülen wie Anle138b würde zugleich einen protektiven und therapeutischen Ansatz darstellen und könnte möglicherweise die Behandlungsmöglichkeiten der Parkinsonerkrankung und anderer neurodegenerativer Erkrankungen revolutionieren.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Neurodegenerative Erkrankungen sind durch die extra- und intrazelluläre Ablagerung von krankheitsspezifischen Proteinen im zentralen Nervensystem gekennzeichnet (Soto, 2003). Beim Morbus Parkinson handelt es sich dabei um α -Synuclein, das sich unter anderem in Form von Lewy-Körperchen in Neuronen der Substantia nigra ablagert (Arima, 1998). Eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der Parkinsonerkrankung spielen dabei α -Synuclein-Oligomere, eine Zwischenstufe im Aggregationsprozess von α -Synuclein. Man geht davon aus, dass α -Synuclein-Oligomere, und nicht wie bisher angenommen α -Synuclein-Fibrillen, toxische Eigenschaften besitzen. Sie können beispielsweise Poren in Lipidmembranen bilden und die prä- und postsynaptische AMPA-Rezeptor-vermittelte Übertragung erhöhen (Huls, 2011; Schmidt, 2012).

Zahlreiche epidemiologische Studien und *in vitro* Untersuchungen deuten auf einen kausalen Zusammenhang zwischen der Exposition gegenüber Metallionen und der Aggregation von α -Synuclein hin (Chinta, 2008). So korreliert beispielsweise die berufliche oder umweltbedingte Exposition gegenüber Schwermetallen mit einer erhöhten Inzidenz an Morbus Parkinson (van der Mark, 2012). Ferner konnte *in vitro* eine vermehrte Bildung von α -Synuclein-Oligomeren in Anwesenheit von dreiwertigen Metallionen wie Eisen und Aluminium nachgewiesen werden (Kahle, 2008). Neuere Studien führen dies auf einen komplexen Interaktionsmechanismus zwischen α -Synuclein, oxidativen Stress und Metallionen zurück, der über die Aggregation von α -Synuclein die Degeneration dopaminerger Neurone und klinische Ausfallerscheinungen bedingt (Levin, 2011). Insbesondere dreiwertige Metallionen scheinen bei diesem Interaktionsmechanismus und damit in der Pathogenese des Morbus Parkinson eine entscheidende Rolle zu spielen (Kostka, 2008; Uversky, 2001b). Mittels bildgebender Verfahren konnte beispielsweise eine vermehrte Eisenablagerung im Bereich der Substantia nigra von an Morbus Parkinson erkrankten Patienten beobachtet werden (Michaeli, 2007). Ferner ließ sich in histopathologischen Untersuchungen zudem eine erhöhte Eisenkonzentration mit einer Verschiebung des $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ -Verhältnisses zugunsten der dreiwertigen Form beobachten (Riederer, 1989).

Um den Einfluss dreiwertiger Metallionen auf die Entwicklung der Parkinsonerkrankung *in vivo* zu untersuchen, wurde ein Langzeit-Tierversuch mit

ZUSAMMENFASSUNG

einem transgenen Mausmodell für Synucleinopathien durchgeführt. Im Rahmen dieses Versuches wurden transgene, das humane A30P- α -Synuclein überexprimierende Mäuse über das Futter erhöhten Konzentrationen an dreiwertigen Metallionen wie Eisen, Aluminium oder Gadolinium ausgesetzt. Um den Effekt auf die Krankheitsentwicklung zu erfassen, wurden Veränderungen der motorischen Leistungsfähigkeit, des Gewichtes und der Überlebenszeit bestimmt sowie pathologische α -Synuclein-Ablagerungen im zentralen Nervensystem beurteilt.

Im transgenen Mausmodell führte die langfristige Exposition gegenüber hohen Metallionenkonzentrationen im Vergleich zur Versuchsgruppe, die eine niedrig normale Eisenzufuhr erhielt, zu einer schnelleren Krankheitsprogression mit einem früheren Beginn der motorischen Leistungseinschränkungen und zu einem verkürzten krankheitsfreien Überleben und zu einem verkürzten Gesamtüberleben. Ferner kam es zu einer vermehrten α -Synuclein-Ablagerung im zentralen Nervensystem. Die Wildtypversuchstiere zeigten hingegen keine klinischen oder neuropathologischen Veränderungen, sodass Toxizitätseffekte durch die erhöhte Metallionenzufuhr ausgeschlossen werden konnten. Die bei den transgenen Versuchstieren beobachteten Veränderungen sind demnach der Exposition gegenüber hohen Metallionenkonzentrationen nur in Kombination mit α -Synuclein zuzuschreiben.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen auf einen entscheidenden Einfluss von dreiwertigen Metallionen wie Eisen, Aluminium und Gadolinium auf die Krankheitsprogression des Morbus Parkinson *in vivo* hin und bestärken die Ergebnisse zahlreicher epidemiologischer und *in vitro*-Studien.

In Anwesenheit von dreiwertigen Metallionen und α -Synuclein-Monomeren kann es *in vitro* zu einer Bildung von toxischen α -Synuclein-Oligomeren kommen (Kostka, 2008). Diese Metallionen-abhängige Aggregationstendenz ist für oxidiertes Eisen, Aluminium und Gadolinium nachgewiesen worden (Kongressbeitrag von J. Levin et al. beim Kongress „100 Years of Lewy Bodies – Where are we now?“ in München am 15.09.2012).

Diese Beobachtung stellt somit eine mögliche Erklärung für die *in vivo* Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dar. Demnach können die erhöhten cerebralen Metallionenkonzentrationen in den transgenen Versuchsgruppen *in vivo* zu einer vermehrten Bildung toxischer α -Synuclein-Oligomere geführt haben. Die damit

ZUSAMMENFASSUNG

einhergehende Neurodegeneration kann die deutlich schnellere Krankheitsprogression im transgenen Mausmodell bedingt haben.

Die beim Vergleich der transgenen Eisengruppe mit der Aluminium- und Gadoliniumgruppe beobachteten Unterschiede in der Krankheitsprogression sind am ehesten auf die bereits in 4.5 beschriebenen, im Vergleich zum Eisenmetabolismus fehlenden, komplexen Regulationsmechanismen für Aluminium und Gadolinium zurückzuführen (Crichton, 2011; Mills, 2010; Sian-Hulsmann, 2011). Andererseits liegen Aluminium und Gadolinium ausschließlich als dreiwertige Ionen in der Umwelt vor. Dreiwertiges Eisen hingegen kann über den Haber-Weiss-Kreis in eine zweiwertige und somit nicht aggregationsfördernde Form übertragen werden (Kostka, 2008).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern erstmals den Nachweis einer von dreiwertigen Metallionen abhängigen Aggregationstendenz von α -Synuclein *in vivo* und untermauern somit zahlreiche epidemiologische Studien und *in vitro*-Experimente, die dreiwertigen Metallionen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese zuschreiben.

Die potentiell protektive Wirkung einer Verminderung der Metallionenkonzentration im zentralen Nervensystem auf die Entwicklung der Parkinsonerkrankung wird durch die Daten der vorliegenden Arbeit bestärkt. Sie stellt daher einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt in der Behandlung des Morbus Parkinson und möglicherweise auch anderer neurodegenerativer Erkrankungen dar und sollte daher in den Vordergrund des wissenschaftlichen Interesses gerückt werden.

