

Aus der Klinik für Neurologie  
Direktor: Herr Prof. Dr. med. Heinz Reichmann

---

**Untersuchungen zur Dynamik und zum Aggregationmechanismus  
von  $\alpha$ -Synuklein in chronischen Toxinmodellen  
der dopaminergen mesenzephalen Primärzellkultur**

Dissertationsschrift

*zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Gesundheitswissenschaften  
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)*

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus  
der Technischen Universität Dresden

von  
Dipl. Neurobiologin Sandra Oster  
geboren am 25.04.1976 in Meißen

Dresden 2017

1. Gutachter: Prof. Dr.med. Dr.rer.med. Andreas Hermann.

2. Gutachter: Prof. Dr.rer.nat Elmar Kirches

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2017

Prof. Dr. Gerd Kempermann  
Vorsitzender der Promotionskommission

*„WENN DER MENSCH SICH ETWAS VORNIMMT, SO IST IHM MEHR MÖGLICH, ALS ER  
GLAUBT“*

*(JOHANN PESTALOZZI)*

# Inhalt

<b>1.</b>	<b><i>EINLEITUNG</i></b>	<b>0</b>
1.1	Morbus Parkinson: Idiopathisches Parkinson-Syndrom	0
1.1.1	Pathophysiologie	0
1.1.2	Genetische Faktoren	3
1.1.3	Therapiemöglichkeiten	5
1.1.4	Lewy-Körperchen-das histopathologische Merkmal beim IPS	6
1.1.5	Ursachen des Idiopathischen Parkinson-Syndroms	7
<b>1.2</b>	<b><math>\alpha</math>-Synuklein</b>	<b>8</b>
1.2.1	Die pathologische Bedeutung von $\alpha$ -Synuklein bei der Parkinson-Krankheit	8
1.2.2	Entdeckung und Proteinstruktur des $\alpha$ -Synuklein	9
1.2.3	Physiologische Funktionen des $\alpha$ -Synuklein	11
1.2.4	Aggregatbildung	12
1.2.5	Transmission von $\alpha$ -Synuklein	14
1.2.6	$\alpha$ -Synuklein und Inflammation	15
1.2.7	Abbauwege des $\alpha$ -Synuklein	17
<b>1.3</b>	<b>Parkinson-Modelle: Rotenon und Paraquat</b>	<b>20</b>
1.3.1	Rotenon	21
1.3.2	Paraquat	22
1.3.3	Das Zellkulturmodell	23
<b>1.4</b>	<b>Zielstellung der Arbeit</b>	<b>24</b>
<b>2.</b>	<b><i>MATERIAL UND METHODEN</i></b>	<b>25</b>
<b>2.1</b>	<b>Geräte</b>	<b>25</b>
<b>2.2</b>	<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>26</b>
<b>2.3</b>	<b>Antikörper</b>	<b>27</b>
<b>2.4</b>	<b>Chemikalien und Kits</b>	<b>28</b>
<b>2.5</b>	<b>Verwendete Pestizide</b>	<b>30</b>
2.5.1	Rotenon	30
2.5.2	Paraquat	31
<b>2.6</b>	<b>Dopaminerge mesenzephal Primärzellkultur des Mausstammes C57Bl/6</b>	<b>31</b>
2.6.1	Präparation	31
2.6.2	Kultivierung der Primärzellkultur	33
2.6.3	Behandlung der dopaminergen mesenzephalen Primärzellkultur	34
2.6.4	Fixierung	34
<b>2.7</b>	<b>Immunocytochemische Färbung</b>	<b>35</b>
2.7.1	Nachweis der DA Neurone mittels Anti-Tyrosin Hydroxylase (TH)-Färbung	35
2.7.2	Quantifizierung der TH-positiven Neurone	35
<b>2.8</b>	<b>Fluoreszenzfärbungen</b>	<b>35</b>
2.8.1	Propidium Iodid (PI)/Hoechst 33342-Lebendfärbung	36
2.8.2	Färbung mit dem ProteoStat Aggreosome Detection Kit (ENZO)	36
2.8.3	Färbung mit dem CellMask™ Plasma Membrane Stain (Life technologies)	37
2.8.4	Quantifizierung von Fluoreszenzmessungen	37
<b>2.9</b>	<b>Proteinbiochemische Messungen</b>	<b>38</b>
2.9.1	Zellyse mit Neuronal Protein Extraction Reagenz (NEPER)	38
2.9.2	Proteinquantifizierung	38
2.9.3	Western Blot Analyse	39
2.9.4.	Immunpräzipitation	39
<b>2.10</b>	<b>Statistik</b>	<b>40</b>
<b>3.</b>	<b><i>ERGEBNISSE</i></b>	<b>41</b>
<b>3.1</b>	<b>Überlebenskurve der dopaminergen Neurone unter Pestizidbehandlung</b>	<b>41</b>
3.1.2	Verhalten von $\alpha$ -Synuklein nach Toxin-Behandlung im Verlauf der Zeit	42
<b>3.2</b>	<b>Lokalisation von <math>\alpha</math>-Synuklein in den dopaminergen Neuronen</b>	<b>47</b>
3.2.1	Überblick über die Verteilung von $\alpha$ -Synuklein über den gesamten Zeitraum	53
3.2.2	Quantifizierung von $\alpha$ -Synuklein mittels BZ II Analyzer	53
<b>3.3</b>	<b>Akutversuch über 24 Stunden</b>	<b>55</b>
3		55
3.1	Lokalisation von $\alpha$ -Synuklein in dem Akutversuch	55
3.3.2	Darstellung von $\alpha$ -Synuklein in der Gesamtkultur nach Akutversuch	56
<b>3.4</b>	<b>Nachweis von <math>\alpha</math>-Synuklein-Aggregaten mit dem Proteo-Aggreosomen-Kit</b>	<b>57</b>
3.4.1	Die Phosphorylierung von $\alpha$ -Synuklein in den dopaminergen Neuronen	61

<b>3.5</b>	<b>Lokalisation und Einfluss von <math>\alpha</math>-Synuklein an den Synapsen</b>	<b>63</b>
<b>3.6</b>	<b>Lokalisation des <math>\alpha</math>-Synuklein in der Zellmembran</b>	<b>68</b>
<b>3.7</b>	<b>Rotenon hemmt die Ubiquitinierung von <math>\alpha</math>-Synuklein</b>	<b>70</b>
3.7.1	Ubiquitin kolokalisiert mit $\alpha$ -Synuklein ausgewertet mittels BZII-Analyzer	75
3.7.2	Interaktionen von $\alpha$ -Synuklein und HSP70	75
<b>3.8</b>	<b>Auswirkung von Rotenon und Paraquat auf das Verhalten der Mikroglia</b>	<b>79</b>
3.8.1	Präsenz von Mikroglia und $\alpha$ -Synuklein an den dopaminergen Neuronen	81
3.9	Zusammenfassung der Ergebnisse	86
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>87</b>
4.1	Abnahme der dopaminergen Neurone in der Primärzellkultur unter Toxineinfluss	88
4.2	$\alpha$ -Synuklein im Toxinmodell-Rotenon versus Paraquat	88
4.3	Lokalisation von $\alpha$ -Synuklein in den dopaminergen Neuronen	92
4.4	Einfluss von $\alpha$ -Synuklein auf den Proteinabbau	92
4.5	$\alpha$ -Synuklein und inflammatorische Veränderungen nach Toxinbehandlung	95
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>98</b>
<b>6.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>101</b>
<b>7.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>104</b>
<b>8.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>105</b>
<b>9.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>106</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
CVA	Chaperon vermittelte Autophagie
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
DA	Dopamin
DAR	Dopamin-Rezeptor
DAT	Dopamin-Transporter
d.h.	das heißt
DIV	day in vitro
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DNA	deoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
DPBS	Dulbecco`s Phosphat Buffered Saline
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii (lateinisch, und andere)
Fe	Eisen
GABA	gamma-Aminobutric acid
GP	Globus pallidus
GSH	Glutathion
GPX	Glutathion Peroxidase
GDNF	glial-derived neurotrophic factor
GSSG	oxidiertes Glutathion
h	Stunden
HBSS	Hank`s balanced salt solution
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCL	Chlorwasserstoff
HSP	heat shock protein
6-OHD	6 Hydroxydopamin
IPS	Idiopathisches Parkinson-Syndrom
IGF	Insulin-like growth factor
IgG	Immunglobulin G
in vivo	lateinisch, im Lebendigen
in vitro	lateinisch, im Glas
LDH	Laktat-Dehydrogenase
L-DOPA	Levodopa (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin)

LRRK	Leucine rich repeat kinase
LK	Lewykörperchen
MAO	Monoaminoxidase
MPDP+	1-Methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium
MP	Morbus Parkinson
MPPP	1-Methyl-4-phenyl-4-propion-oxy-piperidin
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
MPP+	1-Methyl-4-phenylpyridinium
MRT	Magnetresonanztomographie
mtDNA	mitochondriale DNA
MHC	Major Histocompatibility Complex
NADH	Nicotin-Adenin-Dinucleotid
NAC	N-Acethylcystein
NC	Nucleus caudatus
NS	Nucleus subthalamicus
NM	Neuromelanin
nNOS	neuronale NOS
eNOS	endotheliae NOS
iNOS	induzierbare NOS
NGF	nerve growth factor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidanion
OH	Hydroxylradikal
Pq	Paraquat
PET	Positronen Emissions Tomographie
PI	Propidium Jodid
PINK	PTEN-induced putative kinase
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP3	Phosphatidyl-inositol-3,4,5-triphosphat
PLA2	Phospholipase A2
PTP	permeability transition pore
PBS	Phospate Buffered Saline
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
Ro	Rotenon

TH	Tyrosinhydroxylase
TCS	Transcranielle Hirnparenchymsonographie
TNF	Tumornekrosefaktor
TLR	toll-like-receptor
SNCA	synuclein alpha
SN	Substantia nigra
SNpc	Substantia nigra pars compacta
SNpr	Substantia nigra pars reticulata
SOD	Superoxid-Dismutase
SPECT	Single Photon Emissions Computed Tomography
STN	Nucleus subthalamicus
TNF	Tumornekrosefaktor
TLR	Toll-like Rezeptor
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UCHL	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1. Einleitung

## 1.1 *Morbus Parkinson: Idiopathisches Parkinson-Syndrom*

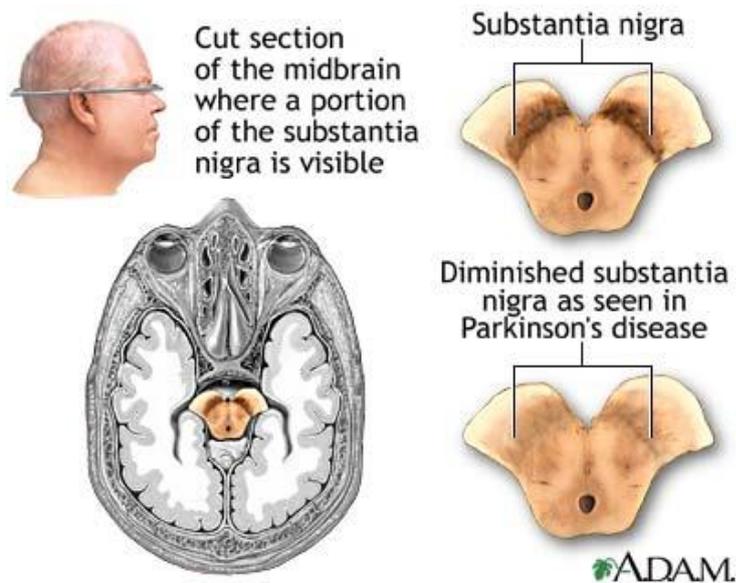
Das Idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS) kommt schleichend und ist bisher unheilbar. Weltweit gibt es rund 4 Millionen betroffene Patienten. Nach dem Morbus Alzheimer ist der Morbus Parkinson die zweithäufigste neurologische Erkrankung und betrifft etwa 1 Prozent der über 60jährigen und ca. 2,2 Prozent der über 85jährigen. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 62 Jahren. Bis zu 10 Prozent der Patienten sind bei der Diagnose jünger als 40 Jahre. Da die Häufigkeit mit steigendem Alter zunimmt, wobei das männliche Geschlecht etwas zahlreicher betroffen ist, muss aufgrund zunehmender Lebenserwartung in der Zukunft mit einer steigenden Zahl von Erkrankungen gerechnet werden (Samii et al. 2004) (Lau and Breteler 2006).

Ihren Namen erhielt die Krankheit vom Londoner Arzt und Apotheker James Parkinson, der im Jahre 1817 die Abhandlung „Essay on the Shaking Palsy“ veröffentlichte und darin sehr genau die wichtigsten Krankheitszeichen beschrieb (Parkinson, 1817).

Die Leitsymptome der Krankheit Rigor (Muskelsteifheit), Bradykinese /Akinese (langsame/fehlende Bewegung) und Tremor (unwillkürliches Zittern) sind typisch und häufig in unterschiedlicher Ausprägung zu beobachten. Oft treten als Frühsymptome Störungen der Schrift (Mikrographie) sowie der Sprache (Dysarthrophonie), Schlafverhaltensstörungen, Riechstörung (Hyposmie), neuropsychiatrische Störungen sowie vegetative Dysfunktionen auf (Rao et al. 2006) (Hawkes et al. 2007) (Hawkes et al. 2010) ([www.pdf.org/eu/clinicaltrials](http://www.pdf.org/eu/clinicaltrials)).

### 1.1.1 *Pathophysiologie*

Bereits in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts gelang ein wesentlicher Durchbruch hinsichtlich des Verständnisses dieser Krankheit. 1959 entdeckte Arvid Carlsson, dass der Neurotransmitter Dopamin (DA) im Gehirn von Parkinson-Patienten verringert vorkam. Diese Verarmung war die Folge der Degeneration dopaminerger Neurone in der Substantia nigra (SN).



**Abbildung 1** Lage der Substantia nigra im Horizontalschnitt

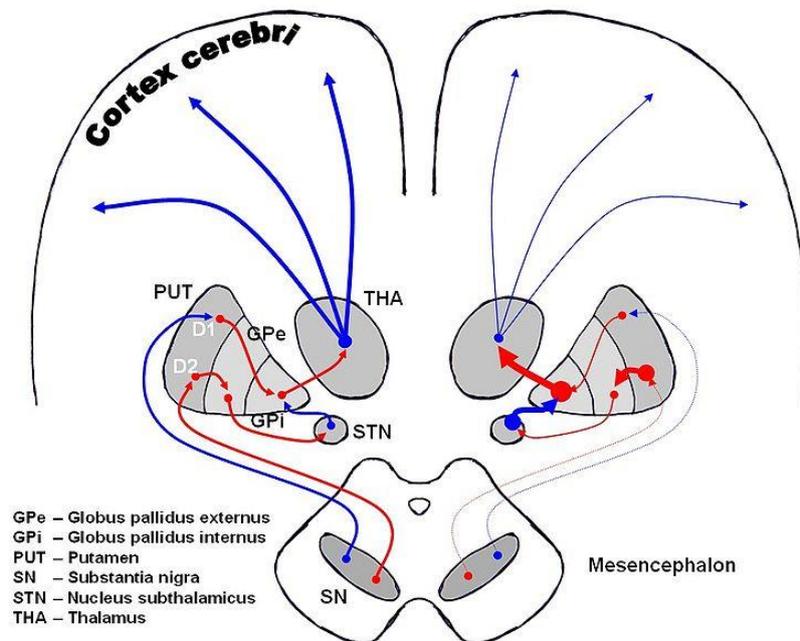
mit Pigmentierungsgrad beim Gesunden und beim Mb. Parkinson (unten rechts)  
 (<https://medlineplus.gov/ency/imagepages/19515.htm>)

Die Substantia nigra, eine Region im Mittelhirn, ist mit dem Striatum, einem Eingangskern der Basalganglien, einem wesentlichen Bestandteil des extrapyramidal-motorischen Systems, verschaltet. In der Substantia nigra wird vornehmlich Dopamin gebildet, welches als Botenstoff wichtige regulierende Eigenschaften hat. Durch den selektiven Verlust dieser dopaminergen Neurone in der SN und dem damit eintretenden Dopaminmangel im Striatum, dem Hauptprojektionsgebiet der SN, können bewegungsregulierende Signale nur ungenügend weitergeleitet und Bewegungen von motorischen Hirnregionen nicht mehr ausreichend koordiniert werden.

Die Basalganglien sind an einer Vielzahl von motorischen Funktionen, einschließlich Planung, Initiierung und Durchführung von Bewegungen beteiligt und bestehen aus folgenden Strukturen: dem Striatum (Nucleus caudatus), Putamen, Nucleus accumbens, dem Pallidum (externes und internes Segment des Globus pallidus und ventrales Pallidum), dem Nucleus subthalamicus (STN) und der Substantia nigra (SN). Die Substantia nigra besteht aus zwei Teilen: dem ventralen Teil, der Substantia nigra pars reticulata (SNr), und dem dorsalen Teil der Substantia nigra pars compacta (SNc).

Physiologisch sind die Basalganglien in einem Regelkreis zusammengeschlossen: erregende Impulse aus dem primär-motorischen und prä-motorischen Kortex gelangen dabei zunächst in das Striatum (genauer in seine Substruktur Putamen), das seinerseits über GABAerge Neurone hemmende Impulse an das Pallidum sendet. Das Pallidum hemmt nun über GABAerge Fasern den motorischen Thalamus, welcher die motorischen kortikalen Areale innerviert.

Durch den Ausfall der Substantia nigra (wie bei der Parkinson-Krankheit) kommt es zu einer verstärkten Hemmung des Thalamus und damit zu verminderter motorischer Aktivität (Akinesie oder Hypokinesie) die dabei gleichzeitig zur Erhöhung des Muskeltonus führt (Blandini et al. 2000) (Trepel 2004) (Benmoyal-Segal and Soreq 2006) (Obeso et al. 2008).



**Abbildung 2 Verschaltung für die bei der Parkinson-Erkrankung relevanten Gehirnregionen**

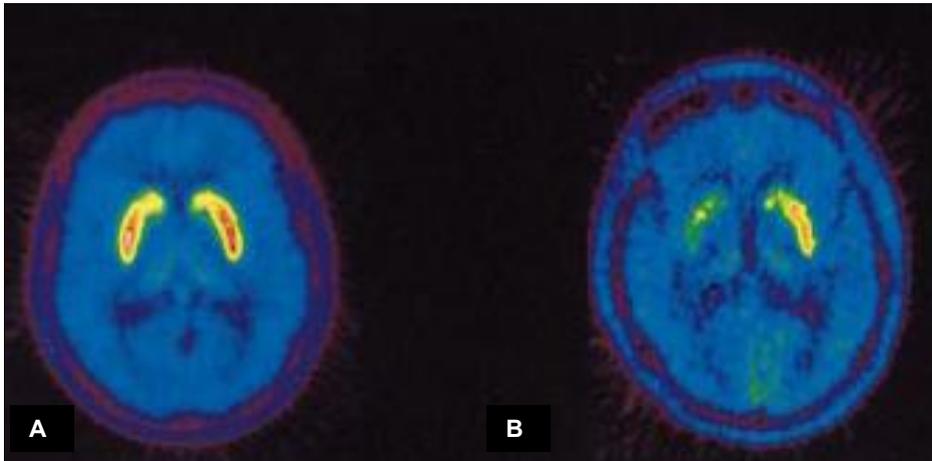
links: Verschaltung im gesunden Gehirn (rote Bahnen=Aktivierung, blaue Bahnen=Inhibition)  
 rechts: Verschaltung nach Ausfall der dopaminergen Innervierung aus der SN im Gehirn eines Parkinson-Patienten ([http://en.wikipedia.org/wiki/File:DA-loops\\_in\\_PD.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:DA-loops_in_PD.jpg))

Neuropathologische Untersuchungen der letzten Jahre zeigten allerdings, dass erste Zellveränderungen nicht in der Substantia nigra, sondern in tiefen Hirnstammregionen beginnen. Es ist auch nicht ausgeschlossen, dass die Parkinson-assoziierte Pathologie noch früher oder gleichzeitig mit den ersten Veränderungen im Hirnstamm, im Gastrointestinaltrakt beginnt (Braak et al. 2003) (Pan-Montojo et al. 2012).

Fatalerweise treten die ersten klinischen Symptome erst auf, wenn bereits 60 % der Substantia nigra-Neurone ihre Funktion eingestellt haben und der Dopamingehalt im Striatum unter 80% gesunken ist (Fearnley and Lees 1991).

Im Frühstadium der Krankheit ist es nicht einfach eine Diagnose zu stellen. Als strukturelle und funktionelle Bildgebung und als Unterstützung der Diagnose wird die Positronenemissionstomographie (PET) oder noch verbreiteter, da weniger aufwendig, die Single-Photon-Emissionscomputertomographie (SPECT) genutzt. Dabei wird entweder die Dichte der Dopamintransporter (DAT) gemessen oder wie in Abbildung 3, das von den dopaminergen Neuronen (via DAT) aufgenommene und gespeicherte F-Dopa. Also wird die

Dichte der dopaminergen Innervation des Striatums gemessen (Bain 2002) (Weng et al. 2004) (Brooks 2012).



**Abbildung 3** 18F-Dopa SPECT Analyse

Vergleich gesunder Proband und Parkinson-Patient

A) gesunde Kontrollperson B) Parkinsonpatient mit verminderter <sup>18</sup>F-Dopa-Aufnahme (Bain 2002)

### **1.1.2 Genetische Faktoren**

Etwa 10-15% der Parkinson-Krankheitsfälle haben ihre Ursache in der Mutation bestimmter Gene und werden zu den familiären Formen gezählt (Gasser 2007). Die genetischen Ursachen der Parkinson-Krankheit sind heute zum Teil sehr gut charakterisiert. Bisher sind 18 Gen-Loci für die seltenen vererbten Formen des IPS beschrieben (siehe Tabelle 1). Sie werden als PARK-Gene bezeichnet und obwohl sie nur selten vorkommen, haben sie stark zum Verständnis der Krankheit beigetragen.

<b>Locus und Position</b>	<b>Gen</b>	<b>Vererbung</b>	<b>Proteinfunktion (soweit bekannt)</b>
<b>PARK 1 &amp; PARK 4</b> (4q21)	SNCA ( $\alpha$ -Synuklein)	dominant	Synaptische Plastizität
<b>PARK 2</b> (6q25.2-27)	Parkin	rezessiv	Ubiquitin E3 Ligase
<b>PARK 3</b> (2q13)	unbekannt	dominant	unbekannt
<b>PARK 5</b> (4q14)	UCHL 1	dominant	C-terminale Ubiquitin Hydrolase
<b>PARK 6</b> (1p35-36)	PINK 1	rezessiv	Mitochondriale Kinase
<b>PARK 7</b> (1p36)	DJ-1	rezessiv	Schutz gegen oxidativen Stress
<b>PARK 8</b> (12p11.2)	LRRK 2	dominant	Signaltransduktion, Zytoskelettdynamik, Proteintranslation
<b>PARK 9</b> (1p36)	ATP13A2	rezessiv	unbekannt
<b>PARK 10</b> (1p32)	unbekannt	dominant	unbekannt
<b>PARK 11</b> (2p37)	GIGYF2	dominant	IGF-I Signaltransduktion
<b>PARK 12</b> (Xp21-q25)	unbekannt	x-chromosomal	unbekannt
<b>PARK 13</b> (2p13)	Omi/HtrA2	unbekannt	Mitochondriale Serinprotease
<b>PARK 14</b> (22q13)	PLA2G6	rezessiv	Phospholipase Enzym
<b>PARK 15</b> (22q11)	FBX07	rezessiv	Ubiquitin E3 Ligase
<b>PARK 16</b> (1q32)	unbekannt	unbekannt	unbekannt
<b>PARK 17</b> (Chromosom 4p)	GAK/DGKQ	unbekannt	Cyclin G-assoziierte Kinase Diacylglycerol Kinase
<b>PARK 18</b> (6p21.3)	HLA DRA	unbekannt	Klasse II HLA-DR Antigene

**Tabelle 1 Bekannte Mutationen von chromosomal codierten Proteinen beim Morbus Parkinson**

modifiziert nach (Eschbach & Danzer, 2013)

SNCA ( $\alpha$ -Synuklein) ist das am besten untersuchte Gen und Schwerpunkt dieser Arbeit. Es wird im Detail in Abschnitt 1.2 beschrieben. Die häufigste Form des autosomal-dominant vererbten Parkinson-Syndroms stellt LRRK2 (leucin-rich repeat kinase 2) dar. Etwa 10 % der familiären Fälle sowie 2-3% der sporadischen Fälle tragen eine Mutation in diesem Gen. Die häufigsten Ursachen des früh beginnenden, rezessiv vererbten Parkinson-Syndroms, sind homozygote Mutationen im PRKN-Gen (Parkin) und im PINK1-Gen (PTEN-induced putative kinase 1). Ähnlich wie Parkin und PINK1 verursachen homozygote Mutationen auf dem DJ-

1-Gen ein früh beginnendes Parkinson-Syndrom. Diese Mutationen kommen jedoch seltener vor. Eine weitere Reihe an PARK-Loci und Genen werden mit dem Auftreten eines familiären Parkinsons assoziiert (Tab.1). Ihre Relevanz sowie Funktionen sind zum Teil jedoch unklar und konnten bisher nur in einzelnen Familien nachgewiesen werden (Thomas and Beal 2007) (Bonifati 2013).

### **1.1.3 Therapiemöglichkeiten**

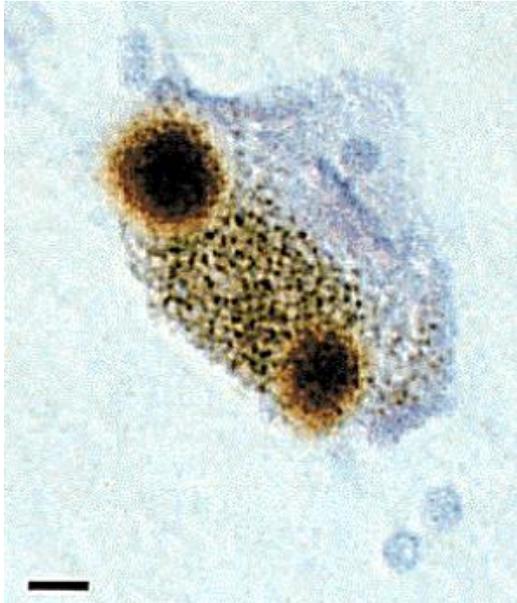
Der Morbus Parkinson ist eine neurodegenerative Erkrankung des ganzen Gehirns und beschränkt sich nicht nur auf den Untergang dopaminerger Zellen in der Substantia nigra. Dennoch setzen hier medikamentöse Therapien an und behandeln die Krankheit durch Gabe von Levodopa (L-DOPA), einer Vorstufe des Dopamins, welches im Gegensatz zu Dopamin die Bluthirnschranke passieren kann und in dopaminergen Neuronen zu Dopamin umgewandelt wird. Die Gabe von reinem L-DOPA ist mit vielen Nebenwirkungen verbunden, sodass die Umwandlung zum Dopamin nur auf den Bereich des Nervensystems beschränkt werden soll. Dazu werden DOPA-Decarboxylase-Hemmer verabreicht, welche in der Peripherie den Umbau von L-DOPA zu Dopamin vermindern. Der Abbau von L-DOPA kann außerdem durch die Behandlung mit einem Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT)-Hemmer oder Monoaminoxidase-B (MAO-B)-Hemmer verhindert werden (Riederer 2003) (Rao et al. 2006).

Auch der Einsatz von NMDA-Rezeptorantagonisten, welche die Aktivität exzitatorischer glutamaterger Neurone hemmen, die bei der Parkinson-Krankheit überaktiv sind, ist bei der Therapie möglich. Darüber hinaus kommen immer mehr Dopaminagonisten, die direkt die Dopaminrezeptoren stimulieren und in Studien auch neuroprotektive Eigenschaften zeigen, zum Einsatz. Klinische Erfahrungen und Studien belegen außerdem, dass eine früh eingeleitete Therapie den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen kann. Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, wie wichtig eine frühe Diagnose und möglicherweise eine neuroprotektive Behandlung ist (Alexi et al. 2000) (Gerlach et al. 2003) (Olanow and Schapira 2013).

Eine weitere Behandlungsform die erwiesenermaßen manche Symptome des IPS lindert ist die Tiefe Hirnstimulation (engl. Deep brain stimulation =DBS). Bei dieser Therapie wird versucht mit Hilfe elektrischer Stimulation überaktive Hirnregionen zu dämpfen (Hariz 2014). Schon längere Zeit sind auch operative Therapie-Ansätze wie Transplantationen von dopaminproduzierendem Gewebe in den Basalganglienbereich des Gehirns von Parkinson-Patienten im Gespräch, jedoch konnten bis jetzt noch keine Langzeitverbesserungen gesichert werden (Bjorklund and Kordower 2013). Auch Behandlungen durch Gentherapie zeigen in klinischen Studien erste Anzeichen von Erfolg (Feng and Maguire-zeiss 2010) (Allen and Feigin 2013).

### 1.1.4 Lewy-Körperchen-das histopathologische Merkmal beim IPS

Ein neuropathologisches Charakteristikum der Parkinson-Erkrankung sind Einschlusskörperchen im Zytoplasma der verbleibenden dopaminergen Neurone in der Substantia nigra, die so genannten Lewy-Körperchen (englisch: Lewy-Bodies).



**Abbildung 4** Lewy-Körperchen in der Substantia nigra

immunhistologische Färbung von  $\alpha$ -Syn  
(Ritchie and Thomas 2012)

Sie wurden nach ihrem Entdecker Friedrich Lewy benannt, der sie 1912 im Gehirn von IPS-Patienten als erster identifizierte. Es handelt sich hierbei um runde bis zu 25  $\mu$ m durchmessende intrazelluläre, zytoplasmatische Einschlusskörperchen, mit einem dichten eosinophilen Kern und einer hellen äußeren, ringförmigen Struktur. Sie bestehen vor allem aus Proteinablagerungen, wie zum Beispiel  $\alpha$ -Synuklein, Ubiquitin und Neurofilament (Tofaris and Spillantini 2005) (Shults 2006) (Wakabayashi et al. 2007).

Färbungen mit Antikörpern gegen Amino- und Carboxyl-terminaler Sequenz von  $\alpha$ -Synuklein zeigten, dass  $\alpha$ -Synuklein nahezu in voller Länge und auch als Hauptkomponente in den Lewy-Körperchen enthalten ist (Spillantini 1998) (Tofaris and Spillantini 2005) (Mukaetova-ladinska and Mckeith 2006) (Luk and Lee 2014). Nach wie vor ist nicht völlig geklärt, ob sie ursächlich an der Pathogenese der Erkrankung teilnehmen oder ob es sich um einen Schutzmechanismus der Zellen handelt, der dazu dient, Proteinaggregate in unschädlichen Formen abzulagern.

### **1.1.5 Ursachen des Idiopathischen Parkinson-Syndroms**

Trotz intensiver Pathogeneseforschung sind die molekularen Ursachen des Morbus Parkinson noch unklar. Die Krankheit kann sowohl sporadisch als auch familiär gehäuft auftreten. Als Ursache der sporadischen Erkrankungsformen geht man von einem Zusammenspiel von Umweltfaktoren, Alterserscheinung und genetischer Prädisposition aus (Ramsden et al. 2001) (Shastry 2001) (Thomas and Beal 2007) (Kiebertz and Wunderle 2013).

Die Bedeutung der genetischen Faktoren für die Entstehung der Krankheit wurde in der Vergangenheit als gering eingeschätzt, da in der Mehrzahl der Fälle das IPS, zumindest auf den ersten Blick, sporadisch auftritt. Bei einem Teil der Patienten finden sich familiäre Häufungen ohne klaren Vererbungsmodus, nur bei wenigen lässt sich eindeutig ein dominanter oder rezessiver Erbgang identifizieren (Olanow and Tatton 1999) (Gasser 2007) (Kiebertz and Wunderle 2013).

Die Hypothese, dass Alterungsprozesse Auslöser des IPS sein könnten, ist darin begründet, dass mit fortschreitendem Alter apoptotische Degenerationsvorgänge zunehmen, Reparaturmechanismen und Regeneration immer mehr eingeschränkt werden, die Anzahl nigraler Neurone abnimmt und der nigrale Dopaminspiegel sinkt (Kish et al. 1992), zudem auch die zunehmende Prävalenz im Alter. Für die Beteiligung von Umweltfaktoren spricht ein erhöhtes Erkrankungsrisiko in Industrienationen (Olanow 2007).

Neben diesen Theorien haben Forschungsergebnisse der letzten Jahre nahegelegt, dass vor allem exogene und endogene Toxine bei der Entstehung des Idiopathischen Morbus Parkinson eine Rolle spielen könnten. Vor etwa 25 Jahren konnte gezeigt werden, dass nach Einnahme der Substanz MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin) ein dem IPS ähnliches Krankheitsbild entsteht. MPTP ist ein Neurotoxin, das bei der unsachgemäßen Herstellung von MPPP (1-Methyl-4-phenyl-4-propion-oxy-piperidin), einer Designerdroge, entsteht. MPTP wird in den Zellen zu MPP<sup>+</sup> umgewandelt, welches neurotoxisch wirkt. Menschen, die sich eine Mischung aus MPPP und MPTP injiziert hatten, zeigten typische Symptome der Parkinson-Krankheit (Calne and Langston 1983).

Eine Vielzahl veröffentlichter Studien liefern einen Hinweis darauf, dass Pestizide wie zum Beispiel Rotenon und Paraquat zur Pathogenese der Parkinson-Krankheit beitragen können. Es wird beschrieben, dass in Tiermodellen nach der Behandlung mit Pestiziden histologische Veränderungen im Gehirn auftreten, die sich im klinischen Erscheinungsbild ähnlich dem IPS äußern (Semchuk et al. 1992) (Gorell et al. 1998) (Shastry 2001) (Hirata and Nagatsu 2005) (Phinney et al. 2006) (Le et al. 2013).

Als weitere exogene potentielle Neurotoxine werden Metalle und Schwermetalle (Aluminium, Mangan, Eisen) diskutiert (Hirsch et al. 1991) (Gorell et al. 1999). Auch  $\beta$ -Carboline, heterozyklische Indolalkaloide mit struktureller Verwandtschaft zu dem dopaminergen

Neurotoxin MPP+, scheinen einen möglichen Beitrag zur Pathogenese der Parkinson-Krankheit zu liefern.  $\beta$ -Carboline sind in verschiedenen Nahrungs- und Genussmitteln enthalten, können aber auch aus endogenen Quellen stammen (Hamann et al. 2008) (Polanski et al. 2010).

Eine andere Hypothese geht von der zytotoxischen Wirkung von im Stoffwechsel entstehenden Oxyradikalen aus (oxidativer Stress). Defekte zelluläre Radikalentgiftungsmechanismen, Störungen im mitochondrialen Energiestoffwechsel, Exzitotoxizität, inflammatorische Vorgänge oder eine pathologische Akkumulation von Eisen-Ionen ( $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen) im Neuromelanin der dopaminergen Neurone der Substantia nigra werden als Auslöser oxidativen Stresses diskutiert (Brandis 2006) (Olanow 2007) (Miller et al. 2009).

## **1.2 $\alpha$ -Synuklein**

### **1.2.1 Die pathologische Bedeutung von $\alpha$ -Synuklein bei der Parkinson-Krankheit**

Es gibt einen neuen Therapieansatz für die Parkinson-Krankheit, der sich in der Phase I der klinischen Studie befindet. Es soll ein therapeutischer Impfstoff gegen  $\alpha$ -Synuklein ( $\alpha$ -Syn), einem Protein, dem schon seit längerem eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der Parkinson-Krankheit zugeschrieben wird, entwickelt werden (Schneeberger et al. 2012) ([www.affiris.com](http://www.affiris.com) 08/2014). Dieses Protein steht unter Verdacht, sich bei der Erkrankung in Aggregaten in den Nervenzellen anzureichern und sich im weiteren Verlauf im Gehirn auszubreiten. Schon die Identifikation von Mutationen auf dem  $\alpha$ -Synuklein-Gen bei seltenen Fällen von familiärer Parkinson-Krankheit zeigen, dass ein direkter Zusammenhang zwischen  $\alpha$ -Synuklein und der Entstehung der Parkinson-Erkrankung besteht (Polymeropoulos et al. 1996).

Die Entdeckung von aggregiertem  $\alpha$ -Synuklein als Hauptkomponente der für die Parkinson-Krankheit ätiopathogenetisch bedeutsamen Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten zeigt weiter seine Bedeutsamkeit in der Pathologie des Parkinson (Spillantini 1998).

Außerdem konnte in  $\alpha$ -Synuklein-transgenen Mausmodellen sowie bei viraler Überexpression von Wildtyp und mutierten  $\alpha$ -Synuklein in Zellkulturmodellen gezeigt werden, dass eine höhere Anfälligkeit entsteht, parkinsonähnliche Syndrome zu entwickeln oder sogar das Parkinson-Syndrom induziert wird (Eschbach & Danzer, 2013).

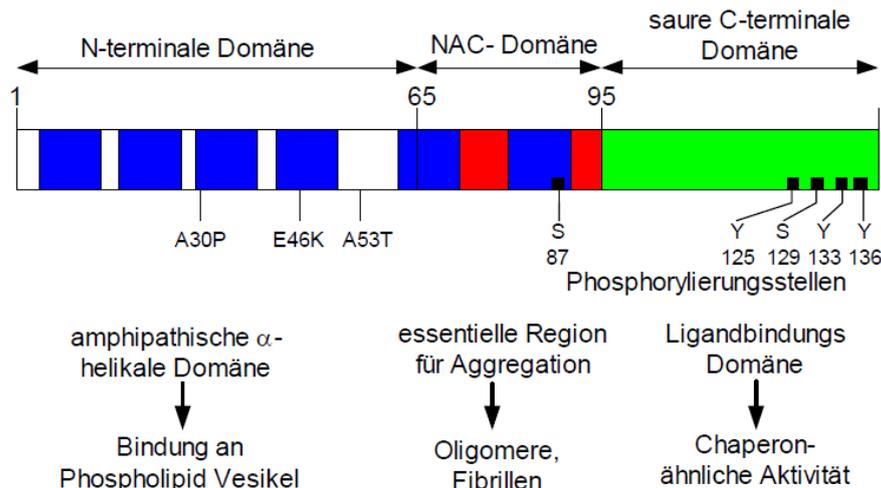
$\alpha$ -Synuklein spielt nicht nur in der Parkinson-Krankheit eine wichtige Rolle, sondern auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen, die mit Aggregat-Ablagerungen von  $\alpha$ -Synuklein einhergehen wie zum Beispiel Demenz mit Lewy Körperchen und Multisystematrophien.

### **1.2.2 Entdeckung und Proteinstruktur des $\alpha$ -Synuklein**

$\alpha$ -Synuklein wurde erstmalig im elektrischen Organ des Zitterrochens (*Torpedo californica*) entdeckt und erhielt seinen Namen aufgrund seiner Lokalisierung in der Synapse und im Nukleus (Maroteaux 1988). In Verbindung mit neurodegenerativen Erkrankungen wurde  $\alpha$ -Synuklein erstmals durch seine Entdeckung innerhalb von Alzheimer Plaques im Gehirn gebracht (Ueda et al. 1993) (Jakes et al. 1994).

In nachfolgenden Studien wird beschrieben, dass  $\alpha$ -Synuklein ein zytoplasmatisches Protein ist, das sich überwiegend an den Präsynapsen ansammelt (Masliah et al. 1996)(Petersen et al. 1999). Das Protein hat ein Molekulargewicht von 14 kDa und wird in hohem Maße im Gehirn, in der Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit und in geringem Maße im Muskel, in Hirnblutgefäßen, roten Blutzellen, im Plasma und in Blutzellen des Immunsystems exprimiert (Borghi et al. 2000) (Seo et al. 2004) (El-Agnaf et al. 2006) (Barbour et al. 2008). Zur Proteinfamilie der Synukleine gehören hauptsächlich die drei Homologe:  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Synuklein. Sie sind zwischen 127 und 140 Aminosäuren lang und zu etwa 60% identisch. Außer dem Volllängenprodukt mit 140 Aminosäuren (AS) sind noch zwei verkürzte Isomere mit 126 bzw. 112 Aminosäuren bekannt. Im nativen Zustand kommt  $\alpha$ -Synuklein ungefaltet vor. An der N-terminalen Seite des Proteins findet man sechs unvollständige Wiederholungssequenzen, die durch das hexamerische Konsensusmotiv KTKEGV verbunden sind. Im Anschluss an die Wiederholungssequenzen befindet sich der Mittelteil mit den hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren. Er enthält die sehr hydrophobe NAC-Domäne (AS61-95) mit dem fibrillenbildenden Partikel (AS71-82), welcher essentiell für die Aggregation des Proteins zu Fibrillen ist. Diese zentrale Peptidregion hat die Fähigkeit, selbstständig Fibrillen und  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen auszubilden (Duda et al. 2000) (Giasson et al. 2001) (Ardah et al. 2014).

Der C-Terminus besitzt bei physiologischem pH-Wert viele negative Ladungen sowie mehrere Phosphorylierungsstellen, während sich die NAC-Domäne in einem durch hydrophobe Aminosäureketten dominierten Bereich befindet (Okochi et al. 2000) (Abb.5).



**Abbildung 5 Schematische Darstellung des humanen  $\alpha$ -Synukleins**

Struktur: N-terminale Domäne in blau, NAC-Domäne in rot/blau und die C terminale Domäne in grün modifiziert nach (Eschbach & Danzer, 2013)

$\alpha$ -Synuklein gehört zu den intrinsisch ungeordneten Proteinen, die je nach Umgebung verschiedenste Konformationen annehmen können (Dunker et al. 2001).

Nach Interaktion mit sauren, phospholipidhaltigen Vesikeln nimmt  $\alpha$ -Synuklein eine Struktur mit hoher  $\alpha$ -helikaler Neigung ein (Eliezer et al. 2001).

Strukturuntersuchungen an der ungebundenen Form des Proteins zeigen, dass es  $\alpha$ -Synuklein in über eintausend verschiedenen strukturellen Konformationen geben kann (Dedmon et al. 2005). Viele dieser Konformationen umfassen lange Teilstücke der Aminosäurekette (15-20 Aminosäuren). Es gibt Wechselwirkungen zwischen dem C-Terminus, dem N-Terminus sowie dem zentralen Teil des Proteins. Einige Studien legen nahe, dass eine Störung dieser Wechselwirkungen eine aggregierte Form des Proteins fördern könnten (Bertoncini et al. 2005) (Deleersnijder et al. 2013).

Auch oxidativer Stress und freie reaktive Radikale können Auswirkungen auf die Proteinfaltung von  $\alpha$ -Synuklein haben. Eine erhöhte Eisen- sowie Lipidperoxidkonzentration in der Zelle können zur Oxidation, Nitrierung oder Phosphorylierung in der carboxylterminalen Region des Proteins führen, was wiederum zur Förderung der Polymerisation beiträgt (Giasson and Lee 2000)(Murray et al. 2003). In präsynaptischen Nervenendigungen liegen  $\alpha$ -Synuklein-Monomere sowohl in freier als auch in einer Vesikel- bzw. Plasmamembrangebundenen Form vor, wobei ca. 15 % des  $\alpha$ -Synukleins membrangebunden sind (McLean 2000) (Lee and Lee 2002) (Alderson and Markley 2014).

### **1.2.3 Physiologische Funktionen des $\alpha$ -Synuklein**

Bis heute sind noch nicht alle physiologischen Funktionen von  $\alpha$ -Synuklein verstanden (Burré et al. 2010) (Fortin et al. 2010). Eine wichtige Funktion ist der Einfluss auf die synaptische Plastizität. George et al. konnte 1995 nachweisen, dass während der Lernphase von Balzliedern bei Zebrafinken  $\alpha$ -Synuklein in erhöhtem Maße in bestimmten Neuronen präsynaptisch exprimiert wird (George et al. 1995). Eine weitere wichtige bekannte Funktion ist sein Einfluss auf den Dopaminstoffwechsel.  $\alpha$ -Synuklein ist in der Lage, die Menge an Dopamintransportern (DAT) in der Plasmamembran zu regulieren. Dabei kann  $\alpha$ -Synuklein den Transfer des DAT sowohl steigern als auch vermindern (Wersinger et al. 2003). Außerdem gibt es Hinweise, dass  $\alpha$ -Synuklein die Dopaminbiosynthese durch Reduktion der Tyrosinhydroxylase-Aktivität hemmt (Perez et al. 2002).

Dass  $\alpha$ -Synuklein als präsynaptischer Regulator auch Einfluss auf die Dopaminausschüttung hat, konnte durch  $\alpha$ -Synuklein-knockout (KO) in Mäusen und Zellkulturen nachgewiesen werden (Abeliovich et al., 2000) (Murphy et al. 2000) (Cabin et al. 2002).

Das Protein wirkt weiterhin als ein potenter *in vitro* Inhibitor der Phospholipase D2 und kann damit durch die Inhibition der Phosphatidsäureproduktion indirekt Einfluss auf die Aktivierung von Kinasen, die Regulation von Guanosintriphosphat-bindenden Proteinen und auf die Vesikelformation im Trans-Golgi Netzwerk ausüben (Payton et al. 2004) (Gorbatyuk et al. 2010).

Neuere Hinweise zeigen, dass  $\alpha$ -Synuklein eine Chaperonfunktion besitzen könnte, da es in seinen biochemischen Eigenschaften und seiner Struktur denen eines Chaperonproteins ähnelt (Witt 2014). Diese Proteine sind in der Lage, Fehlfaltungen eines Proteins zu verhindern. Beim mutierten  $\alpha$ -Synuklein könnte nun diese Eigenschaft fehlen und so zu den Ablagerungen von Proteinen zum Beispiel in Lewy-Körperchen führen (Ostrerova et al. 1999)(George 2001).

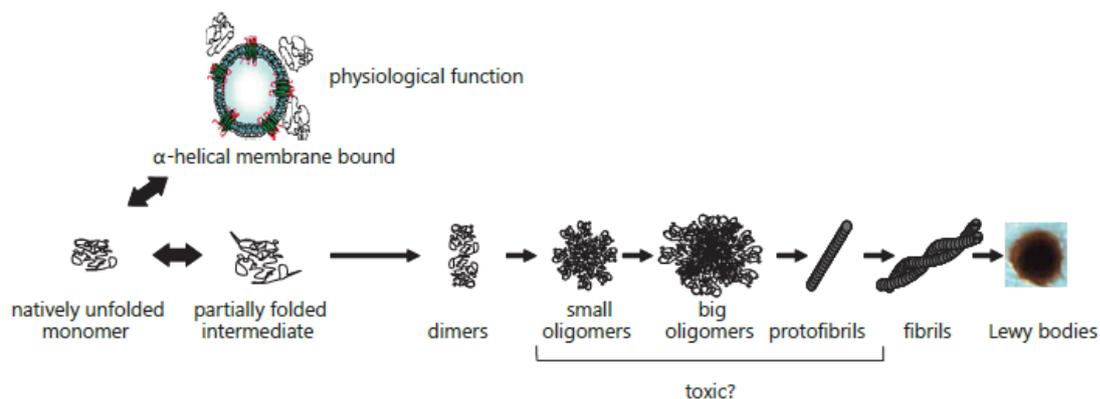
Die pathologischen Mechanismen, die zur abnormen Aggregation von  $\alpha$ -Synuklein führen, sind weitgehend unbekannt. Auch weitere physiologische Funktionen des Proteins sowie die Art und Weise seines Abbaus bleiben umstritten. Sowohl das Ubiquitin-Proteasom-System und der Autophagie-Lysosomen-Weg scheinen eine Rolle zu spielen (Webb et al. 2003)(Cuervo 2004). Da es in beiden Systemen auch mit dem Altern einen Aktivitätsrückgang gibt, könnte der dysfunktionale Abbau von  $\alpha$ -Synuklein eine zentrale Bedeutung bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Chorea Huntington haben (Pan et al. 2008).

### 1.2.4 Aggregatbildung

Ein großer Teil der Literatur unterstützt die Hypothese, dass  $\alpha$ -Synuklein bei Punktmutationen oder erhöhter Expression anfällig für Aggregationen ist und damit Neuronen geschädigt werden. Die Aggregation von  $\alpha$ -Synuklein scheint bei der Entstehung des Parkinson-Syndroms eine zentrale Rolle zu spielen. Man nimmt an, dass der Vorgang der Aggregatbildung vom Monomer zur Fibrille folgendermaßen abläuft:

Durch Dimerisierung bilden sich aus den Monomeren verschiedene Formen von löslichen Oligomeren, sogenannte Protofibrillen, welche sich weiter zu unlöslichen Fibrillen aggregieren können oder als Oligomer verbleiben.

Diese Protofibrillen erscheinen als kleine, über das gesamte Zytoplasma verteilte Aggregate, die sich zu unlöslichen Fibrillen mit  $\beta$ -Faltblattstruktur und amyloid-ähnlichen Filamenten verbinden können, bevor sie sich zu größeren fibrillären Strukturen zusammenfügen (Lee & Lee, 2002) (Caughey 2003) (Munishkina 2003) (Abb. 6).



**Abbildung 6 Schematische Darstellung der  $\alpha$ -Synuklein Aggregation**

(Eschbach & Danzer, 2013)

In der  $\beta$ -Faltblatt-Struktur kann sich  $\alpha$ -Synuklein an verschiedene andere Proteine wie zum Beispiel Synphilin, einem präsynaptischen Protein, binden. Der apoptotische Tod der Neurone kann jedoch sowohl durch wildtypische als auch mutierte Aggregate von  $\alpha$ -Synuklein ausgelöst werden. (El-agnaf et al. 1998)

Zunächst wurde die fibrilläre Form von  $\alpha$ -Synuklein, wie sie in den Lewy Körperchen vorkommt, als die toxische angesehen. Immer mehr Hinweise deuten darauf hin, dass die Neurotoxizität von  $\alpha$ -Synuklein hauptsächlich durch oligomere oder protofibrilläre Proteinformen verursacht wird (Lansbury and Lashuel 2006) (Eisbach and Outeiro 2013) (Eschbach & Danzer, 2013) (Stöckl et al. 2013). Ein Beleg dafür ist, dass es bei Überexpression von  $\alpha$ -Synuklein im Zellkulturmodell zu Apoptose und Schädigung der

Zellorganellen ohne Ausbildung von Fibrillen kommt (Gosavi et al. 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Co-Expression von HSP70 (sogenanntes Hitzeschockprotein und wichtige Komponente des Chaperonsystems) und  $\alpha$ -Synuklein im Gegensatz zur alleinigen Expression von  $\alpha$ -Synuklein zu einem verminderten Zelltod führt, jedoch ohne Veränderung der Anzahl an Einschlusskörperchen (Auluck et al. 2002).

Es wird vermutet, dass die Protofibrillen Membranen permeabilisieren können und so zum Beispiel auch Speichervesikel, die das oxidationsanfällige Dopamin enthalten, freisetzen (Volles et al. 2001). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass  $\alpha$ -Synuklein-Oligomere die energieverzehrenden Mitochondrien und die zellulären Abfall abbauenden Lysosomen permeabilisieren (Hashimoto et al. 2003) und auch die Mikrotubuli, Hauptkomponenten des an Transportprozessen beteiligten Zytoskeletts, schädigen können (Abdul et al. 2004). In einer weiteren Studie konnte sogar direkt ein toxischer Effekt durch präfibrilläre  $\alpha$ -Synuklein-Konstrukte gezeigt werden (Karpinar et al. 2009).

Da Lewy-Körperchen mit  $\alpha$ -Synuklein-Aggregaten vor allem postmortal bei Parkinson-Patienten gefunden wurden, kann man von der Theorie ausgehen, dass sie als Schutzmaßnahme der Zellen gebildet werden und somit auch neuroprotektiv sein könnten. Dazu passt die Beobachtung, dass Neurone, die Lewy-Körperchen enthalten, schließlich die überlebenden Neurone sind und unter dem Mikroskop stabiler aussehen als die verbleibenden Neurone, die keine Lewy-Körperchen aufweisen (Goldberg and Jr 2000). Bekräftigt wird diese Hypothese durch Versuche mit einer Substanz, welche die Bildung von Einschlusskörperchen in einem Parkinson-Zellkulturmodell fördert und interessanterweise die toxischen Auswirkungen von  $\alpha$ -Synuklein hemmt (Bodner et al. 2006).

Da noch nicht alle Funktionen von  $\alpha$ -Synuklein eindeutig belegt sind, versucht man durch die Beobachtung der zellulären Lokalisation des Proteins in Zellkulturen und Tiermodellen Hinweise auf seine weiteren Funktionen zu bekommen.

In neuronalen Zellen konnte  $\alpha$ -Synuklein außer im Zytoplasma auch im Zellkern nachgewiesen werden (Ma et al. 2013). Seine Lokalisation im Zellkern ist noch wenig erforscht. Man weiß, dass eine vermehrte Einschleusung von  $\alpha$ -Synuklein in den Zellkern zu erhöhter Toxizität beitragen kann, indem es die Azetylierung der Histone hemmt und somit zu Inaktivierung von Genen führt (Kontopoulos et al. 2006a).

Studien in Rattengehirnen ergaben, dass etwa 15% des  $\alpha$ -Synuklein membrangebunden vorkommt (Lee et al. 2002a). Viele Forscher gehen davon aus, dass Veränderungen in der Interaktion von  $\alpha$ -Synuklein mit der Membran ausschlaggebend sein könnten für Störungen im Vesikeltransport und der synaptischen Plastizität (Clayton and George 1998) (Clayton and George 1999) (Auluck et al. 2010).

Sicher scheint, dass die Aggregationsprozesse die physiologischen Funktionen des  $\alpha$ -Synuklein beeinträchtigen, durch ihre Größe Transportvorgänge in der Zelle hemmen und so

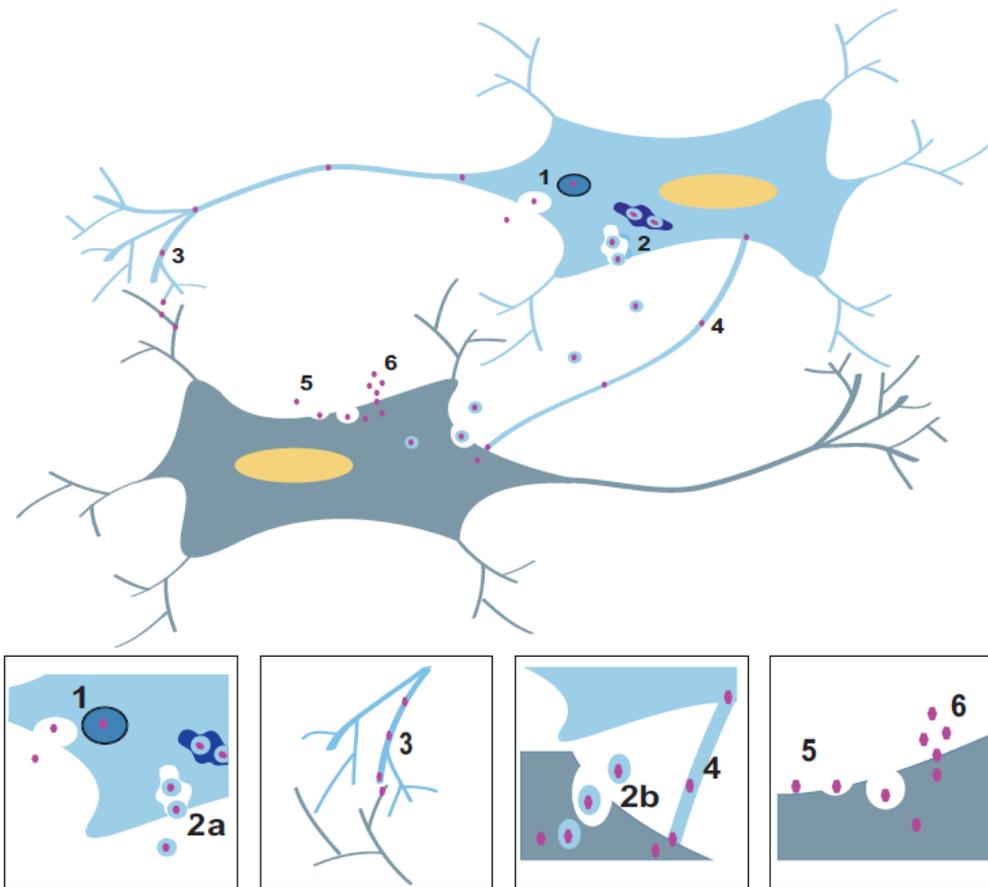
zur Degeneration dopaminergener Neurone beitragen können. Bisher ist ungeklärt, welche Ursache der Aggregation zu Grunde liegt.

### **1.2.5 Transmission von $\alpha$ -Synuklein**

Obwohl sich der Hauptfokus der  $\alpha$ -Synuklein Forschung bisher auf die intrazelluläre Aggregation und Toxizität von  $\alpha$ -Synuklein beschränkt hat, mehren sich die Beweise, dass es auch extrazellulär vorkommt und ein Transfer des Proteins zwischen den Zellen stattfindet. Es ist seit mehreren Jahren bekannt, dass  $\alpha$ -Synuklein abgesondert werden kann und in Liquor, Speichel, Plasma sowie in Zellkulturmedien nachgewiesen wurde (Lee et al. 2005b) (Jang et al. 2010).

Ein ganz entscheidenden Hinweis auf eine Transmission von pathologischem  $\alpha$ -Synuklein lieferten die Ergebnisse erster Transplantationsstudien. Es wurden dabei Patienten mit IPS primäre dopaminerge Nervenzellen von abgetriebenen Fetten transplantiert. Nach dem Tod der Patienten erfolgte eine neuropathologische Aufarbeitung der Gehirne, in denen Lewy-Körperchen auch in den neu transplantierten Zellen nachweisbar waren (Kordower et al. 2008). (Li et al. 2008) Der Mechanismus und die Ursache der Ausbreitung bleiben aber nach wie vor ungeklärt.

Desweiteren konnte in *in vitro* Studien deutlich gezeigt werden, dass in Exosomen enthaltenes und auch freies  $\alpha$ -Synuklein sekretiert und von anderen Zellen aufgenommen werden kann (Alvarez-Erviti et al. 2011b) (Danzer et al. 2012) (Chang et al. 2013). Der Transfer von  $\alpha$ -Syn von Zelle zu Zelle scheint eine wichtige Rolle bei der pathologischen Degeneration des dopaminergen Systems zu spielen (Luk and Lee 2014). Theoretisch mögliche Mechanismen des Transfers sind in Abb. 7 zusammengefasst.

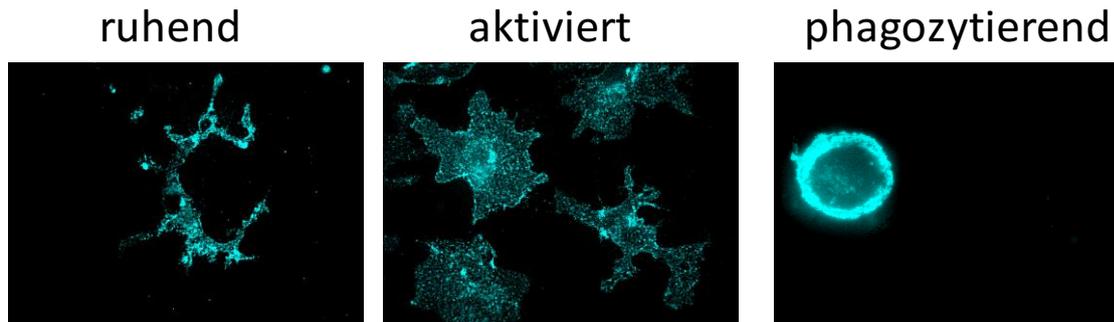


**Abbildung 7** Mögliche Mechanismen des  $\alpha$ -Synuklein Transfer von Zelle zu Zelle

1) in exozytotischen Vesikeln, 2 a,b) in Exosomen, 3) direkt von Zelle zu Zelle über Synapsen, 4) Transport über Prion-Proteine, 5) Endozytose, 6) passive Diffusion (Dunning et al. 2012)

### 1.2.6 $\alpha$ -Synuklein und Inflammation

Ein weiterer wichtiger Ansatzpunkt ist die Möglichkeit, dass  $\alpha$ -Synuklein eine inflammatorische Reaktion auslöst und so an den neurodegenerativen Prozessen beteiligt ist. Wie die Immunantwort ausgelöst wird, ist noch nicht richtig verstanden, aber es gibt die These, dass  $\alpha$ -Synuklein als Initiator nicht nur an der Pathogenese, sondern auch an der Mikroglia-Aktivierung beteiligt ist. Inflammatorische Prozesse werden im Hirngewebe hauptsächlich von den Mikrogliazellen vermittelt. Diese immunkompetenten Gliazellen sind postnatal aus der Blutbahn eingewanderte Zellen und entsprechen den immunkompetenten Makrophagen. Man unterscheidet drei Hauptstadien von Mikroglia: die ruhende Mikrogliazelle, wie sie im normalen ausgereiften Gehirn vorkommt, die aktivierte, nicht phagozytierende Mikroglia, die im Bereich der Inflammation zu finden ist, und schließlich die reaktive, phagozytierende Mikroglia, die in der Lage ist, Fremdkörper und Zellfragmente aufzunehmen (Minagar et al. 2002).



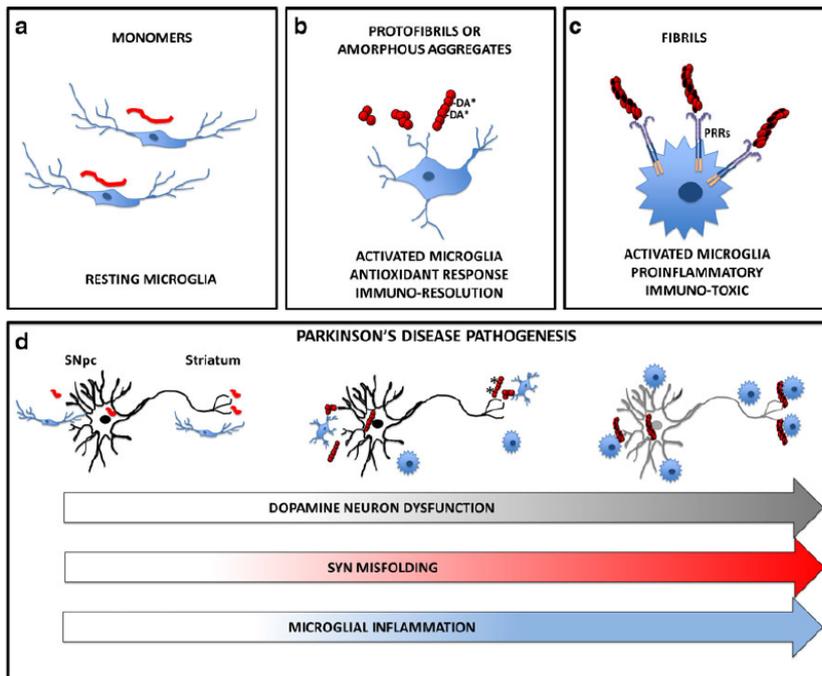
**Abbildung 8 Die drei Stadien der Mikroglia**

Fluoreszenzfärbung in unserer dopaminergen Primärzellkultur zur Verdeutlichung des Mikroglia-Phänotyps mit Anti-F4/80 (Antikörper gegen Mikroglia) in dopaminergem Primärzellkultur in 100-facher Vergrößerung

Die ruhende Mikroglia hat eine verzweigte Morphologie und ist verantwortlich für die Immunüberwachung. Die Aktivierung der Zellen ist ein stimulusabhängiger Prozess und erfolgt durch verschiedene Signale wie proinflammatorische Botenstoffe (Interleukine, Interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), Umwelttoxine (Pestizide, Schwermetalle), neurodegenerative Pathologien ( $\alpha$ -Synuklein,  $\beta$ -Amyloid-Plaques) oder Verletzungen des Gehirns (Taetzsch 2013). Dann unterziehen sich die Zellen einer dramatischen morphologischen Veränderung in reaktive amöboide Mikroglia (Kreutzberg 1996).

Bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen konnte beobachtet werden, dass Mikroglia den pathologischen Prozess durch Zellrekrutierung, Aktivierung und Sekretion verschiedener Botenstoffe antreibt.

Dass die Neurotoxizität *in vitro*, ausgelöst durch  $\alpha$ -Synuklein, im Zusammenhang mit Mikrogliazellen steht, konnten Zhang und Kollegen 2005 zeigen, indem sie nachwiesen, dass die Toxizität durch das Vorhandensein von Mikroglia in der Kultur verstärkt wurde. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass  $\alpha$ -Synuklein die Produktion von Superoxid durch Mikroglia aktiviert und morphologische Veränderungen der Mikroglia induziert (Zhang et al., 2005). Inflammatorische Prozesse, ausgelöst durch  $\alpha$ -Synuklein, konnten Beraud und Kollegen 2013 *in vitro* nachweisen, indem sie zeigten, dass aggregiertes  $\alpha$ -Synuklein Mikrogliazellen aktiviert, die wiederum proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  ausschütten. Außerdem konnte diese Gruppe noch nachweisen, dass die genaue Struktur des  $\alpha$ -Synuklein wichtig für die Induktion des proinflammatorischen Weges ist (Béraud et al. 2013).



**Abbildung 9 Schematische Darstellung der Wirkung von  $\alpha$ -Synuklein auf Mikroglia**

Hier werden mögliche Ereignisse, die zusammen an der Pathogenese der Parkinson-Krankheit beteiligt sind, gezeigt. Die Daten dieser Gruppe stützen die Hypothese, dass eine spezifische Struktur benötigt wird, um direkt Mikroglia zu aktivieren. a) monomeres  $\alpha$ -Synuklein (rote Linie) scheint nicht direkt Mikroglia zu aktivieren, b) Protofibrillen und amorphe Aggregate von  $\alpha$ -Synuklein führen zu einer abgeschwächten proinflammatorischen Reaktion (Zunahme von IL1 $\beta$ ), c) fibrilläres  $\alpha$ -Synuklein aktiviert direkt Mikroglia durch den klassischen proinflammatorischen Weg (hohe Konzentrationen von NO, NOX1, TNF- $\alpha$  und IL1 $\beta$ ) d) (Béraud et al. 2013)

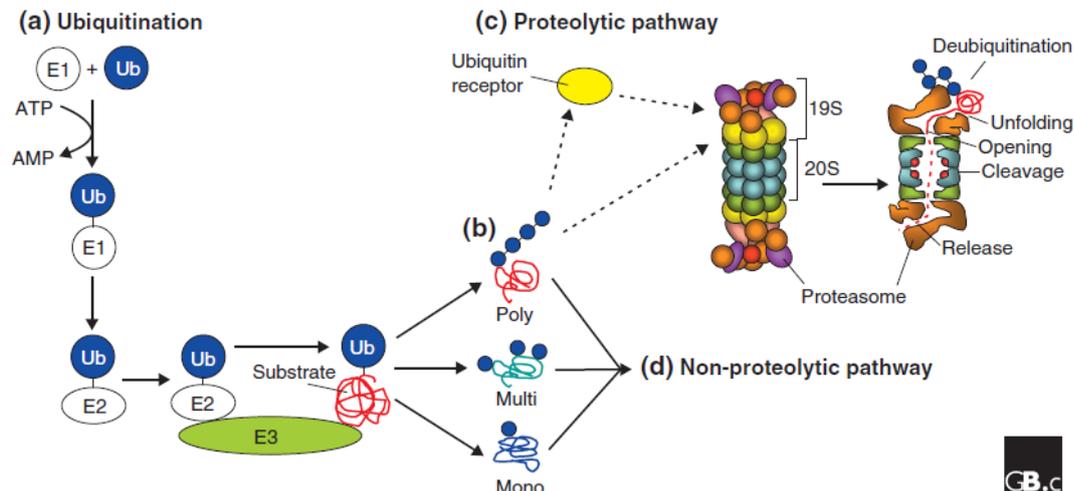
Weitere Studien belegen, dass  $\alpha$ -Syn eine wichtige Rolle bei der Auslösung der Immunantwort einnimmt, da es als endogener Agonist am Toll-like-Rezeptor 2 (TLR2) bindet, Mikroglia aktiviert und so Antigenpräsentation und Cytokin-Ausschüttung auslöst (Harms et al. 2013). Auch andere Gruppen konnten  $\alpha$ -Synuklein als Mikroglia-Aktivator identifizieren und zum Beispiel an einem Mausmodell mit überexprimierten  $\alpha$ -Synuklein zeigen, dass mutiertes  $\alpha$ -Syn und die Entzündungsreaktion gemeinsam an der chronischen Neurodegeneration beteiligt sind (Béraud et al. 2013) (Gao et al. 2008) (Alvarez-Erviti et al. 2011a) (Sanchez-Guajardo et al. 2013).

### 1.2.7 Abbauwege des $\alpha$ -Synuklein

Die Homöostase und das Überleben der Zelle sind abhängig von der Balance zwischen Bildung und Abbau der Zellproteine. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und die Autophagie sind die wichtigsten Systeme des Proteinabbaus.

Etwa 90% aller intrazellulären Proteine werden vom Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut. Die Hauptfunktion des UPS ist der Abbau von fehlgefalteten Proteinen in der Zelle. Deshalb steht das UPS auch immer mehr im Mittelpunkt bei der Erforschung von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson (Ciechanover and Brundin 2003). Bei der Degradation

wird das Zielprotein isopeptitisch mit Ubiquitin verknüpft. Diese Reaktion erfordert die Anlagerung von drei enzymatischen Aktivitäten: dem Ubiquitin-aktivierenden Enzym E1, dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym E2 und einer Ubiquitin Ligase E3. Die Ubiquitinierungsreaktion wird in der Regel viele Male wiederholt, ist ATP abhängig und führt zur Bildung einer Polyubiquitinkette.



**Abbildung 10 Schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom-System**

(a) die Ubiquitinierung benötigt die Enzyme E1, E2, E3. Dies führt zur Bildung einer Ubiquitinkette (b), die das Substratprotein für den nichtproteolytischen (d) oder den proteolytischen Abbau (c) durch das 26S Proteasom markiert. (Kaiser and Huang 2005)

Diese Polyubiquitinkette wird dann spezifisch vom 26S Proteasom-Komplex, einem zentralen Bestandteil des UPS, welcher aus einer 20S Einheit und zwei 19S Untereinheiten besteht, erkannt und entsorgt (Hershko and Ciechanover 1998).

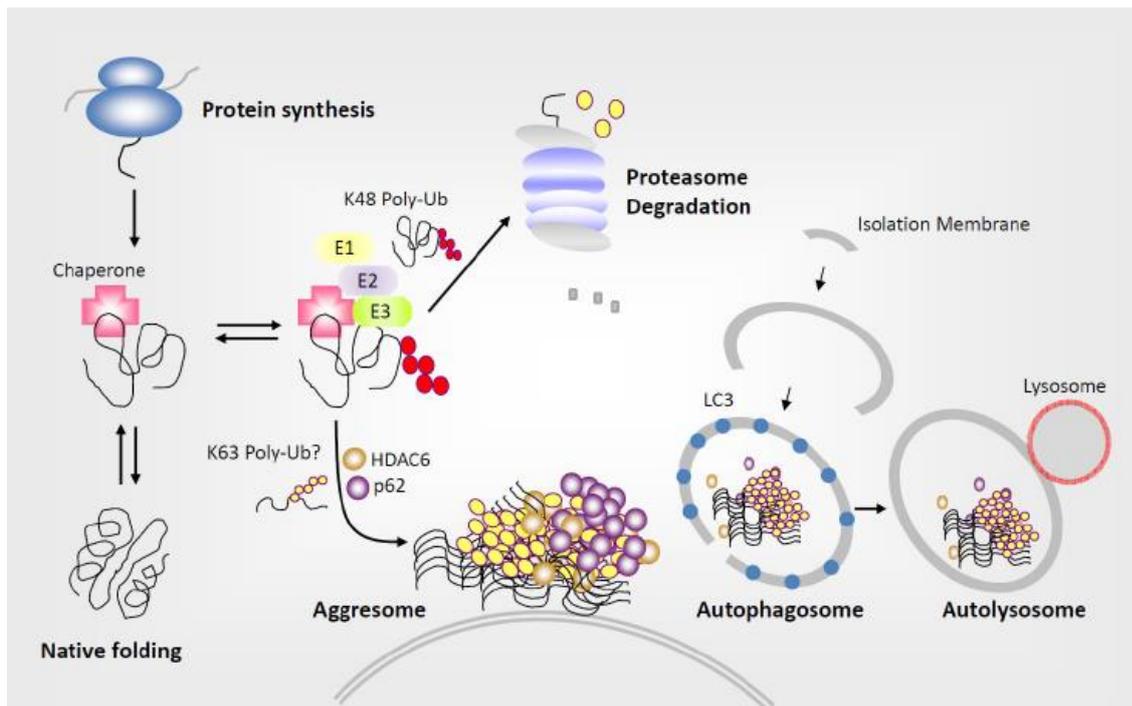
Die Art der Ubiquitinierung ist ausschlaggebend für ihre Funktion. Monoubiquitinierung ist wichtig für die Endozytose und/oder die endosomale Sortierung (Haglund and Dikic 2012). Polyubiquitinierung beschreibt die Bildung von Ubiquitinketten über verschiedene Lysine innerhalb der Ubiquitinmoleküle. Ausschlaggebend für die jeweilige Proteolyse ist letztendlich die Länge der Polyubiquitinkette.

Eine Dysregulierung des UPS findet man bei vielen Erkrankungen, so auch beim IPS. Die Tatsache, dass  $\alpha$ -Synuklein in Lewy-Körperchen vor allem an Ubiquitin gebunden vorkommt, zeigt, dass hier der Abbau über die Ubiquitinierung gescheitert sein könnte. Studien, in denen Ratten mit Rotenon oder MPTP behandelt wurden, belegen eine Reduktion der proteasomalen Aktivität im Gehirn (Fornai et al. 2005) (Betarbet et al. 2006). Untersuchungen in *post mortem* Gehirnen von Parkinson-Patienten mit der sporadischen Form der Erkrankung zeigen in der Substantia nigra eine selektive Reduktion vom 20S-Komplex des Proteasoms (Mcnaught and Olanow 2003) (Lindersson et al. 2004). Auch eine Überexprimierung von  $\alpha$ -Synuklein *in vitro* führt zur Reduktion vom 20S-Komplex (Tanaka et

al. 2001) (Singleton et al. 2003). Fibrillen, aber auch monomeres  $\alpha$ -Synuklein, hemmen *in vitro* die proteasomale Funktion, wodurch  $\alpha$ -Synuklein seinen, aber auch den Abbau anderer Proteine inhibiert (Snyder et al. 2003) (Ma et al. 2013). Proteasomale Inhibition führt wiederum in der Zellkultur zur Bildung von Ubiquitin-positiven und  $\alpha$ -Synuklein-positiven Einschlusskörperchen (Rideout et al. 2001). Diese Daten zeigen, dass Überexpression, Mutationen oder Modifikationen von  $\alpha$ -Synuklein, der erhöhte oxidative Stress durch mitochondriale Dysfunktionen und die Einwirkung von Umwelttoxinen sowie alterungsbedingte Veränderungen im Gehirn Auswirkungen auf das UPS haben können und somit einen wichtigen Punkt in der Parkinson-Pathogenese, sowohl der erblich bedingten als auch der sporadischen Form, darstellen.

Beim Abbau von fehlgefalteten Proteinen spielt unter anderem der Mechanismus der Autophagie eine entscheidende Rolle. Proteine mit längeren Halbwertszeiten werden meistens über den Autophagie-Weg in Lysosomen abgebaut (Cuervo 2004). Dieser Weg ist ein mehrstufiges Verfahren, bei dem der Inhalt der Autophagosomen nach ihrer Fusion mit den Lysosomen durch hydrolytische Enzyme abgebaut wird (Webb et al. 2003).

Auch Störungen im autophagischen Abbau von  $\alpha$ -Synuklein scheinen im pathogenen Mechanismus der Parkinson-Krankheit mitzuwirken. Im Gehirn von Parkinson-Patienten sowie in Parkinson-Tiermodellen wurde eine erhöhte Anzahl autophagischer Vakuolen nachgewiesen. Diese erhöhte Anzahl könnte durch die gestörte Funktion des UPS zustandekommen, da durch die Hochregulierung des Autophagiesystems der Abbau von fehlgefalteten Proteinen gewährleistet werden soll (Anglade et al. 1997). Diese Hochregulierung der Autophagie konnte auch nach Gabe von MPTP und Paraquat *in vivo* beobachtet werden (Trojanowski 2000). *In vitro* führt eine lysosomale Hemmung zu einer erhöhten  $\alpha$ -Synuklein-Konzentration im Zytoplasma, was darauf hinweist, dass ein Teil des  $\alpha$ -Synuklein über den lysosomalen Weg abgebaut wird (Paxinou et al. 2001) (Lee et al. 2004). Weiterhin konnte man zeigen, dass bei Überexpression von  $\alpha$ -Syn die Autophagie aktiviert wird (Cuervo 2004). Eine Hemmung der Autophagie führt aber nicht zum Anstieg von  $\alpha$ -Synuklein (Lee et al. 2004). Eine weitere Rolle im Abbau des  $\alpha$ -Synuklein scheint die Chaperon-vermittelte Autophagie (CVA) zu spielen, deren Inhibition wiederum die  $\alpha$ -Synuklein-Konzentration im Plasma erhöht. Bei der CVA handelt es sich um einen lysosomalen Abbauweg, bei dem die Proteine zuerst durch sogenannte Hitzeschockproteine (HSP-Proteine, zum Beispiel HSP70) gekennzeichnet und dann degradiert werden (Cuervo 2004).  $\alpha$ -Synuklein enthält eine für HSP70 erkennbare Domäne und somit könnten Wildtyp- $\alpha$ -Synuklein, aber auch Oligomere teilweise über die CVA abgebaut werden.



**Abbildung 11** Schematische Darstellung von CVA, UPS und Autophagie  
(Lim and Zhang 2013)

### 1.3 Parkinson-Modelle: Rotenon und Paraquat

Wie eingangs erwähnt, werden Umwelttoxine als eine Ursache der Parkinson-Krankheit in Erwägung gezogen. Studien zeigen, dass der Einfluss genetischer Faktoren weitaus geringer als der von Umweltfaktoren ist (Tanner et al. 2011). Insbesondere in der Landwirtschaft genutzte Chemikalien wie Rotenon und Paraquat konnten mit dem IPS in Verbindung gebracht werden (Freire and Koifman 2012) (Moretto and Colosio 2013). Im Hinblick auf die Pestizide existiert vermutlich eine Assoziation zur Parkinson-Krankheit.

Um die Ursachen des Idiopathischen Parkinson-Syndroms näher zu erklären, wurden bisher, außer dem schon genannten MPTP, Rotenon und Paraquat als artifizielle Modelle *in vivo* sowie *in vitro* eingesetzt.

### 1.3.1 Rotenon

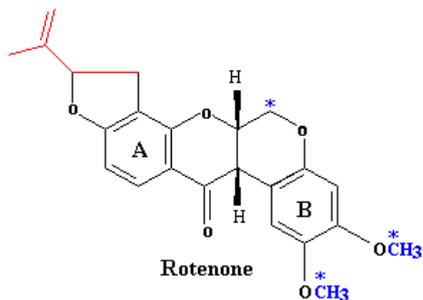
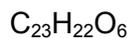


Abbildung 12 Struktur- und Summenformel Rotenon



Rotenon, ein landwirtschaftlich genutztes Pestizid, wurde als Insektizid und Fischgift verwendet. Rotenon gewinnt man aus den Wurzeln von in tropischen Regionen heimischen Leguminosen (*Derris spp.*, *Lonchocarpus spp.*, *Terphrosia spp.*).

Seit 1987 ist der Wirkstoff in Deutschland aufgrund fehlender toxikologischer Untersuchungen zur gesundheitlichen Bewertung nicht mehr als Pflanzenschutzmittel zugelassen ([www.bfr.bund.de](http://www.bfr.bund.de) 01/2014).

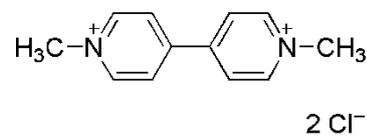
Rotenon kann aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften die Blut-Hirn-Schranke durchdringen. Eine chronische Exposition zu dem Pestizid wird mit einem erhöhten Risiko an Parkinson zu erkranken verbunden (Tanner et al. 2011).

Subkutan injiziert, löst es bei Ratten parkinsonähnliche Symptome aus (Sherer et al. 2003). Die Ratten entwickeln eine progressive Degeneration der nigrostriatalen dopaminergen Neurone und es werden Einschlusskörperchen gebildet, die mit Antikörpern gegen Ubiquitin und  $\alpha$ -Synuklein sichtbar gemacht werden können. Die Einschlusskörperchen bilden einen dichten Kern, der von Fibrillen umschlossen wird, ähnlich der Lewy-Körperchen.

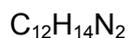
Auch nach oraler Gabe in einer Studie bei Ratten und Mäusen war Rotenon im Gehirn nachzuweisen (Caboni et al. 2004). Es passiert die Zellmembran und kann sich in Zellorganellen wie zum Beispiel Mitochondrien anreichern (Schuler and Casida 2001). In neueren Studien konnte auch die Depolymerisierung von Mikrotubuli, welche als Substrate des Proteasom-Komplexes wichtig für den Abbau von Proteinen sind, durch Rotenon gezeigt werden (Choi et al. 2011). Der so verursachte Mangel verlangsamt den Abbau dieser, sich unter Rotenon anhäufenden Proteine, und fördert somit die Bildung von Aggregaten. Von größerer Bedeutung ist allerdings die durch Rotenon verursachte, spezifische Hemmung des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette, wodurch die Elektronenübertragung verhindert und die ATP Herstellung eingestellt wird. Schon die Hemmung der Atmungskette erklärt hinreichend die durch Rotenon entstehenden Mechanismen wie oxidativen Stress, Exzitotoxizität, Proteinaggregation und Apoptose, die auch *in vivo* gegenüber einem alleinigen ATP Mangel eine größere Rolle spielen (Sherer et al. 2002). *In vitro* konnte an

verschiedenen Zellkulturmodellen gezeigt werden, dass nach Behandlung mit Rotenon eine erhöhte Expression von  $\alpha$ -Synuklein in apoptotischen Zellen induziert und eine Aggregation von  $\alpha$ -Synuklein beobachtet werden konnte (Cells et al. 2004) (Lee et al. 2005b). In der Parkinson-Forschung bleibt das Rotenon-Modell von besonderem Interesse, da einerseits der spezifische Untergang dopaminerger Neurone in der SNpc und die Bildung von  $\alpha$ -Synuklein-haltigen Einschlüssen eine Ähnlichkeit mit der Pathogenese des IPS zeigen (Ferrante et al. 1997).

### 1.3.2 Paraquat



**Abbildung 13** Struktur- und Summenformel von Paraquat



Paraquat (1,1 Dimethyl-4,4'-bipyridiniumdichlorid) gehört zur Gruppe der Bipyridylumherbizide. Es wird zur Unkrautbekämpfung verwendet und ist ein schnell wirkendes, nichtselektives Gift, welches das Gewebe von Pflanzen zerstört. Es hat sich jedoch gezeigt, dass Paraquat auch für Menschen und Tiere toxisch ist und wird deshalb in der Schweiz und in der EU nicht mehr zugelassen ([paraquat.com/safety/regulation](http://paraquat.com/safety/regulation)).