6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Histologische Darstellung eines Lewy-Körperchen und eines Lewy-Neuriten im Hirnstamm beim Morbus Parkinson mittels Lichtmikroskopie.....	11
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Tierversuchaufbaus im Zeitverlauf.	33
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Binarisierungsprinzips.	49
Abbildung 4: Graphische Darstellung der mittels ICP-MS-Analyse bestimmten Metallionenkonzentrationen in den Spezialfuttermitteln in $\mu\text{g pro g Trockengewicht}$	54
Abbildung 5: Graphische Darstellung der in der ICP-MS-Analyse bestimmten Metallionenkonzentrationen in Gewebeproben von Wildtypversuchstieren im Alter von 28 Wochen.	57
Abbildung 6: Exemplarische gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten PCR-Produkte der aus den Schwanzspitzen der transgenen Versuchstiere isolierten DNA.....	58
Abbildung 7: Graphische Darstellung der maximalen Laufleistungen der einzelnen Versuchstiere in den verschiedenen Wildtypversuchsgruppen.	60
Abbildung 8: Graphische Darstellung der durchschnittlichen Laufleistung der Wildtypversuchsgruppen im zeitlichen Verlauf.	62
Abbildung 9: Graphische Darstellung der Laufleistungen der einzelnen Versuchstiere aus den verschiedenen transgenen Versuchsgruppen.	64
Abbildung 10: Graphische Darstellung der absoluten Laufleistung der transgenen Versuchsgruppen und der gesamten Wildtypversuchsgruppe (WT Mittelwert) im zeitlichen Verlauf.....	65
Abbildung 11: Graphische Darstellung der Laufleistung der transgenen Referenzgruppe, der Wildtyp-Referenzgruppe und der gesamten Wildtypversuchsgruppe.	66

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 12: Graphische Darstellung der Laufleistung der transgenen Eisengruppe, der Wildtyp-Eisengruppe und der gesamten Wildtypversuchsgruppe.	67
Abbildung 13: Graphische Darstellung der Laufleistung der transgenen Aluminiumgruppe, der transgenen Referenzgruppe, der Wildtyp-Aluminiumgruppe und der gesamten Wildtypversuchsgruppe.	68
Abbildung 14: Graphische Darstellung der Laufleistung der transgenen Gadoliniumgruppe, der Wildtyp-Gadoliniumgruppe und der gesamten Wildtypversuchsgruppe.	69
Abbildung 15: Graphische Darstellung der Entwicklung des normierten Gewichtes der einzelnen Wildtypversuchstiere pro Versuchsgruppe.	71
Abbildung 16: Graphische Darstellung der Entwicklung des normierten Gewichtes der einzelnen Versuchsgruppen in Zeitverlauf.	72
Abbildung 17: Graphische Darstellung der Entwicklung des normierten Gewichtes der einzelnen Versuchstiere aus den transgenen Versuchsgruppen.	74
Abbildung 18: Graphische Darstellung der Entwicklung des normierten Gewichtes der transgenen Versuchsgruppen im Zeitverlauf.	75
Abbildung 19: Graphische Darstellung der Entwicklung des normierten Gewichtes der transgenen Referenzgruppe.	76
Abbildung 20: Graphische Darstellung der Entwicklung des normierten Gewichtes der transgenen Eisengruppe.	77
Abbildung 21: Graphische Darstellung der Entwicklung des normierten Gewichtes der transgenen Aluminiumgruppe.	78
Abbildung 22: Graphische Darstellung der Entwicklung des normierten Gewichtes der transgenen Gadoliniumgruppe.	79
Abbildung 23: Box-Whisker-Plot der Überlebenszeiten der transgenen Versuchsgruppen und der transgenen Zuchttiere.	80
Abbildung 24: Kaplan-Meier-Analyse der Überlebenszeiten der transgenen Versuchstiere und der transgenen Zuchttiere.	81

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 25: Graphische Darstellung des krankheitsfreien Überlebens der transgenen Versuchsgruppen.	82
Abbildung 26: Exemplarische immunhistochemische Anfärbung des Hirnstamms (A) und Cortex (B) eines transgenen Versuchstieres.....	83
Abbildung 27: Darstellung der verschiedenen morphologischen α -Synuclein-Ablagerungen im Hirnstamm von transgenen Versuchstieren mittels immunhistochemischer Färbung mit dem Antikörper 15G7.....	84
Abbildung 28: Graphische Darstellung der quantitativen Verteilung der verschiedenen morphologischen α -Synuclein-Ablagerungen im Hirnstamm und Cortex der transgenen Versuchstiere.	85
Abbildung 29: Box-Whisker-Plot des α -Synuclein-Anteils am Hirnstammgewebe in transgenen Versuchstieren im Alter von 62 Wochen.....	87
Abbildung 30: Box-Whisker-Plot zur anteiligen α -Synuclein-Ablagerung im Hirnstammgewebe in den transgenen Versuchsgruppen.....	89
Abbildung 31: Punkt-Diagramm zur Darstellung des Sterbealters und den dabei beobachteten α -Synuclein-Ablagerungen im Hirnstamm.	90
Abbildung 32: Box-Whisker-Plot zur Darstellung der α -Synuclein-Ablagerungen im Cortexgewebe von transgenen Versuchstieren im Alter von 62 Wochen.	92
Abbildung 33: Graphische Darstellung der anteiligen α -Synuclein-Ablagerungen am Cortexgewebe der transgenen Versuchsgruppen.....	93
Abbildung 34: Punkt-Diagramm zur Darstellung des Sterbealters und der α -Synuclein-Ablagerungen im Cortex zum Zeitpunkt des Todes.....	94

7. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der Versuchsgruppen	35
Tabelle 2: Messprotokoll für die Überprüfung der motorischen Leistungsfähigkeit der Versuchstiere.....	37
Tabelle 3: Basensequenzen der für die PCR verwendeten Primer.	40
Tabelle 4: PCR-Protokoll zur Amplifizierung des durch die Primer begrenzten DNA-Fragmentes.....	41
Tabelle 5: Metallionenkonzentration in mg pro kg Trockengewicht in industriell angefertigten Basisexperimentfuttermitteln.	53
Tabelle 6: Tabellarische Übersicht der in der ICP-MS-Analyse bestimmten Metallionenkonzentrationen in den Spezialfuttermitteln.	54
Tabelle 7: Übersicht über die mittels ICP-MS Analyse bestimmten Metallionenkonzentrationen in den Serum- und Gehirngewebeproben der Wildtypversuchstiere im Alter von 12 Wochen.	55
Tabelle 8: Tabellarische Darstellung der Konzentrationen von Eisen, Aluminium und Gadolinium in Gewebeproben von Wildtypversuchstieren im Alter von 28 Wochen.	56
Tabelle 9: Tabellarische Übersicht der vorzeitig aus dem Versuch entnommenen Wildtypversuchstiere.	58
Tabelle 10: Tabellarische Übersicht der vorzeitig aus dem Versuch entnommenen transgenen Versuchstiere.....	59
Tabelle 11: Deskriptive Statistik der maximalen Laufleistung der Wildtypversuchsgruppen.	61
Tabelle 12: Deskriptive Statistik des normierten Gewichtes der Wildtypversuchstiere.	72
Tabelle 13: Deskriptive Statistik des durchschnittlichen Überlebens der transgenen Versuchsgruppen und der transgenen Zuchttiere.	80

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 14: Deskriptive Statistik der α -Synuclein-Ablagerungen im Hirnstamm von transgenen Versuchstieren im Alter von 62 Wochen.....	87
Tabelle 15: Quantitative Auswertung der α -Synuclein-Ablagerungen im Hirnstamm der transgenen Versuchsgruppen.....	88
Tabelle 16: Deskriptive Statistik der α -Synuclein-Ablagerungen im Cortex von transgenen Versuchstieren im Alter von 62 Wochen.	91
Tabelle 17. Deskriptive Statistik der α -Synuclein-Ablagerungen im Cortex der einzelnen Versuchsgruppen.....	93