Strukturell sind sich Paraquat und MPP<sup>+</sup> sehr ähnlich und es konnte in epidemiologischen Studien belegt werden, dass der Kontakt mit dem Herbizid Paraquat zu parkinsonähnlichen Symptomen führen kann (Dinis-Oliveira et al. 2006).

Die zelluläre Toxizität von Paraquat beruht auf der Bildung von freien Radikalen. Das Paraquat-Monoradikal wird in Anwesenheit von Sauerstoff schnell reoxidiert und es kommt zur Bildung von Superoxydradikalen, was wiederum zur Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führt. Insbesondere Superoxidradikale, Wasserstoffperoxid und Hydroxyl-Radikale führen zur Beschädigung von Lipiden, Proteinen, DNA, RNA und beeinträchtigen damit den Energiestoffwechsel und proteasomale Funktionen. Paraquat gelangt durch Carrier-vermittelten Transport durch die Blut-Hirn-Schranke und sammelt sich nach chronisch wiederholter Exposition im ZNS an (Prasad et al. 2007) (Cochemé et al. 2008). Dort führt es zur Degeneration von dopaminerger Neuronen (Dinis-Oliveira et al. 2006).

Die Neuroinflammation scheint eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Neurotoxinen wie Paraquat zu spielen. Es hat sich gezeigt, dass es in Mittelhirn-Kulturen unter Paraquat zu einer schnellen Vermehrung und Aktivierung der ruhenden Mikrogliazellen kommt und diese

sich in sogenannte Fresszellen (Makrophagen) umwandeln. Cicchetti et al. und Liebert et al. stellten fest, dass die Paraquat-vermittelte Degeneration der dopaminergen Neurone abhängig ist von der Anwesenheit von Mikroglia in der Kultur (Cicchetti et al. 2005)(Liebert et al. 2005). Weiterhin wird ausgesagt, dass die Neurotoxizität von Paraquat vergleichbar mit oxidativem Stress und ROS-Produktion ist (Prasad et al. 2007), wobei der Komplex I der mitochondrialen Atmungskette sowie der Zellkern weitere Angriffspunkte sind (Chen et al. 2010). Ebenso konnte gezeigt werden, dass Paraquat die  $\alpha$ -Synuklein-Konzentration steigert und die Fibrillenbildung beschleunigt (Maning Bog 2002).

### **1.3.3 Das Zellkulturmodell**

Den Goldstandard neuronaler Zellmodelle stellt nach wie vor die Primärkultur der entsprechenden Neuronenpopulation dar, an denen Degenerationsvorgänge auf molekularer Ebene gut zu untersuchen sind. Der große Vorteil dieser Technik besteht darin, dass unter möglichst authentischen Gewebebedingungen eine direkte Einflussnahme und kontinuierliche Beobachtung von Neuronen und Gliazellen *in vitro* möglich ist. Als Nachteil könnte gerade der natürliche Gewebeverband angesehen werden, da isolierte Effekte auf die hier besonders interessierenden dopaminergen Neurone aufgrund der Wechselwirkung mit den sie umgebenden übrigen Neuronen und Gliazellen nur schwer identifizierbar sind. Darüber hinaus können neuronale Primärkulturen nur embryonal gewonnen werden, sodass Alterseffekte nur schlecht untersucht werden können. Hier gilt es jedoch abzuwägen, denn die in der neurowissenschaftlichen Forschung zumeist genutzten Krebszelllinien wie die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y oder die Phäochromozytomzelllinie PC12 bieten zwar den Vorteil einer homogenen Zellpopulation mit für diese Zellen spezifischen Reaktionen, jedoch sind sie physiologisch und durch ihre fehlende Interaktion mit einer natürlichen Zellumgebung weit von den tatsächlichen Verhältnissen in der Substantia nigra entfernt. Somit zeigen sie häufig auch völlig unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber Toxinen im Vergleich zu Neuronen aus Primärzellkulturen. Für diese Arbeit betrachteten wir daher den Einsatz von Zelllinien als weniger zielführend. Nicht außer Acht lassen darf man jedoch den Aspekt der Verifizierung der gewonnenen Erkenntnisse im Tiermodell, auch wenn hier die Komplexität weiter zunimmt. Primärzellkultur und Tiermodell sind wichtige, sich ergänzende Methoden des Erkenntnisgewinns, die jeweils ihre eigenen Vor- und Nachteile haben.

## **1.4 Zielstellung der Arbeit**

Alterungsprozesse und Umweltfaktoren sind entscheidende Risikofaktoren, um an Parkinson zu erkranken. Und obwohl es immer mehr Hinweise gibt, dass  $\alpha$ -Synuklein-Aggregate eine wichtige pathophysiologische Rolle spielen, wird bisher noch unzulänglich verstanden, wie die für die dopaminergen Neurone toxische Wirkung entfaltet wird.

In der vorliegenden Arbeit sollen die Mechanismen der  $\alpha$ -Synuklein-Aggregation in einem mesenzephalen dopaminergen Primärzellkulturmodell nach chronischem Einfluss der Pestizide Rotenon und Paraquat untersucht werden. Die kurzzeitige Behandlung mit hochkonzentrierten Toxinen löst eine akute Degeneration dopaminergener Neurone aus, die so nicht der des Idiopathischen Parkinsons entspricht. Beim IPS erfolgt die Degeneration über Jahre hinweg.

Deshalb wurde die dafür verwendete Zellkultur, um auch den Einfluss der normalen zellulären Zellalterung auf die  $\alpha$ -Synuklein-Aggregation zu zeigen, über 46 Tage kultiviert und die Pestizid-Konzentration so eingestellt, dass etwa 25-50% der dopaminergen Neurone absterben.

Um eventuelle Unterschiede aufzeigen zu können, die durch die zelluläre Alterung entstehen, werden vergleichsweise junge Zellkulturen (nur bis zum Tag 10) kultiviert und kurze Zeit mit höher konzentrierten Pestiziden behandelt.

In der Literatur werden viele solcher Kurzzeitversuche mit Toxinen und  $\alpha$ -Synuklein-Aggregatbildung beschrieben. Es ist jedoch unklar, wie sich  $\alpha$ -Synuklein über einen längeren Zeitraum unter niedrig konzentrierter Pestizid-Menge in einer dopaminergen Zellkultur verhält. In dieser Arbeit soll deshalb in dem chronisch behandelten Langzeit-Modell charakterisiert werden, ob und zu welchem Zeitpunkt eine Konformationsänderung von  $\alpha$ -Synuklein stattfindet, wo in der dopaminergen Zelle die  $\alpha$ -Synuklein-Aggregate lokalisiert sind und wie sie abgebaut werden. Es soll vor allem die unterschiedliche Wirkung der Toxine Rotenon und Paraquat auf  $\alpha$ -Synuklein in den dopaminergen Neuronen aufgezeigt werden. Um diese Vorgänge näher zu beleuchten, soll die Kolo-kalisation mit verschiedenen Proteinen dargestellt werden. Darüber hinaus soll auch der Einfluss von den Pestiziden und  $\alpha$ -Synuklein auf Inflammationsvorgänge untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Geräte

In Tabelle 2 sind alle im Labor verwendeten Geräte mit genauer Bezeichnung und Firma und Herkunftsort aufgeführt:

Gerät	Firma
<b>Mikroskope und Kameras</b>	
Keyence BZ9000 Mikroskop	Keyence (Osaka, Japan)
Leica DM IRE2 HC Fluo	Leica (Wetzlar, D)
Leica Digitalkamera DC350 FX	Leica (Wetzlar, D)
LAS 3000	Fujifilm (Japan)
Olympus CKX41	Olympus GmbH (Hamburg, D)
Stereoskop Stemi DV4	Carl Zeiss AG (Jena, D)
Zeiss Axiovert 35	Carl Zeiss AG (Jena, D)
<b>Plattenlesegeräte und Photometer</b>	
TECAN GENios	TECAN (Crailsheim, D)
TECAN SUNRISE	TECAN (Crailsheim, D)
<b>Zentrifugen</b>	
Biofuge pico Kendro	Kendro (Osterode, D)
Biofuge primo Kendro	Kendro (Osterode, D)
Centrifuge 5403	Eppendorf (Hamburg, D)
Centrifuge 5810 R	Eppendorf (Hamburg, D)
Galaxy Mini	VWR™ International (Darmstadt, D)
<b>Waagen</b>	
Scaltec SBA 52	SCALTEC (Heiligenstadt, D)
Feinwaage Sartorius CP225D-OCE	Sartorius AG (Göttingen, D)
<b>Sonstige Geräte</b>	
Ultraschallbad Sonorex Super Digital	Bandelin (Berlin, D)
UV-Lampe UVC 30	Kendro (Osterode, D)
Thermoschrank	Memmert (Schwabach, D)
Wasserbad Julabo SW22	Julabo Labortechnik GmbH (Seelbach, D)
Autoklav Systec V-65	Systec GmbH (Wettenberg, D)
Orbital Rotamax 120	Heidolph (Schwabach, D)

Sezierbesteck	Fine Science Tools (Heidelberg, D)
Sterilbank Heraeus HeraSafe	Kendro (Hanau)
Inkubator HeraCell150	Kendro (Hanau)
Neubauer Zählkammer	Optik Labor (Friedrichsdorf, D)
Pipetboy acu Integra	Biosciences (Chur, CH)
Reinstwasser-Aufbereitungssystem GenPure	TKA (Niederelbert, D)
Multipette	Eppendorf (Hamburg, D)
NuPage Gelelektrophoresekammer	Life technology (Carlsbad,CA)
NuPage iBlot	Life technology (Carlsbad,CA)
Neubauer Zählkammer	Optik Labor (Lancing, UK)
Pipetten	Gilson (Middleton, USA)
Labdancer	VWR™ International (Darmstadt, D)
Vacuubrand CVC2 (Pumpe)	Vacuubrand GmbH&Co (Wertheim, D)
Thermal Cycler Primus	MWG-Biotech (Ebersberg, D)
Ultraschallbad Sonorex Super Digital	Bandelin (Berlin, D)
Wasserbad Therostatic Water Bath WBS	neoLab (Heidelberg, D)
Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg, D)
UV-Lampe UVC 30	Kendro (Hanau, D)

**Tabelle 2**      **Geräte**

## **2.2 Verbrauchsmaterialien**

In Tabelle 3 sind häufig verwendete Verbrauchsmaterialien mit Bezeichnung, Firma und Herstellungsort aufgeführt:

<b>Material</b>	<b>Firma, Herstellungsort</b>
Dulbeco's PBS	Life technology (Carlsbad,CA)
HBSS	Life technology (Carlsbad,CA)
Injektionswasser	Serum-Werk Bernburg AG (Bernburg, D)
Multidish 4 Wells Nunclon Delta SI	NUNC™ (Wiesbaden, D)
BD Poly-D-Lysine Cellware Coverslips	BD Bioscience (San Jose, CA)
Cell view Glass Bottom Dish (627871)	Greiner Bio-one (Frickenhausen, D)
Glas-Pasteurpipetten	Volac (Barking, UK)
Filterspitzen	Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf), Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen, D)

Objektträger(J2800AMNZ)	Pierce Biotechnology (Rockford, USA)
Petrischalen	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen, D)
96-Well-Platten für Fluoreszenz schwarz	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen, D)
96-Well-Platten weiß	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen, D)
Pipettenspitzen	Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf), Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen, D)
Combitips (5 ml, 10 ml)	Eppendorf (Hamburg, D)
LoBind Tubes	Eppendorf (Hamburg, D)

**Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien**

## 2.3 Antikörper

In Tabelle 4 sind verwendete Primär- und Sekundär-Antikörper mit Bezeichnung, Hersteller und Bestellnummer aufgeführt:

<b>Primär-Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Anti- $\alpha$ -Synuklein-AK	Santa Cruz (Dallas, Texas, USA)	sc-7011-R
Anti- $\alpha$ -Synuklein-AK	Merck Millipore (Darmstadt, D)	PC325
Anti-GAPDH-AK	Merck Millipore (Darmstadt, D)	MAB374
Anti-Actin-AK	Santa Cruz (Dallas, Texas, USA)	sc-1616
Anti-F4/80-AK	AbD Serotec (Oxford, UK)	MCA497R
Anti-GFAP-AK	Merck Millipore (Darmstadt, D)	MAB3402
Anti-HSC/HSP70-AK	Santa Cruz (Dallas, Texas, USA)	sc-59570
Anti-Interleukin-1 $\beta$	Rockland (Limerick, PA)	209-401-301
Anti-LAMP-2-AK	Life technology (Carlsbad, CA)	512200
Anti-Mouse IgG	Vector Laboratories (Burlingame, CA)	BA-2000
Anti Mouse / Rabbit IgG	Vector Laboratories (Burlingame, CA)	BA-1400
Anti-Tyrosin Hydroxylase-AK	Merck Millipore (Darmstadt, D)	MAB 5280
Anti-Tyrosin Hydroxylase-AK	Merck Millipore (Darmstadt, D)	AB 152
Anti-Tyrosin Hydroxylase AK	Pel-Freez (Arkansas, USA)	P40101
Anti-Synaptophysin-AK	Santa Cruz (Dallas, Texas, USA)	sc-35488
Anti-phos $\alpha$ -Synuklein-AK	Assay biotech (Sunnyvale, CA)	A0582
Anti-Ubiquitin-AK	Santa Cruz (Dallas, Texas, USA)	sc-271289
Anti-Ubiquitin-AK	Santa Cruz (Dallas, Texas, USA)	sc-8017

<b>Sekundär-Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Alexa Fluor donkey 488 Anti-rabbit, sheep	Life technology (Carlsbad, CA)	A21206, A11015
Alexa Fluor goat 488 Anti-guinea pig, mouse	Life technology (Carlsbad, CA)	A11073, A11001
Alexa Fluor goat 555 Anti-rabbit, mouse	Life technology (Carlsbad, CA)	A21428, A21422
Alexa Fluor donkey 555 Anti-goat	Life technology (Carlsbad, CA)	A12432
Alexa Fluor donkey 647 Anti-sheep, goat, mouse	Life technology (Carlsbad, CA)	A21448, A21447, A31571
Alexa Fluor goat 647 Anti-rat, rabbit	Life technology (Carlsbad, CA)	A21247, A21244
Alexa Fluor goat 405 Anti-mouse, rabbit	Life technology (Carlsbad, CA)	A31553, A31556
Peroxydase-conjugated AffiniPure Donkey Anti-guinea pig, mouse, rabbit, goat (WB)	Jackson Immuno Research Laboratories (West Grove, PA, USA)	86825

**Tabelle 4 Primär- und Sekundärantikörper**

## **2.4 Chemikalien und Kits**

In Tabelle 5 sind verwendete Chemikalien und Kits mit Bezeichnung, Bestellnummer und Firma aufgeführt:

<b>Stoff</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Pierce high sensitivity	Pierce Biotechnology (Rockford, USA)	31030
Blocking Solution	Candor Bioscience GmbH (Wangen, D)	110500
B-27-Supplement	Life technology (Carlsbad, CA)	10889-038
BCA Protein Assay	Pierce Biotechnology (Rockford, USA)	23227
Cell mask plasma membrane Stain	Life technology (Carlsbad, CA)	C-10045
D-PBS	Life technology (Carlsbad, CA)	14190-086
DMEM	Life technology (Carlsbad, CA)	10889-038
DMEM ohne Phenolrot	Life technology (Carlsbad, CA)	10889-039
Dnase I	Roche Diagnostics (Penzberg, D)	11 284 932 001

DMSO	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	D4540-100ML
Fetal Bovine Serum	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	F 9665
D-(+)-Glucose solution	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	G-8769
Dura Femto Kit	Pierce Biotechnology (Rockford, USA)	34075
Goat Serum	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	G-6767
HBSS	Life technology (Carlsbad, CA)	14175-053
HEPES Buffer	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	H-0887
Horse Serum	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	H-1270
Hoechst 33342	Life technology (Carlsbad, CA)	H3570
Histochoice	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	H2904
iBlot Gel Transfer Stacks Nitrocellulose	Life technology (Carlsbad, CA)	IB301001
Magic Mark Western Standard	Life technology (Carlsbad, CA)	LC5603
N-2 Supplement (100x)	Life technology(Carlsbad, CA)	17502-048
Neuronal Protein Extraction Reagent	Pierce biotechnology (Rockford, USA)	87792
NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gele	Life technology (Carlsbad, CA)	NP0323BOX
NuPAGE LDS Sample Buffer	Life technology (Carlsbad, CA)	NP0007
NuPAGE Running Buffer MOPS	Life technology (Carlsbad, CA)	NP0001
NuPAGE Running Buffer MES	Life technology (Carlsbad, CA)	NP0002
PBS (unsteril)	PAN Biotech GmbH	P04-362500
Penicillin-Streptomycin	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	P-0781
Pierce Classic IP Kit	Pierce biotechnology (Rockford, USA)	26146
Poly-D-Lysin	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	P-7280
ProteoStat Aggreosome Detection Kit	ENZO (Lörrach, D)	ENZ-51035- K100
ProLong Antifade Kit	Life technology (Carlsbad, CA)	P7481
Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail	Pierce biotechnology (Rockford, USA)	78441
Propidium Jodid	Life technology (Carlsbad, CA)	P3566
Protein Ubiquitination	Boston Biochem (Cambrige, MA)	11464614

Detection Kit		
PFA	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	P6148-500G
Paraquat dichloride	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	36541
Rotenon	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	R-8875
SeeBlue Pre-stained	Life technology (Carlsbad, CA)	LC5625
Stripping Buffer	Candor Bioscience GmbH (Wangen, D)	150 050
Triton (Surfact-Amps X-100)	Pierce biotechnology (Rockford, USA)	28314
Trypsin-EDTA (10 x )	Life technology (Carlsbad, CA)	35400-027
Tween 20	Serva	37470
Vectastain Elite ABC Kit (Mouse IgG)	Vector Laboratories (Burlingame, CA)	PK-6102
Vectastain Elite ABC Kit (Rabbit IgG )	Vector Laboratories (Burlingame, CA)	PK-6101
Vectastain Elite ABC Kit (Universal)	Vector Laboratories (Burlingame, CA)	PK-6200
Vector VIP Substrate Kit	Vector Laboratories (Burlingame, CA)	SK-4600
Wasser für Injektionszwecke	Serumwerk-Berburg (Berburg, D)	Zul.Nr. 42805.00.00
Wasser für Molekularbiologie	Roth AG (Karlsruhe, D)	T143.4

**Tabelle 5 Chemikalien und Kits**

## **2.5 Verwendete Pestizide**

### **2.5.1 Rotenon**

Um die chronische Pestizidexposition an der dopaminergen mesenzephalen Primärzellkultur zu simulieren, wurde das Pestizid Rotenon (Sigma Aldrich (Steinheim, D)) verwendet. Die angewendete Konzentration an einzusetzendem Rotenon wurde aus Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe Gille übernommen. Das Pestizid wurde als 1 mM Stammlösung in DMSO (Sigma Aldrich (Steinheim, D)) hergestellt und die Stammlösung anschließend so lange mit Medium verdünnt, bis eine Endkonzentration von 0,5 nM in der Kultur vorlag. Die Zellkultur wurde in den Langzeitversuchen ab dem Kultivierungstag 6 und dann jeden zweiten Tag mit

dieser Konzentration behandelt. Für die Kurzzeitversuche erfolgte die Behandlung der Kultur am DIV (Day in vitro) 10 für 24 Stunden mit 80 nM Rotenon.

### **2.5.2 Paraquat**

Als weiteres Toxin wurde Paraquat (Sigma Aldrich (Steinheim, D)) in der vorliegenden Arbeit verwendet. Es erfolgte ebenfalls die Behandlung der Zellkulturen ab DIV 6 jeden zweiten Tag mit 5  $\mu$ M Paraquat. Diese Konzentration wurde gewählt, da bei dieser Behandlung etwa 25-50% der dopaminergen Neurone abstarben, etwa so wie bei der Rotenon-Behandlung. Paraquat wurde als 50 mM Stammlösung in B27-Medium hergestellt und anschließend auf eine Endkonzentration von 5  $\mu$ M verdünnt. Die Zellkultur wurde ab dem Kultivierungstag 6 und dann jeden zweiten Tag mit dieser Konzentration behandelt. Für die Kurzzeitversuche erfolgte die Behandlung am DIV 10 für 24 Stunden mit 40  $\mu$ M Paraquat.

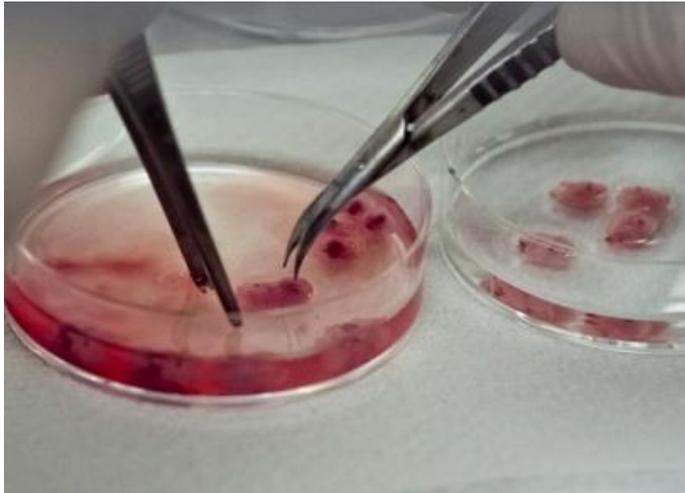
## **2.6 Dopaminerge mesenzephal Primärzellkultur des Mausstammes C57Bl/6**

Für die Präparation wurden Tiere des Mausstammes C57Bl/6 von der Firma Charles River Wiga (Sulzfeld, D) bezogen. Die Haltung erfolgte nach Richtlinien der Europäischen Union (86/609/EU) für Labortiere.

Für die mesenzephal Zellkultur wurden Embryonen am 14. Schwangerschaftstag benötigt. Am Präparationstag wurden die verpaarten weiblichen Mäuse, die makroskopisch deutliche Schwangerschaftszeichen zeigten, genutzt. Die dafür verwendeten Tiere stammten aus dem von der Landesdirektion Sachsen bestätigten Versuchsvorhaben „Entnahme von embryonalem Gewebe aus getöteten Mäusen zur Anlegung dopaminerg Primärzellkulturen“ mit dem Aktenzeichen: 24-9168.24-1/2011-18.

### **2.6.1 Präparation**

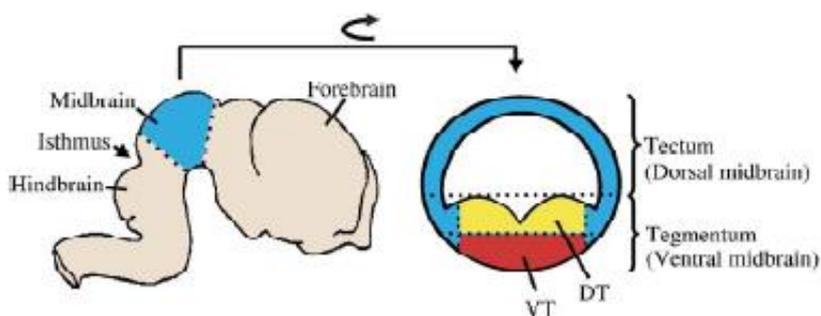
Für die Präparation wurde sterilisiertes Sezierbesteck verwendet. Die weiblichen Tiere wurden am 14. Schwangerschaftstag in einem Gefäß langsam mit CO<sub>2</sub> ruhig eingeschläfert. Nach Desinfektion des Abdomens mit 80%igem Ethanol wurde beginnend von Höhe des Afters ein v-förmiger subkutaner und danach peritonealer Schnitt gesetzt, die Uteri mit steriler Schere und Pinzette entnommen und in eine große Petrischale mit sterilem PBS (Life technology (Carlsbad, CA) überführt. Alle weiteren Präparationsschritte erfolgten unter der Sterilbank. Die Embryonen wurden mit einer Schere und Pinzette aus dem Uterus entfernt und in eine mittelgroße Petrischale mit sterilem PBS transferiert.



**Abbildung 14 Am 14. Embryonaltag entnommene Embryonen**

Foto: Ingo Morgenstern

Danach erfolgte die Teilung der Embryonen unterhalb der oberen Extremitäten, wobei der obere Teil wieder in eine Petrischale mit PBS überführt wurde. Die weitere Präparation wurde mit Hilfe eines Stereoskops durchgeführt. Der auf der Seite liegende Embryo wurde im dorsalen Bereich mit einer Pinzette fixiert und das Gehirn durch einen vertikalen Schnitt mit einer Augenschere in Höhe der Augen bis zum Hinterkopf freigelegt. Nach einem rostralen Schnitt in die Schädelhaut wurde das Gehirn bis zur Medulla oblongata freigelegt, dort abgetrennt sowie aus dem übrigen Gewebe isoliert und in eine neue Petrischale überführt. Das Abtrennen des Mesenzephalons erfolgte mit einem Skalpell, wobei ein Schnitt zwischen Pros- und Mesenzephalon und ein Schnitt kurz vor der Anlage des Cerebellums ausgeführt wurde.



**Abbildung 15 Darstellung des Mittelhirns am embryonalen Mausgehirn**

Bereich der aus der Präparation genutzt wird in blau (Jørgensen et al 2006)

Die isolierten Mittelhirne wurden nach Entfernung der Meningen mit einer Pinzette in eine kleine Petrischale in einen Tropfen PBS überführt und mit dem Skalpell gleichmäßig zerteilt.

Anschließend wurden die zerkleinerten Mesenzephalien mittels 2 ml 0,25%iger Trypsinlösung (37°C)(Life technology, Carlsbad, CA) mit einer Pipette in ein 15 ml Falcon überführt, mit 3 ml 0,02 %iger DNase I-Lösung (Roche, Penzberg, D) (gelöst in HBSS) (Life technology, Carlsbad, CA) versehen und bei 37°C für 7 Minuten (min) in einem Wasserbad inkubiert. Dabei wurde das Röhrchen von Zeit zu Zeit vorsichtig geschwenkt. Danach wurden 2 ml Basic Medium hinzugegeben, die Verdau-Reaktion gestoppt und bei 750 rpm (Biofuge primo, Heraeus) 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und 3 ml Basic-Medium und 60 µl DNase I-Lösung hinzugegeben. Mit einer Pasteurpipette (Durchmesser 0,5 -1 mm) erfolgte die weitere Vereinzelnung der Zellen, indem die Suspension vorsichtig trituriert wurde. Nach 10 min Inkubationszeit wurde der Zellüberstand vorsichtig abgenommen und in einen Erlenmeyerkolben mit vorgelegtem 3 ml Basic Medium pipettiert. War das Gewebe nicht vollständig dissoziiert, wurde dieser Vorgang bis zu 3 Mal wiederholt. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt und auf 600 000 Zellen pro ml eingestellt. Danach wurde 750 µl Zellsuspension pro Well in Poly-D-Lysin (Sigma Aldrich (Steinheim, D)) beschichtete 4-Well-Platten (NUNC, Wiesbaden, D) ausgesät. Somit betrug die Zelldichte 450000 Zellen/Well. Die Beschichtung der 4-Well-Platten erfolgte zuvor mit 50 µg / ml Poly-D-Lysin über Nacht in der Sterilbank oder während einer 30-minütigen Inkubation im Brutschrank. In die für die Fluoreszenzfärbung genutzten Platten wurden mit PDL beschichtete Coverslips (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) gelegt. Jedes Well wurde nach dem Absaugen des Poly-D-Lysins einmal mit PBS gewaschen. Die Inkubation der dopaminergen Primärzellkultur erfolgte in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank.

### **2.6.2 Kultivierung der Primärzellkultur**

Zur Behandlung der Zellkultur wurde ein einheitliches Kultivierungsschema verwendet. Alle Vorgänge erfolgten ausschließlich unter der Sterilbank. Am ersten Tag (DIV 1 = day in vitro 1) nach der Präparation wurde die Hälfte (375 µl) des serumhaltigen Basic-Mediums ausgetauscht. Am DIV 3 wurde 500 µl Basic-Medium ausgetauscht. Am DIV 5 erfolgte die teilweise Umstellung auf serumfreies Medium durch Austausch von 375 µl mit B27 Supplement (siehe unten) und am DIV 6 eine komplette Fütterung mit serumfreiem B27-Medium. B-27 stabilisierte die dopaminerge Neuronen in den Kulturen so, dass kein Zelltod durch Serumentzug einsetzte. Der Mediumwechsel mit serumfreiem B27-Medium erfolgte nun jeden zweiten Tag.

Zusammensetzung von serumhaltigem Basic-Medium:

- DMEM (Life technology, Carlsbad, CA)
- 10 mM Hepes Buffer (Sigma Aldrich, Steinheim, D)
- 33,3 mM D-Glucose (Sigma Aldrich, Steinheim, D)
- 100 U/ml Penicillin; 0,1 mg/ml Streptomycin (Sigma Aldrich, Steinheim, D)
- 10 % Fetal Bovine Serum (Sigma Aldrich, Steinheim, D)

Das serumfreie B27-Medium enthielt die gleiche Zusammensetzung wie das serumhaltige, nur wurde statt dem fötalem Kälberserum in 2%iger Endkonzentration B-27 Supplement (Life technology, Carlsbad, CA) zugesetzt.

### **2.6.3 *Behandlung der dopaminergen mesenzephalen Primärzellkultur***

Die Inkubation der Zellkultur mit Rotenon oder Paraquat erfolgte jeweils ab DIV 6 für die chronische Behandlung und am DIV 10 für Kurzzeitversuche. Die Substanzen wurden auf der Feinwaage eingewogen, immer frisch in DMSO oder in Medium gelöst und eine Stammlösung hergestellt (siehe Kap. 2.4). Die Inkubationszeit erfolgte im Brutschrank. Bei den Langzeitversuchen erfolgte nach 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42 und 46 Tagen die Ernte der Zellen für den Western Blot oder die Fixierung der Zellkultur für folgende Immunofluoreszenzfärbungen. Die Kurzzeitversuche mit den hohen Konzentrationen erfolgten jeweils am DIV 10 für 2 Stunden.

### **2.6.4 *Fixierung***

Für die Fixierung der Kultur wurde Histochoice (Sigma Aldrich, Steinheim, D) (RT) oder 4% Paraformaldehyd (Sigma Aldrich, Steinheim, D) in PBS 4°C verwendet. Das Medium wurde vorsichtig abgesaugt und die Kultur einmal mit PBS gewaschen. Nach dem Absaugen erfolgte die Behandlung mit 400 µl Fixierreagenz für 25 min. Danach wurde zweimal mit PBS (Raumtemperatur) gewaschen. Die 4-Well-Platten konnten nun mit PBS-Puffer überschichtet und bis zur Färbung im Kühlschrank verwahrt werden.

## **2.7 Immunocytochemische Färbung**

### **2.7.1 Nachweis der DA Neurone mittels Anti-Tyrosin Hydroxylase (TH)-Färbung**

Vor der Färbung wurde das PBS abgesaugt und die fixierten Zellen 15 min mit 0,4%igem Triton-X100 (Pierce biotechnology, Rockford, USA) permeabilisiert. Anschließend wurde das Gewebe für 1 Stunde mit 5%igem Pferdeserum (Vector laboratories, Burlingame, CA) bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, um unspezifische Wechselwirkungen des Antikörpers (AK) zu unterbinden. Dann erfolgte die Inkubation mit dem Primär-AK (Merck Millipore, Darmstadt, D) gegen Tyrosin Hydroxylase bei 4°C über Nacht. Für die immunocytochemische Färbung wurde der Vectastain ABC Elite Kit von Vector laboratories verwendet. Nach Inkubation mit dem Primär-AK wurde jedes Well 3 mal mit PBS gewaschen und danach 1h mit dem biotinylierten Sekundär-AK bei RT inkubiert. Anschließend wurde wieder 3 mal mit PBS gewaschen und es erfolgte 1h Inkubation mit Avidin-Biotin-Horseradish-Peroxidase-Komplex bei RT. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde das Produkt mit dem Vector VIP (purple) Kit (nach Herstellerangaben) entwickelt und die Färbeintensität der TH-positiven Neurone unter dem Lichtmikroskop beobachtet (circa 2-5 min). Bei ausreichender Farbintensität wurde die Reaktion mit PBS gestoppt und die Platten konnten im Kühlschrank gelagert werden.

### **2.7.2 Quantifizierung der TH-positiven Neurone**

TH-positive Neurone wurden an einem inversen Lichtmikroskop mit Hilfe eines Fotorahmens von Zeiss (Foto 35, 9x12/4x5) quantifiziert. Dabei wurden die DA Neurone von 20 Feldern (1,302 mm<sup>2</sup>/Feld) pro Well (1,9 cm<sup>2</sup>) in der 10-fachen Vergrößerung ausgezählt. Es wurden nur Neurone gezählt, deren Soma gefärbt und gut abgrenzbar war und bei denen noch mindestens zwei gefärbte Fortsätze zu erkennen waren. Pro Behandlung wurde jeweils eine 4-fach-Bestimmung (4 Wells) durchgeführt und das Experiment dann 3-4 mal mit unabhängigen Kulturen wiederholt.

## **2.8 Fluoreszenzfärbungen**

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurde die fixierte Kultur für 15 min mit Triton X-100 und danach für 1h mit Blocking Solution (Candor Bioscience, Wangen, D) inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper (siehe Tabelle 5) über Nacht wurde 3 mal mit PBS gewaschen und danach 1h mit dem Sekundärantikörper Alexa 488 (Life technology,

Carlsbad, CA)) bei RT im Dunklen inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS konnte die Färbung am Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ 9000 aufgenommen werden.

### **2.8.1 Propidium Iodid (PI)/Hoechst 33342-Lebendfärbung**

Hoechst 33342 (Bisbenzimid) (Life technology, Carlsbad, CA) ist ein nicht zytotoxischer DNA-Farbstoff, der vorzugsweise an Adenin-Thymin-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA bindet. Mit dieser Färbung kann die Anzahl der Zellkerne nachgewiesen werden. Propidium Iodid (Life technology, Carlsbad, CA) bindet zwischen den Basenpaaren ohne Sequenzpräferenzen. Die Methode der Propidiumiodid-Aufnahme wird als Indikator für zelluläre Integrität und Zellvitalität genutzt. Nur wenn die Zellmembran beschädigt ist, kann PI vom Kern aufgenommen und die Fluoreszenz detektiert werden. Bei der PI/Hoechst-Lebendfärbung wurde die 4-Well-Platte 1 x mit PBS (37°C) gewaschen und danach 15 min mit der PI-Lösung (0,75 µl/ml in PBS (finale Konzentration im Well 2 µM)) lichtgeschützt im Brutschrank inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit PBS (37°C) wurde 5 min mit dem Zellkernfarbstoff Hoechst 33342 (0,75 µl/ml in HBSS (finale Konzentration im Well 2 µM)) gefärbt. Die Inkubation erfolgte wiederum im Brutschrank. Danach wurde noch einmal mit PBS (37°C) gewaschen.

Während der Beobachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop (bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C) erhielten die Zellen farbloses B27 Medium (Life technology, Carlsbad, CA). In der 20-fachen Vergrößerung wurden 10 Fotos pro Well aufgenommen. Die Auswertung erfolgte im Bildbearbeitungsprogramm des Keyence BZ 9000. Mit diesem Programm wurde die Farbintensität anhand der Pixelzahl bestimmt und diese dann bei der Kontrolle als 100% angenommen und alle weiteren Kulturen darauf bezogen.

### **2.8.2 Färbung mit dem ProteoStat Aggreosome Detection Kit (ENZO)**

Der ProteoStat Aggreosome Detection Kit von der Firma Enzo eignet sich für Antikörper Kollokalisationsstudien zum Nachweis von Wechselwirkungen zwischen aggregierten und anderen Proteinen, die an der Aggreosomenbildung beteiligt sind. Er ist in der Lage denaturierte Proteine, die sich innerhalb von Aggreosomen in der Zelle befinden, bei fixierten Proben zu detektieren. Die Rot-Fluoreszenz entsteht bei der Bindung des Farbstoffes an das aggregierte Protein. Nach der Fixierung der Kultur mit 4% PFA, zwei Waschschriffen mit dem dazugehörigen Assay-Puffer und der 30-minütigen Behandlung mit Triton-X-100 auf Eis, wurde die Kultur für 30 min lichtgeschützt mit dem ProteoStat Aggreosom Farbstoff lichtgeschützt auf dem Schüttler inkubiert. Nach zwei Waschschriffen mit Assay-Puffer erfolgten weitere Färbungen mit Antikörpern gegen α-Synuklein und Tyrosin Hydroxylase.

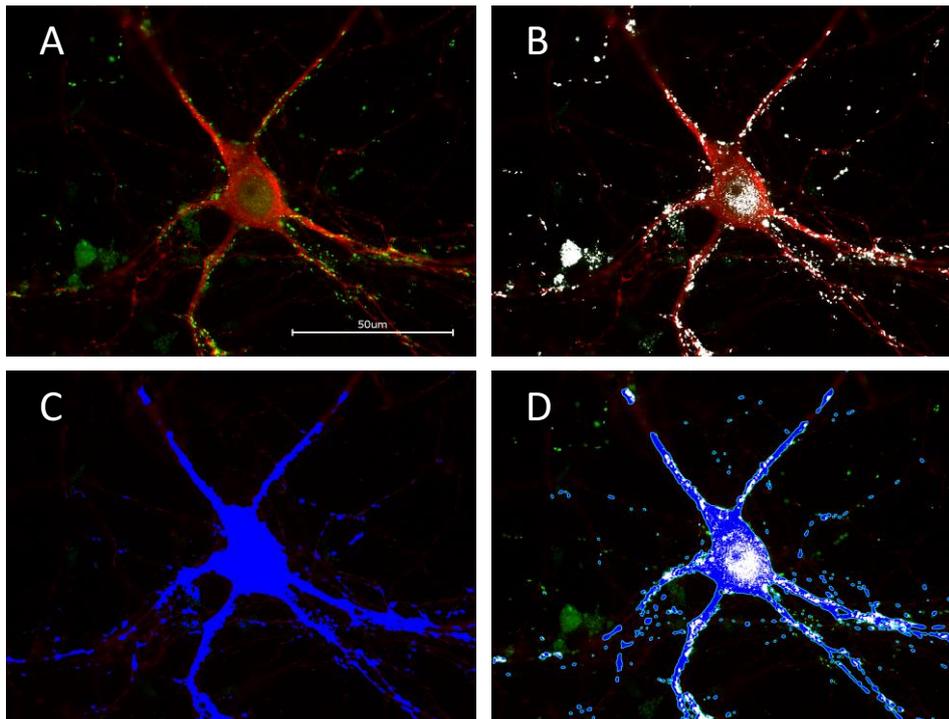
Danach konnte die Färbung am Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ 9000 aufgenommen werden.

### **2.8.3 Färbung mit dem CellMask™ Plasma Membrane Stain (Life technologies)**

Die CellMask™ Plasma Membrane Färbung ermöglicht eine schnelle und gleichmäßige Kennzeichnung der Plasmamembran, welche auch nach Fixierung der Zellen aufrechterhalten wird. Die nach Herstellerangaben in Medium verdünnte Färbelösung wird für 5 min bei 37° auf die Kultur gegeben. Nach der Fixierung der Kultur für 10 min mit 4% PFA und zwei Waschschritten mit PBS erfolgten weitere Färbungen mit dem  $\alpha$ -Synuklein-Antikörper. Danach konnte die Färbung am Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ 9000 aufgenommen werden.

### **2.8.4 Quantifizierung von Fluoreszenzmessungen**

Die bildgebende Fluoreszenzmikroskopie von mit Farbstoffen beladenen Zellen ist eine etablierte und sich in ständiger Weiterentwicklung befindende Methode. In dieser Arbeit wurde zur Quantifizierung der Fluoreszenzintensität die Software BZ-II-Analyser von Keyence genutzt. Um die Fluoreszenzintensität eines Proteins in der Zellkultur zu bestimmen, ist es möglich, mit dem Keyence BZ-9000, die einzelnen Wells der 4-Well-Zellkulturplatte in 10-facher Vergrößerung in kurzer Zeit aufzunehmen. Die entstandenen Einzelbilder werden dann zusammengesetzt und zur Auswertung genutzt. Bei der Zellfärbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern ist die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen, das heißt je mehr Bindungsstellen vorhanden sind, desto heller leuchtet die Zelle. Mit Hilfe der Software kann nun eine Maske erstellt werden, bei der der Messungsbereich manuell bestimmt wird. Mit der BZ-II-Analyser Software ist es dazu noch möglich, einen Bereich der Zelle zu markieren und die in dem Bereich befindlichen angefärbten Proteine auszuwählen (Siehe Abb.15). Diese Technik wurde in dieser Arbeit genutzt, um die Menge an  $\alpha$ -Synuklein in der dopaminergen Zelle in der 100er Vergrößerung zu bestimmen.



**Abbildung 16** mit BZ-II-Analyzer erstellte Maske zur Auswertung der Menge an  $\alpha$ -Syn

A) Tyrosinhydroxylase-positiv (rot) mit  $\alpha$ -Syn (grün) B) erstellte Maske in weiß für grünen Farbbereich C) erstellte Maske in blau für roten Farbbereich D) nur Auswahl vom grünen Farbbereich, der sich im roten Farbbereich befindet

## 2.9 Proteinbiochemische Messungen

### 2.9.1 Zellyse mit Neuronal Protein Extraction Reagenz (NEPER)

Dem Lysepuffer NEPER (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) wurde 1:100 Protease/Phosphatase Inhibitor (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) hinzugefügt. Die Zellen aus einer 4-Wellplatte wurden einmal mit PBS (4°C) gewaschen. Nach Zugabe von 100  $\mu$ l NEPER pro Well für 5 min auf Eis wurden die Zellen mechanisch mit der Pipettenspitze von der Platte geschabt und in ein 1,5 ml Tube überführt. Nach 10 min Zentrifugation bei 10000xg und 4°C wurde der Überstand in ein neues 0,5 ml Low binding Tube überführt und bei -20°C gelagert.

### 2.9.2 Proteinquantifizierung

Zur Messung der Proteinkonzentration im Lysat wurde der BCA Protein Assay Kit von Pierce (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) genutzt. Dieser Test basiert auf der Bildung eines farbigen Komplexes von  $\text{Cu}^+$  mit Bicinchoninsäure (BCA). Dabei wird die Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  im alkalischen Milieu ausgenutzt. Zuerst wurde eine Eichkurve mit BSA als Standard erstellt. Die Messlösung (50 Teile BCA Reagenz A, 1 Teil BCA Reagenz B) wurde zu den

Proben und der Eichlösung pipettiert, für 30 sec geschüttelt und für 30 min bei 37° inkubiert. Die Konzentration der Proteine wurde im Abgleich zur Eichkurve bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch gemessen.

### **2.9.3 Western Blot Analyse**

Mittels einer denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden Proteine im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt. Dazu wurde das NuPage® SDS-Page-Gel System von Life technology verwendet. Da gleichzeitig Proteine hohen und sehr niedrigen Molekulargewichts aufgetrennt werden sollten, wurden kommerzielle 4-12% NuPage® Bis-Tris-Gradientengele mit MES Laufpuffer (Aufspaltungsbereich von 6 kDa bis 220 kDa) (Life technology, Carlsbad, CA) verwendet. Die Proben liefen mit NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X) bei 200 V und 80 mA.

Die Proteinbanden wurden auf eine Nitrocellulosemembran mittels iBlot-System (Life technology, Carsbad, CA) nach Herstellerangaben übertragen. Um die zu analysierenden Proteine auf der Membran sichtbar zu machen, wurden spezifische Antikörper gegen diese Proteine eingesetzt. Durch die einstündige Inkubation mit Blocking Solution (Candor Bioscience, Wangen, D) wurden zuerst unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Die Färbungen mit dem Primärantikörper (siehe Tabelle 5) wurden bei 37°C für 1h oder über Nacht bei 4°C durchgeführt. Zum Nachweis des Primärantikörpers wurde die Membran mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA) für 1h bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich nochmals viermal gewaschen. Um die durch den Antikörper detektierten Banden sichtbar zu machen, wurde das DURA VEMTO Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) nach Herstellerangaben benutzt. Die Membran wurde mit 1 ml der Entwicklerlösung benetzt und die Proteinbande konnte mit Hilfe des Luminescent Image Analyzer LAS 3000 (Fujifilm) detektiert werden.

### **2.9.4 Immunpräzipitation**

Mit dieser Methode können, mit Hilfe spezifischer Antikörper, gezielt Proteine aus einem Proteingemisch angereichert bzw. präzipitiert werden. Dazu wurde der Pierce Classic IP Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) nach Herstellerangaben genutzt. Bei der Immunpräzipitation wurde der Antikörper an Protein A/G Plus Agarose gekoppelt und mit dem Proteingemisch inkubiert. Protein A/G sind Proteine der bakteriellen Zellwand, die eine hohe Affinität zur Fc-Region vieler Immunglobuline der Säuger besitzen. Diese Proteine bieten sich zur Aufreinigung und Anreicherung von Antikörpern bzw. Immunkomplexen an,

da nach Bindung des Fc-Teils der Fab-Teil weiterhin für die Antigenbindung zur Verfügung steht. Pro Immunpräzipitation wurden an 40 µl Protein A/G-Agarose 10 µg affinitätsgereinigter Antikörper gekoppelt. Die Kopplung des Antikörpers an die Agarose erfolgte unter leichtem Schütteln bei 4°C für 1 Stunde bis über Nacht. Nach dem Verfahren wurden die Immunkomplex-Agarosekügelchen bei 1000xg für 1 min pelletiert, und 2 mal gewaschen und anschließend mit 2 mal SDS-Page-Probenpuffer für 5 min auf 80°C erhitzt. Danach erfolgte die Analyse mittels SDS-Page.

## **2.10 Statistik**

Bei allen Versuchen wurde eine Kontrollkultur mitgeführt, die jeweils nur dem Mediumwechsel unterlag. Jeder Versuch wurde mindestens 3 mal unter gleichen Bedingungen wiederholt (n=Anzahl Wiederholungen, m=Anzahl der Wells).

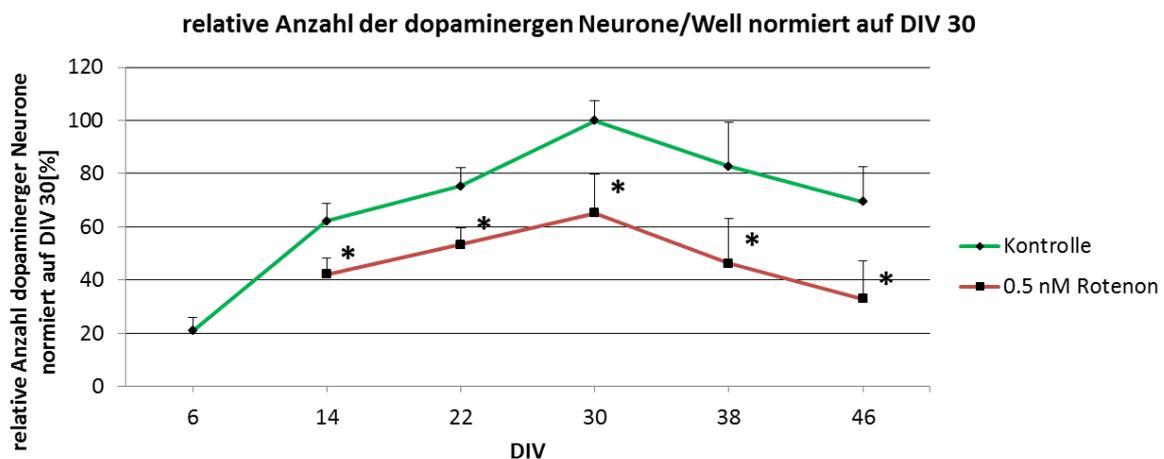
Nach Vereinigung der Einzelversuche wurde mittels Mann-Whitney-Test untersucht, ob sich die toxinbehandelte Gruppe in ihrem Ergebnis signifikant von der anderen toxinbehandelten Gruppe und der unbehandelten Kontrollgruppe unterschied, dabei wurden die p-Werte je nach Signifikanzniveau \* für  $p < 0,05$ , \*\* für  $p < 0,01$  und \*\*\* für  $p < 0,001$  eingestuft.

Der Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben ist ein nichtparametrischer Test zur Überprüfung, ob die zentrale Tendenz von zwei verschiedenen Stichproben unterschiedlich ist. Die Berechnung der Teststatistik basiert also auf dem Vergleich von zwei Rangreihen. Dahinter steht die Überlegung, dass sich die Daten in einer gemeinsamen Rangreihe gleichmässig verteilen, wenn sich die zentrale Tendenz zweier Rangreihen nicht unterscheiden. Am häufigsten werden diese Tests angewendet, um Mittelwertsunterschiede zwischen zwei Experimental-Stichproben oder einer Experimental- und einer Kontrollgruppe zu untersuchen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Überlebenskurve der dopaminergen Neurone unter Pestizidbehandlung

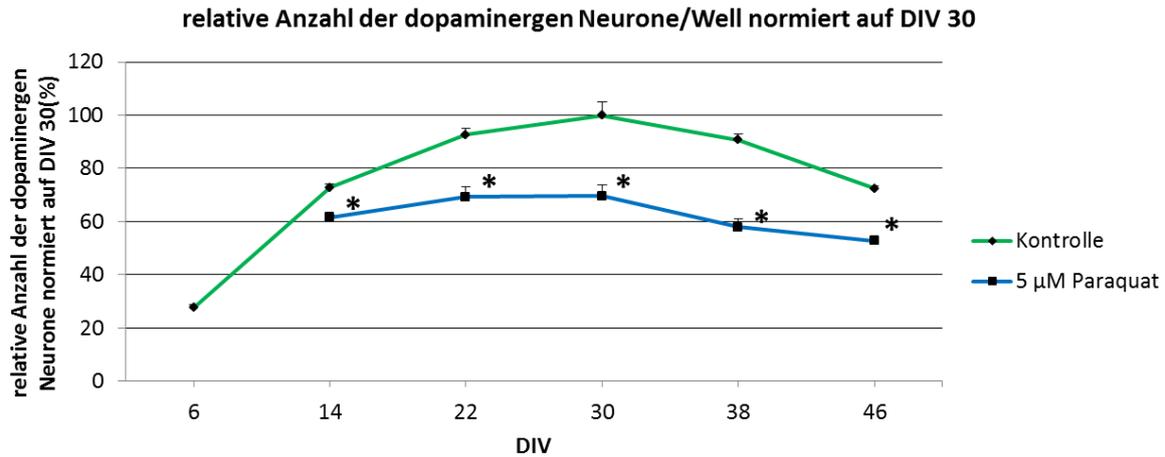
Die Kultur wurde am DIV 6, dann jeden zweiten Tag mit Rotenon behandelt und am DIV 6, 14, 22, 30, 38 und 46 fixiert. Um die Überlebensrate der dopaminergen Neurone um etwa 25-50 % gegenüber der Kontrolle zu senken, wurde 0,5 nM Rotenon verwendet. Die Wahl dieser Toxin-Konzentration basiert auf Vorversuchen der Arbeitsgruppe. (Radad and Gille 2008) Morphologisch unterscheiden sich die überlebenden dopaminergen Neurone kaum von denen der Kontrollkultur (siehe Abb.19 A, B).



**Abbildung 17** Überlebensrate der dopaminergen Neurone nach Rotenon

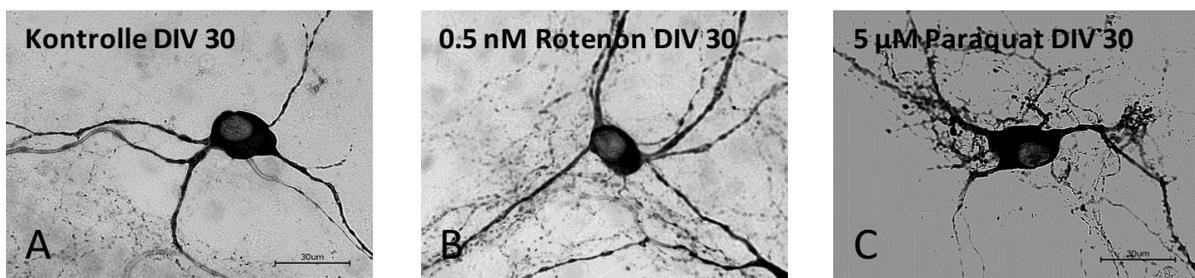
Die Behandlung erfolgte mit 0,5 nM Rotenon ab DIV 6 (jeden zweiten Tag) bis DIV 46. Die Ergebnisse wurden vor der Auswertung auf ein einheitliches Maß in Prozent normiert. Die Kontrolle DIV 30 entspricht 100 %. Die dopaminergen Neurone wurden immunzytochemisch durch TH-Färbung nachgewiesen und ausgezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von mindestens 3 unabhängigen Kulturen mit je 4 Wells pro Experiment. Die signifikanten Unterschiede zur Kontrolle wurden mit dem Mann-Whitney Test berechnet  $*p < 0,05$ .

Um mit Paraquat einen ähnlichen Effekt zu erzielen wie durch die Rotenon-Behandlung, musste eine sehr viel höhere Konzentration eingesetzt werden. Die Kultur wurde wiederum ab DIV 6 und dann jeden zweiten Tag mit 5  $\mu$ M Paraquat behandelt. Die überlebenden dopaminergen Neurone unter Paraquat-Einfluss zeigen morphologisch eine starke Verkürzung der Neuriten (siehe Abb.19 C).



**Abbildung 18 Überlebensrate der dopaminergen Neurone nach Paraquat**

Die Behandlung erfolgte mit 5 µM Paraquat ab DIV 6 (jeden zweiten Tag) bis DIV 46. Die Ergebnisse wurden vor der Auswertung auf ein einheitliches Maß in Prozent normiert. Die Kontrolle DIV 30 entspricht 100 %. Die dopaminergen Neurone wurden immunzytochemisch durch TH-Färbung nachgewiesen und ausgezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von mindestens 3 unabhängigen Kulturen mit je 4 Wells pro Experiment. Die signifikanten Unterschiede zur Kontrolle wurden mit dem Mann-Whitney Test berechnet  $p < 0,05$ .

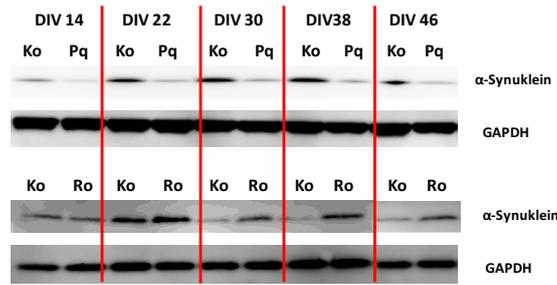


**Abbildung 19 Morphologie der dopaminergen Neurone unter Rotenon- bzw. Paraquat-Einfluss**

Darstellung der Morphologie: A) typische dopaminerge Nervenzelle mit für diesen Zeitpunkt normal ausgebildetem Zellkörper und Neuriten B) dopaminerge Nervenzelle am DIV 30 unter Rotenon mit normal ausgebildeten Neuriten C) Verkürzung und Rückbildung der Neuriten unter Paraquat-Einfluss.

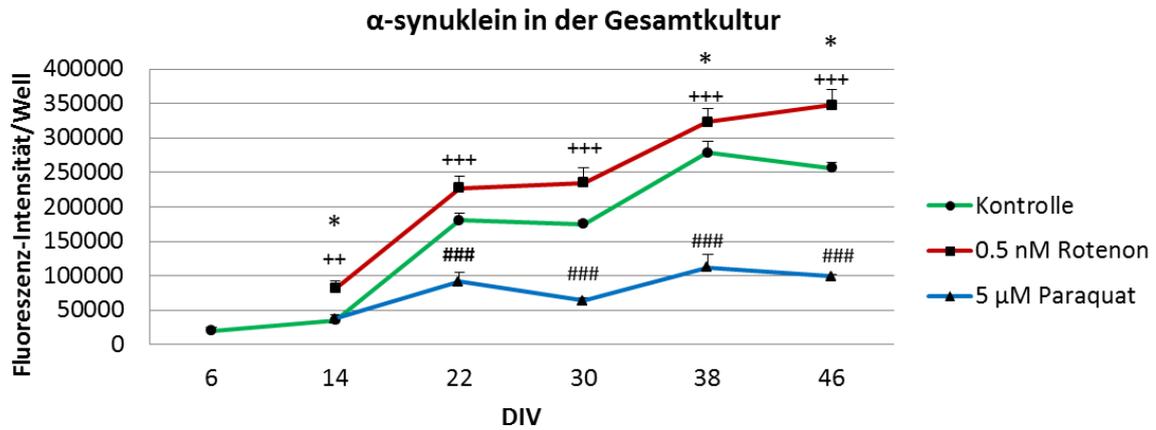
### 3.1.2 Verhalten von $\alpha$ -Synuklein nach Toxin-Behandlung im Verlauf der Zeit

Während der chronischen Behandlung wurde kontinuierlich das Verhalten des  $\alpha$ -Synukleins durch Fluoreszenzfärbung und Western Blot beobachtet. In den mit Rotenon behandelten Kulturen war schon durch eine stärkere Fluoreszenzfärbung eine erhöhte  $\alpha$ -Synuklein-Expression zu vermuten, was im Western Blot (Abb. 20) zur Proteinquantifizierung und in der Auswertung der Fluoreszenzintensität bestätigt werden konnte. Sowohl im Western Blot als auch bei der Quantifizierung der Übersichtsaufnahmen in der 10-fachen Vergrößerung der Fluoreszenzfärbung zeigte sich, dass die Menge an  $\alpha$ -Synuklein in der Gesamtkultur bei Rotenon-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle signifikant zunimmt und bei Paraquat abnimmt (Abb.21).



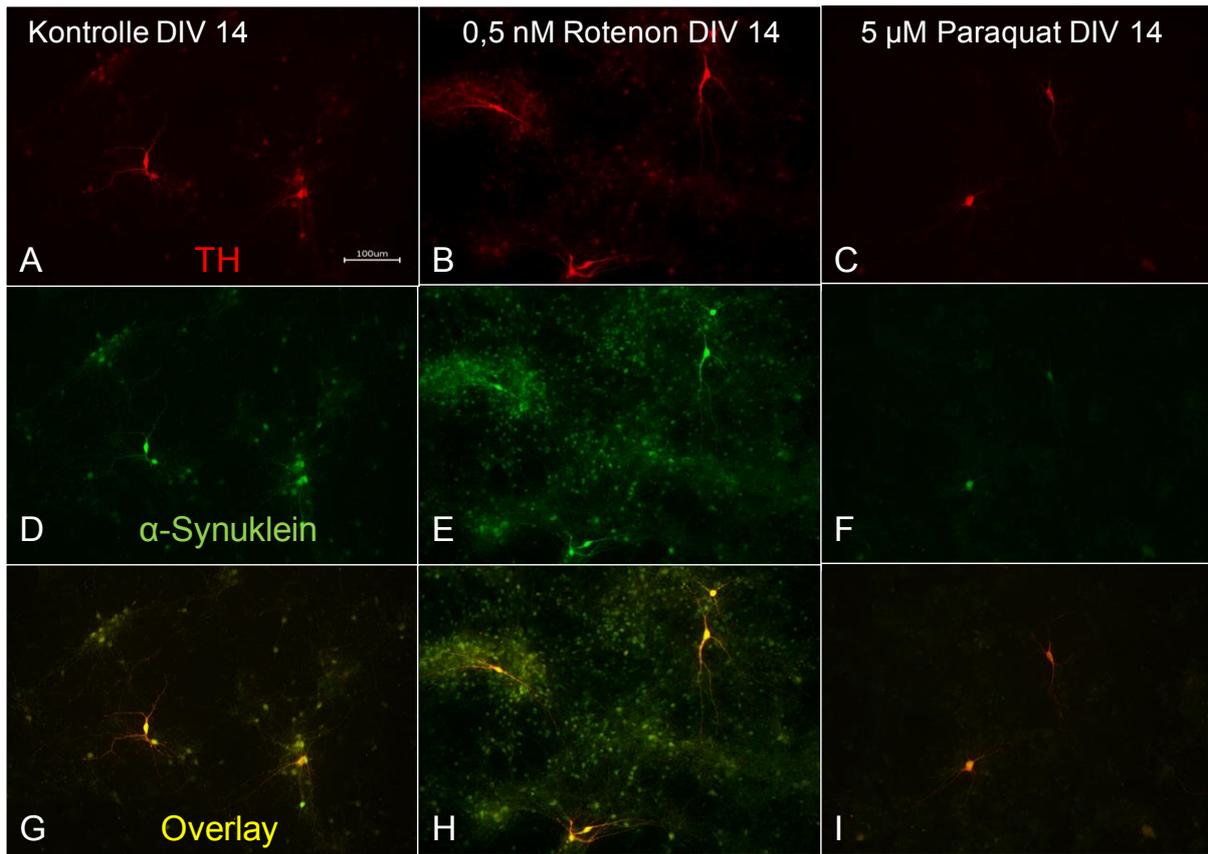
**Abbildung 20 Darstellung von  $\alpha$ -Synuklein im Verlauf der Zeit nach Toxin-Behandlung**

Es wurden 15  $\mu$ g Gesamtein auf einem 4-12 % Bis-Tris-Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einem spezifischen Anti- $\alpha$ -Syn-Antikörper. Als Ladekontrolle diente GAPDH. Unter Paraquat ist zu jedem Zeitpunkt eine Abnahme von  $\alpha$ -Synuklein zu erkennen und unter Rotenon ab DIV 22 eine Zunahme.



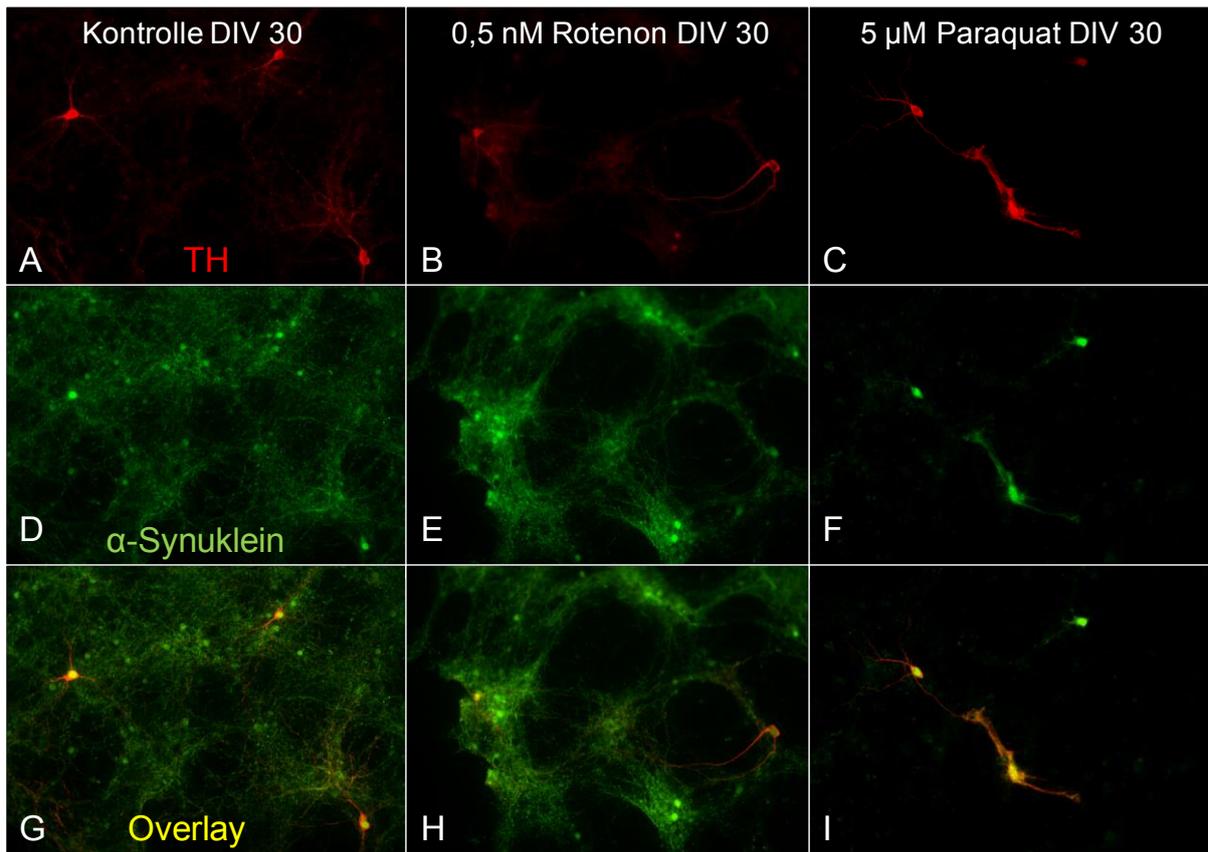
**Abbildung 21 Fluoreszenzintensität von  $\alpha$ -Synuklein pro Well**

Am DIV 6, 14, 22, 30, 38, 46 erfolgte die Fixierung der Kulturen mit PFA und danach die Fluoreszenzfärbung mit Anti- $\alpha$ -Synuklein. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 unabhängigen Kulturen mit Fluoreszenz-Messungen in 4 Wells pro Experiment. Die signifikanten Unterschiede von Kontrolle zu Rotenon (\*  $p < 0,05$ ); Kontrolle zu Paraquat (###  $p < 0,001$ ) und Rotenon zu Paraquat (\*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ) wurden mit dem Mann-Whitney Test berechnet.



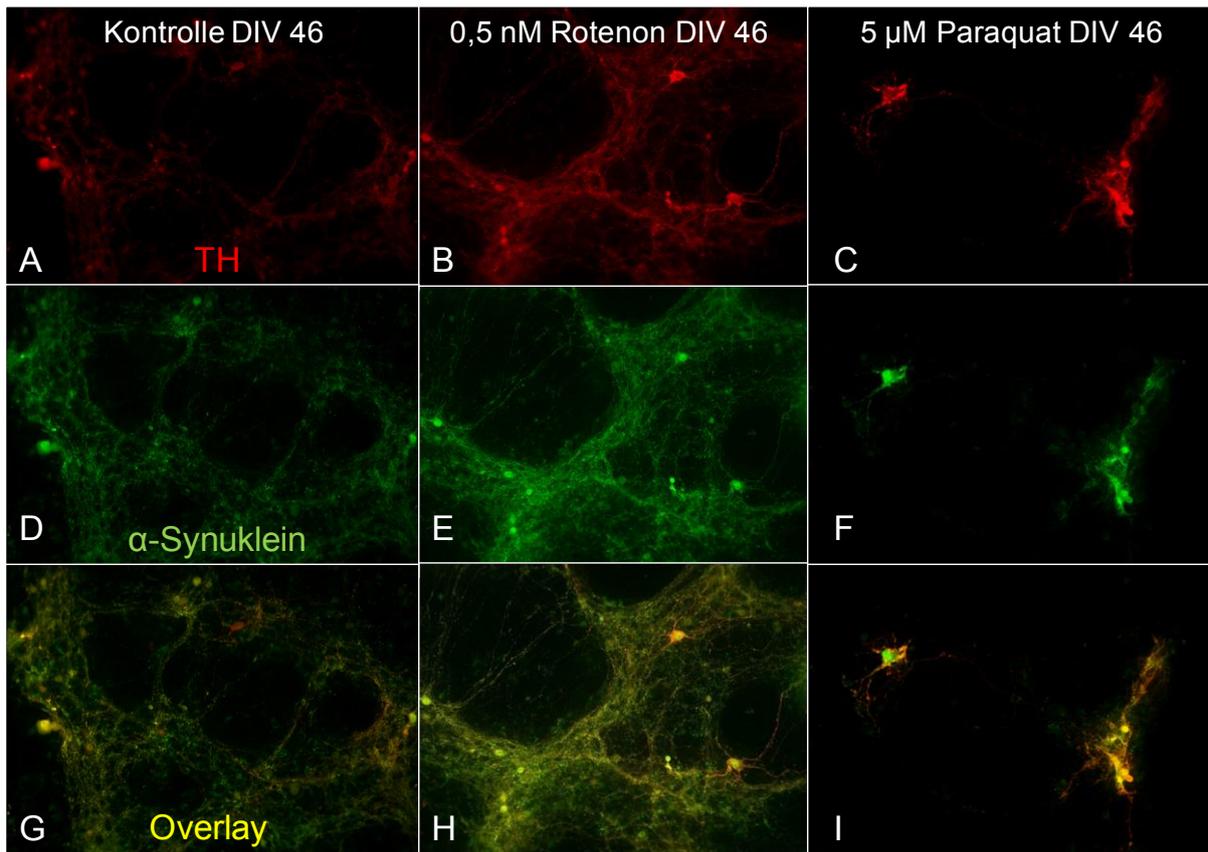
**Abbildung 22** Verteilung von  $\alpha$ -Synuklein in der dopaminergen Primärzellkultur am DIV 14

Darstellung der dopaminergen Primärzellkultur am DIV 14, gefärbt mit Antikörpern gegen TH und  $\alpha$ -Syn in 10-facher Vergrößerung; G, H und I stellen die jeweiligen Overlays von TH und  $\alpha$ -Syn dar, Maßstab = 100  $\mu$ m.



**Abbildung 23** Verteilung von  $\alpha$ -Synuklein in der dopaminergen Primärzellkultur am DIV 30

Darstellung der dopaminergen Primärzellkultur am DIV 30, gefärbt mit Antikörpern gegen TH und  $\alpha$ -Syn in 10-facher Vergrößerung, G, H und I stellen die jeweiligen Overlays von TH und  $\alpha$ -Syn dar, Maßstab = 100  $\mu$ m.

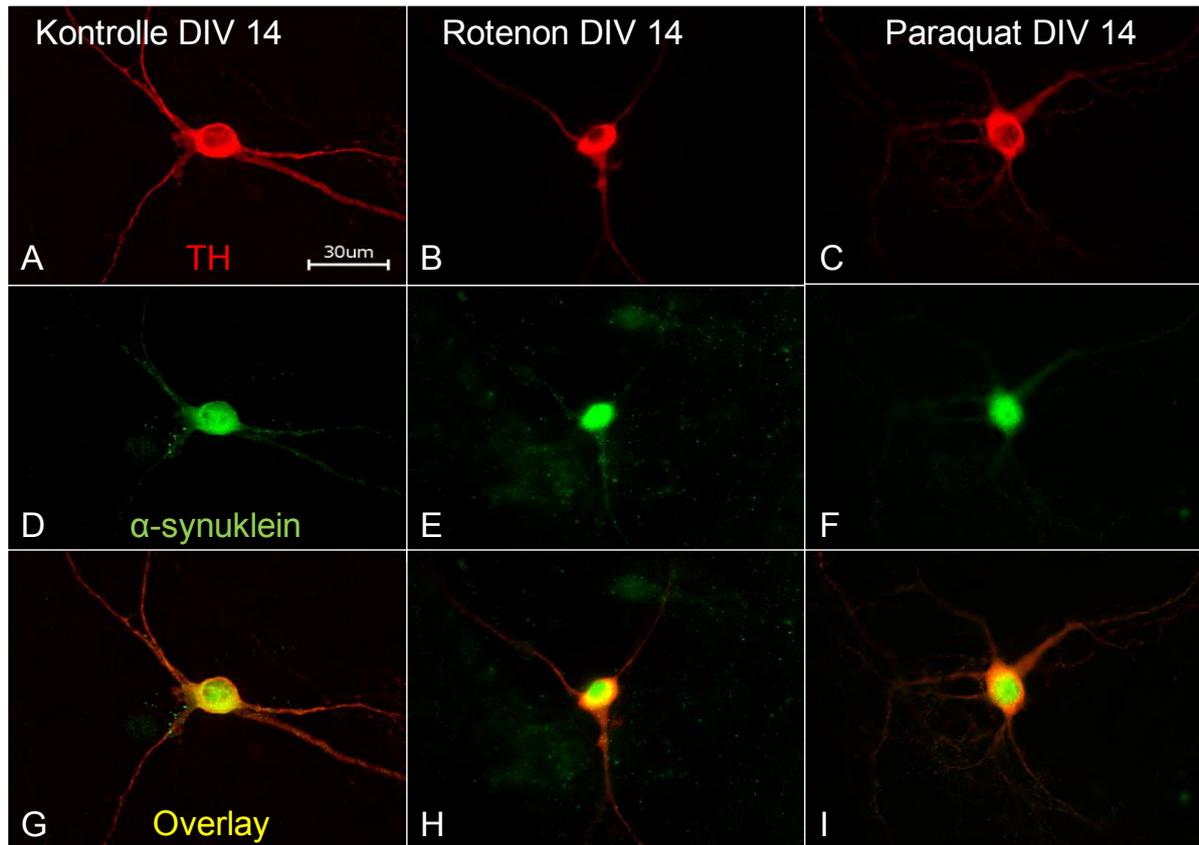


**Abbildung 24** Verteilung von  $\alpha$ -Synuklein in der dopaminergen Primärzellkultur am DIV 46

Darstellung der dopaminergen Primärzellkultur am DIV 46, gefärbt mit Antikörpern gegen TH und  $\alpha$ -Syn in 10-facher Vergrößerung. G, H und I stellen die jeweiligen Overlays von TH und  $\alpha$ -Syn dar, Maßstab = 100  $\mu$ m.

### 3.2 Lokalisation von $\alpha$ -Synuklein in den dopaminergen Neuronen

Bei der Analyse der dopaminergen Neurone in der Kultur mit der 100-fachen Vergrößerung zeigte sich, dass  $\alpha$ -Synuklein zu Beginn der Kultivierung überwiegend diffus im Soma, aber auch in den Neuriten lokalisiert ist (Abb.25 D, E, F). Die dopaminergen Neurone, auch in den unbehandelten Kontrollkulturen, sind hier schon allein an ihrer  $\alpha$ -Synuklein-Intensität in der Kultur zu erkennen.

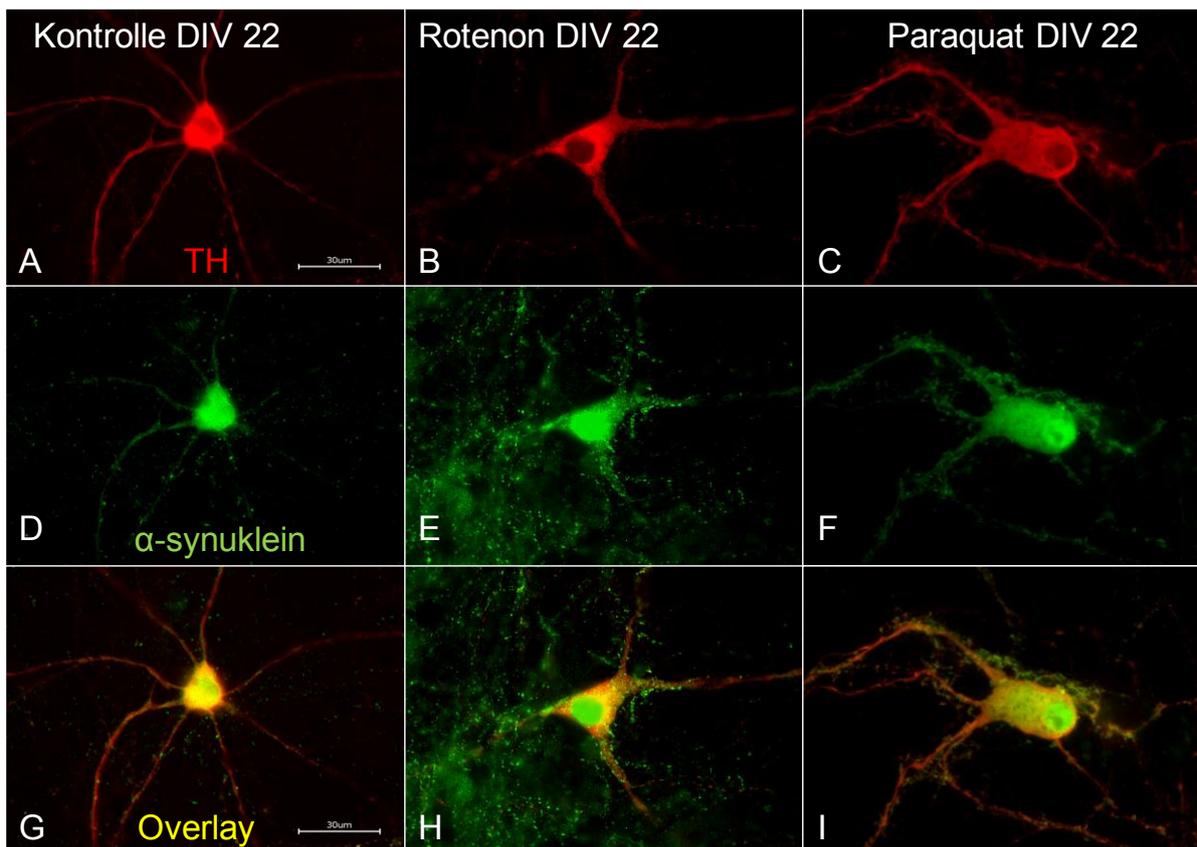


**Abbildung 25** Verteilung von  $\alpha$ -Synuklein in den dopaminergen Neuronen am DIV 14

Darstellung der dopaminergen Neurone am DIV 14 gefärbt mit Antikörpern gegen TH und  $\alpha$ -Syn in 100-facher Vergrößerung, G, H und I stellen die jeweiligen Overlays von TH und  $\alpha$ -Syn dar, Maßstab = 30  $\mu$ m.

Im weiteren Verlauf des Kulturalters kommt es ab DIV 22 bei den Rotenon-behandelten Zellen zu einer Verlagerung des  $\alpha$ -Synuklein in Richtung Neuriten und dort zu einer punktförmigen Anhäufung (Abb. 26 E, H).

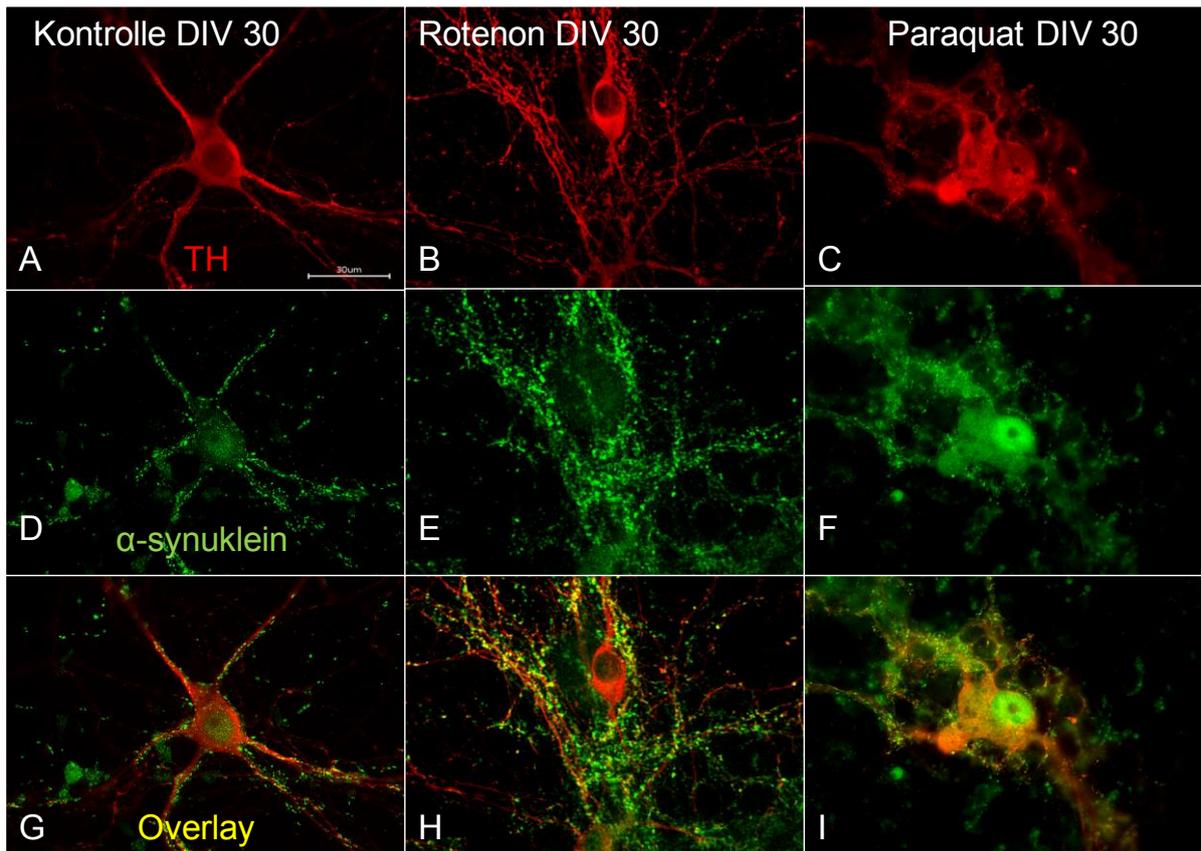
Bei den Paraquat-behandelten Zellen kommt es zu einer Deformierung der Zellkörper und die Verteilung des  $\alpha$ -Synuklein ist eher diffus in der ganzen Zelle zu beobachten, wobei auch wenige punktförmige Ansammlungen zu erkennen sind (Abb. 26 F, I).



**Abbildung 26** Verteilung von  $\alpha$ -Synuklein in den dopaminergen Neuronen am DIV 22

Darstellung der dopaminergen Neurone am DIV 22 gefärbt mit Antikörpern gegen TH und  $\alpha$ -Syn in 100-facher Vergrößerung, G, H und I stellen die jeweiligen Overlays von TH und  $\alpha$ -Syn dar, Maßstab = 30  $\mu$ m.