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

6-OHDA	6-Hydroxydopamin
Al	Aluminium
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BCSG1	(breast cancer specific gene 1) Brustkrebs-spezifisches Gen 1
bp	Basenpaare
C	Celsius
DAB	Diaminobenzidin
DMT1	(Divalent metal transporter) divalenter Metalltransporter
DNA	(deoxyribonucleic acid) Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fe	Eisen
g	Einheit für Schwerebeschleunigung
Gd	Gadolinium
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
ICP-MS	Induktiv-gekoppelte Plasma-Massenspektroskopie
IE	Internationale Einheiten
IRE	(iron responsive element) Eisen-gesteuertes Element
kDa	Kilo-Dalton
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
M	Molar
ml	Milliliter
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
NAC	(non-A β -component) Nicht-A β -Komponente
NaCl	Natriumchlorid
NACP	(Non-A β -component-precursor protein) Nicht-A β -Komponenten Vorläuferprotein
NBIA	(Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation) Neurodegeneration mit Eisenablagerung im Gehirn
NK	Negativkontrolle

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PCR	Polymerasekettenreaktion
PK	Positivkontrolle
PK-Verdau	Proteinkinaseverdau
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	(ribonucleic acid) Ribonukleinsäure
rpm	(rounds per minute) Umdrehungen pro Minute
SD	Standardabweichung
SDS	(sodium dodecyl sulfate) Natriumdodecylsulfat
SDS PAGE	(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
Sek	Sekunden
Tg	Transgen
TH	Tyrosinhydroxylase
vgl.	vergleiche
w/v	(weight per volumen) Gewicht pro Volumen/Gewichtsprozent
Wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

9. LITERATURVERZEICHNIS

- Abeliovich, A., Schmitz, Y., Farinas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W. H., Castillo, P. E., Shinsky, N., Verdugo, J. M., Armanini, M., Ryan, A., Hynes, M., Phillips, H., Sulzer, D., & Rosenthal, A. (2000). Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*, 25(1), 239-252.
- Aguzzi, A., & Haass, C. (2003). Games played by rogue proteins in prion disorders and Alzheimer's disease. *Science*, 302(5646), 814-818.
- Akopian, A. N., & Wood, J. N. (1995). Peripheral nervous system-specific genes identified by subtractive cDNA cloning. *J Biol Chem*, 270(36), 21264-21270.
- Arawaka, S., Saito, Y., Murayama, S., & Mori, H. (1998). Lewy body in neurodegeneration with brain iron accumulation type 1 is immunoreactive for alpha-synuclein. *Neurology*, 51(3), 887-889.
- Arima, K., Ueda, K., Sunohara, N., Hirai, S., Izumiyama, Y., Tonzuka-Uehara, H., & Kawai, M. (1998). Immunoelectron-microscopic demonstration of NACP/alpha-synuclein-epitopes on the filamentous component of Lewy bodies in Parkinson's disease and in dementia with Lewy bodies. *Brain Res*, 808(1), 93-100.
- Baba, M., Nakajo, S., Tu, P. H., Tomita, T., Nakaya, K., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., & Iwatsubo, T. (1998). Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol*, 152(4), 879-884.
- Becker, G., Muller, A., Braune, S., Buttner, T., Benecke, R., Greulich, W., Klein, W., Mark, G., Rieke, J., & Thumler, R. (2002). Early diagnosis of Parkinson's disease. *J Neurol*, 249 Suppl 3, III/40-48.
- Berg, D. (2007). Disturbance of iron metabolism as a contributing factor to SN hyperechogenicity in Parkinson's disease: implications for idiopathic and monogenetic forms. *Neurochem Res*, 32(10), 1646-1654.
- Beyer, K. (2006). Alpha-synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers. *Acta Neuropathol*, 112(3), 237-251.
- Beyer, K. (2007). Mechanistic aspects of Parkinson's disease: alpha-synuclein and the biomembrane. *Cell Biochem Biophys*, 47(2), 285-299.
- Biere, A. L., Wood, S. J., Wypych, J., Steavenson, S., Jiang, Y., Anafi, D., Jacobsen, F. W., Jarosinski, M. A., Wu, G. M., Louis, J. C., Martin, F., Narhi, L. O., & Citron, M. (2000). Parkinson's disease-associated alpha-synuclein is more fibrillogenic than beta- and gamma-synuclein and cannot cross-seed its homologs. *J Biol Chem*, 275(44), 34574-34579.
- Binolfi, A., Rasia, R. M., Bertoncini, C. W., Ceolin, M., Zweckstetter, M., Griesinger, C., Jovin, T. M., & Fernandez, C. O. (2006). Interaction of alpha-synuclein with divalent metal ions reveals key differences: a link between structure, binding specificity and fibrillation enhancement. *J Am Chem Soc*, 128(30), 9893-9901.
- Blandini, F., & Armentero, M. T. (2012). Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J*, 279(7), 1156-1166.
- Bohlega, S. A., & Al-Foghom, N. B. (2013). Drug-induced Parkinson's disease. A clinical review. *Neurosciences (Riyadh)*, 18(3), 215-221.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R. A., Jansen Steur, E. N., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 24(2), 197-211.

- Braak, H., Rub, U., Gai, W. P., & Del Tredici, K. (2003). Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm*, 110(5), 517-536.
- Braak, H., Sandmann-Keil, D., Gai, W., & Braak, E. (1999). Extensive axonal Lewy neurites in Parkinson's disease: a novel pathological feature revealed by alpha-synuclein immunocytochemistry. *Neurosci Lett*, 265(1), 67-69.
- Breydo, L., & Uversky, V. N. (2011). Role of metal ions in aggregation of intrinsically disordered proteins in neurodegenerative diseases. *Metallomics*, 3(11), 1163-1180.
- Buettner, G. R., & Jurkiewicz, B. A. (1996). Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiat Res*, 145(5), 532-541.
- Caruana, M., Hogen, T., Levin, J., Hillmer, A., Giese, A., & Vassallo, N. (2011). Inhibition and disaggregation of alpha-synuclein oligomers by natural polyphenolic compounds. *FEBS Lett*, 585(8), 1113-1120.
- Carvalho, M. M., Campos, F. L., Coimbra, B., Pego, J. M., Rodrigues, C., Lima, R., Rodrigues, A. J., Sousa, N., & Salgado, A. J. (2013). Behavioral characterization of the 6-hydroxidopamine model of Parkinson's disease and pharmacological rescuing of non-motor deficits. *Mol Neurodegener*, 8, 14.
- Caughey, B., & Lansbury, P. T. (2003). Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci*, 26, 267-298.
- Chandra, S., Fornai, F., Kwon, H. B., Yazdani, U., Atasoy, D., Liu, X., Hammer, R. E., Battaglia, G., German, D. C., Castillo, P. E., & Sudhof, T. C. (2004). Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(41), 14966-14971.
- Chinta, S. J., & Andersen, J. K. (2008). Redox imbalance in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1780(11), 1362-1367.
- Clayton, D. F., & George, J. M. (1998). The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci*, 21(6), 249-254.
- Clayton, D. F., & George, J. M. (1999). Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *J Neurosci Res*, 58(1), 120-129.
- Cole, N. B., Murphy, D. D., Grider, T., Rueter, S., Brasaemle, D., & Nussbaum, R. L. (2002). Lipid droplet binding and oligomerization properties of the Parkinson's disease protein alpha-synuclein. *J Biol Chem*, 277(8), 6344-6352.
- Collier, T. J., & Coleman, P. D. (1991). Divergence of biological and chronological aging: evidence from rodent studies. *Neurobiol Aging*, 12(6), 685-693.
- Conway, K. A., Harper, J. D., & Lansbury, P. T. (1998). Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat Med*, 4(11), 1318-1320.
- Conway, K. A., Harper, J. D., & Lansbury, P. T., Jr. (2000). Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry*, 39(10), 2552-2563.
- Costanza, A., Weber, K., Gandy, S., Bouras, C., Hof, P. R., Giannakopoulos, P., & Canuto, A. (2011). Review: Contact sport-related chronic traumatic encephalopathy in the elderly: clinical expression and structural substrates. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 37(6), 570-584.
- Cowper, S. E., Robin, H. S., Steinberg, S. M., Su, L. D., Gupta, S., & LeBoit, P. E. (2000). Scleromyxoedema-like cutaneous diseases in renal-dialysis patients. *Lancet*, 356(9234), 1000-1001.