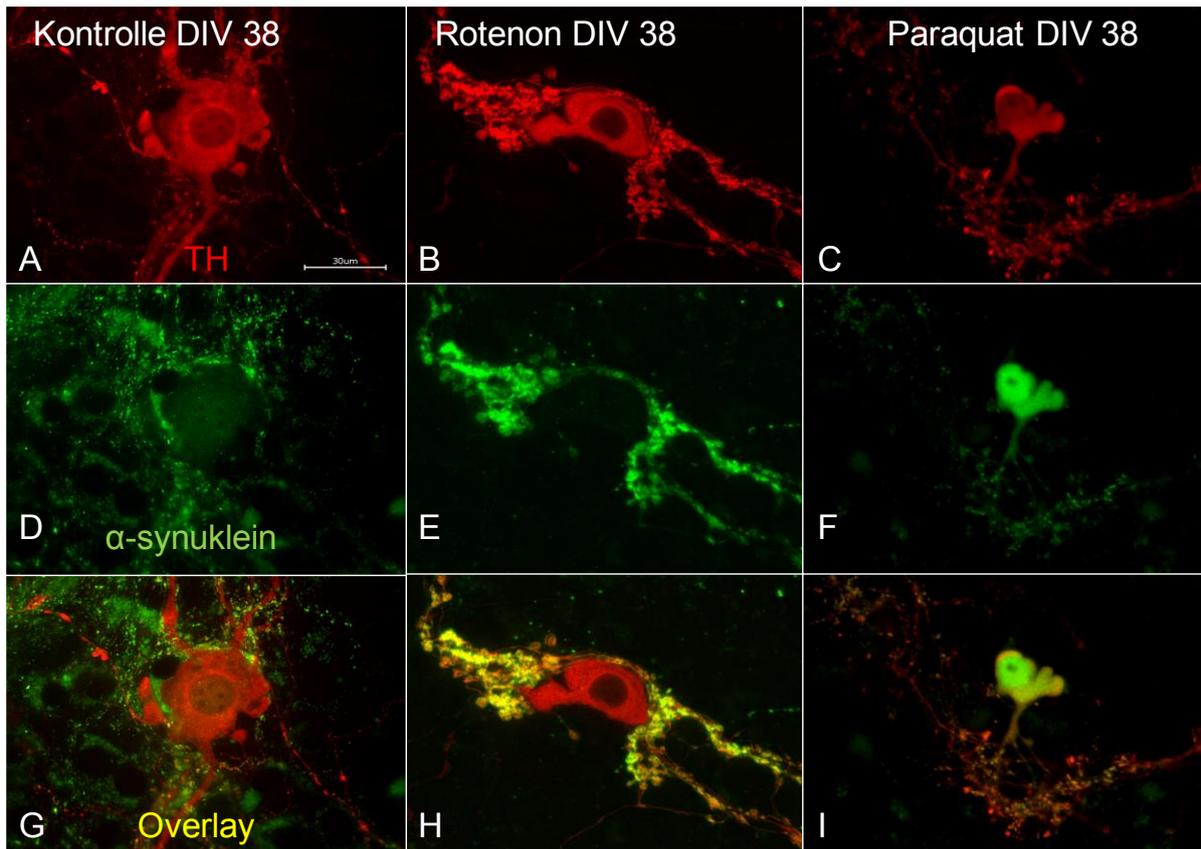
Mit zunehmendem Kulturalter lässt sich dann in den Rotenon-behandelten Zellen ein Wanderungsprozess beobachten, bei welchem das  $\alpha$ -Synuklein aus dem Zellkörper hinaus wandert und zunehmend weniger im Soma als an den Neuriten nachzuweisen ist (Abb.27 E, H). Bei der Paraquat-Behandlung sind es nur ganz wenige Zellen, die diesen Prozess zeigen. Die Mehrheit der dopaminergen Neurone bleibt auch im Soma und Kern  $\alpha$ -Synuklein-positiv und die Deformierung der Zellkörper ist weiterhin zu sehen (Abb.27 C, F, I).



**Abbildung 27 Verteilung von  $\alpha$ -Synuklein in den dopaminergen Neuronen am DIV 30**

Darstellung der dopaminergen Neurone am DIV 30 gefärbt mit Antikörpern gegen TH und  $\alpha$ -Syn in 100-facher Vergrößerung, G, H und I stellen die jeweiligen Overlays von TH und  $\alpha$ -Syn dar, Maßstab = 30  $\mu$ m.

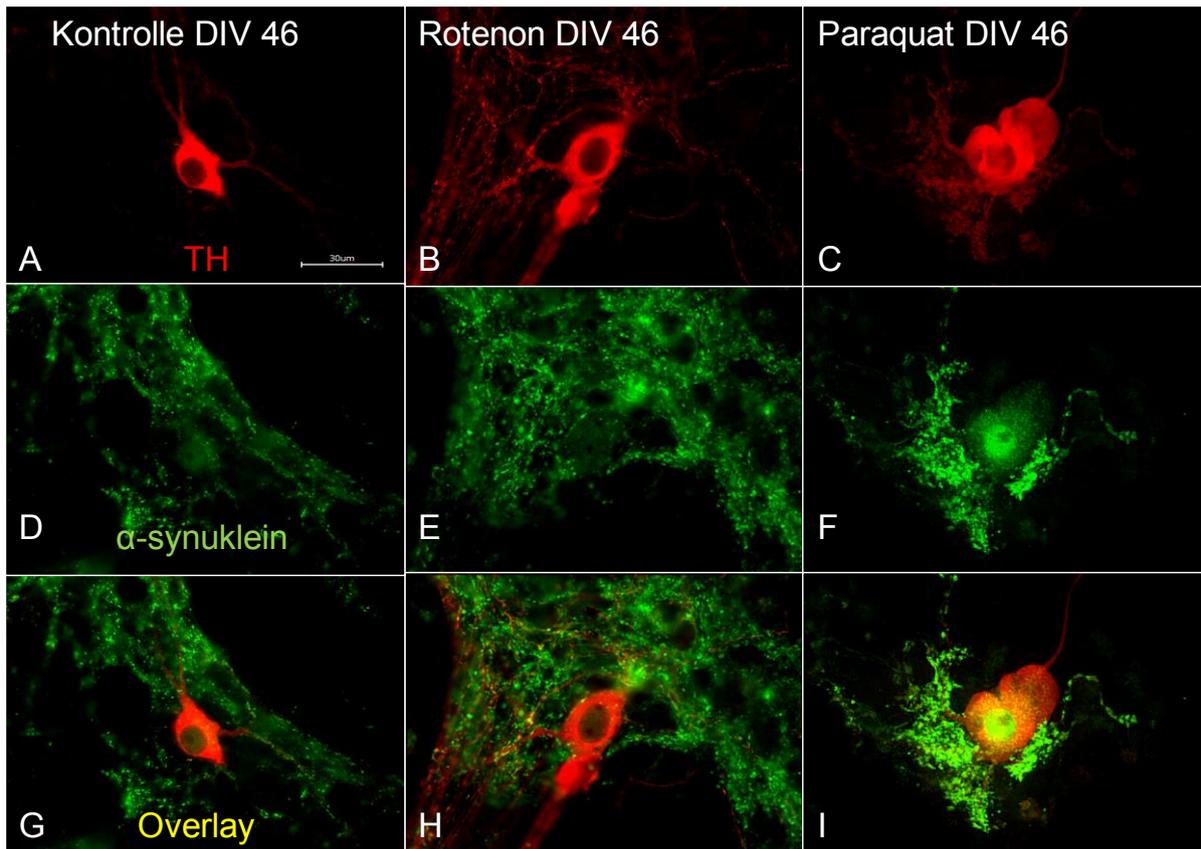
Innerhalb der Rotenon-behandelten Kultur kommt es sogar bei einigen Zellen zur Bildung von kugelförmigen Aggregaten und einem gänzlichen Auswandern von  $\alpha$ -Synuklein aus dem Soma ab DIV 38 (Abb.28 E, H).



**Abbildung 28 Verteilung von  $\alpha$ -Synuklein in den dopaminergen Neuronen am DIV 38**

Darstellung der dopaminergen Neurone am DIV 38 gefärbt mit Antikörpern gegen TH und  $\alpha$ -Syn in 100-facher Vergrößerung, G, H und I stellen die jeweiligen Overlays von TH und  $\alpha$ -Syn dar, Maßstab = 30  $\mu$ m.

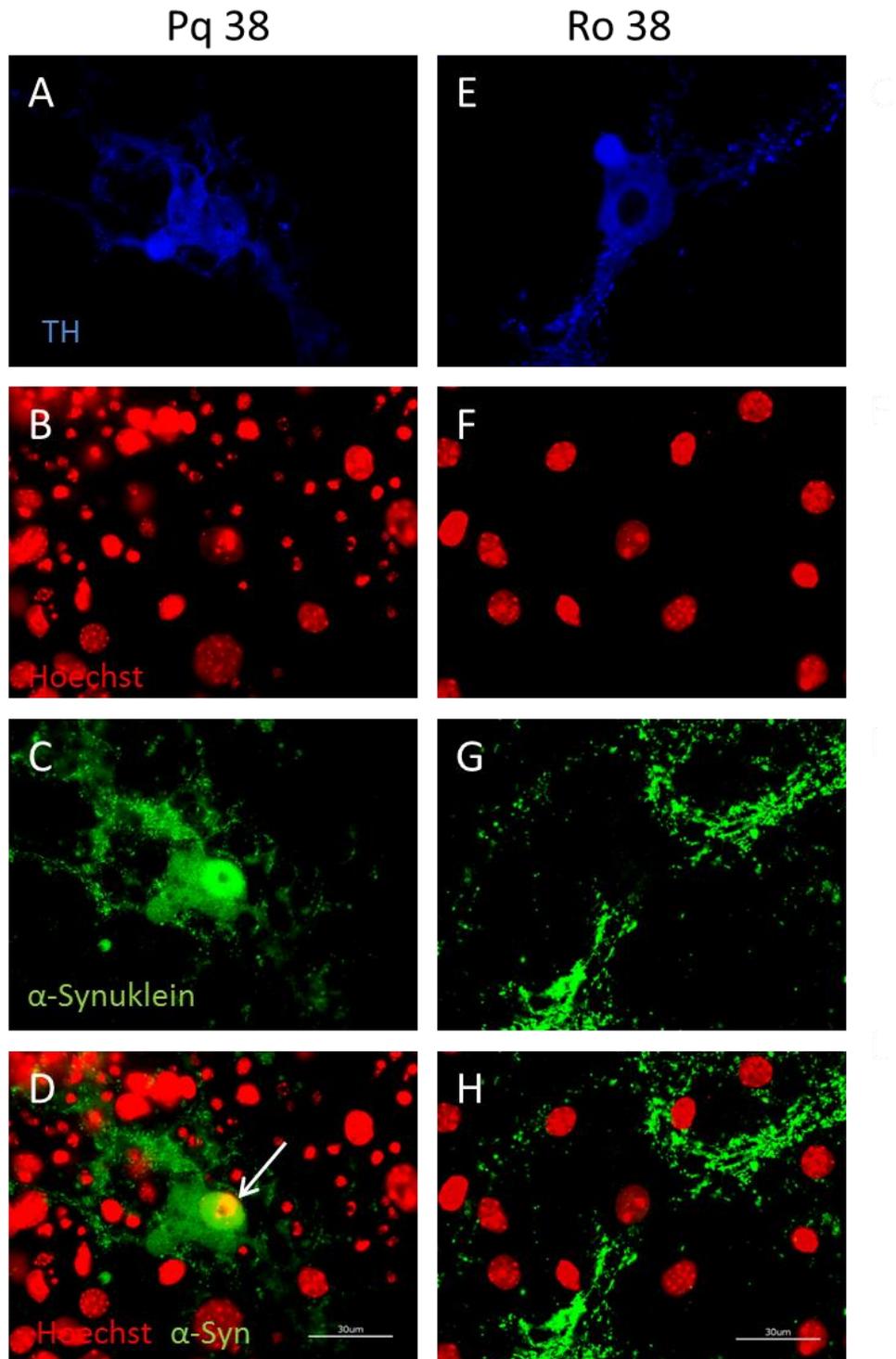
Ab DIV 46 ist  $\alpha$ -Synuklein sowohl in den Kontrollen als auch unter Rotenon-Behandlung als punktförmige Aggregate außen um den Zellkörper zu beobachten, wobei sich noch wenig  $\alpha$ -Synuklein im Soma befindet (Abb.29 D, E, G, H). Unter Paraquat-Behandlung ist weiterhin mehr  $\alpha$ -Synuklein im Zellkörper und am Kern zu sehen und die Aggregatbildung an den Neuriten ist nicht so großflächig wie bei Rotenon (Abb.29 F, I).



**Abbildung 29** Verteilung von  $\alpha$ -Synuklein in den dopaminergen Neuronen am DIV 46

Darstellung der dopaminergen Neurone am DIV 46 gefärbt mit Antikörpern gegen TH und  $\alpha$ -Syn in 100-facher Vergrößerung, G, H und I stellen die jeweiligen Overlays von TH und  $\alpha$ -Syn dar, Maßstab = 30  $\mu$ m.

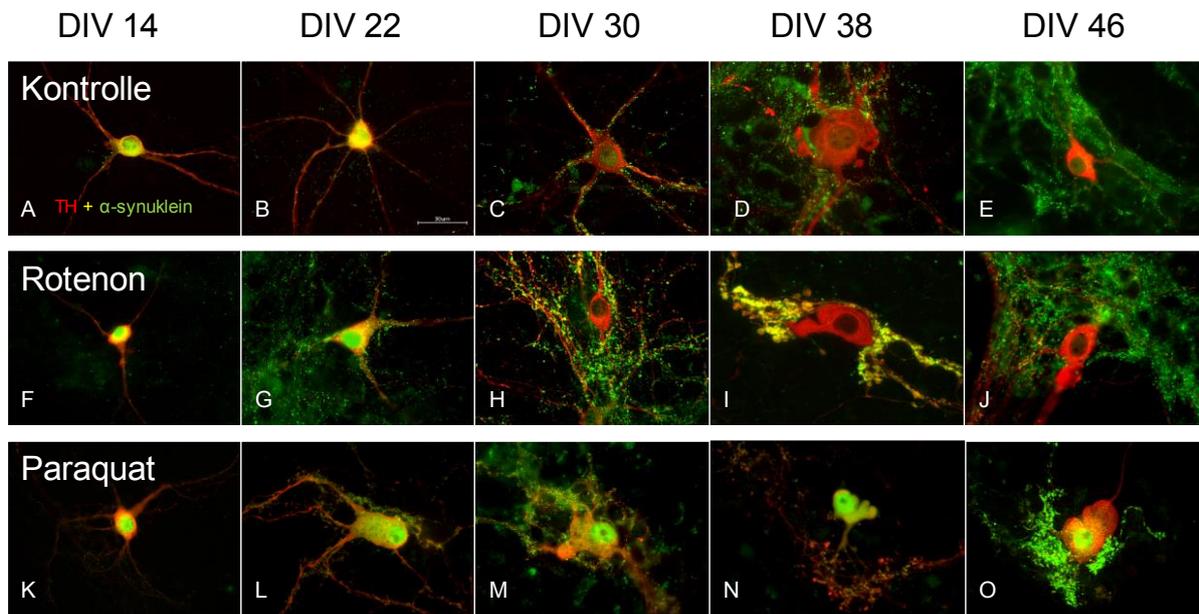
Eine Quantifizierung ergab, dass ca. 30 % der dopaminergen Neurone derartige Effekte zeigen. Der Prozess der Verlagerung und Anhäufung des  $\alpha$ -Synuklein ist bei den Rotenon-behandelten Zellen bereits ab einem früheren Zeitpunkt zu beobachten als in den Kontrollen, welche sich aber mit zunehmendem Alter ähnlich verhalten. Dies lässt schließen, dass die Behandlung mit Rotenon einen beschleunigten Alterungsprozess der Kulturen herbeiführen könnte. Außerdem wurde in den Kulturen besonders bei den Rotenon-behandelten dopaminergen Neuronen ein punktförmiges Verteilungsmuster und auch größere Ansammlungen des Proteins beobachtet, was für eine aggregierte Form des  $\alpha$ -Synuklein spricht. Die Beobachtung, dass  $\alpha$ -Synuklein mit zunehmendem Kulturalter aus dem Soma in die Peripherie austritt, konnte bei der chronischen Paraquat-Behandlung so nicht gemacht werden. Auffällig bei der Paraquat-Behandlung ist die Lokalisierung von  $\alpha$ -Synuklein im Zellkern auch in der Langzeitbehandlung (Abb.30 D). Hervorzuheben ist, dass bei der Paraquat-Behandlung von Behandlungsbeginn an keine Heraufregulierung der Gesamt- $\alpha$ -Synuklein-Expression in der Kultur zu beobachten war, wie dies sowohl bei der Kontrolle als auch bei der Rotenon-Behandlung der Fall war.



**Abbildung 30** Lokalisation von  $\alpha$ -Syn im Zellkern nach Pq und Ro im TH+ Neuron

Darstellung der dopaminergen Neurone am DIV 38 gefärbt mit Antikörpern gegen TH, Hoechst und  $\alpha$ -Syn in 100-facher Vergrößerung, D und H stellen die jeweiligen Overlays von Hoechst und  $\alpha$ -Syn dar, Maßstab = 30  $\mu$ m.

### 3.2.1 Überblick über die Verteilung von $\alpha$ -Synuklein über den gesamten Zeitraum

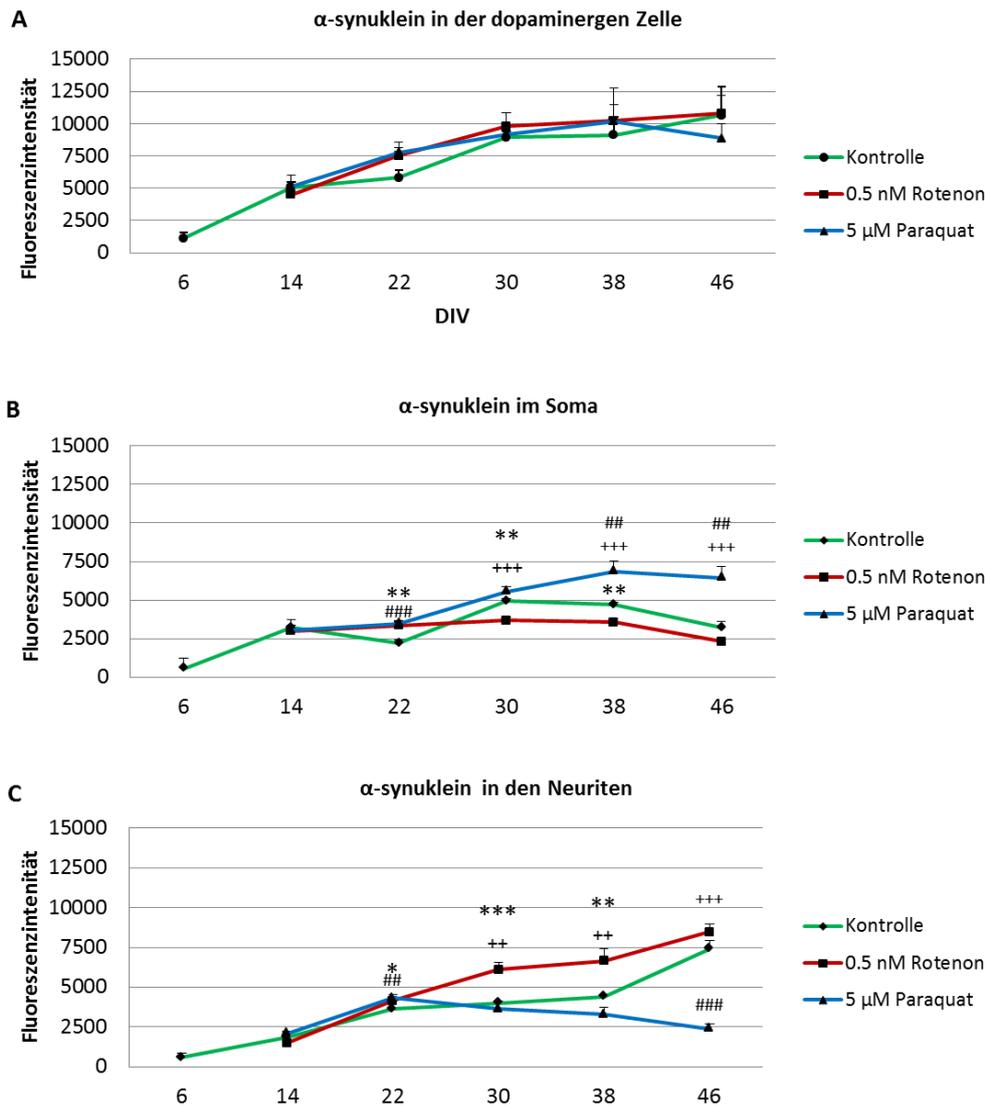


**Abbildung 31** Overlays von TH und  $\alpha$ -Synuklein in den TH+ Neuronen im Überblick

Darstellung der dopaminergen Neurone am DIV 14, 22, 30, 38 und 46 gefärbt mit Antikörpern gegen TH und  $\alpha$ -Syn in 100-facher Vergrößerung, Darstellung der Overlays von TH und  $\alpha$ -Syn, Maßstab = 30  $\mu$ m.

### 3.2.2 Quantifizierung von $\alpha$ -Synuklein mittels BZ II Analyzer

Mit Hilfe der Software BZ II Analyzer des Keyence BZ9000 Mikroskop ist es möglich den Anteil an  $\alpha$ -Synuklein (grün) im Soma und in den Neuriten der dopaminergen Neurone (rot) zu analysieren (siehe Material und Methoden 2.7.4). In Abbildung 32 sieht man bei dieser Quantifizierung, dass unter Paraquat mehr  $\alpha$ -Synuklein im Soma der dopaminergen Zelle verbleibt und kann außerdem den Wanderungsprozess des  $\alpha$ -Syn in die Neuriten unter Rotenon nachweisen.

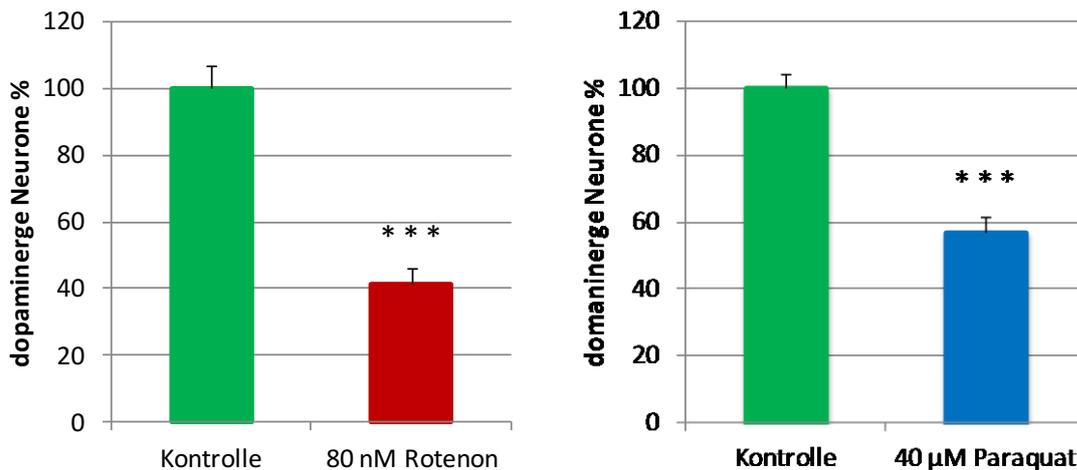


**Abbildung 32 Intensität von α-Syn in der TH+ Zelle(A), im Soma(B), in den Neuriten(C)**

Am DIV 6, 14, 22, 30, 38, 46 erfolgte die Fixierung der Kulturen mit PFA und danach die Fluoreszenzfärbung mit Anti-α-Synuclein und Anti-TH. Die Auswertung erfolgte mit dem BZII-Analyzer von Keyence. Dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenzmessung ± SEM von 3 unabhängigen Kulturen von jeweils 16 dopaminergen Zellen pro Platte pro Experiment. Die signifikanten Unterschiede von Kontrolle zu Rotenon (\* p<0,01), von Kontrolle zu Paraquat (###p<0,01; ####p<0,001) und von Rotenon zu Paraquat (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001) wurden mit dem Mann-Whitney-Test berechnet.

### 3.3 Akutversuch über 24 Stunden zum Vergleich zur chronischen Behandlung

Auch beim Akut-Versuch über 24 Stunden wurde eine viel höhere Konzentration von Paraquat benötigt, um etwa die Effekte wie in der Rotenon-Behandlung zu erreichen (Abb. 33).

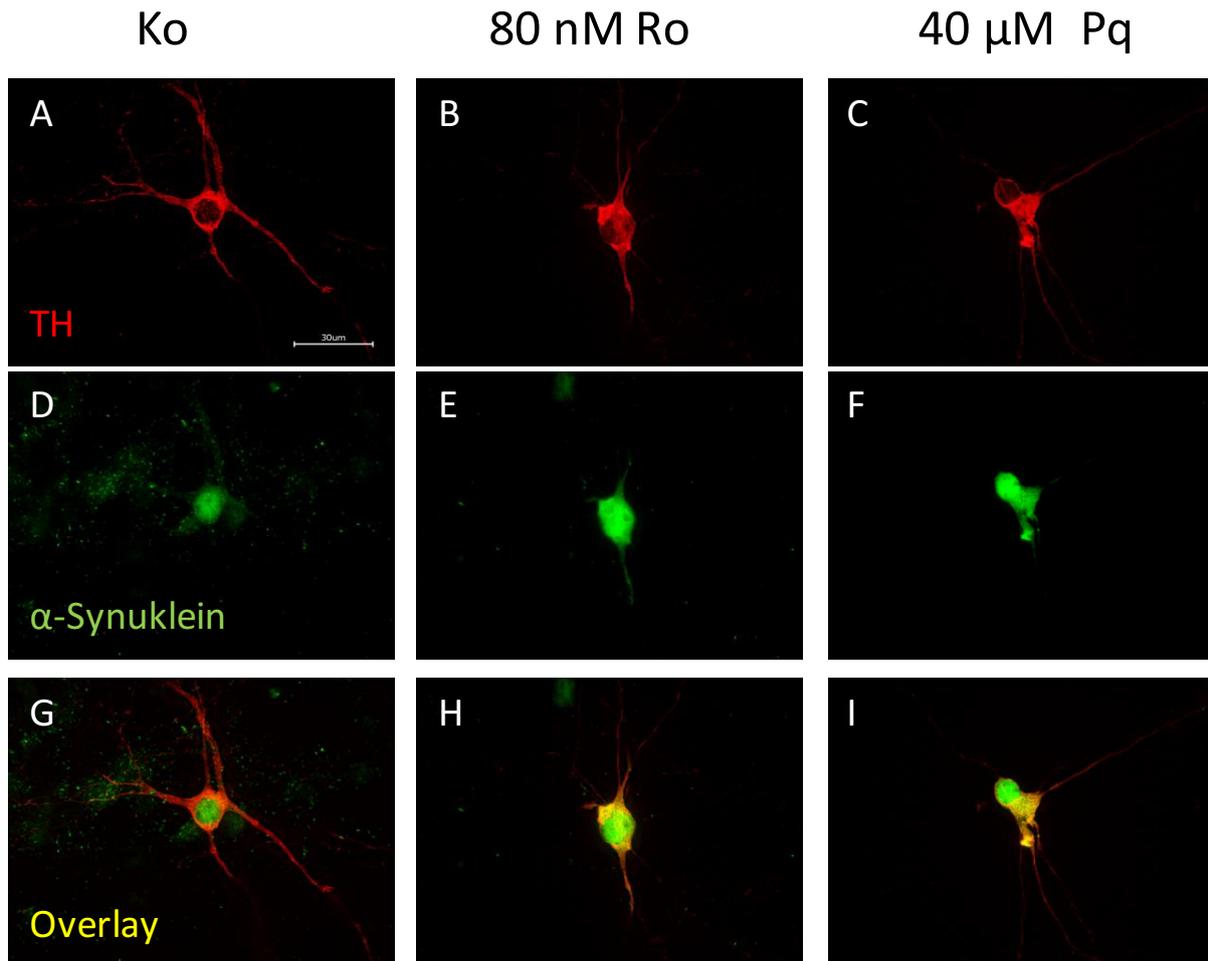


**Abbildung 33** Überlebensrate der TH+ Neuronen nach 80 nM Ro und 40 µM Pq

Die Behandlung erfolgte am DIV 10 für 24 h. Die dopaminergen Neurone wurden immunzytochemisch durch TH-Färbung nachgewiesen und ausgezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von mindestens 3 unabhängigen Kulturen mit je 4 Wells pro Experiment. Die signifikanten Unterschiede von Kontrolle zu Rotenon ( $^{***} p < 0,001$ ), von Kontrolle zu Paraquat ( $^{***} p < 0,001$ ) wurden mit dem Mann-Whitney-Test berechnet.

#### 3.3.1 Lokalisation von $\alpha$ -Synuklein in dem Akutversuch

Bei akuter Behandlung der Zellkultur mit hohen Konzentrationen des jeweiligen Pestizides über einen kurzen Zeitraum wird bei Paraquat und Rotenon eine dichte Ansammlung von  $\alpha$ -Synuklein im Bereich des Somas deutlich (Abb.34 E, F, H, I).

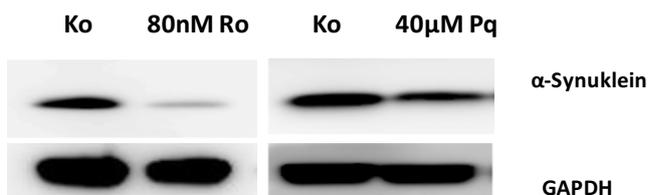


**Abbildung 34**  $\alpha$ -Syn in den TH+ Neuronen am DIV 11 nach 24 h 80 nM Rot bzw. 40  $\mu$ M Pq

Darstellung der dopaminergen Neurone am DIV 11 gefärbt mit Antikörpern gegen TH und  $\alpha$ -Syn in 100-facher Vergrößerung, G, H und I stellen die jeweiligen Overlays von TH und  $\alpha$ -Syn dar, Maßstab = 30  $\mu$ m.

### 3.3.2 Darstellung von $\alpha$ -Synuklein in der Gesamtkultur nach Akutversuch

Bei der Quantifizierung mittels Western Blot ist im Akutversuch sowohl unter Rotenon- als auch unter Paraquat-Einfluss eine Abnahme von  $\alpha$ -Synuklein in der Gesamtkultur nachweisbar (Abb.36).



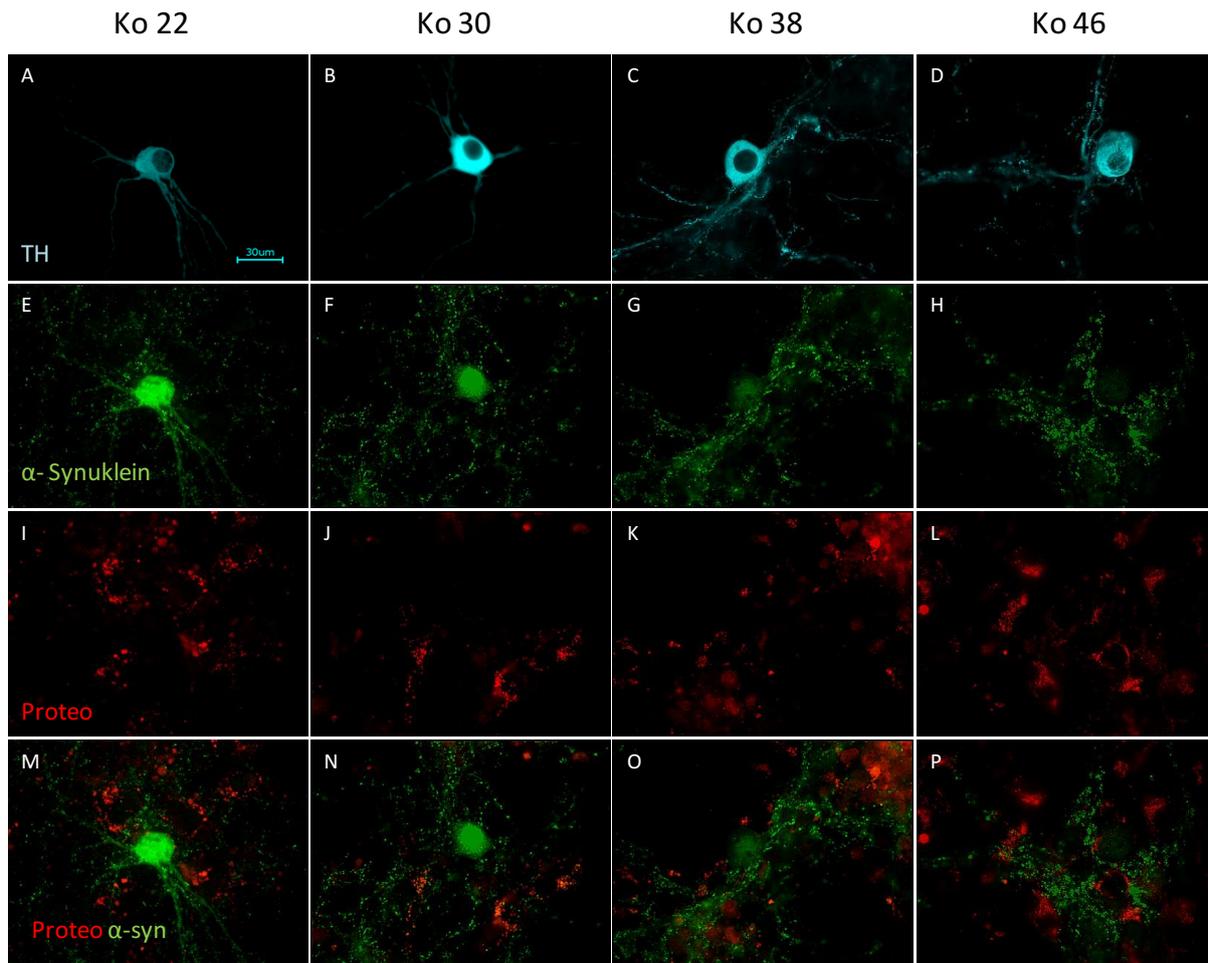
**Abbildung 35** Darstellung von  $\alpha$ -Syn nach 24h mit 80 nM Rotenon bzw. 40  $\mu$ M Paraquat

Es wurden 15 $\mu$ g Gesamtprotein auf einem 4-12 % Bis-Tris-Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einem spezifischen Anti- $\alpha$ -Syn-Antikörper. Als Ladekontrolle diente GAPDH. Unter Paraquat und Rotenon ist eine Abnahme von  $\alpha$ -Synuklein zu erkennen.

Der Verteilungsprozess des  $\alpha$ -Synuklein, der im chronischen Behandlungsversuch mit beiden Toxinen zu beobachten war, stellt unserer Meinung nach den Prozess der Aggregationsbildung des  $\alpha$ -Synuklein in den dopaminergen Neuronen realistischer dar als die Vorgänge im Akutversuch. Die akute Toxizität scheint eine direkte Neurotoxizität mit Zelltod zur Folge zu haben, während die chronische Vergiftung die Aggregationsbildung anregt und deshalb eher der Situation *in vivo* entspricht. Alle weiteren Versuche wurden deshalb über 46 Tage unter chronischer Behandlung durchgeführt.

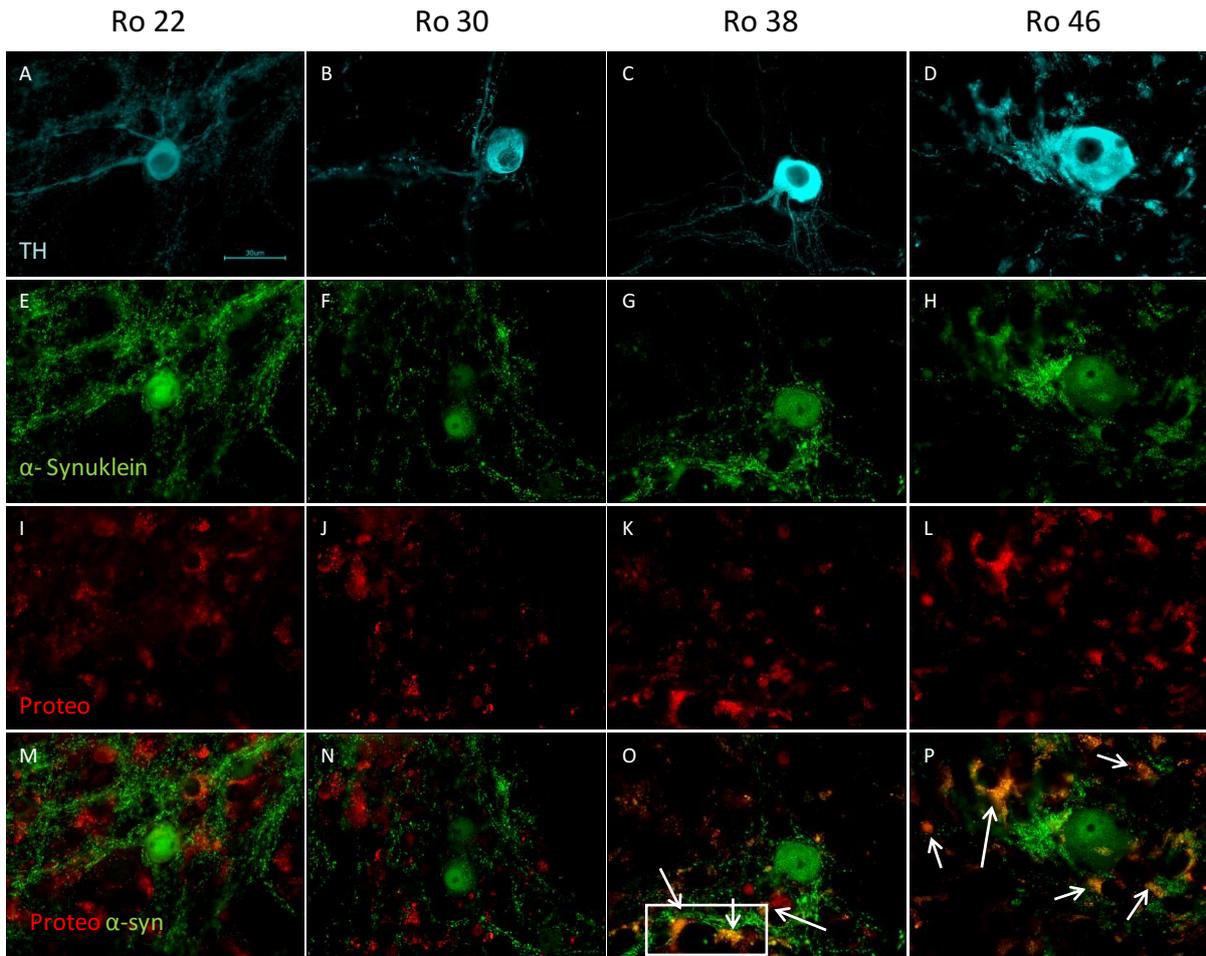
### **3.4 Nachweis von $\alpha$ -Synuklein-Aggregaten mit dem Proteo-Aggregosomen-Kit**

Um die Aggregatbildung von  $\alpha$ -Synuklein nachzuweisen, wurde der Proteo-Aggregosomen-Kit verwendet. Mit diesem Kit konnte in den Kontrollen und bei der Paraquat-Behandlung wenig, unter Rotenon-Behandlung ab DIV 38 und vermehrt ab DIV 46 (Abb. 38 A, B, C) eine Aggregation durch eine Kolo-kalisation der Proteo-Färbung und der  $\alpha$ -Synuklein-Färbung nachgewiesen werden.



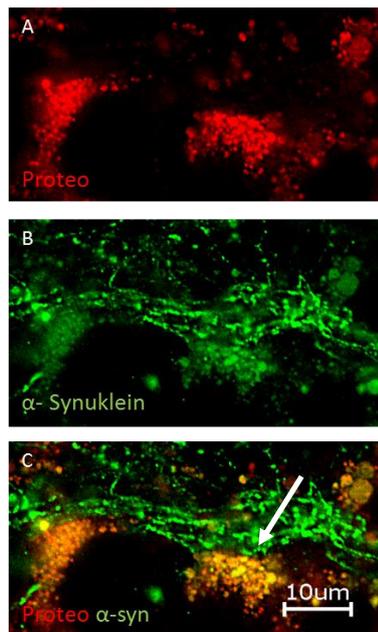
**Abbildung 36 TH,  $\alpha$ -Syn, Proteo-Aggregosomen Kit in der Kontrollkultur im Überblick**

Darstellung der dopaminergen Neurone am DIV 22, 30, 38 und 46 gefärbt mit Antikörpern gegen TH,  $\alpha$ -Syn und dem Proteo Aggregosomen Kit in 100-facher Vergrößerung, Maßstab = 30  $\mu$ m.



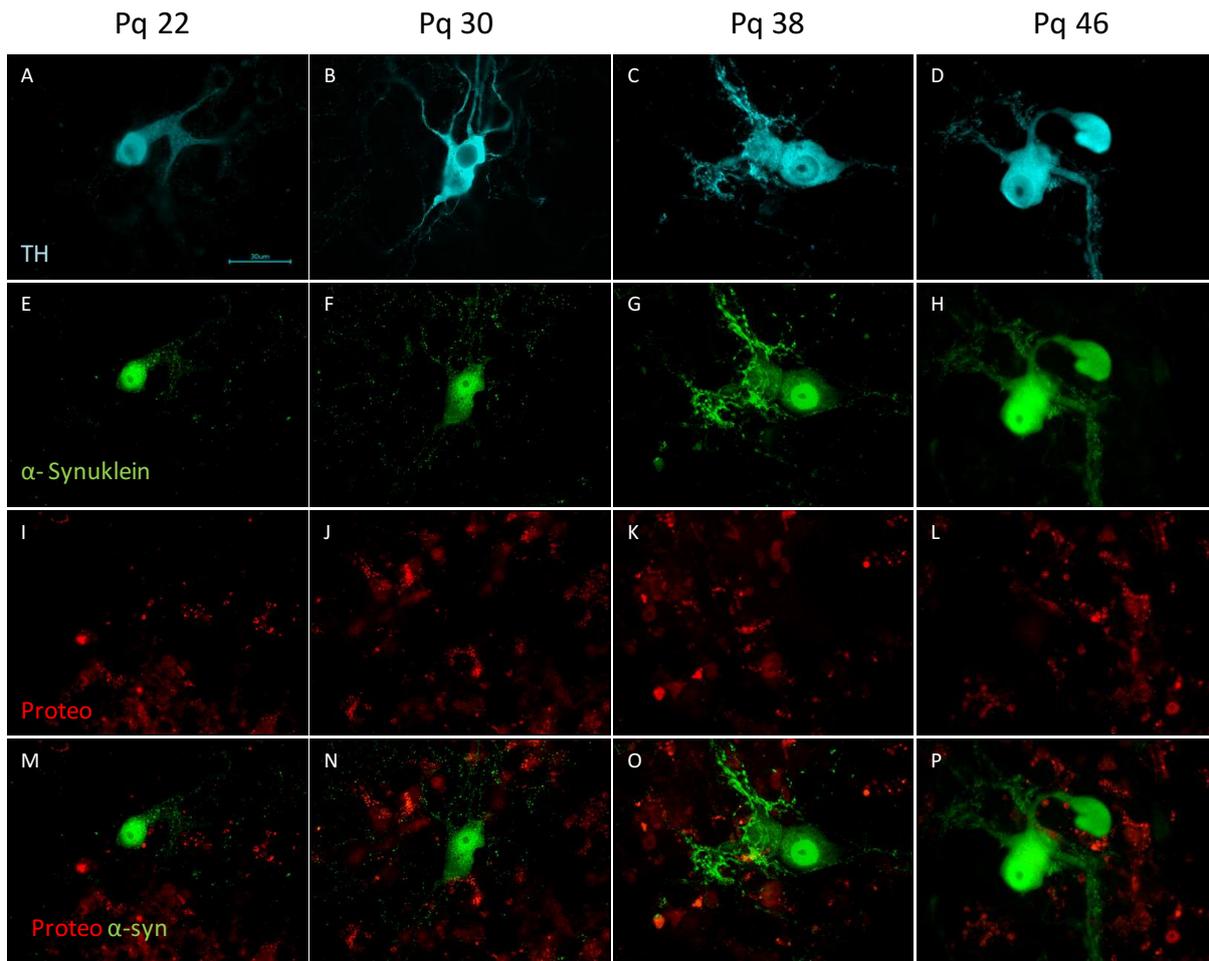
**Abbildung 37 TH, α-Syn, Proteo-Aggregosomen-Kit in der Rotenon-Kultur im Überblick**

Darstellung der mit 0,5 nM Rotenon behandelten dopaminergen Neurone am DIV 22, 30, 38 und 46 gefärbt mit Antikörpern gegen TH, α-Syn und dem Proteo Aggregosomen Kit in 100-facher Vergrößerung, Maßstab = 30 µm



**Abbildung 38 α-Syn und Proteo-Aggregosomen-Kit DIV 38**

Darstellung der mit 0,5 nM Roptenon behandelten dopaminergen Neurone am DIV 38 Maßstab 10 µm

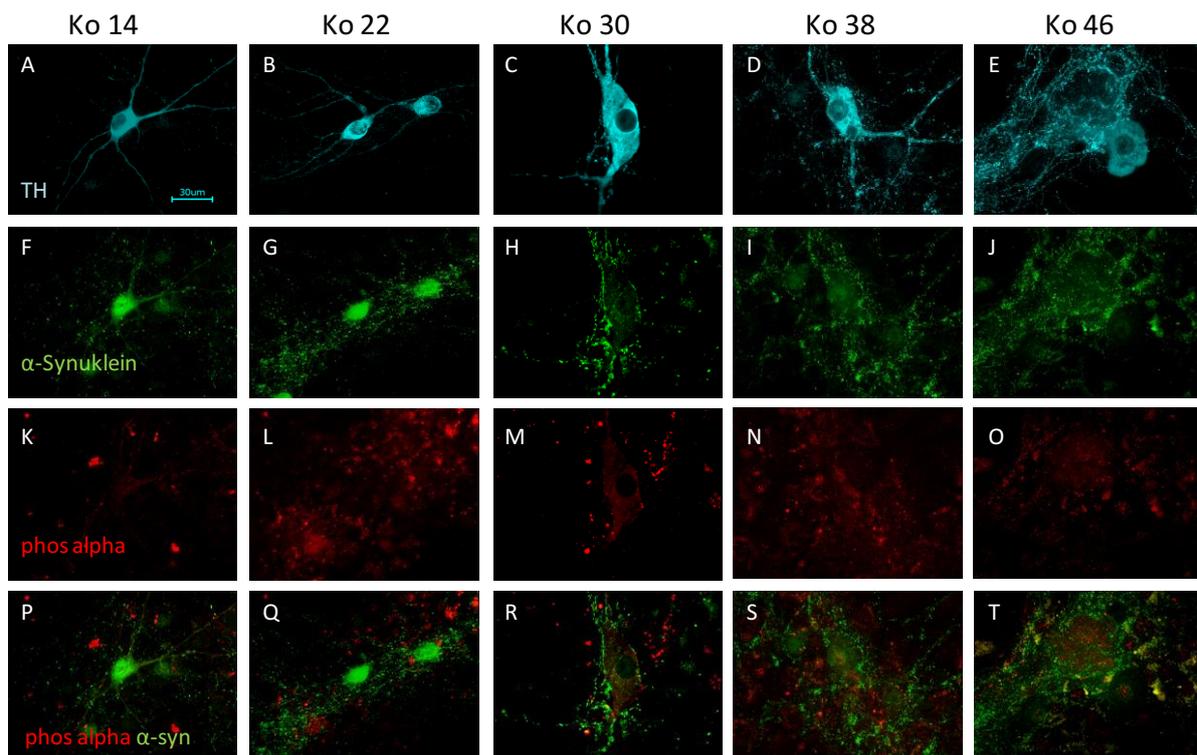


**Abbildung 39 TH,  $\alpha$ -Syn, Proteo-Aggregosomen Kit in der Paraquat-Kultur im Überblick**

Darstellung der mit 5  $\mu$ M Paraquat behandelten dopaminergen Neurone am DIV 22, 30, 38 und 46 gefärbt mit Antikörpern gegen TH,  $\alpha$ -Syn und dem Proteo Aggregosomen Kit in 100-facher Vergrößerung, Maßstab = 30  $\mu$ m.

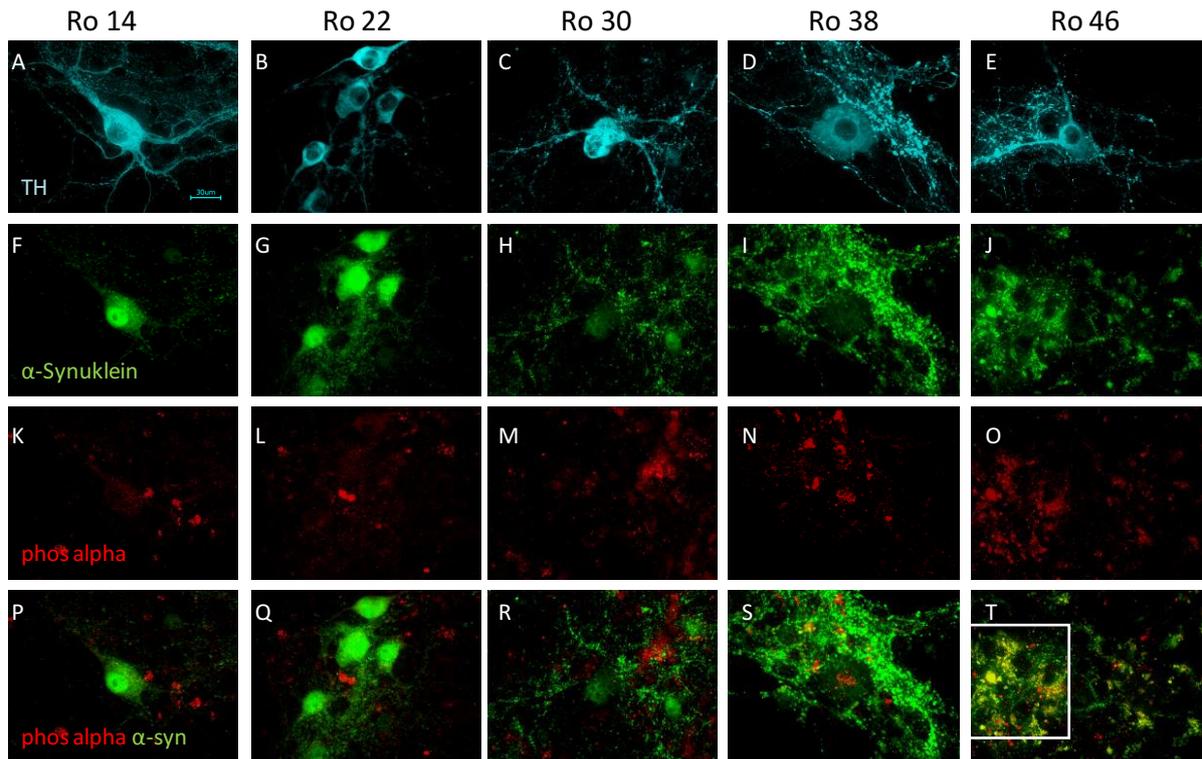
### 3.4.1 Die Phosphorylierung von $\alpha$ -Synuklein in den dopaminergen Neuronen

Es sind einige posttranslationale Veränderungen des  $\alpha$ -Synuklein mit aggregationssteigernder Wirkung bekannt. Dazu gehört die Phosphorylierung an Position 129 (Duda et al. 2000) (Giasson and Lee 2000) (Okochi et al. 2000) (Fujiwara et al. 2002) (Schell et al. 2009). Etwa 90% des  $\alpha$ -Synuklein, welches in fibrillären Aggregaten in Lewy-Körperchen gefunden wird, ist am Serin 129 (Ser129) phosphoryliert. Dies legt nahe, dass die Anhäufung von an Ser129 phosphoryliertem  $\alpha$ -Synuklein zur Bildung von Lewy-Körperchen führt. Deshalb untersuchten wir anhand einer Färbung mit Antikörpern gegen phosphoryliertes  $\alpha$ -Synuklein und natives  $\alpha$ -Synuklein welchen Einfluss die Alterung und der chronische Toxineinfluss auf die Phosphorylierung haben. In der Kontroll-Kultur konnte ab DIV 46 und in der Rotenon-Behandlung ab DIV 38 eine Kolokalisation von  $\alpha$ -Synuklein und phosphoryliertem  $\alpha$ -Synuklein in dopaminergen Neuronen bei größeren Ansammlungen des Proteins, außerhalb des dopaminergen Neurons, beobachtet werden. In der Paraquat-Behandlung konnte nur vereinzelt eine Kolokalisation von  $\alpha$ -Synuklein und phosphoryliertem  $\alpha$ -Synuklein nachgewiesen werden.



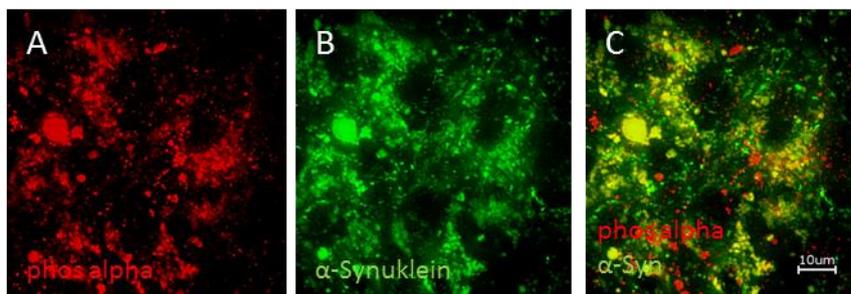
**Abbildung 40** TH,  $\alpha$ -Syn, phosphoryliertes  $\alpha$ -Syn in den Kontroll-Kulturen

Darstellung der dopaminergen Neurone am DIV 14, 22, 30, 38 und 46 gefärbt mit Antikörpern gegen TH,  $\alpha$ -Syn und dem  $\alpha$ -Syn (phospho S-129) in 100-facher Vergrößerung, Maßstab = 30  $\mu$ m.



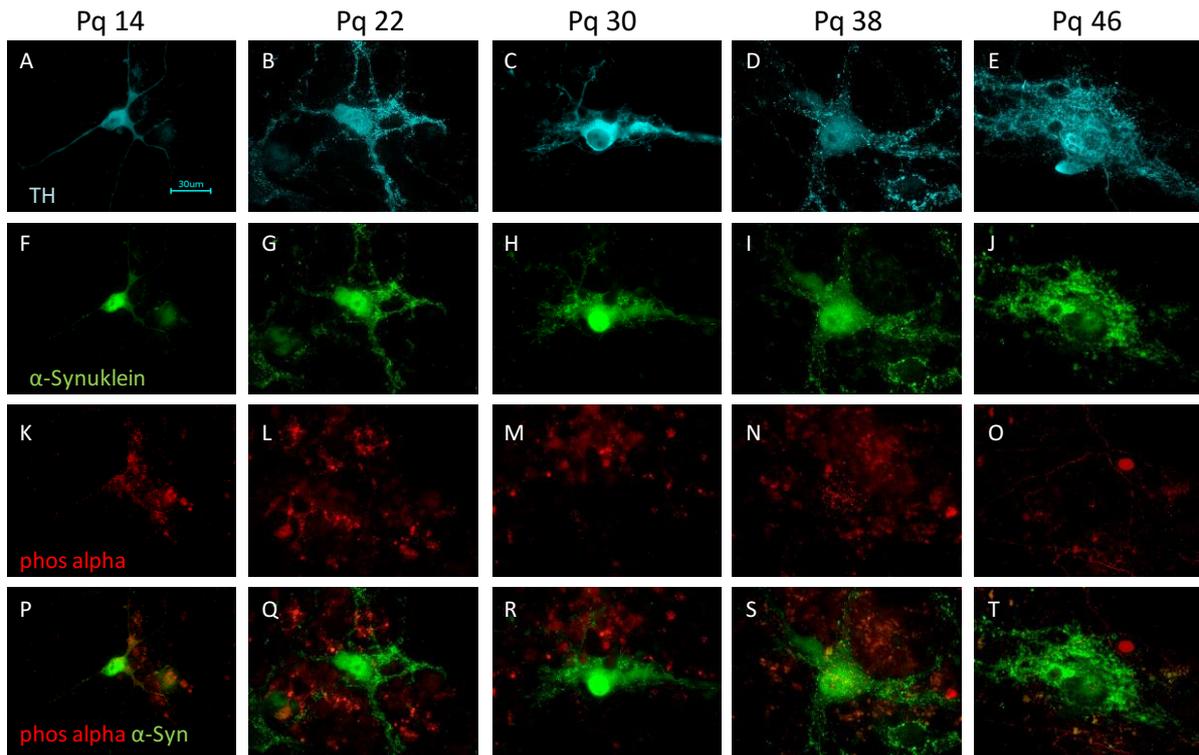
**Abbildung 41 TH,  $\alpha$ -Syn, phosphoryliertes  $\alpha$ -Syn unter Rotenon-Behandlung**

Darstellung der mit 0,5 nM Rotenon behandelten dopaminergen Neurone am DIV 14, 22, 30, 38 und 46 gefärbt mit Antikörpern gegen TH,  $\alpha$ -Syn und dem  $\alpha$ -Syn (phospho S-129) in 100-facher Vergrößerung, Maßstab = 30  $\mu$ m.



**Abbildung 42  $\alpha$ -Synuklein und phos  $\alpha$ -Synuklein am DIV 46**

Darstellung der mit 0,5 nM Rotenon behandelten dopaminergen Neuronen am DIV 38, Maßstab 10  $\mu$ m

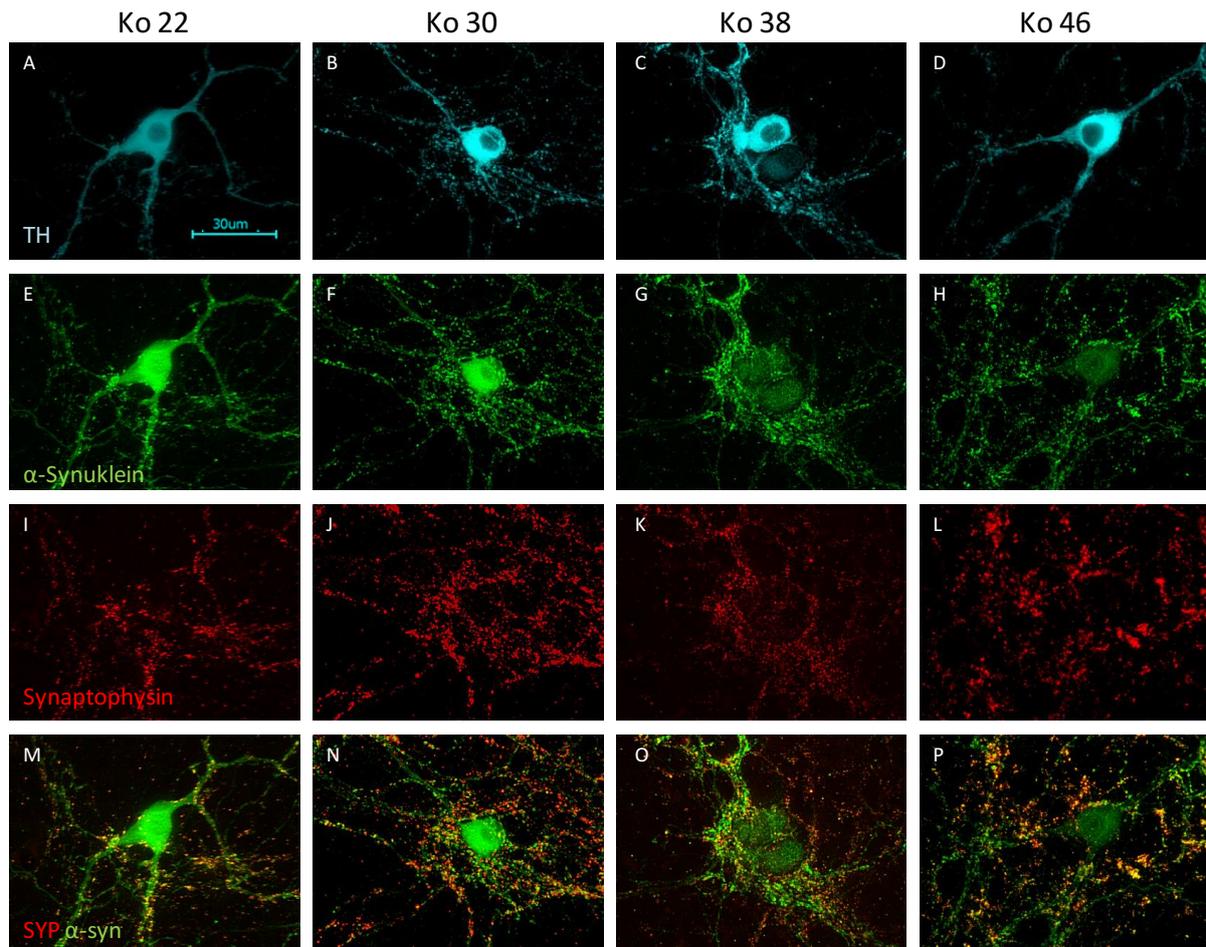


**Abbildung 43 TH,  $\alpha$ -Syn, phosphoryliertes  $\alpha$ -Syn unter Paraquat-Behandlung**

Darstellung der mit 5  $\mu$ M Paraquat behandelten dopaminergen Neurone am DIV 14, 22, 30, 38 und 46 gefärbt mit Antikörpern gegen TH,  $\alpha$ Syn und dem  $\alpha$ -Syn (phospho S-129) in 100-facher Vergrößerung, Maßstab = 30  $\mu$ m.

### 3.5 Lokalisation und Einfluss von $\alpha$ -Synuklein an den Synapsen

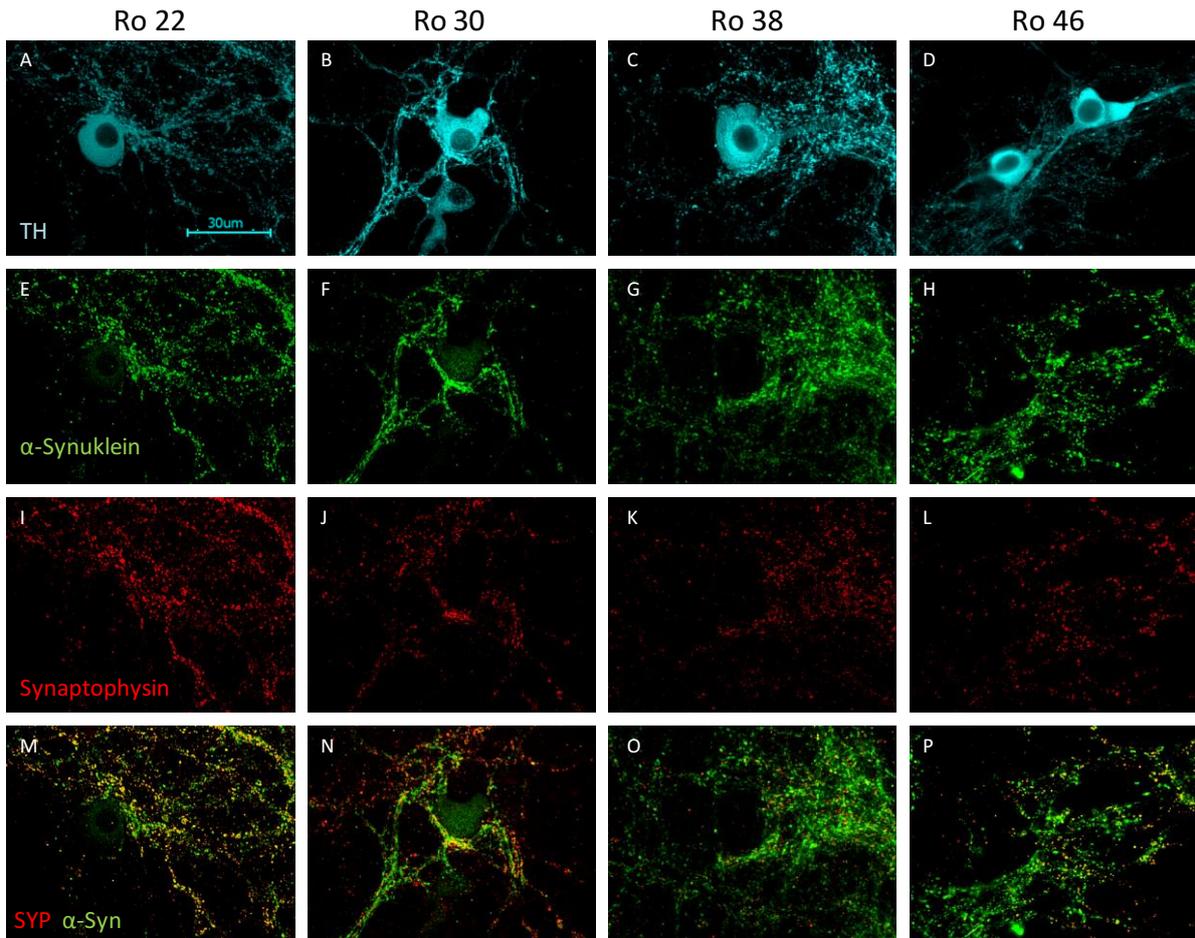
Um die morphologische Lokalisation von  $\alpha$ -Synuklein an den dopaminergen Neuronen nach Austritt aus dem Soma der Zelle zu analysieren, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit  $\alpha$ -Synuklein und Synaptophysin durchgeführt. Diese Färbung zeigte, dass die Anzahl der Synaptophysin-immunoreaktiven Strukturen stark mit der Anzahl der  $\alpha$ -Synuklein-immunreaktiven Strukturen korreliert.



**Abbildung 44** TH,  $\alpha$ -Syn, Synaptophysin in der Kontroll-Kultur im Überblick

Darstellung der dopaminergen Neurone am DIV 22, 30, 38 und 46 gefärbt mit Antikörpern gegen TH,  $\alpha$ -Syn und Synaptophysin in 100-facher Vergrößerung, Maßstab = 30  $\mu$ m.

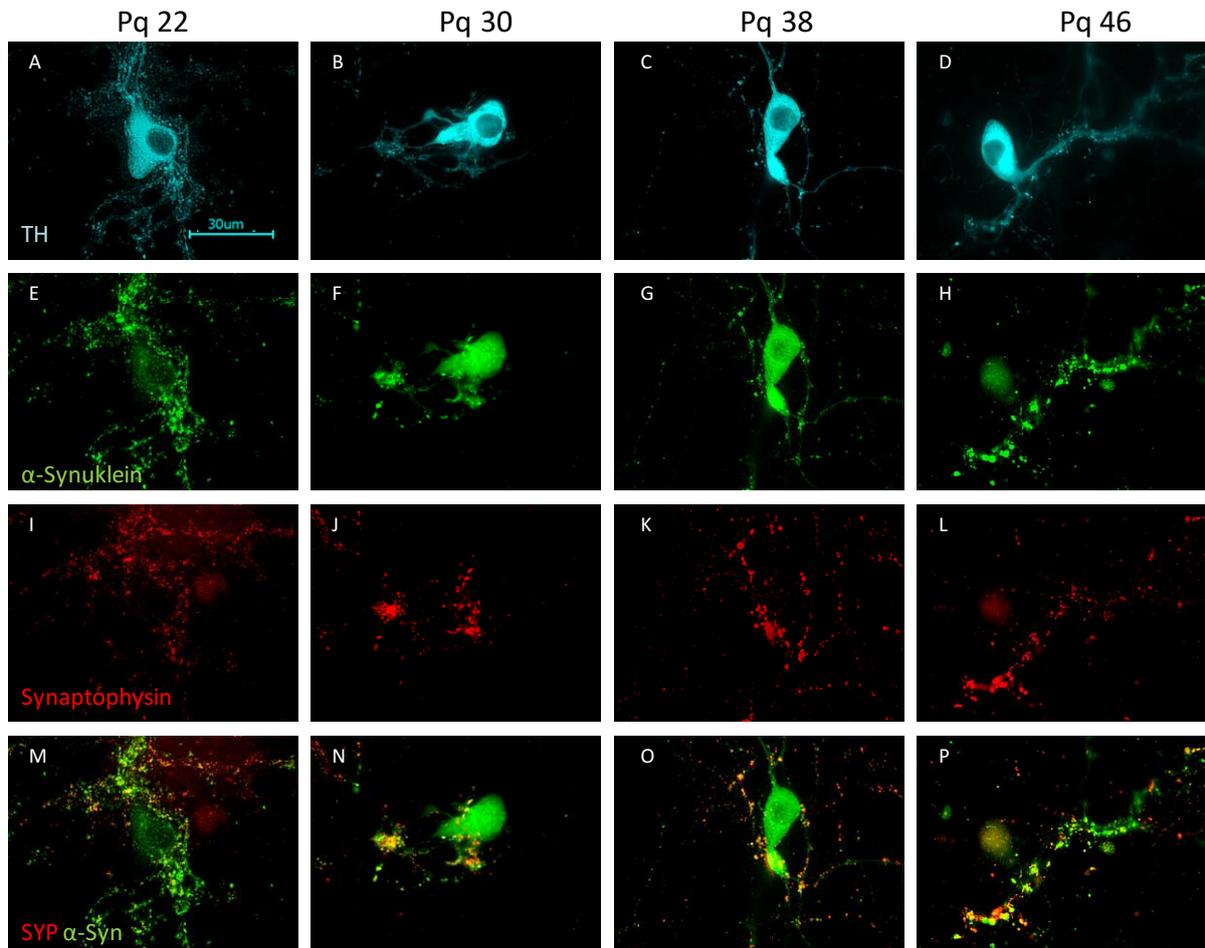
Diese Präsenz von  $\alpha$ -Synuklein in den präsynaptischen Nervenendigungen lässt in den Rotenon-behandelten Kulturen ab DIV 30 nach (Abb.44 N, O, P) und es tritt nur noch ein Teil des  $\alpha$ -Synukleins mit Synaptophysin kolokalisiert auf. Es scheint, dass die Akkumulation und Anreicherung von  $\alpha$ -Synuklein zu einer Verringerung von synaptischen Proteinen führt. Eine immunzytochemische Analyse von Synaptophysin und  $\alpha$ -Synuklein zeigte eine signifikante Abnahme sowohl der synaptischen Kolokalisation wie auch der Anzahl von Synaptophysin-immunoreaktiven Strukturen unter Rotenon-Behandlung (Abb.47).



**Abbildung 45 TH, α-Syn, Synaptophysin in der Roteon-Kultur im Überblick**

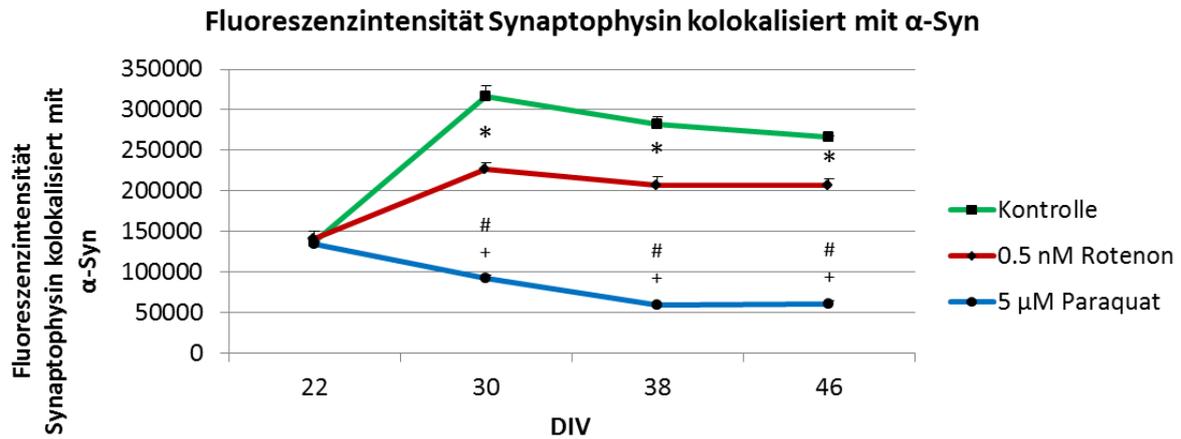
Darstellung der mit 0,5 nM Rotenon behandelten dopaminergen Neurone am DIV 22,30,38 und 46 gefärbt mit Antikörpern gegen TH, α-Syn und Synaptophysin in 100-facher Vergrößerung, Maßstab = 30µm.

Die Analyse der Synapsen unter Paraquat-Behandlung zeigt einen noch stärkeren Verlust der Synaptophysin-immunreaktiven Strukturen (Abb.46 N, O, P). Wie schon in Abb.19 C beschrieben, führt die Behandlung mit Paraquat zu einer Degeneration der Neuriten, die mit einer signifikanten Reduktion der Synapsen einhergeht (Abb.46).



**Abbildung 46 TH,  $\alpha$ -Syn, Synaptophysin in der Paraquat-Kultur im Überblick**

Darstellung der mit 5  $\mu$ M Paraquat behandelten dopaminergen Neurone am DIV 22, 30, 38 und 46 gefärbt mit Antikörpern gegen TH,  $\alpha$ -Syn und Synaptophysin in 100-facher Vergrößerung, Maßstab = 30  $\mu$ m.

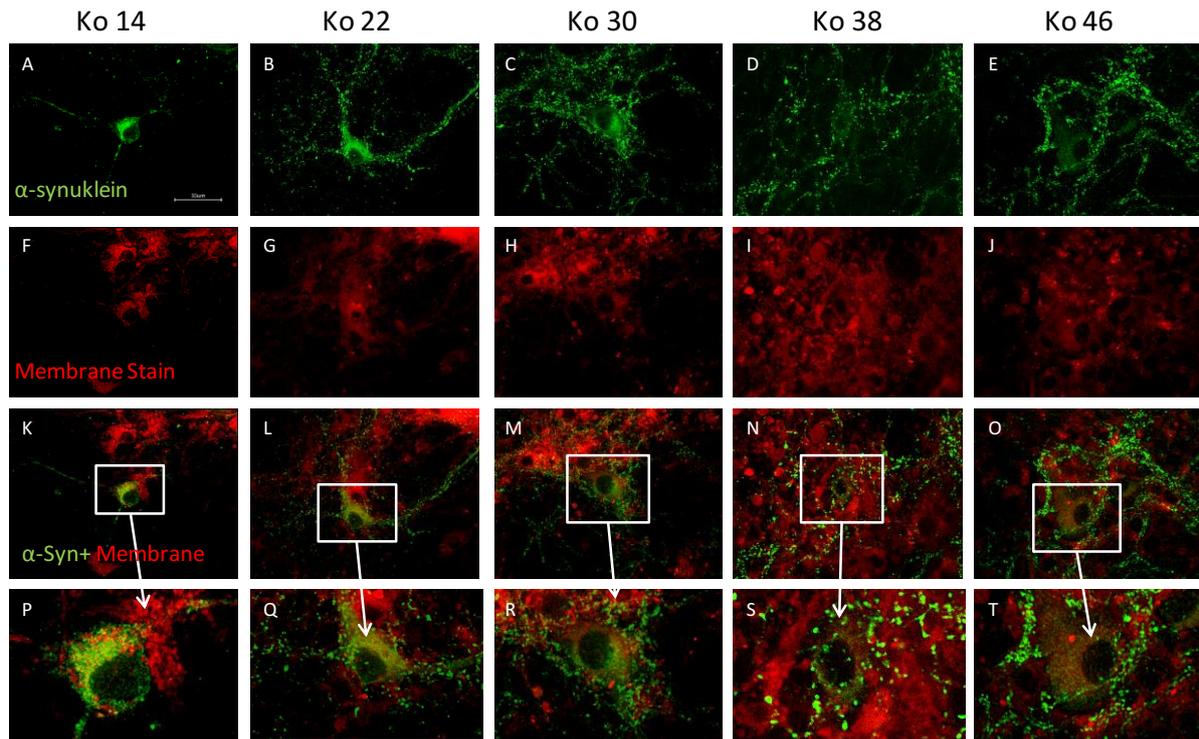


**Abbildung 47 Analyse der Kolokalisation zwischen Synaptophysin und  $\alpha$ -Syn**

Am DIV 22, 30, 38, 46 erfolgte die Fixierung der Kulturen mit PFA und danach die Fluoreszenzfärbung mit Synaptophysin und  $\alpha$ -Synuklein. Die Auswertung erfolgte mit dem BZII-Analyzer von Keyence. Dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenzmessung  $\pm$  SEM von 3 unabhängigen Kulturen, von jeweils 16 dopaminergen Zellen pro Platte pro Experiment. Die signifikanten Unterschiede von Kontrolle zu Rotenon (\* $p$ <0,05), von Kontrolle zu Paraquat (# $p$ <0,05) und von Rotenon zu Paraquat (+ $p$ <0,05) wurden mit dem Mann-Whitney Test berechnet.

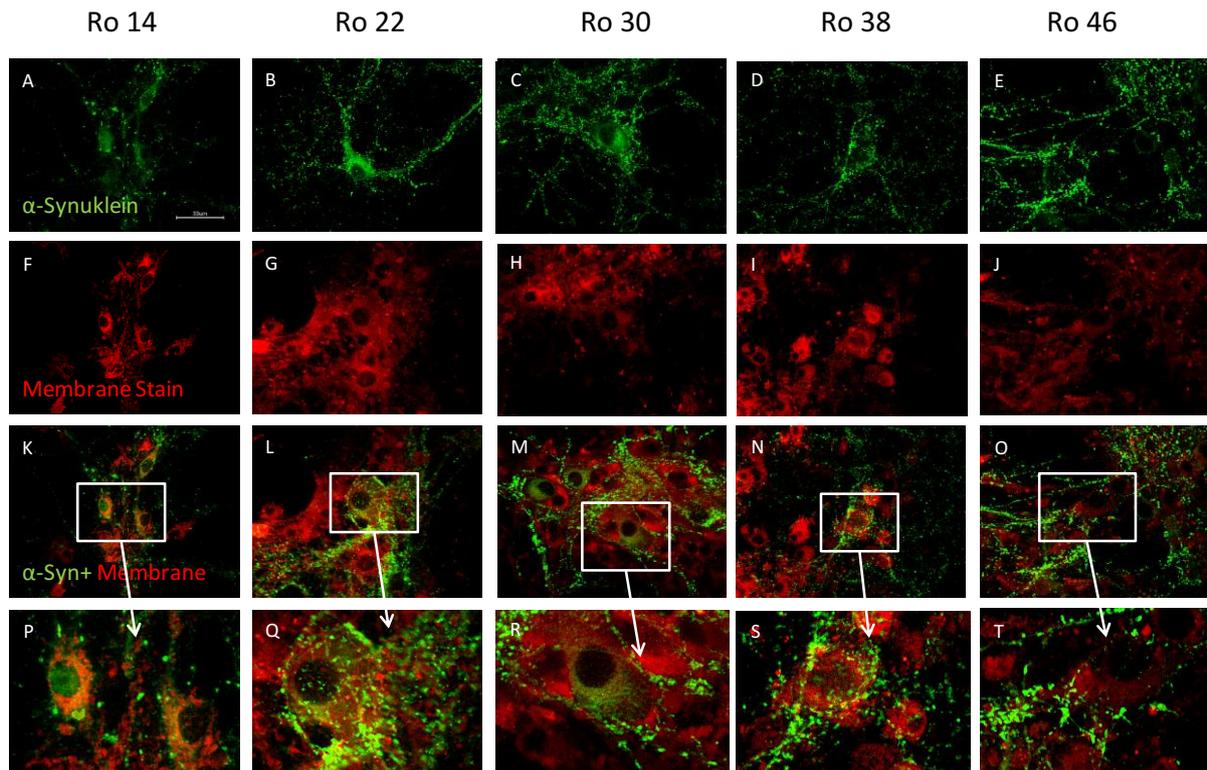
### 3.6 Lokalisation des $\alpha$ -Synuklein in der Zellmembran

Um die zelluläre Lokalisation von  $\alpha$ -Synuklein in der Zellmembran zu verschiedenen Zeitpunkten und den Einfluss von Rotenon und Paraquat auf diese zu bestimmen, wurde ein lipophiler Fluoreszenzmarker für die Membran (Membrane Stain) in Doppelfärbung mit  $\alpha$ -Synuklein eingesetzt.



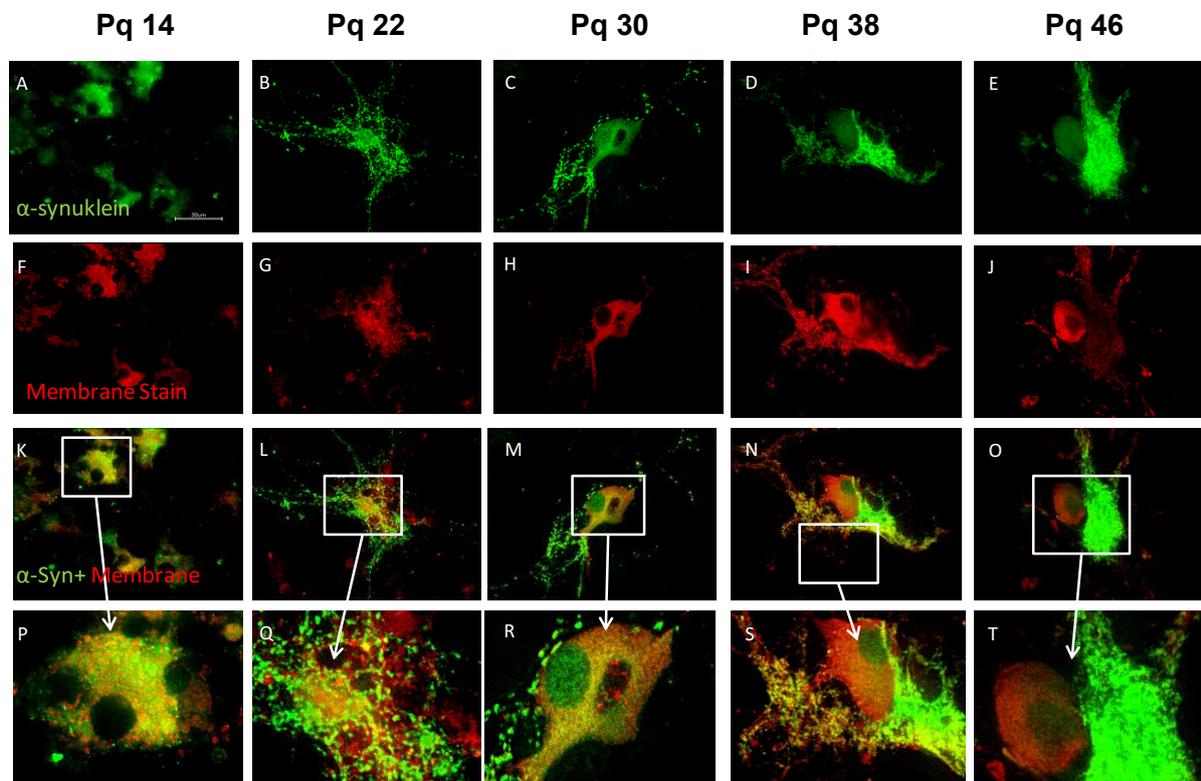
**Abbildung 48**  $\alpha$ -Synuklein und Membrane Stain in der Kontroll-Kultur im Überblick

Darstellung der dopaminergen Neurone am DIV 14, 22, 30, 38 und 46 gefärbt mit CellMask™ Plasma Membrane Stain und  $\alpha$ -Syn in 100-facher Vergrößerung, Maßstab = 30  $\mu$ m.



**Abbildung 49 α-Synuclein und Membrane Stain in der Rotenon-Kultur**

Darstellung der 0,5 nM Rotenon behandelten dopaminergen Neurone am DIV 14, 22, 30, 38 und 46 gefärbt mit CellMask™ Plasma Membrane Stain und α-Syn in 100-facher Vergrößerung, Maßstab = 30 μm.



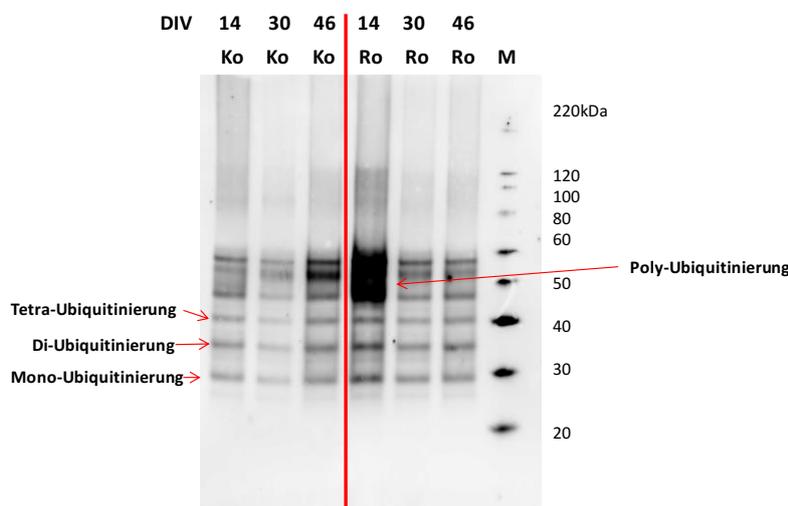
**Abbildung 50 α-Synuclein und Membrane Stain in der Paraquat-Kultur**

Darstellung der mit 5 μM Paraquat behandelten dopaminergen Neurone am DIV 14, 22, 30, 38 und 46 gefärbt mit CellMask™ Plasma Membrane Stain und α-Syn in 100-facher Vergrößerung, Maßstab = 30 μm.