- Crichton, R. R., Dexter, D. T., & Ward, R. J. (2011). Brain iron metabolism and its perturbation in neurological diseases. *J Neural Transm*, 118(3), 301-314.
- Davidson, W. S., Jonas, A., Clayton, D. F., & George, J. M. (1998). Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem*, 273(16), 9443-9449.
- de Rijk, M. C., Launer, L. J., Berger, K., Breteler, M. M., Dartigues, J. F., Baldereschi, M., Fratiglioni, L., Lobo, A., Martinez-Lage, J., Trenkwalder, C., & Hofman, A. (2000). Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*, 54(11 Suppl 5), S21-23.
- Dexter, D. T., Carayon, A., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Wells, F. R., Daniel, S. E., Lees, A. J., Jenner, P., & Marsden, C. D. (1991). Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain*, 114 (Pt 4), 1953-1975.
- Dexter, D. T., Sian, J., Jenner, P., & Marsden, C. D. (1993). Implications of alterations in trace element levels in brain in Parkinson's disease and other neurological disorders affecting the basal ganglia. *Adv Neurol*, 60, 273-281.
- Dexter, D. T., Wells, F. R., Lees, A. J., Agid, F., Agid, Y., Jenner, P., & Marsden, C. D. (1989). Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J Neurochem*, 52(6), 1830-1836.
- Erazi, H., Ahboucha, S., & Gamrani, H. (2011). Chronic exposure to aluminum reduces tyrosine hydroxylase expression in the substantia nigra and locomotor performance in rats. *Neurosci Lett*, 487(1), 8-11.
- Fleming, S. M., Salcedo, J., Fernagut, P. O., Rockenstein, E., Masliah, E., Levine, M. S., & Chesselet, M. F. (2004). Early and progressive sensorimotor anomalies in mice overexpressing wild-type human alpha-synuclein. *J Neurosci*, 24(42), 9434-9440.
- Forman, M. S., Lee, V. M., & Trojanowski, J. Q. (2005). Nosology of Parkinson's disease: looking for the way out of a quagmire. *Neuron*, 47(4), 479-482.
- Forno, L. S. (1996). Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 55(3), 259-272.
- Francardo, V., Recchia, A., Popovic, N., Andersson, D., Nissbrandt, H., & Cenci, M. A. (2011). Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 42(3), 327-340.
- Fredriksson, A., Schroder, N., Eriksson, P., Izquierdo, I., & Archer, T. (2000). Maze learning and motor activity deficits in adult mice induced by iron exposure during a critical postnatal period. *Brain Res Dev Brain Res*, 119(1), 65-74.
- Freichel, C., Neumann, M., Ballard, T., Muller, V., Woolley, M., Ozmen, L., Borroni, E., Kretschmar, H. A., Haass, C., Spooen, W., & Kahle, P. J. (2007). Age-dependent cognitive decline and amygdala pathology in alpha-synuclein transgenic mice. *Neurobiol Aging*, 28(9), 1421-1435.
- Gaeta, A., & Hider, R. C. (2005). The crucial role of metal ions in neurodegeneration: the basis for a promising therapeutic strategy. *Br J Pharmacol*, 146(8), 1041-1059.
- Galvin, J. E., Giasson, B., Hurtig, H. I., Lee, V. M., & Trojanowski, J. Q. (2000). Neurodegeneration with brain iron accumulation, type 1 is characterized by alpha-, beta-, and gamma-synuclein neuropathology. *Am J Pathol*, 157(2), 361-368.

LITERATURVERZEICHNIS

- Giasson, B. I., Murray, I. V., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2001). A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem*, 276(4), 2380-2386.
- Glenner, G. G., & Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 425(3), 534-539.
- Goedert, M. (2001a). Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, 2(7), 492-501.
- Goedert, M. (2001b). Parkinson's disease and other alpha-synucleinopathies. *Clin Chem Lab Med*, 39(4), 308-312.
- Gorell, J. M., Johnson, C. C., Rybicki, B. A., Peterson, E. L., Kortsha, G. X., Brown, G. G., & Richardson, R. J. (1997). Occupational exposures to metals as risk factors for Parkinson's disease. *Neurology*, 48(3), 650-658.
- Gorell, J. M., Rybicki, B. A., Cole Johnson, C., & Peterson, E. L. (1999). Occupational metal exposures and the risk of Parkinson's disease. *Neuroepidemiology*, 18(6), 303-308.
- Gregory, A., Polster, B. J., & Hayflick, S. J. (2009). Clinical and genetic delineation of neurodegeneration with brain iron accumulation. *J Med Genet*, 46(2), 73-80.
- Grobner, T. (2006). Gadolinium--a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis? *Nephrol Dial Transplant*, 21(4), 1104-1108.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y. C., Zaidi, M. S., & Wisniewski, H. M. (1986). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem*, 261(13), 6084-6089.
- Gupta, D., & Kuruvilla, A. (2011). Vascular parkinsonism: what makes it different? *Postgrad Med J*, 87(1034), 829-836.
- Haass, C., & Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(2), 101-112.
- Harrington, C. R., Wischik, C. M., McArthur, F. K., Taylor, G. A., Edwardson, J. A., & Candy, J. M. (1994). Alzheimer's-disease-like changes in tau protein processing: association with aluminium accumulation in brains of renal dialysis patients. *Lancet*, 343(8904), 993-997.
- Hashimoto, M., Takeda, A., Hsu, L. J., Takenouchi, T., & Masliah, E. (1999). Role of cytochrome c as a stimulator of alpha-synuclein aggregation in Lewy body disease. *J Biol Chem*, 274(41), 28849-28852.
- Hillmer, A. S., Putcha, P., Levin, J., Hogen, T., Hyman, B. T., Kretschmar, H., McLean, P. J., & Giese, A. (2010). Converse modulation of toxic alpha-synuclein oligomers in living cells by N'-benzylidene-benzohydrazide derivatives and ferric iron. *Biochem Biophys Res Commun*, 391(1), 461-466.
- Hofer, A., & Gasser, T. (2004). New aspects of genetic contributions to Parkinson's disease. *J Mol Neurosci*, 24(3), 417-424.
- Houk, R. S., Fassel, V. A., Flesch, G. D., Svec, H. J., Gray, A. L., & Taylor, C. E. (1980). Inductively coupled argon plasma as an ion source for mass spectrometric determination of trace elements. *Analytical Chemistry*, 52(14), 2283-2289.
- Hsu, L. J., Sagara, Y., Arroyo, A., Rockenstein, E., Sisk, A., Mallory, M., Wong, J., Takenouchi, T., Hashimoto, M., & Masliah, E. (2000). alpha-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress. *Am J Pathol*, 157(2), 401-410.