Im Verlauf der Behandlung mit Rotenon scheint es zu einer Beeinträchtigung der Membranassoziation mit  $\alpha$ -Synuklein zu kommen. Bei dieser Färbung wird bei der Rotenon-Behandlung nicht nur der Wanderungsprozess des Proteins deutlich, sondern es scheint auch zu einem Austritt von  $\alpha$ -Synuklein aus der Membran zu kommen. Während der Paraquat-Behandlung ist eine stärkere Anreicherung des Proteins erkennbar. Scheinbar kommt es unter Paraquat zu einer Zytoskelet-Disorganisation und dadurch zur Verformung des Zellkörpers und der Axone.

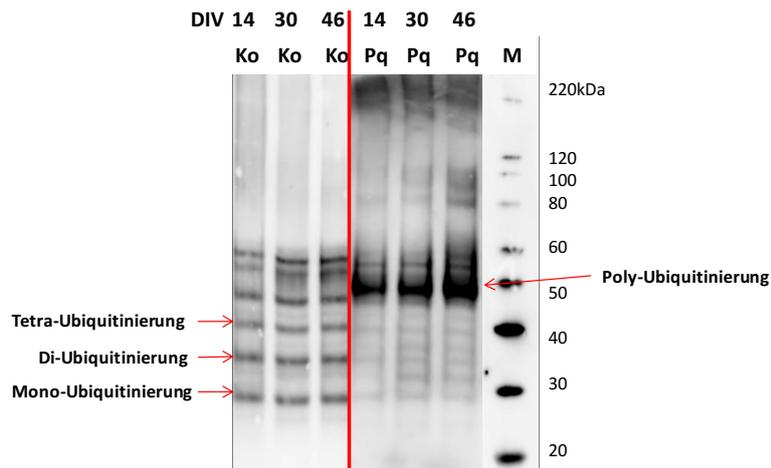
### 3.7 Rotenon hemmt die Ubiquitinierung von $\alpha$ -Synuklein

Die Dysregulation des Proteinabbaus über den Ubiquitin-Proteasomen-Weg scheint einen Einfluss auf die Lokalisation und das Aggregationsverhalten von  $\alpha$ -Synuklein zu haben. Durch Immunpräzipitation konnten wir sowohl mono-, di-, tetraubiquitinierte und polyubiquitinierte Formen von  $\alpha$ -Synuklein nachweisen. Chronisch niedrig dosierte Rotenon-Behandlung zeigt am 14. Tag eine Erhöhung der Polyubiquitinierung des  $\alpha$ -Synuklein im Vergleich zur Kontrolle, welche aber im Laufe des Kulturalters stark abnimmt (Abb.51). Bei der Behandlung mit Paraquat zeigte sich eine erhöhte Polyubiquitinierung des  $\alpha$ -Synukleins über den gesamten Zeitraum (Abb. 52).



**Abbildung 51 Ubiquitinierung von  $\alpha$ -Syn im Verlauf der Zeit nach Rotenon-Behandlung**

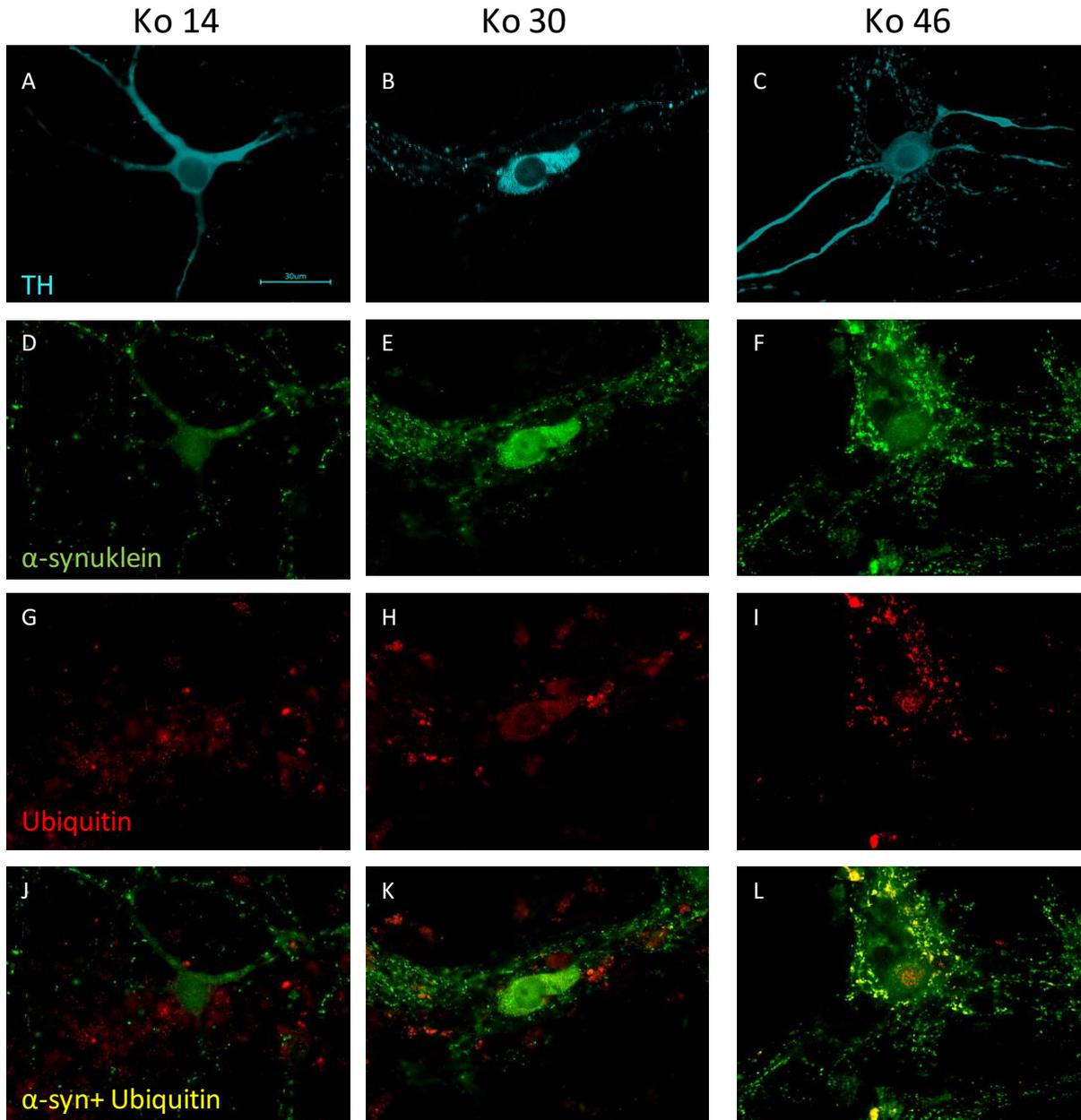
Aus dem Gesamt-Zelllysat wurde durch Immunpräzipitation  $\alpha$ -Synuklein isoliert. Es wurden 15  $\mu$ g des isolierten  $\alpha$ -Synuklein auf einem 4-12 % Bis-Tris-Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einem spezifischen Anti-Ubiquitin-Antikörper. Unter 0,5 nM Rotenon ist zum Zeitpunkt DIV 14 eine starke Polyubiquitinierung von  $\alpha$ -Synuklein zu erkennen, welche dann im Verlauf der Zeit abnimmt.



**Abbildung 52 Ubiquitinierung von  $\alpha$ -Syn im Verlauf der Zeit nach Paraquat-Behandlung**

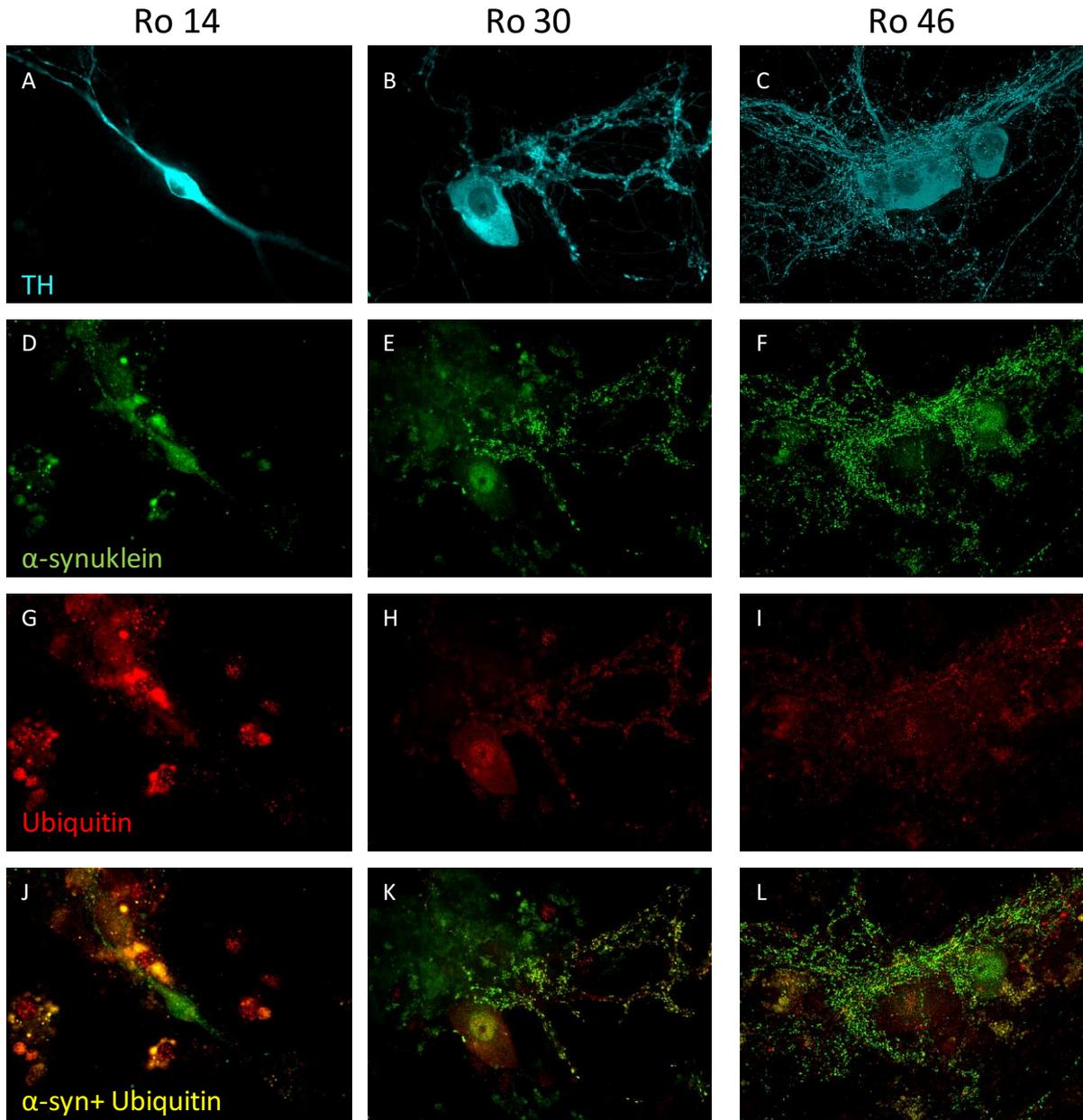
Aus dem Gesamt-Zelllysate wurde durch Immunpräzipitation  $\alpha$ -Synuclein isoliert. Es wurden 15  $\mu$ g des isolierten  $\alpha$ -Synuclein auf einem 4-12 % Bis-Tris-Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einem spezifischen Anti-Ubiquitin-Antikörper. Unter 5  $\mu$ M Paraquat ist zum Zeitpunkt DIV 14 eine Polyubiquitinierung von  $\alpha$ -Synuclein zu erkennen, welche im Verlauf der Zeit zunimmt.

Die Ergebnisse der Ubiquitinierung im Western Blot nach Immunpräzipitation von  $\alpha$ -Synuclein korrelieren mit den Beobachtungen der Fluoreszenz-Kolokalisation von Ubiquitin und  $\alpha$ -Synuclein in der dopaminergen Zelle in der 100-fachen Vergrößerung.



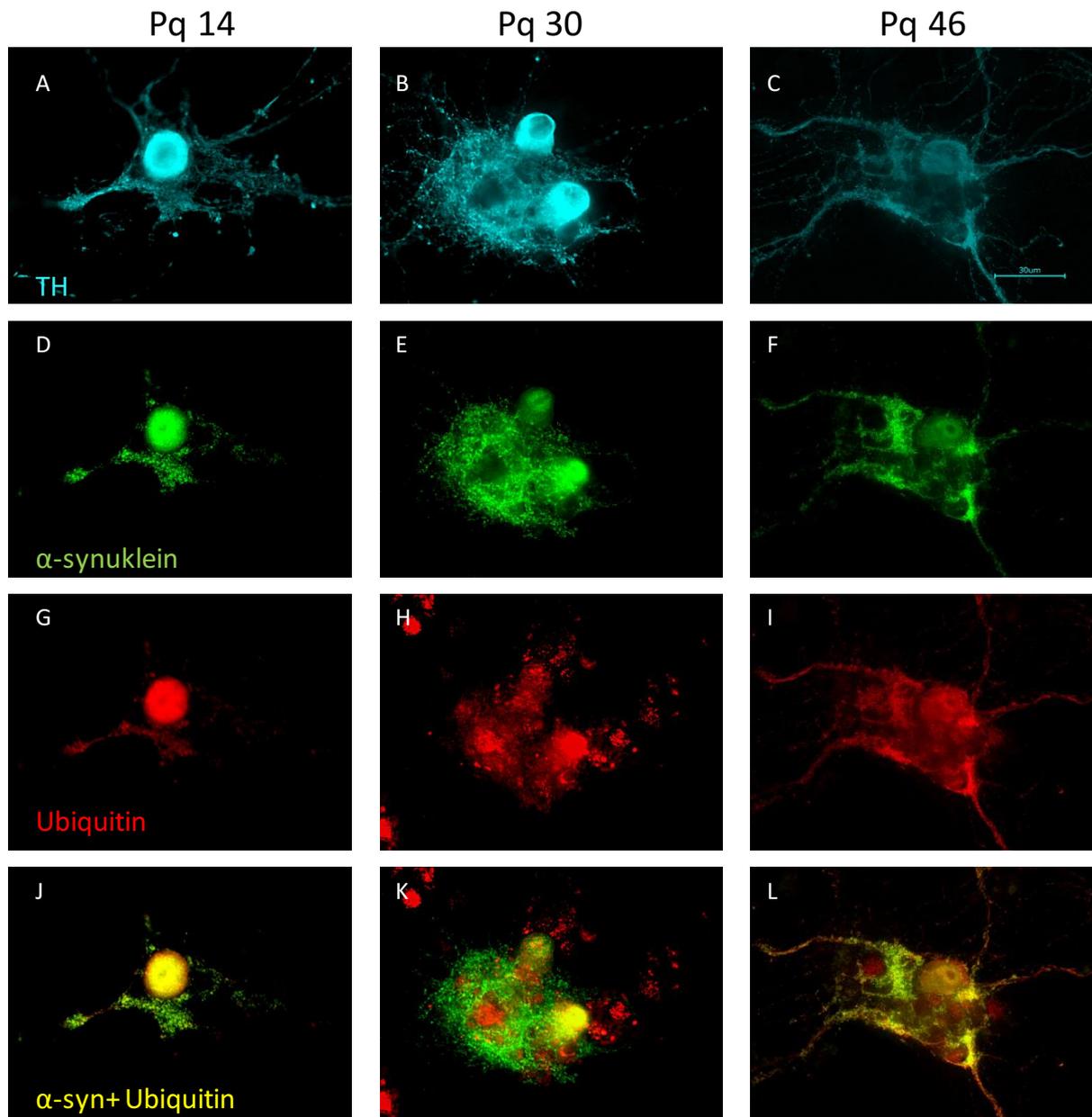
**Abbildung 53 TH,  $\alpha$ -Syn, Ubiquitin in den dop. Neuronen bei den Kontroll-Kulturen**

Darstellung der dopaminergen Neurone am DIV 14, 30 und 46 gefärbt mit Antikörpern gegen TH,  $\alpha$ -Syn und Ubiquitin in 100-facher Vergrößerung, Maßstab = 30  $\mu$ m.



**Abbildung 54 TH,  $\alpha$ -Syn, Ubiquitin in den dop. Neuronen bei Rotenon-Behandlung**

Darstellung der mit 0,5 nM Rotenon behandelten dopaminergen Neurone am DIV 14, 30 und 46 gefärbt mit Antikörpern gegen TH,  $\alpha$ -Syn und Ubiquitin in 100-facher Vergrößerung, Maßstab = 30  $\mu$ m.

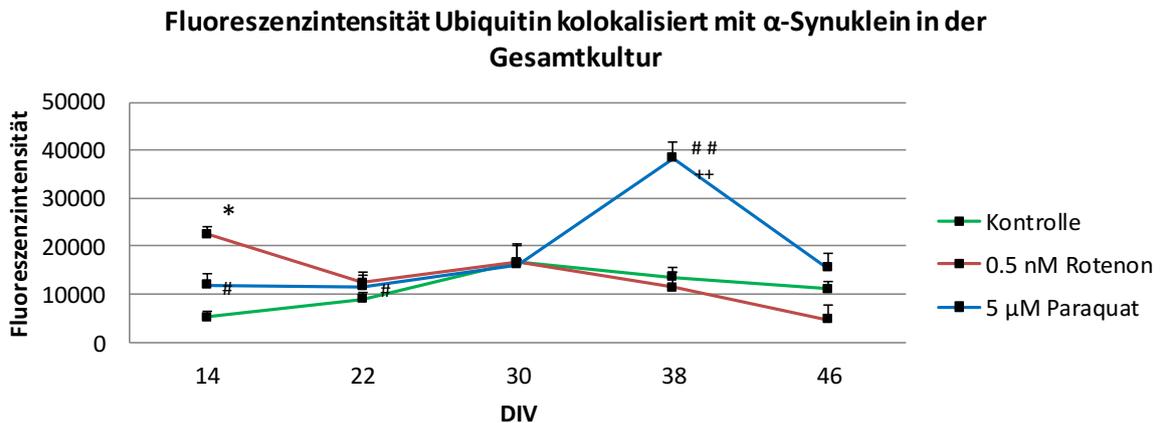


**Abbildung 55 TH,  $\alpha$ -Syn, Ubiquitin in den dop. Neuronen bei Paraquat-Behandlung**

Darstellung der mit 5  $\mu$ M Paraquat behandelten dopaminergen Neurone am DIV 14, 30 und 46 gefärbt mit Antikörpern gegen TH,  $\alpha$ -Syn und Ubiquitin in 100-facher Vergrößerung, Maßstab = 30  $\mu$ m.

### 3.7.1 Ubiquitin kolokalisiert mit $\alpha$ -Synuklein ausgewertet mittels BZII-Analyser

Die immunzytochemische Analyse von Ubiquitin und  $\alpha$ -Synuklein in der Gesamtkultur zeigt eine signifikante Zunahme gegenüber der Kontrolle am DIV 14 unter Rotenon sowie am DIV 38 unter Paraquat (Abb. 56).

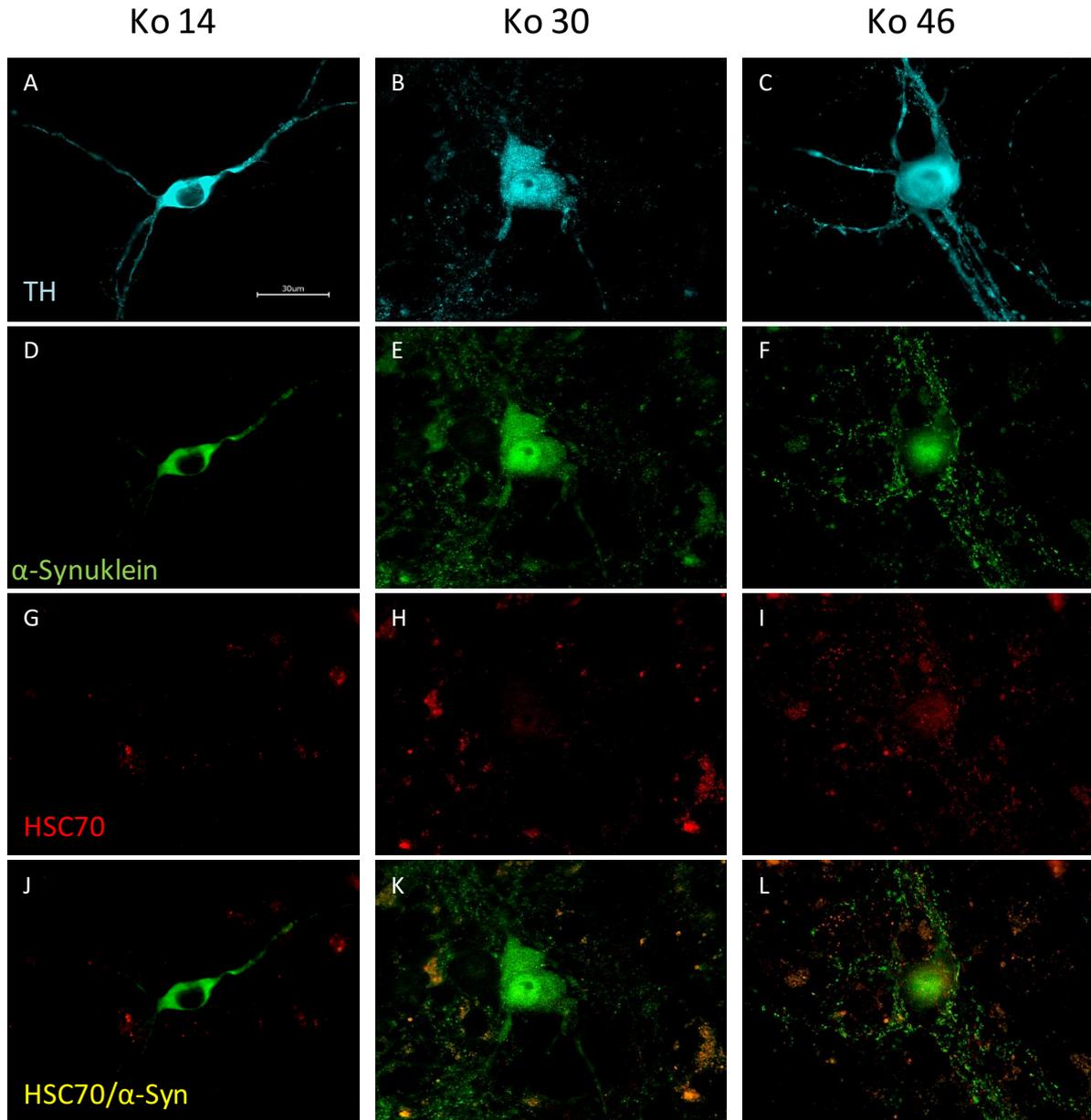


**Abbildung 56** Analyse der Kolokalisation zwischen Ubi und  $\alpha$ -Syn in der Gesamtkultur

Am DIV 14, 22, 30, 38, 46 erfolgte die Fixierung der Kulturen mit PFA und danach die Fluoreszenzfärbung mit Ubiquitin und  $\alpha$ -Synuklein. Die Auswertung erfolgte mit dem BZII-Analyser von Keyence. Dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenzmessung  $\pm$  SEM von 3 unabhängigen Kulturen mit Fluoreszenz-Messungen in 4 Wells pro Experiment. Die signifikanten Unterschiede von Kontrolle zu Rotenon ( $p < 0,05$ ), von Kontrolle zu Paraquat ( $\#p < 0,05$ ), ( $##p < 0,01$ ) und von Rotenon zu Paraquat ( $++p < 0,01$ ) wurden mit dem Mann-Whitney Test berechnet.

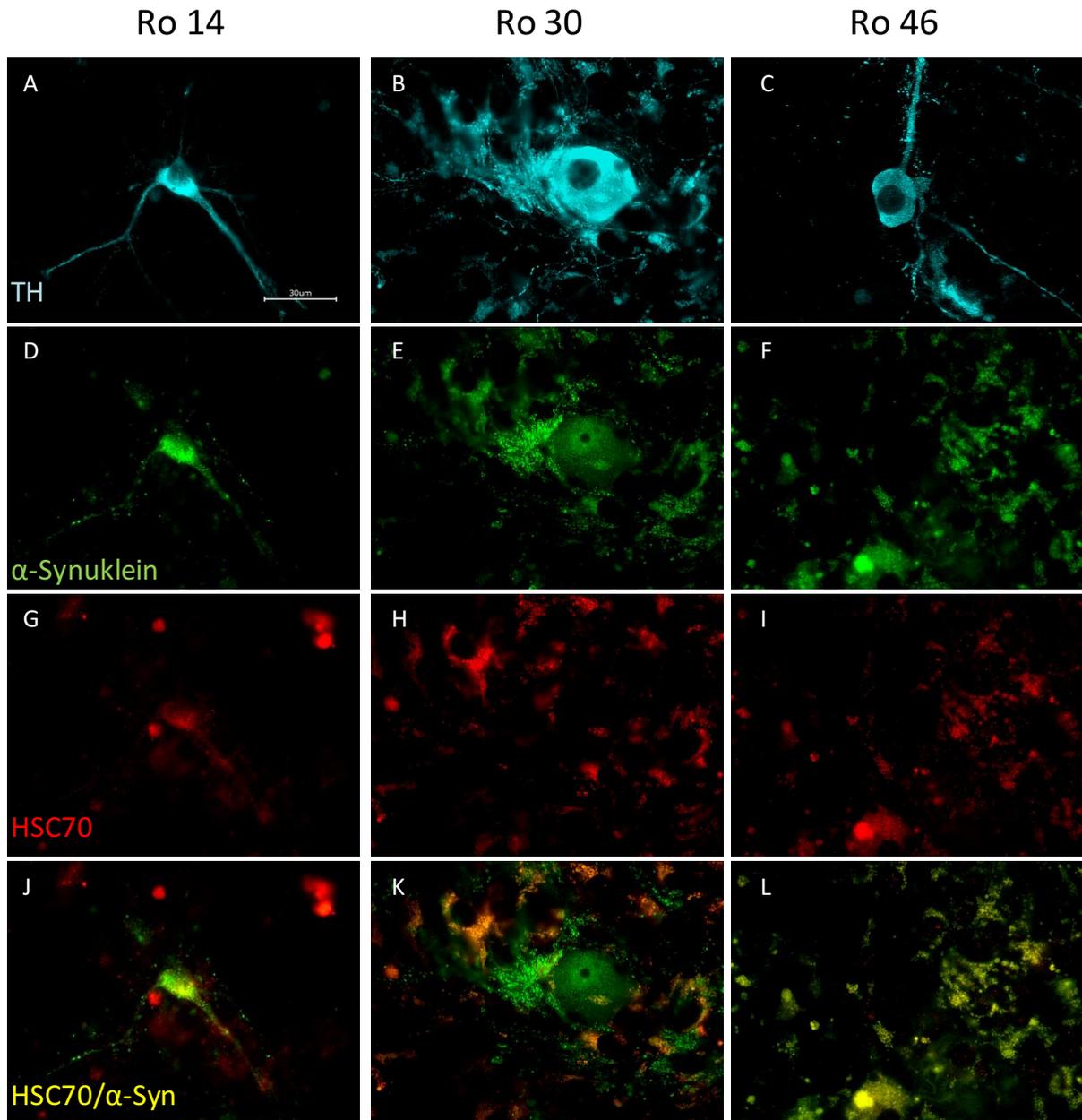
### 3.7.2 Interaktionen von $\alpha$ -Synuklein und HSC70

Weitere Untersuchungen zum Abbau von  $\alpha$ -Synuklein unter chronischer Pestizidexposition, über den Autophagie-Weg, wurden durch eine Färbung mit HSC70 durchgeführt, einem Stressantwort-Chaperon-Protein, das sowohl Rückfaltung und Abbau fehlgefalteter Proteine vermittelt. Kolokalisation von  $\alpha$ -Syn und HSC70 konnte bei Kontrolle und unter Rotenon-Behandlung am DIV 14 diffus in der Zelle und ab DIV 30 bei größeren Ansammlungen von  $\alpha$ -Synuklein außerhalb vom Soma der dopaminergen Zelle beobachtet werden. Unter Paraquat-Behandlung scheint die Markierung von  $\alpha$ -Synuklein durch HSC70 eine untergeordnete Rolle zu spielen.



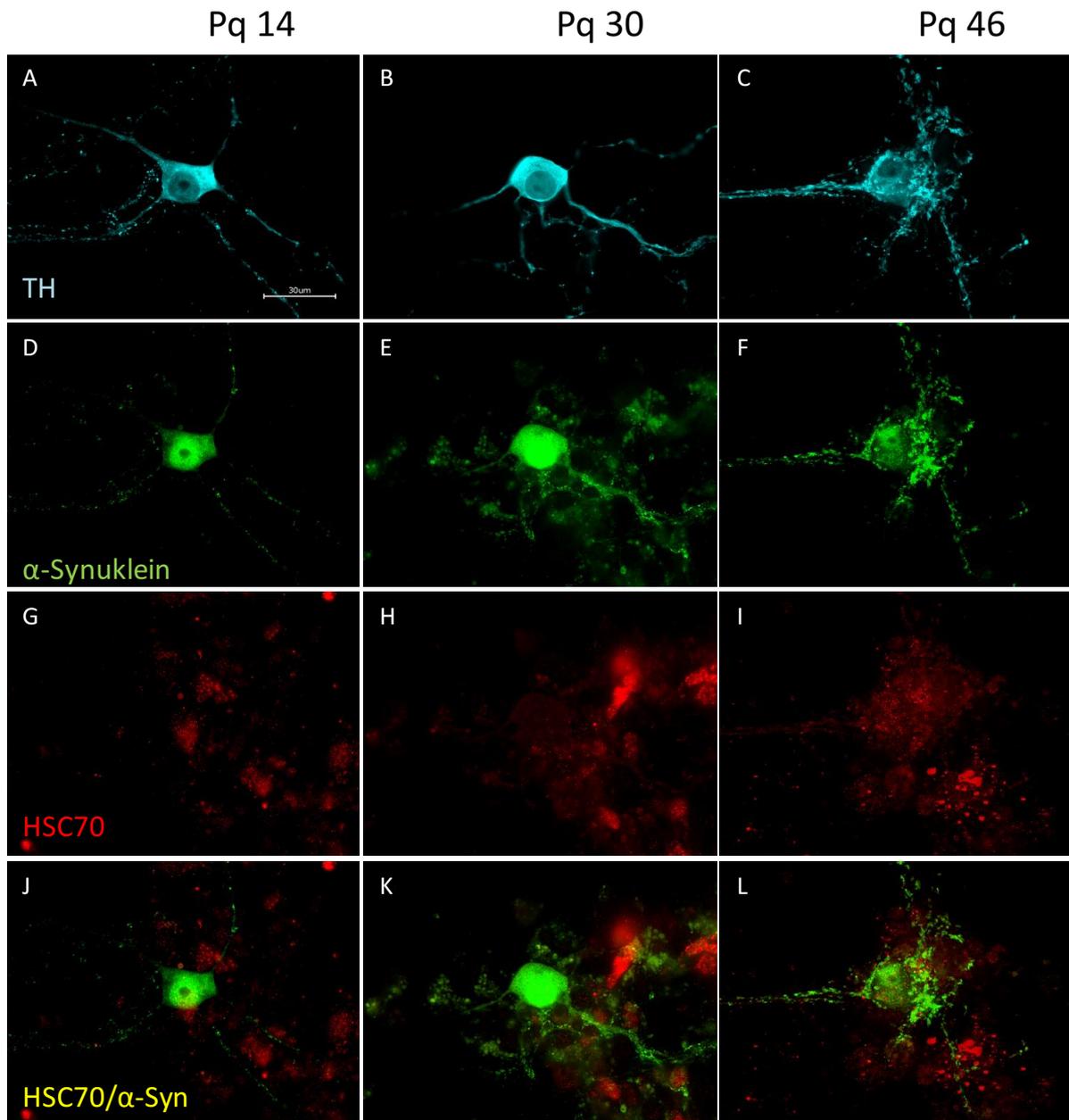
**Abbildung 57** TH,  $\alpha$ -Syn, HSC70 in den dop. Neuronen in der Kontroll-Kultur

Darstellung der dopaminergen Neurone am DIV 14, 30 und 46 gefärbt mit Antikörpern gegen TH,  $\alpha$ -Syn und HSC70 in 100-facher Vergrößerung, Maßstab = 30  $\mu$ m.



**Abbildung 58 TH, α-Syn, HSC70 in den dop. Neuronen unter Rotenon-Behandlung**

Darstellung der mit 0,5 nM Rotenon behandelten dopaminergen Neurone am DIV 14, 30 und 46 gefärbt mit Antikörpern gegen TH, α-Syn und HSC70 in 100-facher Vergrößerung, Maßstab = 30 μm.

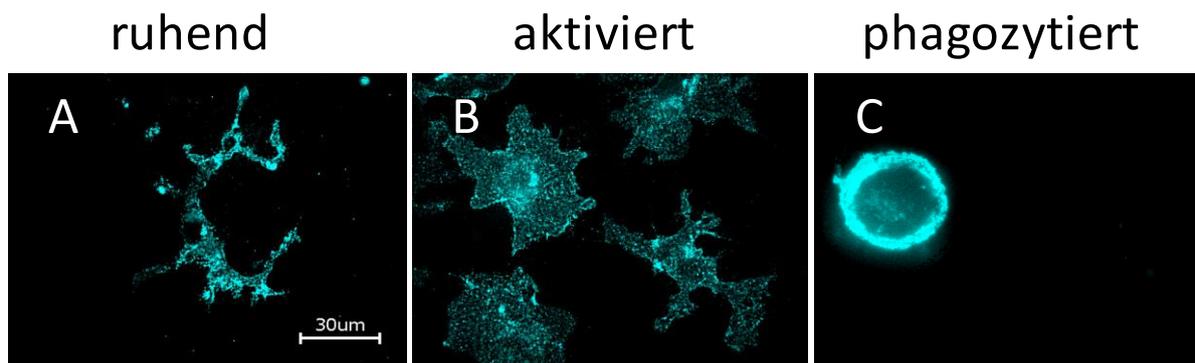


**Abbildung 59 TH, α-Syn, HSC70 in den dopaminergen Neuronen unter Paraquat-Behandlung**

Darstellung der mit 5 μM Paraquat behandelten dopaminergen Neurone am DIV 14, 30 und 46 gefärbt mit Antikörpern gegen TH, α-Syn und HSP70 in 100-facher Vergrößerung, Maßstab = 30 μm.

### 3.8 Auswirkung von Rotenon und Paraquat auf das Verhalten der Mikroglia

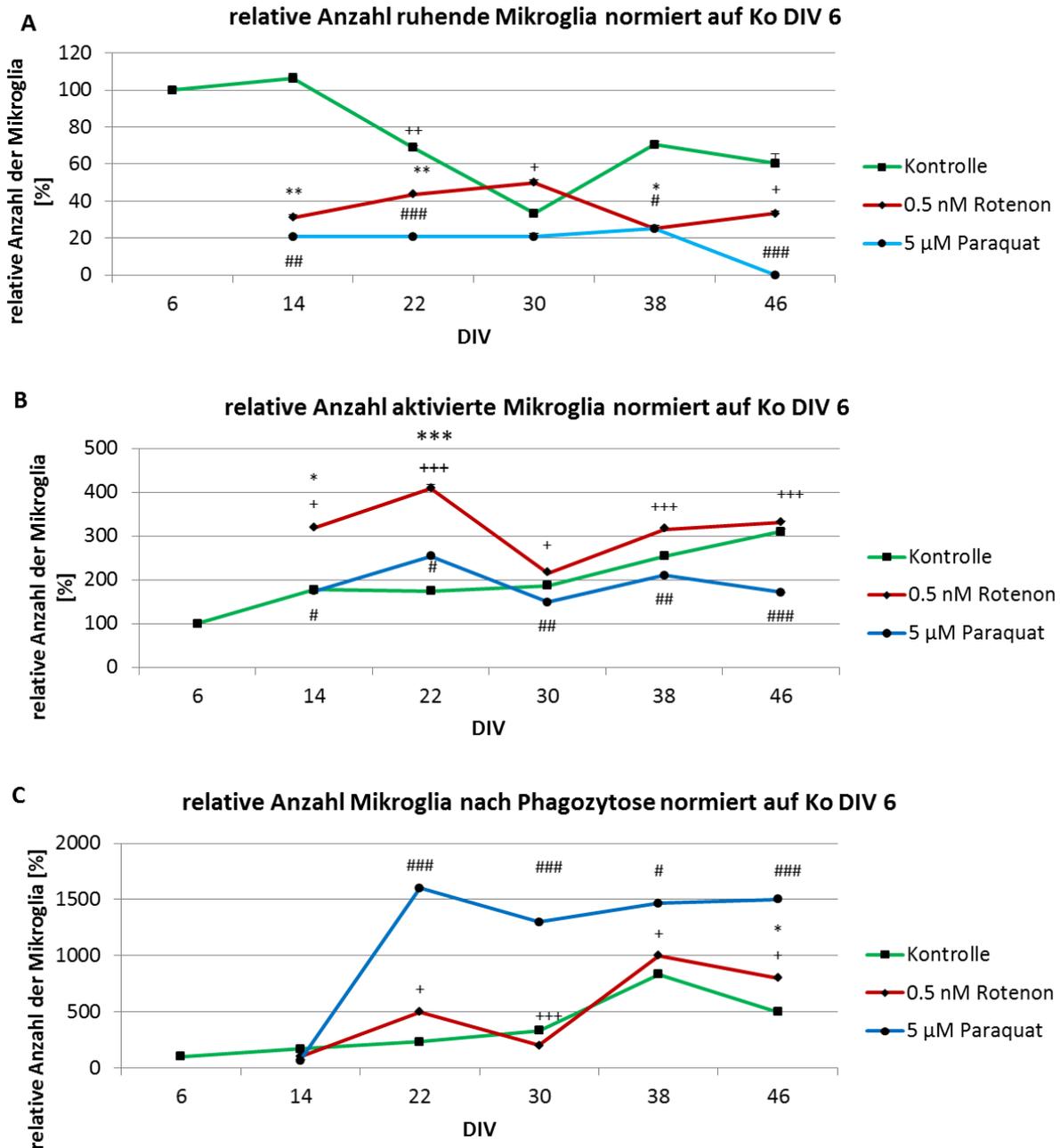
Zur Untersuchung der Rolle der Mikroglia in Rotenon- bzw. Paraquat-induzierter Degeneration dopaminergener Neurone nutzten wir in der Fluoreszenzfärbung den Mikroglia-Marker F 4/80 und im Western Blot Antikörper gegen Interleukin-1- $\beta$  als Marker für aktivierte Mikroglia. Eine Mikroglia-Aktivierung ist gekennzeichnet von dramatischen Veränderungen in der Morphologie (siehe Abb.60).



**Abbildung 60** Mikroglia-Phänotypen

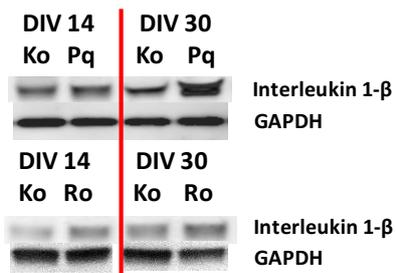
Die Auszählung der Mikroglia erfolgte mittels Auswahl der Zellform siehe Abbildung (A) ruhend (B) aktiviert und (C) phagozytiert.

Die Ergebnisse der Auszählung zeigen, dass Rotenon eine Mikroglia-Aktivierung in der dopaminergen Primärzellkultur induzieren kann, die sich ab DIV 30 wieder der Kontroll-Auszählung annähert (Siehe Abb.61 B). Unter Paraquat-Behandlung lässt sich eine stark erhöhte Phagozytoseaktivität ab DIV 22 bis zum Kulturende beobachten (Siehe Abb.61 C). Im Western Blot konnten wir außerdem unter Paraquat einen Anstieg des Zytokins Interleukin-1 $\beta$  am DIV 30 nachweisen.



**Abbildung 61 Anzahl der ruhenden(A), aktivierten(B) und phagozytierten(C) Mikroglia**

Am DIV 6, 14, 22, 30, 38, 46 erfolgte die Fixierung der Kulturen mit Histochoice und danach die Fluoreszenzfärbung mit Anti-F4/80 (Mikroglia-Marker). Die Ergebnisse wurden vor der Auswertung auf ein einheitliches Maß in Prozent normiert. Die Kontrolle DIV 6 entspricht 100 %. Die entsprechenden Mikrogliazellen wurden in einem vordefinierten Bereich der Kulturschale ausgezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Zählung  $\pm$  SEM von 3 unabhängigen Kulturen. Die signifikanten Unterschiede von Kontrolle zu Rotenon ( $p < 0,05$ ), von Kontrolle zu Paraquat ( $^{\#}p < 0,05$ ) und von Rotenon zu Paraquat ( $^{\dagger}p < 0,05$ ) wurden mit dem Mann-Whitney Test berechnet.