- Huls, S., Hogen, T., Vassallo, N., Danzer, K. M., Hengerer, B., Giese, A., & Herms, J. (2011). AMPA-receptor-mediated excitatory synaptic transmission is enhanced by iron-induced alpha-synuclein oligomers. *J Neurochem*, *117*(5), 868-878.
- Iwai, A., Masliah, E., Yoshimoto, M., Ge, N., Flanagan, L., de Silva, H. A., Kittel, A., & Saitoh, T. (1995). The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron*, *14*(2), 467-475.
- Jakes, R., Spillantini, M. G., & Goedert, M. (1994). Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett*, *345*(1), 27-32.
- Jellinger, K. A. (2003). Neuropathological spectrum of synucleinopathies. *Mov Disord*, *18 Suppl 6*, S2-12.
- Jellinger, K. A. (2013). The relevance of metals in the pathophysiology of neurodegeneration, pathological considerations. *Int Rev Neurobiol*, *110*, 1-47.
- Jenner, P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, *53 Suppl 3*, S26-36; discussion S36-28.
- Ji, H., Liu, Y. E., Jia, T., Wang, M., Liu, J., Xiao, G., Joseph, B. K., Rosen, C., & Shi, Y. E. (1997). Identification of a breast cancer-specific gene, BCSG1, by direct differential cDNA sequencing. *Cancer Res*, *57*(4), 759-764.
- Kahle, P. J. (2008). alpha-Synucleinopathy models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol*, *115*(1), 87-95.
- Kahle, P. J., Haass, C., Kretschmar, H. A., & Neumann, M. (2002). Structure/function of alpha-synuclein in health and disease: rational development of animal models for Parkinson's and related diseases. *J Neurochem*, *82*(3), 449-457.
- Kahle, P. J., Neumann, M., Ozmen, L., Muller, V., Jacobsen, H., Schindzielorz, A., Okochi, M., Leimer, U., van Der Putten, H., Probst, A., Kremmer, E., Kretschmar, H. A., & Haass, C. (2000). Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha -synuclein in human and transgenic mouse brain. *J Neurosci*, *20*(17), 6365-6373.
- Kahle, P. J., Neumann, M., Ozmen, L., Muller, V., Odoy, S., Okamoto, N., Jacobsen, H., Iwatsubo, T., Trojanowski, J. Q., Takahashi, H., Wakabayashi, K., Bogdanovic, N., Riederer, P., Kretschmar, H. A., & Haass, C. (2001). Selective insolubility of alpha-synuclein in human Lewy body diseases is recapitulated in a transgenic mouse model. *Am J Pathol*, *159*(6), 2215-2225.
- Kamp, F., & Beyer, K. (2006). Binding of alpha-synuclein affects the lipid packing in bilayers of small vesicles. *J Biol Chem*, *281*(14), 9251-9259.
- Kaur, D., Yantiri, F., Rajagopalan, S., Kumar, J., Mo, J. Q., Boonplueang, R., Viswanath, V., Jacobs, R., Yang, L., Beal, M. F., DiMonte, D., Volitaskis, I., Ellerby, L., Cherny, R. A., Bush, A. I., & Andersen, J. K. (2003). Genetic or pharmacological iron chelation prevents MPTP-induced neurotoxicity in vivo: a novel therapy for Parkinson's disease. *Neuron*, *37*(6), 899-909.
- Kawahara, M., & Kato-Negishi, M. (2011). Link between Aluminum and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: The Integration of the Aluminum and Amyloid Cascade Hypotheses. *Int J Alzheimers Dis*, *2011*, 276393.
- Kayed, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W., & Glabe, C. G. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*, *300*(5618), 486-489.
- Kayed, R., Sokolov, Y., Edmonds, B., McIntire, T. M., Milton, S. C., Hall, J. E., & Glabe, C. G. (2004). Permeabilization of lipid bilayers is a common

- conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. *J Biol Chem*, 279(45), 46363-46366.
- Kehrer, J. P. (2000). The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149(1), 43-50.
- Kell, D. B. (2010). Towards a unifying, systems biology understanding of large-scale cellular death and destruction caused by poorly liganded iron: Parkinson's, Huntington's, Alzheimer's, prions, bactericides, chemical toxicology and others as examples. *Arch Toxicol*, 84(11), 825-889.
- Kostka, M., Hogen, T., Danzer, K. M., Levin, J., Habeck, M., Wirth, A., Wagner, R., Glabe, C. G., Finger, S., Heinzelmann, U., Garidel, P., Duan, W., Ross, C. A., Kretschmar, H., & Giese, A. (2008). Single particle characterization of iron-induced pore-forming alpha-synuclein oligomers. *J Biol Chem*, 283(16), 10992-11003.
- Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kosel, S., Przuntek, H., Eppelen, J. T., Schols, L., & Riess, O. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet*, 18(2), 106-108.
- Larsen, K. E., Schmitz, Y., Troyer, M. D., Mosharov, E., Dietrich, P., Quazi, A. Z., Savalle, M., Nemani, V., Chaudhry, F. A., Edwards, R. H., Stefanis, L., & Sulzer, D. (2006). Alpha-synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis. *J Neurosci*, 26(46), 11915-11922.
- Lashuel, H. A., Hartley, D., Petre, B. M., Walz, T., & Lansbury, P. T., Jr. (2002). Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature*, 418(6895), 291.
- Lashuel, H. A., & Lansbury, P. T., Jr. (2006). Are amyloid diseases caused by protein aggregates that mimic bacterial pore-forming toxins? *Q Rev Biophys*, 39(2), 167-201.
- Lee, H. J., Choi, C., & Lee, S. J. (2002). Membrane-bound alpha-synuclein has a high aggregation propensity and the ability to seed the aggregation of the cytosolic form. *J Biol Chem*, 277(1), 671-678.
- Lesage, S., Anheim, M., Letournel, F., Bousset, L., Honore, A., Rozas, N., Pieri, L., Madiona, K., Durr, A., Melki, R., Verny, C., & Brice, A. (2013). G51D alpha-synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. *Ann Neurol*.
- Levin, J., Högen, T., Hillmer, A. S., Bader, B., Schmidt, F., Kamp, F., Kretschmar, H. A., Bötzel, K., & Giese, A. (2011). Generation of Ferric Iron Links Oxidative Stress to α -Synuclein Oligomer Formation. *Journal of Parkinson's Disease*, 1(2), 205-216.
- Levy, L. M. (2007). Exceeding the limits of the normal blood-brain barrier: quo vadis gadolinium? *AJNR Am J Neuroradiol*, 28(10), 1835-1836.
- Lewy, F. H. (1912). Paralysis agitans *Handbuch der Neurologie* (Vol. 3, pp. 920-933). Berlin: M. Lewandowsky.
- Li, J., Uversky, V. N., & Fink, A. L. (2001). Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. *Biochemistry*, 40(38), 11604-11613.
- Lin, M. T., & Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443(7113), 787-795.
- Lindersson, E., Beedholm, R., Hojrup, P., Moos, T., Gai, W., Hendil, K. B., & Jensen, P. H. (2004). Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers. *J Biol Chem*, 279(13), 12924-12934.

- Liu, L. L., & Franz, K. J. (2007). Phosphorylation-dependent metal binding by alpha-synuclein peptide fragments. *J Biol Inorg Chem*, 12(2), 234-247.
- Logroscino, G. (2005). The role of early life environmental risk factors in Parkinson disease: what is the evidence? *Environ Health Perspect*, 113(9), 1234-1238.
- Logroscino, G., Gao, X., Chen, H., Wing, A., & Ascherio, A. (2008). Dietary iron intake and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol*, 168(12), 1381-1388.
- Lolekha, P., Phanthumchinda, K., & Bhidayasiri, R. (2010). Prevalence and risk factors of Parkinson's disease in retired Thai traditional boxers. *Mov Disord*, 25(12), 1895-1901.
- Mandel, S., Amit, T., Reznichenko, L., Weinreb, O., & Youdim, M. B. (2006). Green tea catechins as brain-permeable, natural iron chelators-antioxidants for the treatment of neurodegenerative disorders. *Mol Nutr Food Res*, 50(2), 229-234.
- Maramattom, B. V., Manno, E. M., Wijdicks, E. F., & Lindell, E. P. (2005). Gadolinium encephalopathy in a patient with renal failure. *Neurology*, 64(7), 1276-1278.
- Maroteaux, L., Campanelli, J. T., & Scheller, R. H. (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci*, 8(8), 2804-2815.
- Marti, M. J., Tolosa, E., & Campdelacreu, J. (2003). Clinical overview of the synucleinopathies. *Mov Disord*, 18 Suppl 6, S21-27.
- Martin, J. B. (1999). Molecular basis of the neurodegenerative disorders. [Review]. *N Engl J Med*, 340(25), 1970-1980.
- Martin, L. J., Pan, Y., Price, A. C., Sterling, W., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Price, D. L., & Lee, M. K. (2006). Parkinson's disease alpha-synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial degeneration and cell death. *J Neurosci*, 26(1), 41-50.
- Masliah, E., Rockenstein, E., Veinbergs, I., Mallory, M., Hashimoto, M., Takeda, A., Sagara, Y., Sisk, A., & Mucke, L. (2000). Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science*, 287(5456), 1265-1269.
- Matsumura, T., Hayakawa, M., Shimada, F., Yabuki, M., Dohanish, S., Palkowitsch, P., & Yoshikawa, K. (2013). Safety of Gadopentetate Dimeglumine after 120 Million Administrations over 25 Years of Clinical Use. *Magn Reson Med Sci*, 12(4), 297-304.
- McKee, A. C., Cantu, R. C., Nowinski, C. J., Hedley-Whyte, E. T., Gavett, B. E., Budson, A. E., Santini, V. E., Lee, H. S., Kubilus, C. A., & Stern, R. A. (2009). Chronic traumatic encephalopathy in athletes: progressive tauopathy after repetitive head injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, 68(7), 709-735.
- McLachlan, D. R., Bergeron, C., Smith, J. E., Boomer, D., & Rifat, S. L. (1996). Risk for neuropathologically confirmed Alzheimer's disease and residual aluminum in municipal drinking water employing weighted residential histories. *Neurology*, 46(2), 401-405.
- Michaeli, S., Oz, G., Sorce, D. J., Garwood, M., Ugurbil, K., Majestic, S., & Tuite, P. (2007). Assessment of brain iron and neuronal integrity in patients with Parkinson's disease using novel MRI contrasts. *Mov Disord*, 22(3), 334-340.
- Mills, E., Dong, X. P., Wang, F., & Xu, H. (2010). Mechanisms of brain iron transport: insight into neurodegeneration and CNS disorders. *Future Med Chem*, 2(1), 51-64.
- Mizoroki, T., Meshitsuka, S., Maeda, S., Murayama, M., Sahara, N., & Takashima, A. (2007). Aluminum induces tau aggregation in vitro but not in vivo. *J Alzheimers Dis*, 11(4), 419-427.

LITERATURVERZEICHNIS

- Mori, F., Inenaga, C., Yoshimoto, M., Umezu, H., Tanaka, R., Takahashi, H., & Wakabayashi, K. (2002). Alpha-synuclein immunoreactivity in normal and neoplastic Schwann cells. *Acta Neuropathol*, *103*(2), 145-151.
- Mounsey, R. B., & Teismann, P. (2012). Chelators in the treatment of iron accumulation in Parkinson's disease. *Int J Cell Biol*, *2012*, 983245.
- Murphy, D. D., Rueter, S. M., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2000). Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J Neurosci*, *20*(9), 3214-3220.
- Neumann, M., Adler, S., Schluter, O., Kremmer, E., Benecke, R., & Kretschmar, H. A. (2000). Alpha-synuclein accumulation in a case of neurodegeneration with brain iron accumulation type 1 (NBIA-1, formerly Hallervorden-Spatz syndrome) with widespread cortical and brainstem-type Lewy bodies. *Acta Neuropathol*, *100*(5), 568-574.
- Neumann, M., Kahle, P. J., Giasson, B. I., Ozmen, L., Borroni, E., Spooen, W., Muller, V., Odooy, S., Fujiwara, H., Hasegawa, M., Iwatsubo, T., Trojanowski, J. Q., Kretschmar, H. A., & Haass, C. (2002). Misfolded proteinase K-resistant hyperphosphorylated alpha-synuclein in aged transgenic mice with locomotor deterioration and in human alpha-synucleinopathies. *J Clin Invest*, *110*(10), 1429-1439.
- Nishie, M., Mori, F., Yoshimoto, M., Takahashi, H., & Wakabayashi, K. (2004). A quantitative investigation of neuronal cytoplasmic and intranuclear inclusions in the pontine and inferior olivary nuclei in multiple system atrophy. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *30*(5), 546-554.
- Nowak, L. A., Smith, G. G., & Reyes, P. F. (2009). Dementia in a retired world boxing champion: case report and literature review. *Clin Neuropathol*, *28*(4), 275-280.
- Nubling, G., Bader B Fau - Levin, J., Levin J Fau - Hildebrandt, J., Hildebrandt J Fau - Kretschmar, H., Kretschmar H Fau - Giese, A., & Giese, A. (2012). Synergistic influence of phosphorylation and metal ions on tau oligomer formation and coaggregation with alpha-synuclein at the single molecule level. (1750-1326 (Electronic)).
- Oakley, A. E., Collingwood, J. F., Dobson, J., Love, G., Perrott, H. R., Edwardson, J. A., Elstner, M., & Morris, C. M. (2007). Individual dopaminergic neurons show raised iron levels in Parkinson disease. *Neurology*, *68*(21), 1820-1825.
- Okochi, M., Walter, J., Koyama, A., Nakajo, S., Baba, M., Iwatsubo, T., Meijer, L., Kahle, P. J., & Haass, C. (2000). Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein. *J Biol Chem*, *275*(1), 390-397.
- Oshima, E., Ishihara, T., Yokota, O., Nakashima-Yasuda, H., Nagao, S., Ikeda, C., Naohara, J., Terada, S., & Uchitomi, Y. (2013). Accelerated tau aggregation, apoptosis and neurological dysfunction caused by chronic oral administration of aluminum in a mouse model of tauopathies. *Brain Pathol*, *23*(6), 633-644.
- Ostrerova, N., Petrucelli, L., Farrer, M., Mehta, N., Choi, P., Hardy, J., & Wolozin, B. (1999). alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *J Neurosci*, *19*(14), 5782-5791.
- Paik, S. R., Shin, H. J., Lee, J. H., Chang, C. S., & Kim, J. (1999). Copper(II)-induced self-oligomerization of alpha-synuclein. *Biochem J*, *340* (Pt 3), 821-828.
- Papp, M. I., Kahn, J. E., & Lantos, P. L. (1989). Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager syndrome). *J Neurol Sci*, *94*(1-3), 79-100.

- Parkinson, J. (1817). An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 14(2), 223-236; discussion 222.
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I., & Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276(5321), 2045-2047.
- Popescu, B. F., George, M. J., Bergmann, U., Garachtchenko, A. V., Kelly, M. E., McCrea, R. P., Luning, K., Devon, R. M., George, G. N., Hanson, A. D., Harder, S. M., Chapman, L. D., Pickering, I. J., & Nichol, H. (2009). Mapping metals in Parkinson's and normal brain using rapid-scanning x-ray fluorescence. *Phys Med Biol*, 54(3), 651-663.
- Proukakis, C., Dudzik Cg Fau - Brier, T., Brier T Fau - MacKay, D. S., MacKay Ds Fau - Cooper, J. M., Cooper Jm Fau - Millhauser, G. L., Millhauser Gl Fau - Houlden, H., Houlden H Fau - Schapira, A. H., & Schapira, A. H. (2013). A novel alpha-synuclein missense mutation in Parkinson disease. *Neurology*, 80(11), 1062-1064.
- Rathke-Hartlieb, S., Kahle, P. J., Neumann, M., Ozmen, L., Haid, S., Okochi, M., Haass, C., & Schulz, J. B. (2001). Sensitivity to MPTP is not increased in Parkinson's disease-associated mutant alpha-synuclein transgenic mice. *J Neurochem*, 77(4), 1181-1184.
- Ray, D. E., Holton, J. L., Nolan, C. C., Cavanagh, J. B., & Harpur, E. S. (1998). Neurotoxic potential of gadodiamide after injection into the lateral cerebral ventricle of rats. *AJNR Am J Neuroradiol*, 19(8), 1455-1462.
- Recchia, A., Debetto, P., Negro, A., Guidolin, D., Skaper, S. D., & Giusti, P. (2004). Alpha-synuclein and Parkinson's disease. *FASEB J*, 18(6), 617-626.
- Richfield, E. K., Thiruchelvam, M. J., Cory-Slechta, D. A., Wuertzer, C., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G., Di Monte, D. A., & Federoff, H. J. (2002). Behavioral and neurochemical effects of wild-type and mutated human alpha-synuclein in transgenic mice. *Exp Neurol*, 175(1), 35-48.
- Riederer, P., Sofic, E., Rausch, W. D., Schmidt, B., Reynolds, G. P., Jellinger, K., & Youdim, M. B. (1989). Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. *J Neurochem*, 52(2), 515-520.
- Roman-Goldstein, S. M., Barnett, P. A., McCormick, C. I., Ball, M. J., Ramsey, F., & Neuwelt, E. A. (1991). Effects of gadopentetate dimeglumine administration after osmotic blood-brain barrier disruption: toxicity and MR imaging findings. *AJNR Am J Neuroradiol*, 12(5), 885-890.
- Ross, C. A., & Poirier, M. A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med*, 10 Suppl, S10-17.
- Rybicki, B. A., Johnson, C. C., Uman, J., & Gorell, J. M. (1993). Parkinson's disease mortality and the industrial use of heavy metals in Michigan. *Mov Disord*, 8(1), 87-92.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.
- Santner, A., & Uversky, V. N. (2010). Metalloproteomics and metal toxicology of alpha-synuclein. *Metallomics*, 2(6), 378-392.
- Sanyal, S., Marckmann, P., Scherer, S., & Abraham, J. L. (2011). Multiorgan gadolinium (Gd) deposition and fibrosis in a patient with nephrogenic systemic

LITERATURVERZEICHNIS

- fibrosis--an autopsy-based review. *Nephrol Dial Transplant*, 26(11), 3616-3626.
- Schmidt, F., Levin, J., Kamp, F., Kretzschmar, H., Giese, A., & Botzel, K. (2012). Single-channel electrophysiology reveals a distinct and uniform pore complex formed by alpha-synuclein oligomers in lipid membranes. *PLoS One*, 7(8), e42545.
- Schober, A. (2004). Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res*, 318(1), 215-224.
- Schramel P., W. A., Seif R., Klose B.J. (1980). Eine neue Apparatur zur Druckveraschung von biologischem Material. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 302, 62-64.
- Schwartz, D. C., & Cantor, C. R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 37(1), 67-75.
- Shachar, D. B., Kahana, N., Kampel, V., Warshawsky, A., & Youdim, M. B. (2004). Neuroprotection by a novel brain permeable iron chelator, VK-28, against 6-hydroxydopamine lesion in rats. *Neuropharmacology*, 46(2), 254-263.
- Shaw, C. A., & Petrik, M. S. (2009). Aluminum hydroxide injections lead to motor deficits and motor neuron degeneration. *J Inorg Biochem*, 103(11), 1555-1562.
- Shin, E. C., Cho, S. E., Lee, D. K., Hur, M. W., Paik, S. R., Park, J. H., & Kim, J. (2000). Expression patterns of alpha-synuclein in human hematopoietic cells and in *Drosophila* at different developmental stages. *Mol Cells*, 10(1), 65-70.
- Shin, R. W., Lee, V. M., & Trojanowski, J. Q. (1994). Aluminum modifies the properties of Alzheimer's disease PHF tau proteins in vivo and in vitro. *J Neurosci*, 14(11 Pt 2), 7221-7233.
- Sian-Hulsmann, J., Mandel, S., Youdim, M. B., & Riederer, P. (2011). The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem*, 118(6), 939-957.
- Simon-Sanchez, J., Kilariski, L. L., Nalls, M. A., Martinez, M., Schulte, C., Holmans, P., Gasser, T., Hardy, J., Singleton, A. B., Wood, N. W., Brice, A., Heutink, P., Williams, N., & Morris, H. R. (2012). Cooperative genome-wide analysis shows increased homozygosity in early onset Parkinson's disease. *PLoS One*, 7(3), e28787.
- Sofic, E., Riederer, P., Heinsen, H., Beckmann, H., Reynolds, G. P., Hebenstreit, G., & Youdim, M. B. (1988). Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. *J Neural Transm*, 74(3), 199-205.
- Soto, C. (2003). Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, 4(1), 49-60.
- Souza, J. M., Giasson, B. I., Chen, Q., Lee, V. M., & Ischiropoulos, H. (2000). Dityrosine cross-linking promotes formation of stable alpha-synuclein polymers. Implication of nitrate and oxidative stress in the pathogenesis of neurodegenerative synucleinopathies. *J Biol Chem*, 275(24), 18344-18349.
- Specht, C. G., Tigaret, C. M., Rast, G. F., Thalhammer, A., Rudhard, Y., & Schoepfer, R. (2005). Subcellular localisation of recombinant alpha- and gamma-synuclein. *Mol Cell Neurosci*, 28(2), 326-334.
- Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M., & Goedert, M. (1998). alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(11), 6469-6473.

LITERATURVERZEICHNIS

- Spillantini, M. G., & Goedert, M. (2000). The alpha-synucleinopathies: Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy. *Ann N Y Acad Sci*, 920, 16-27.
- Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., & Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388(6645), 839-840.
- Stokes, A. H., Hastings, T. G., & Vrana, K. E. (1999). Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *J Neurosci Res*, 55(6), 659-665.
- Tanaka, Y., Engelender, S., Igarashi, S., Rao, R. K., Wanner, T., Tanzi, R. E., Sawa, A., V. L. D., Dawson, T. M., & Ross, C. A. (2001). Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. *Hum Mol Genet*, 10(9), 919-926.
- Tanner, C. M., & Goldman, S. M. (1996). Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin*, 14(2), 317-335.
- Terzioglu, M., & Galter, D. (2008). Parkinson's disease: genetic versus toxin-induced rodent models. *FEBS J*, 275(7), 1384-1391.
- Tolosa, E., Wenning, G., & Poewe, W. (2006). The diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, 5(1), 75-86.
- Tomljenovic, L. (2011). Aluminum and Alzheimer's disease: after a century of controversy, is there a plausible link? *J Alzheimers Dis*, 23(4), 567-598.
- Ueda, K., Fukushima, H., Masliah, E., Xia, Y., Iwai, A., Yoshimoto, M., Otero, D. A., Kondo, J., Ihara, Y., & Saitoh, T. (1993). Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(23), 11282-11286.
- Uversky, V. N. (2007). Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J Neurochem*, 103(1), 17-37.
- Uversky, V. N., Li, J., & Fink, A. L. (2001a). Evidence for a partially folded intermediate in alpha-synuclein fibril formation. *J Biol Chem*, 276(14), 10737-10744.
- Uversky, V. N., Li, J., & Fink, A. L. (2001b). Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure. *J Biol Chem*, 276(47), 44284-44296.
- Uversky, V. N., Li, J., Souillac, P., Millett, I. S., Doniach, S., Jakes, R., Goedert, M., & Fink, A. L. (2002). Biophysical properties of the synucleins and their propensities to fibrillate: inhibition of alpha-synuclein assembly by beta- and gamma-synucleins. *J Biol Chem*, 277(14), 11970-11978.
- Uversky, V. N., Yamin, G., Munishkina, L. A., Karymov, M. A., Millett, I. S., Doniach, S., Lyubchenko, Y. L., & Fink, A. L. (2005). Effects of nitration on the structure and aggregation of alpha-synuclein. *Brain Res Mol Brain Res*, 134(1), 84-102.
- Van Den Eeden, S. K., Tanner, C. M., Bernstein, A. L., Fross, R. D., Leimpeter, A., Bloch, D. A., & Nelson, L. M. (2003). Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol*, 157(11), 1015-1022.
- van der Mark, M., Brouwer, M., Kromhout, H., Nijssen, P., Huss, A., & Vermeulen, R. (2012). Is pesticide use related to Parkinson disease? Some clues to heterogeneity in study results. *Environ Health Perspect*, 120(3), 340-347.
- van der Putten, H., Wiederhold, K. H., Probst, A., Barbieri, S., Mistl, C., Danner, S., Kauffmann, S., Hofele, K., Spooren, W. P., Ruegg, M. A., Lin, S., Caroni, P.,

LITERATURVERZEICHNIS

- Sommer, B., Tolnay, M., & Bilbe, G. (2000). Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein. *J Neurosci*, *20*(16), 6021-6029.
- VanDuyn, N., Settivari, R., LeVora, J., Zhou, S., Unrine, J., & Nass, R. (2013). The metal transporter SMF-3/DMT-1 mediates aluminum-induced dopamine neuron degeneration. *J Neurochem*, *124*(1), 147-157.
- Veldman, B. A., Wijn, A. M., Knoers, N., Praamstra, P., & Horstink, M. W. (1998). Genetic and environmental risk factors in Parkinson's disease. *Clin Neurol Neurosurg*, *100*(1), 15-26.
- Volles, M. J., Lee, S. J., Rochet, J. C., Shtilerman, M. D., Ding, T. T., Kessler, J. C., & Lansbury, P. T., Jr. (2001). Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry*, *40*(26), 7812-7819.
- Wagner, J., Ryazanov, S., Leonov, A., Levin, J., Shi, S., Schmidt, F., Prix, C., Pan-Montojo, F., Bertsch, U., Mitteregger-Kretzschmar, G., Geissen, M., Eiden, M., Leidel, F., Hirschberger, T., Deeg, A. A., Krauth, J. J., Zinth, W., Tavan, P., Pilger, J., Zweckstetter, M., Frank, T., Bahr, M., Weishaupt, J. H., Uhr, M., Urlaub, H., Teichmann, U., Samwer, M., Botzel, K., Groschup, M., Kretzschmar, H., Griesinger, C., & Giese, A. (2013). Anle138b: a novel oligomer modulator for disease-modifying therapy of neurodegenerative diseases such as prion and Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*, *125*(6), 795-813.
- Wakabayashi, K., Tanji, K., Mori, F., & Takahashi, H. (2007). The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. *Neuropathology*, *27*(5), 494-506.
- Wakamatsu, M., Ishii, A., Iwata, S., Sakagami, J., Ukai, Y., Ono, M., Kanbe, D., Muramatsu, S., Kobayashi, K., Iwatsubo, T., & Yoshimoto, M. (2008). Selective loss of nigral dopamine neurons induced by overexpression of truncated human alpha-synuclein in mice. *Neurobiol Aging*, *29*(4), 574-585.
- Walton, J. R. (2009). Functional impairment in aged rats chronically exposed to human range dietary aluminum equivalents. *Neurotoxicology*, *30*(2), 182-193.
- Wardman, P., & Candeias, L. P. (1996). Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res*, *145*(5), 523-531.
- Weinreb, P. H., Zhen, W., Poon, A. W., Conway, K. A., & Lansbury, P. T., Jr. (1996). NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry*, *35*(43), 13709-13715.
- Wesemann, W., Blaschke, S., Solbach, M., Grote, C., Clement, H. W., & Riederer, P. (1994). Intranigral injected iron progressively reduces striatal dopamine metabolism. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*, *8*(3), 209-214.
- Winklhofer, K. F., Tatzelt, J., & Haass, C. (2008). The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases. *EMBO J*, *27*(2), 336-349.
- Wood, S. J., Wypych, J., Steavenson, S., Louis, J. C., Citron, M., & Biere, A. L. (1999). alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Biol Chem*, *274*(28), 19509-19512.
- Yasui, M., Kihira, T., & Ota, K. (1992). Calcium, magnesium and aluminum concentrations in Parkinson's disease. *Neurotoxicology*, *13*(3), 593-600.
- Yokel, R. A. (2002). Brain uptake, retention, and efflux of aluminum and manganese. *Environ Health Perspect*, *110* Suppl 5, 699-704.

LITERATURVERZEICHNIS

- Yokel, R. A. (2006). Blood-brain barrier flux of aluminum, manganese, iron and other metals suspected to contribute to metal-induced neurodegeneration. *J Alzheimers Dis*, 10(2-3), 223-253.
- Zarranz, J. J., Alegre, J., Gomez-Esteban, J. C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atares, B., Llorens, V., Gomez Tortosa, E., del Ser, T., Munoz, D. G., & de Yébenes, J. G. (2004). The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol*, 55(2), 164-173.
- Zatta, P., Drago, D., Bolognin, S., & Sensi, S. L. (2009). Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy. *Trends Pharmacol Sci*, 30(7), 346-355.
- Zecca, L., Youdim, M. B., Riederer, P., Connor, J. R., & Crichton, R. R. (2004). Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*, 5(11), 863-873.
- Zhu, W., Xie, W., Pan, T., Xu, P., Fridkin, M., Zheng, H., Jankovic, J., Youdim, M. B., & Le, W. (2007). Prevention and restoration of lactacystin-induced nigrostriatal dopamine neuron degeneration by novel brain-permeable iron chelators. *FASEB J*, 21(14), 3835-3844.
- Ziegler, A., Lange, S., & Bender, R. (2007). Überlebenszeitanalyse: Eigenschaften und Kaplan-Meier Methode. *Dtsch Med Wchenschr*, 132, e36-38.

10. DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater, Armin Giese, für die Einführung in die Thematik der Neurodegeneration und für die hervorragende Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken. Die kritischen Anmerkungen und fachlichen Diskussionen haben mich immer wieder motiviert und meine Begeisterung für diesen Fachbereich entfacht. Ich möchte mich auch für die Freiheit bei der zeitlichen Gestaltung dieser Arbeit bedanken. Auch für die Unterstützung bei meinem akademischen Werdegang möchte ich ihm einen großen Dank aussprechen.

Ein besonderer Dank gilt auch meinem Betreuer, Johannes Levin, für die vielen Jahre der hervorragenden Betreuung, die unermessliche Geduld beim Gegenlesen der diversen Vorversionen sowie die Bereitschaft, mich bei der Realisierung meiner Auslandsaufenthalte zu unterstützen. Der humorvolle und kollegiale Umgang haben die Arbeit an diesem Projekt und im PJ sehr bereichert und unerschwerlich gemacht. Felix Schmidt danke ich für die Einführung in die Welt des naturwissenschaftlichen Arbeitens und die Geduld und Hilfestellung, mit der er mir bei der Durchführung von Teilen dieser Arbeit zur Seite stand.

Ein großer Dank gilt meiner Studienfreundin und Mit-Doktorandin am ZNP, Catharina Prix, für die Einführung in den Mäusesport und die unzähligen gemeinsamen Stunden im Labor, im Tierstall und außerhalb des ZNPs.

Ebenfalls möchte ich mich bei Julia Ahlfeld für ihre Engelsgeduld beim Korrekturlesen dieser Arbeit sowie morale Unterstützung und Ablenkung während der letzten Jahre bedanken.

Catharina, Julia, Hanna, Markus und Felix danke ich zudem für die tolle Zeit am ZNP.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern für die bedingungslose und unendliche Unterstützung, mit der ich mein Studium und diese Dissertation realisieren konnte. Ihnen verdanke ich alles. Muchísimas gracias por todo.

11. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Schinke, Karin

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

Der Einfluss dreiwertiger Metallionen auf die Entwicklung des Morbus Parkinson im transgenen Tiermodell

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, 16.04.2016

Unterschrift Doktorandin