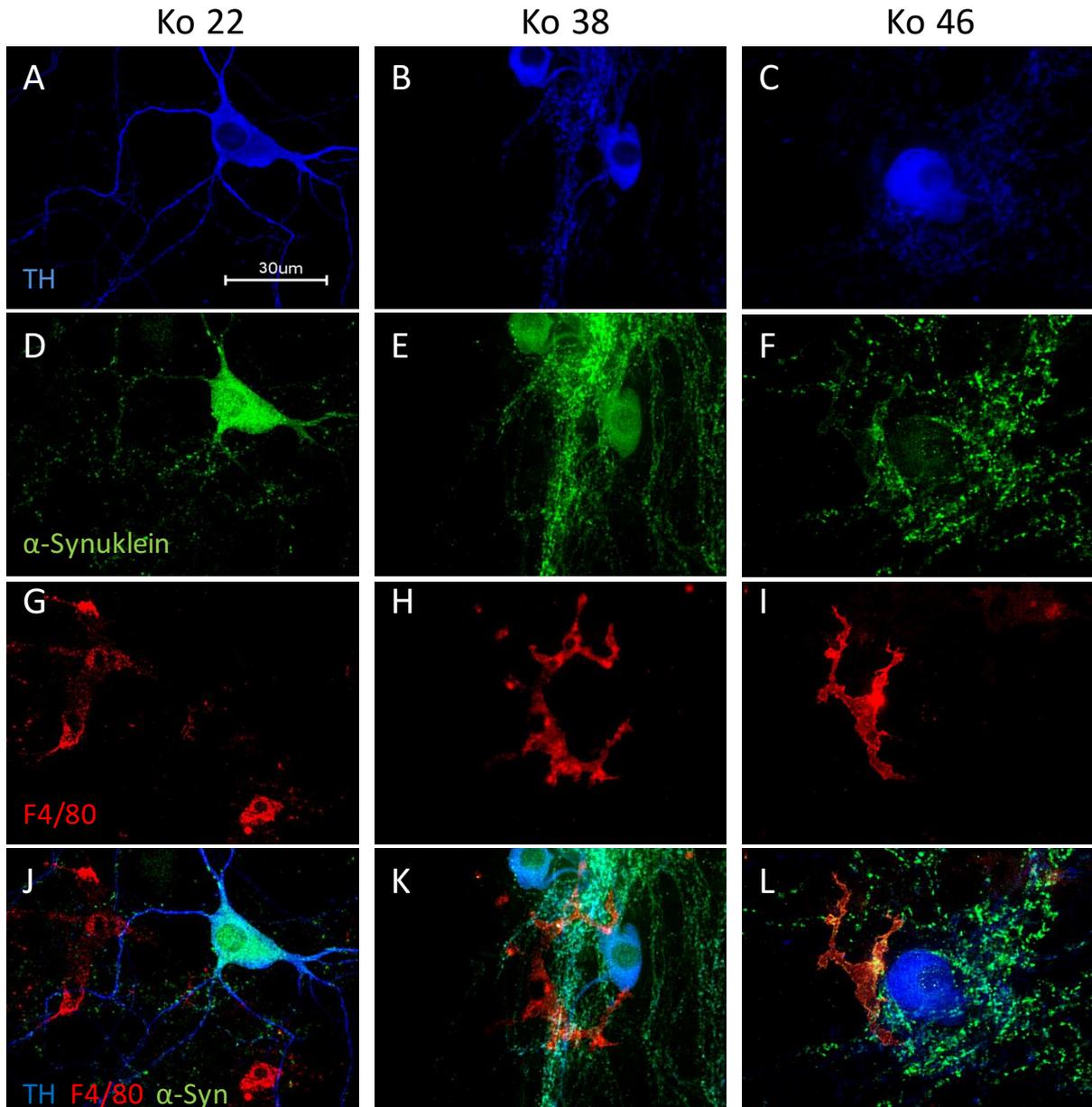
**Abbildung 62 Darstellung von Interleukin-1 $\beta$  nach Rotenon bzw. Paraquat**

Die Behandlung erfolgte mit 0,5 nM Rotenon bzw. 5  $\mu$ M Paraquat. Es wurden jeweils 15  $\mu$ g Gesamtprotein auf einem 4-12 % Bis-Tris-Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einem spezifischen Anti-Interleukin-1 $\beta$  Antikörper. Als Referenzprotein wurde GAPDH genutzt. Unter Paraquat ist eine deutliche Zunahme am DIV 30 zu erkennen.

### **3.8.1 Präsenz von Mikroglia und $\alpha$ -Synuklein an den dopaminergen Neuronen**

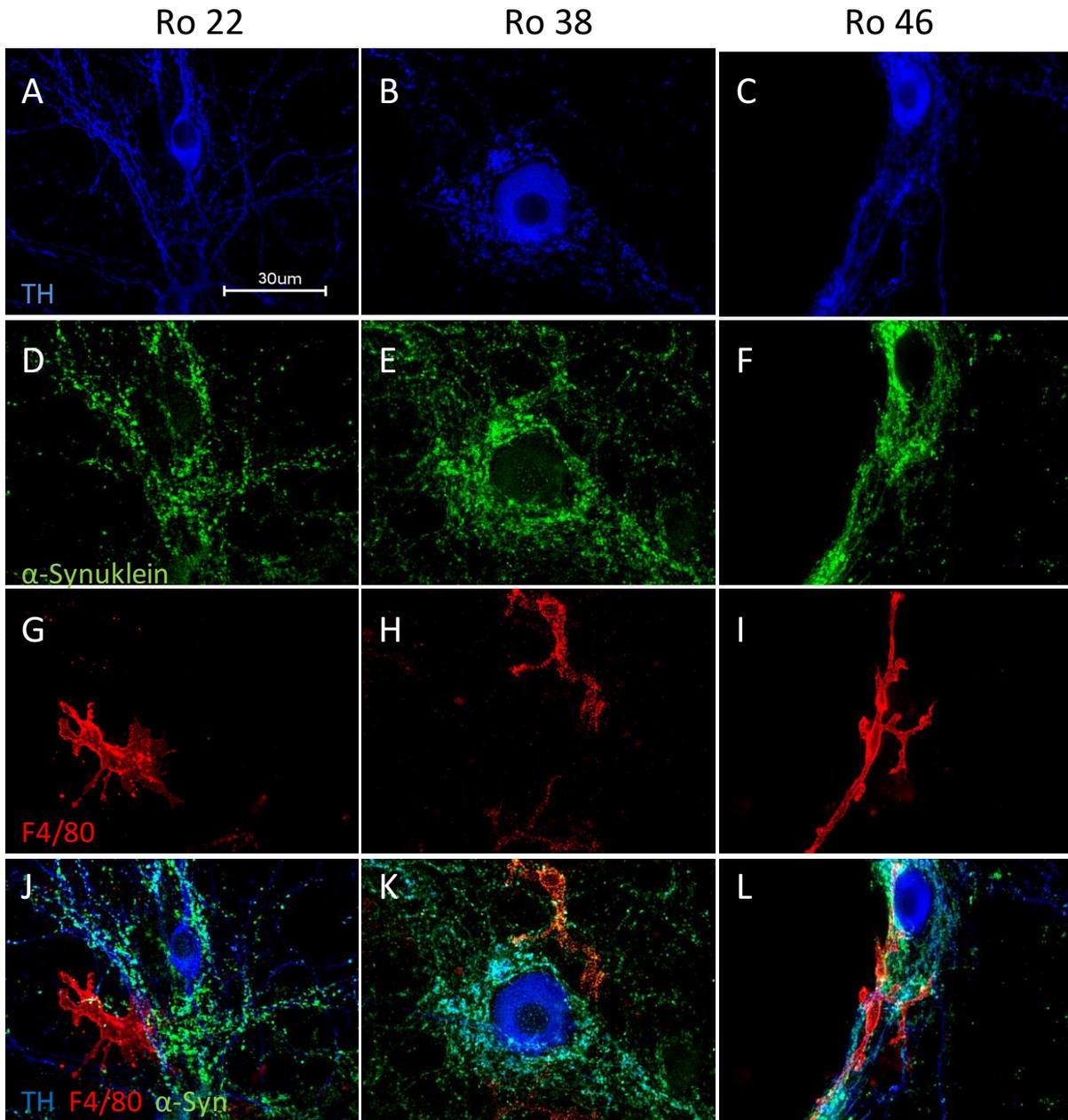
In jüngster Zeit häufen sich die Beweise, dass abnormale Ablagerungen von  $\alpha$ -Synuklein, die von neuronalen Zellen sezerniert werden, in Gliazellen aufgenommen und abgebaut werden. In unserem Zellkulturmodell konnten wir nach Behandlung mit Rotenon zeigen, dass  $\alpha$ -Synuklein von Mikrogliazellen aufgenommen wurde. (Siehe Abb.66 D)

Nach Behandlung mit Paraquat ist ein hochsignifikanter Anstieg von phagozytierenden Mikrogliazellen zu beobachten, welche sowohl  $\alpha$ -Synuklein und dopaminerge Zellreste aufzunehmen scheinen. (Siehe Abb.65 L und 66 E, F)



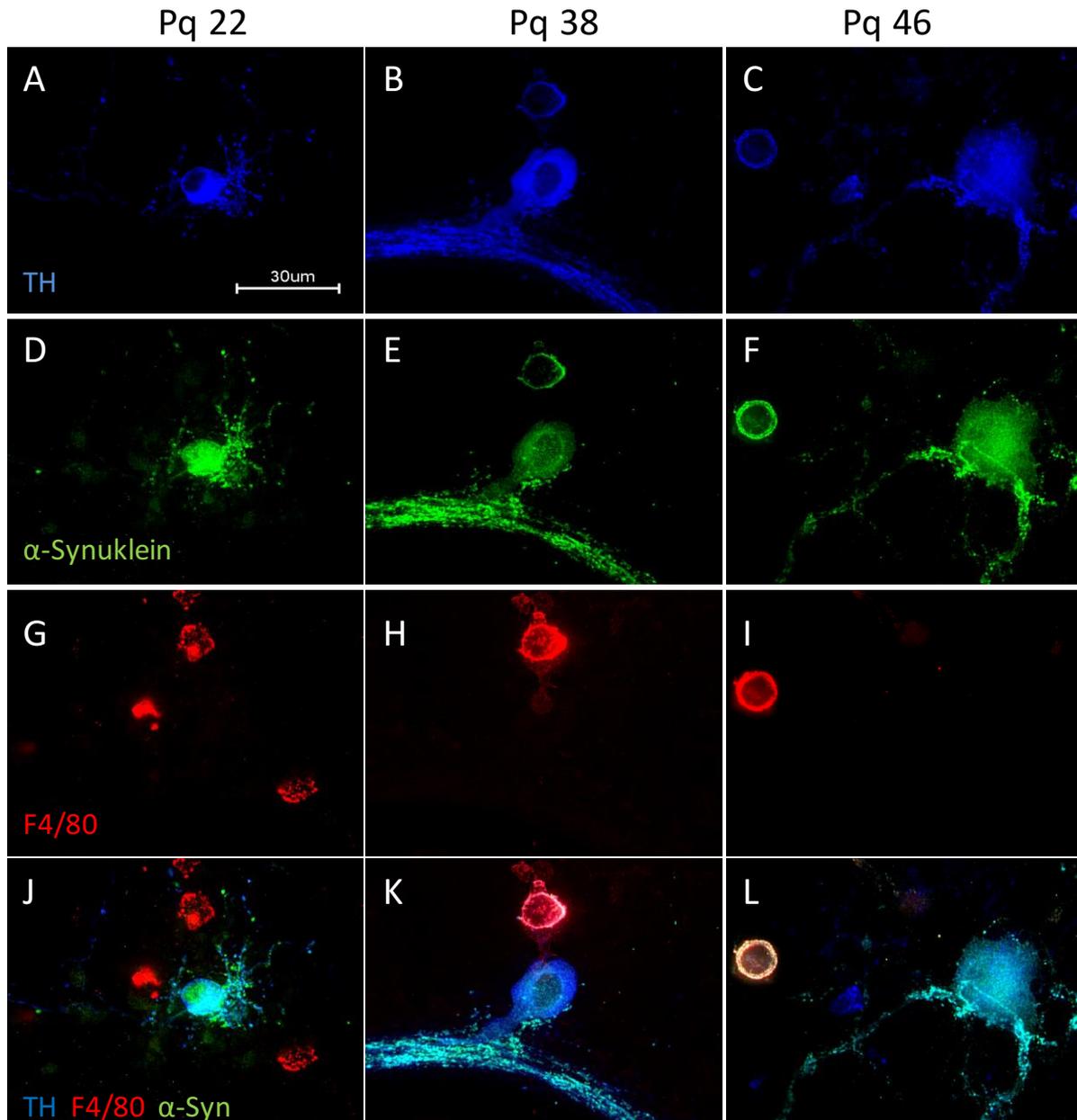
**Abbildung 63 TH, α-Syn und Mikroglia in den Kontroll-Kulturen**

Darstellung der dopaminergen Neurone am DIV 22, 38 und 46 fixiert mit Histochoice und gefärbt mit Antikörpern gegen TH, α-Syn und F4/80 (Mikroglia marker) in 100-facher Vergrößerung, Maßstab = 30 µm.



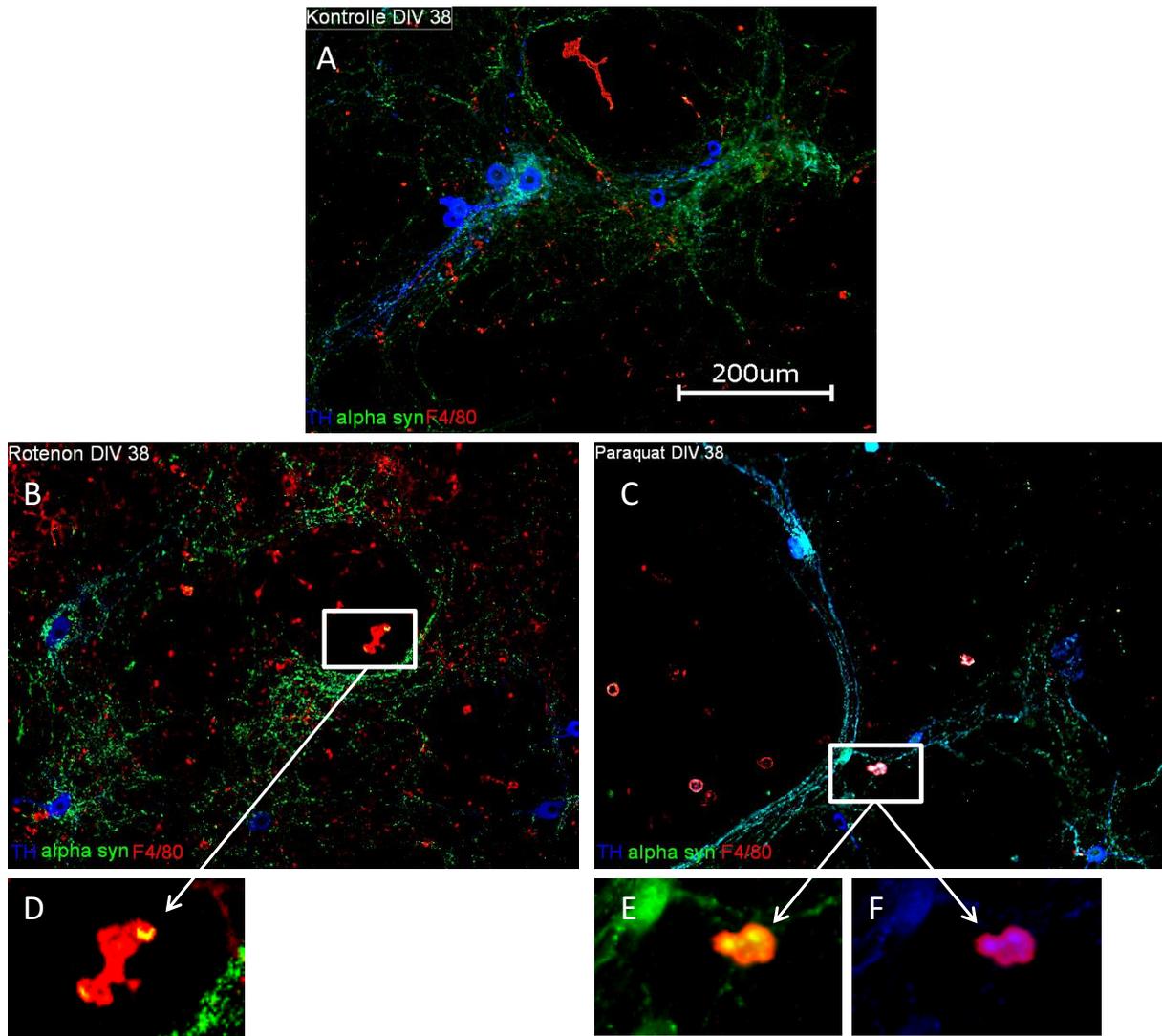
**Abbildung 64 TH,  $\alpha$ -Syn und Mikroglia unter Rotenon-Behandlung**

Darstellung der dopaminergne Neurone am DIV 22, 38 und 46 fixiert mit Histochoice und gefärbt mit Antikörpern gegen TH,  $\alpha$ -Syn und F4/80 (Mikroglia marker) in 100-facher Vergrößerung, Maßstab = 30  $\mu$ m.



**Abbildung 65 TH,  $\alpha$ -Syn und Mikroglia unter Paraquat-Behandlung**

Darstellung der mit 5  $\mu$ M Paraquat behandelten dopaminergen Neurone am DIV 22, 38 und 46 fixiert mit Histochoice und gefärbt mit Antikörpern gegen TH,  $\alpha$ -Syn und F4/80 (Mikroglia marker) in 100-facher Vergrößerung, Maßstab = 30  $\mu$ m.



**Abbildung 66 Aufnahme von TH und/oder  $\alpha$ -Synuklein in Mikroglia**

Die Kultur am DIV 38 fixiert mit Histochoice und gefärbt mit Antikörpern gegen TH,  $\alpha$ -Syn und F4/80 (Mikroglia marker) in 20-facher Vergrößerung, Maßstab = 200  $\mu$ m.

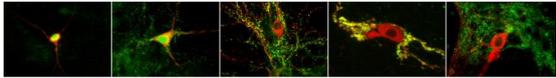
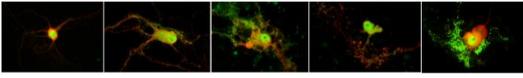
<b>3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse</b>		
	<b>dopaminerge mesenzephalale Primärzellkultur unter chronischer Rotenon-Behandlung</b>	<b>dopaminerge mesenzephalale Primärzellkultur unter chronischer Paraquat-Behandlung</b>
<b>Behandlungskonzentration</b>	Zelltod der dopaminergen Neurone um 25-50% bei 0,5 nM	Zelltod der dopaminergen Neurone um 25-50% bei 5 µM
<b>morphologische Unterschiede der dopaminergen Neurone</b>	Morphologie ähnlich den Kontrollzellen, normal ausgebildete Neuriten	stark verkürzte Neuriten, ab DIV 38 deformierter Zellkörper
<b>Verhalten von α-Synuklein in der ganzen Kultur</b>	α-Synuklein ↑	α-Synuklein ↓
<b>Lokalisierung von α-Synuklein im dopaminergen Neuron</b>	Wanderungsprozess ab DIV 22 aus dem Soma in die Neuriten  14      22      30      38	Konzentration im Soma und Kern  14      22      30      38
<b>Nachweis von Aggregaten mittels Proteo-Aggregosomen-Kit</b>	ab DIV 38 Nachweis von Aggregatbildung an größeren Ansammlung von α-Synuklein außerhalb des Somas	nur vereinzelt
<b>Phosphorylierung am Serin 129</b>	ab DIV 38 an größeren Ansammlung von phosphoryliertem α-Synuklein außerhalb des Somas	nur vereinzelt
<b>Präsenz von α-Synuklein in/ an den Synapsen</b>	Abnahme ab DIV 22, Akkumulation von α-Synuklein führt zu Verringerung von synaptischen Proteinen	durch Verlust der Neuriten noch stärkerer Abnahme von Synaptophysin-immunoreaktiven Strukturen
<b>Lokalisierung von α-Synuklein an der Zellmembran</b>	Membranassoziation von α-Synuklein lässt ab DIV 30 nach	Starke Anreicherung an/in der Membran sowie cytosolische Lokalisation erkennbar
<b>Abbau von α-Synuklein durch Ubiquitinierung</b>	Anstieg ab DIV 14 dann Inhibition der Ubiquitinierung	starke Ubiquitinierung von α-Synuklein über den gesamten Zeitraum
<b>Abbau von α-Synuklein durch Autophagie</b>	nimmt mit aggregierter Form von α-Synuklein zu	Abnahme
<b>Verhalten der Mikroglia</b>	DIV 14 -22 aktivierte Mikroglia, ab DIV 38 phagozytierte Mikroglia	ab DIV 22 aktivierte Mikroglia, von DIV 22 bis DIV 46 phagozytierte Mikroglia stark ansteigend
<b>Interleukin-1β</b>	leicht erhöht DIV 14	erhöht DIV 30
<b>Aufnahme von α-Synuklein /TH durch Mikroglia</b>	ab DIV 38 Aufnahme von α-Synuklein durch Mikroglia	ab DIV 38 Aufnahme von α-Synuklein und TH

Tabelle 6

Zusammenfassung der Ergebnisse im Vergleich

## 4. Diskussion

Pathologische Aggregate des Proteins  $\alpha$ -Synuklein sind seit langem als Marker in der histopathologischen Diagnostik verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen etabliert. Zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Studien haben deutliche Hinweise geliefert, dass dem Protein auch eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie dieser Erkrankungen zukommt. Inwieweit die charakteristische Aggregatbildung von  $\alpha$ -Synuklein ausschlaggebend ist für den Untergang der dopaminergen Neurone bei der Parkinson-Krankheit, bleibt Gegenstand aktueller Forschung.

Da der Zelltod der Neurone und die Bildung der Aggregate nicht immer miteinander korrelieren, geht man inzwischen davon aus, dass auch lösliche Intermediate des  $\alpha$ -Synuklein eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielen. Außerdem scheint die Interaktion von aggregiertem  $\alpha$ -Synuklein und dessen Auswirkung auf das inflammatorische System Einfluss auf die dopaminerge Neurodegeneration zu haben. Es gibt eine ansteigende Zahl an Studien die nahe legen, dass externe Einflüsse, wie Umweltgifte (zum Beispiel Pestizide oder Schwermetalle), die Zellalterung beschleunigen und so das Risiko an Parkinson zu erkranken erhöhen. Die Inzidenz der Parkinson-Krankheit steigt steil in Richtung Ende des fünften Lebensjahrzehnts. Wenn Parkinson ein Ergebnis des Altern ist, muss man die Frage prüfen, warum nur 4-5% der Menschen die Krankheit entwickeln. Zusätzlich zu den genetischen Eigenschaften ist jede Person verschiedenen Einflüssen ausgesetzt. Parkinson ist das Resultat eines langsamen neurodegenerativen Prozesses, der durch wiederholte Schädigungen beschleunigt werden kann. Inwieweit diese Degenerationen kompensiert werden können ist unterschiedlich.

Die vorliegende Arbeit vergleicht die Effekte der Pestizide Rotenon und Paraquat auf die für die dopaminergen Neurone toxische  $\alpha$ -Synuklein-Akkumulation. Zusätzlich zur Einwirkung der Umwelttoxine wurde die Hypothese untersucht, dass auch die normale Alterung der dopaminergen Zellen die  $\alpha$ -Synuklein-Akkumulation beeinflusst. Es wurde die Häufigkeit, Lokalisation, Aggregation, der Abbau und der inflammatorische Einfluss des  $\alpha$ -Synuklein-Proteins unter Toxin-Behandlung in einzelnen dopaminergen Neuronen bzw. in der ganzen Zellkultur mittels immunozytochemischer Färbungen, Fluoreszenzfärbungen und Proteinquantifizierungen analysiert. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine durch  $\alpha$ -Synuklein vermittelte Toxizität teilweise durch die missgefalteten Formen in der dopaminergen Zelle zustande kommt und sich die Lokalisation von  $\alpha$ -Synuklein bei den verschiedenen Toxin-Behandlungen unterscheidet. Für die Analyse der altersrelevanten Veränderungen wurde die dopaminerge Primärzellkultur über 46 Tage kultiviert. Im

Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit unter Einbeziehung bekannter und übergreifender Literatur diskutiert.

#### **4.1 Abnahme der dopaminergen Neurone in der Primärzellkultur unter Toxineinfluss**

Die Degeneration von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra nimmt mit dem Alter bei gesunden Probanden zu (Rodriguez et al. 2015). Interessanterweise zeigt sich in den unbehandelten Kulturen ab DIV 30 eine stetige Abnahme der dopaminergen Neurone bis zum DIV 46. Auch eine Zunahme und Modifikation von  $\alpha$ -Synuklein, wie beim Menschen und Primaten nachgewiesen (Chu and Kordower 2007) (Canron et al. 2012), konnte in unseren Kulturen gezeigt werden. Bei der Behandlung mit Rotenon wird dieser Effekt vor allem im fortschreitenden Alter der Kultur noch verstärkt. In der Arbeitsgruppe Gille wurde schon 2008 gezeigt, dass dopaminerge Neurone in primärer mesenzephaler Kultur nach einer Behandlung ab DIV 6 für 6 Tage mit 1 nM Rotenon um 60% verringert werden und empfindlicher reagieren als andere Neuronen (Radad and Gille 2008). Diesen dopaminergen Verlust konnte die Arbeitsgruppe Gille bei einer Kurzzeitbehandlung von 48 Stunden bei 10 Tage alten primären mesenzephalen Kulturen nur mit 20 nM Rotenon erreichen (Gille et al. 2002). Ähnliche Ergebnisse konnten *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden (Ren et al. 2005) (Ren and Feng 2007). Dies zeigt, dass bereits eine niedrige Konzentration von Rotenon über einen längeren Zeitraum dazu führt, dass der gleiche Grad der Zellschädigung wie in den Kurzzeitversuchen mit höherer Konzentration erreicht wird. Der progressive Verlust von dopaminergen Neuronen, induziert von Konzentrationen im nanomolaren Bereich über einen längeren Zeitraum, scheint die Degenerationsprozesse bei der Parkinson-Krankheit besser zu simulieren als Kurzzeitversuche. Chronisch behandelte mesenzephalere Primärzellkulturen sind daher ein gutes Modell für langfristige Untersuchungen der dopaminergen Schädigung und können möglicherweise einen wesentlichen Beitrag zur Pathophysiologie des Morbus Parkinson leisten.

#### **4.2 $\alpha$ -Synuklein im Toxinmodell-Rotenon versus Paraquat**

Eine zentrale, bis heute ungeklärte Frage ist, welche Ursachen der Aggregation des  $\alpha$ -Synukleins zu Grunde liegen. Als gesicherter Pathomechanismus der Degeneration der dopaminergen Nervenzellen gilt ein erhöhter oxidativer Stress. Es wird vermutet, dass er zur Aggregation des  $\alpha$ -Synukleins beitragen kann. Es werden unter anderen zwei artifizielle Modellschubstanzen eingesetzt, die Pestizide Rotenon und Paraquat, um die Verhältnisse bei

der Parkinson-Krankheit in der Substantia nigra zu simulieren. Das Auslösen von dopaminergem Neuronenverlust sowie die Hochregulierung und Aggregation des  $\alpha$ -Synuklein machen beide Modelle sehr wertvoll für die Parkinson-Forschung. Der oxidative Stress als Initiator des Zelltodes umfasst mehrere nachgeschaltete molekulare Reaktionswege. Diese Mechanismen können in verschiedenen Zellkompartimenten ablaufen und die Downstream-Signalübertragungswege, an deren Ende der Zelltod steht, in vielfältiger Art und Weise beeinflussen. Die molekulare Verbindung zwischen dem oxidativen Stress und dem Zelltod ist jedoch noch ungenügend erklärt.

Auf Grund von Vorversuchen und der Idee den langwierigen Prozess der individuellen und vielfältigen Symptombildung bei der Parkinson-Krankheit zu berücksichtigen, wurde in dieser Arbeit ein chronisches Langzeit-Zellkulturmodell verwendet, welches über 46 Tage ab DIV 6 jeden zweiten Tag mit 0,5 nM Rotenon/5  $\mu$ M Paraquat behandelt wurde, um zu schauen wie sich eine chronisch niedrige Konzentration über längeren Zeitraum auf die dopaminergen Neurone und auf  $\alpha$ -Synuklein auswirkt.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wird Rotenon im Zellkulturmodell und Tiermodell als Inhibitor des mitochondrialen Komplex I, zur Erzeugung von Zellschädigung, vor allem dopaminergem Neurone, und zur Induktion einer erhöhten Expression sowie Aggregationsvorgängen von  $\alpha$ -Synuklein eingesetzt (Sherer et al. 2003) (Greenamyre et al. 2003) (Cells et al. 2004) (Lee et al. 2005a). Die Resultate dieser Arbeit und frühere Versuche der Arbeitsgruppe Gille an der dopaminergen Primärzellkultur zeigen, dass Rotenon dopaminerge Neurone in Kultur dosisabhängig schädigt. Eine Ansammlung von  $\alpha$ -Synuklein in den dopaminergen Zellen wurde auch bei unseren Kurzzeitversuchen mit Rotenon oder Paraquat beobachtet. Dagegen konnten wir im Kurzzeitmodell eine Erhöhung der  $\alpha$ -Synuklein-Expressionsrate gegenüber den Kontrollzellen oder Aggregation des Proteins nicht nachweisen.

Zum Vergleich zur chronischen Rotenon-Behandlung wurde die Kultur genauso mit 5  $\mu$ M Paraquat behandelt, um eventuelle Unterschiede in der Auswirkung der beiden Pestizide auf die dopaminergen Neuronen und  $\alpha$ -Synuklein-Akkumulation aufzuzeigen. Hinweise, dass die Überproduktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Paraquat mit der Pathophysiologie von PD in Zusammenhang gebracht werden können, bestätigen Studien, in denen Paraquat die Anzahl an dopaminergen Neuronen in kortikalen Rattenzellen verringert (Patel 1996) Darüber hinaus geht man davon aus, dass die Schäden an dopaminergen Neuronen, die durch Paraquat verursacht werden, durch Gliazellen vermittelt werden (Rappold et al. 2011). Eine weiterer Grund des Einsatzes von Paraquat für die Parkinson-Forschung ist seine Fähigkeit, wie auch Rotenon,  $\alpha$ -Synuklein in den dopaminergen Neuronen anzuhäufen und Lewybody-ähnliche Strukturen in dopaminergen Neuronen zu

induzieren (Manning-bog et al. 2002). In Neuroblastomzellen löste Paraquat ebenfalls eine erhöhte  $\alpha$ -Synuklein Expression aus (Chorfa et al. 2013). Darüber hinaus existieren kaum Untersuchungen zur  $\alpha$ -Synuklein-Aggregation durch Paraquat in Zellkultur, insbesondere nicht in der dopaminergen Primärzellkultur.

Wir testeten Rotenon und Paraquat im selben Zellkultur-System und konnten feststellen, dass ihre Auswirkungen auf die dopaminergen Zellen und auf  $\alpha$ -Synuklein sehr verschieden sind. Um mit Paraquat (5  $\mu$ M) die gleiche Absterberate dopaminergener Neurone zu erzeugen, war eine 10000-fach höhere Dosis nötig als bei Rotenon (0,5 nM). Wir vermuten, dass die dopaminerge Zelle die Belastung durch Bildung von ROS als Folge von Redoxcycling besser kompensieren kann als eine direkte mitochondriale Schädigung des Komplex I.

In der vorliegenden Studie habe ich gezeigt, dass die chronische Gabe von Rotenon oder Paraquat zu einer Abnahme der dopaminergen Neurone um etwa 25-50 %, je nach Kulturalter, führt. Dabei verschlechtert sich der Allgemeinzustand der Neurone im Laufe der Kultivierung sowohl in den Kontrollen als auch in den Toxin-behandelten Kulturen, wobei diese Verschlechterung durch Rotenon und Paraquat beschleunigt wird. In unseren Primärzellkulturen konnten wir verschiedene Phänomene bei der Entwicklung der  $\alpha$ -Synuklein-Aggregation mit chronisch niedriger Rotenon- und Paraquat-Behandlung beobachten. So waren die dopaminergen Neurone auch in den unbehandelten Kontrollkulturen ab DIV 14 schon allein an ihrer  $\alpha$ -Synuklein-Intensität zu erkennen. In den mit Rotenon behandelten Kulturen vermuteten wir durch eine stärkere Fluoreszenzfärbung eine erhöhte  $\alpha$ -Synuklein-Expression, was im Western Blot zur Proteinquantifizierung bestätigt wurde. Diese Expressionserhöhung von  $\alpha$ -Synuklein, in dopaminergen Neuronen in der Substantia Nigra von Mäusen, konnten auch Nden und Kollegen zeigen. Nach chronischer oraler Gabe von Rotenon (30 mg/kg für 56 Tage) kam es zu cytoplasmatischen Akkumulationen von  $\alpha$ -Synuklein in den überlebenden dopaminergen Neuronen (Nden et al. 2011). Mit steigendem Kulturalter war in unserer Primärzellkultur ca. ab DIV 30 ein Austritt des  $\alpha$ -Synukleins aus dem Zellkörper in die Peripherie zu beobachten, die Färbeintensität für  $\alpha$ -Synuklein nahm im Zellkörper deutlich ab. Teilweise waren auch die Zellfortsätze entleert. Eine Quantifizierung ergab, dass ca. 30 % der dopaminergen Neurone derartige Effekte zeigten. Dies war zum gleichen Prozentsatz auch in den Kontrollzellen zu erkennen, die Effekte traten jedoch hier verzögert auf. So liegt die Vermutung nahe, dass die Behandlung mit Rotenon einen beschleunigten Alterungsprozess der Kulturen herbeiführt. Dieser altersbedingte Verlust von  $\alpha$ -Synuklein in der Substantia nigra von Mäusen konnte schon 2009 von Mak und Kollegen gezeigt werden (Mak et al. 2009).

Interessanterweise konnte in unseren Kulturen, besonders bei den mit Rotenon behandelten dopaminergen Neuronen, ein punktförmiges Verteilungsmuster des  $\alpha$ -Synukleins beobachtet werden, was für eine aggregierte Form des Proteins spricht. Nachzuweisen war diese

Aggregation ab DIV 38 mit dem Proteo-Aggregations-Kit. Man kann davon ausgehen, dass es sich ab diesem Zeitpunkt um  $\alpha$ -Synuklein-Aggregate handelt. Um sicher zu gehen, welche Konformation des  $\alpha$ -Synukleins zu den verschiedenen Zeitpunkten vorliegt, müssten weitere Studien durchgeführt werden.

Die Beobachtung, dass  $\alpha$ -Synuklein mit zunehmendem Kulturalter aus den dopaminergen Neuronen in die Peripherie austritt, konnten wir bei der chronischen Paraquat-Behandlung so nicht tätigen. Hervorzuheben ist, dass bei der Paraquat-Behandlung von Beginn an keine Heraufregulierung der Gesamt- $\alpha$ -Synuklein-Expression in der Kultur zu beobachten war, wie das im Gegensatz sowohl bei Kontrolle als auch bei Rotenon der Fall ist. Der Western Blot zur Proteinquantifizierung bestätigte diese Beobachtungen der fluoreszenzmikroskopischen Ebene.

Es gibt zunehmend Anzeichen, dass aggregiertes  $\alpha$ -Synuklein, zusätzlich zu den vielstudierten intrazellulären zytotoxischen Effekten, seine pathogene Funktion möglicherweise an den Synapsen und im extrazellulären Raum ausübt (Albani 2004) (Lee et al. 2008b) (Masuda-Suzukake et al. 2013) (Eschbach and Danzer 2014). Die Fluoreszenzfärbungen der Zellmembran, der Synapsen zusammen mit  $\alpha$ -Synuklein und die Färbung der Mikroglia mit  $\alpha$ -Synuklein lassen auch in unserem Rotenon-Modell eine Freisetzung des Proteins aus der dopaminergen Zelle vermuten. Die Präsenz von  $\alpha$ -Synuklein in den präsynaptischen Nervenendigungen der Rotenon-behandelten Kulturen lässt ab DIV 30 signifikant nach und es scheint, dass die Akkumulation und Anreicherung von  $\alpha$ -Synuklein zu einer Verringerung von synaptischen Proteinen führt. Unter Paraquat-Behandlung zeigt sich ein noch stärkerer Verlust der Synaptophysin-immunreaktiven Strukturen, der mit der starken Degeneration der Neuriten zu erklären ist. Die Degeneration der dopaminergen Zelle unter Paraquat-Einfluss hat ein anderes Erscheinungsbild als unter Rotenon-Behandlung. Rotenon scheint zu einer schnelleren Alterung der Kultur zu führen, wobei die Strukturen der dopaminergen Neurone der Kontrolle gleichen. Unter Paraquat kommt es ab DIV 30 zu einer regelrechten Deformierung des Zellkörpers und zu einer Verkümmern der Neuriten. Durch die starke Ansammlung des  $\alpha$ -Synuklein im Zytosol des Zellkörpers, in den verbleibenden Neuriten und seine Anlagerung an den Zellkern könnte hier die Störung der Proteinabbau-Maschinerie und DNA-Schäden die hauptsächliche Ursache des dopaminergen Zelltods sein. Um diesen Aspekt noch genauer zu prüfen, führten wir Fluoreszenzfärbungen von verschiedenen Proteinen durch, welche am Abbau von fehlgefalteten Proteinen beteiligt sind.

### **4.3 Lokalisation von $\alpha$ -Synuklein in den dopaminergen Neuronen**

Der Wanderungsprozess des  $\alpha$ -Synuklein aus dem Soma in die Peripherie konnte mittels BZ II Analyzer quantifiziert werden. In unserer Studie wird sichtbar, dass die morphologische Lokalisation von  $\alpha$ -Synuklein in und an den dopaminergen Neuronen eine wichtige Rolle sowohl für den Abbau des Proteins als auch für die Präsenz und Aktivität von Mikrogliazellen spielt. Die Akkumulation und Anreicherung von  $\alpha$ -Synuklein scheint zu einer Verringerung von synaptischen Proteinen zu führen. Unter Paraquat ist die signifikante Reduktion der Synapsen durch die starke Degeneration der Neuriten noch deutlicher. Dass  $\alpha$ -Synuklein scheinbar direkt mit der Zellmembran interagieren und an der Synapse durch abnormale Membran-Wechselwirkungen Toxizität initiieren kann, zeigte schon Auluck mit Kollegen (Auluck et al. 2010). Auch Hellstrand konnte eine sogenannte Co-Aggregation von  $\alpha$ -Synuklein und Lipiden zeigen. Eine damit verbundene Extraktion von Lipiden aus der Zellmembran könnte Struktur und Funktion der Membran neben den gebildeten Aggregaten beeinflussen (Hellstrand et al. 2013). Verschiedene Studien zeigen auch, dass  $\alpha$ -Synuklein-Oligomere Lipidmembranbindungen stören und damit die Funktion der Membran beeinträchtigen können (Volles and Lansbury 2002) (Rochet et al. 2004) (Breydo et al. 2012).

In unseren Studien kam es während der Paraquat-Behandlung zu einer stärkeren Anreicherung des Proteins im Zellkern, im Cytosol sowie in der Membran. Die Lokalisation von  $\alpha$ -Synuklein nach Paraquat im Zellkern könnte eine Ursache der Zytoskell-Disorganisation und der sichtbaren Verformung des Zellkörpers und der Axone sein. Das  $\alpha$ -Synuklein paraquatinduziert in den Zellkern von dopaminergen Neuronen transloziert werden und dort durch Wechselwirkungen mit Histonen toxische Mechanismen aktivieren kann, zeigten Goers und Kollegen (Goers et al. 2003). Die Behandlung mit Rotenon scheint eher die Alterung der dopaminergen Zellen zu beschleunigen und dadurch zur Beeinträchtigung der Membranassoziation mit  $\alpha$ -Synuklein zu führen, wobei es wahrscheinlich zu einem Austritt von  $\alpha$ -Synuklein aus der Membran kommt.

### **4.4 Einfluss von $\alpha$ -Synuklein auf den Proteinabbau**

Abnormalitäten von Proteinhomeostase oder Protease können zur Ansammlung von  $\alpha$ -Synuklein führen (Kalia et al. 2011). Ein weiteres Ziel dieser Studie war, den Einfluss von den Toxinen auf das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) während des Aggregations- und Wanderungsprozesses des  $\alpha$ -Synukleins zu untersuchen. Welchen Einfluß haben nun Rotenon oder Paraquat auf den Abbau von  $\alpha$ -Synuklein?

In vergangenen Studien wurde beschrieben, dass die Hemmung des Ubiquitin-Proteasom-Systems Einfluss auf die strukturellen Eigenschaften von  $\alpha$ -Synuklein und die Lebensfähigkeit von dopaminergen Neuronen hat (Rideout and Stefanis 2002) (Mcnaught and Olanow 2003).

Auch eine veränderte zelluläre Lokalisation von  $\alpha$ -Synuklein unter Proteasom-Hemmung, die durch oxidative Toxizität verursacht wurde, zeigten Musgrove und Kollegen an primären Mittelhirnkulturen der Ratte (Musgrove et al. 2011). In diesen Versuchen wurde durch Fluoreszenzfärbung beobachtet, dass am DIV 21 in dopaminergen Neuronen unter chronischem Stress  $\alpha$ -Synuklein hochreguliert wird und relativ diffus im Neuron lokalisiert ist. Chronisch oxidativer Stress und zusätzliche akute Toxizität bewirkten dagegen eine punktförmige Ansammlung von  $\alpha$ -Synuklein im Soma der dopaminergen Zellen. Diese  $\alpha$ -Synuklein-Akkumulationen zeigen eine Kolo­kalisierung mit Ubiquitin.

Bei unserer Primärzellkultur konnten wir unter Rotenon am DIV 14 eine starke Kolo­kalisierung von diffus in der Zelle vorhandenem  $\alpha$ -Synuklein und Ubiquitin sowie auch eine Polyubiquitinierung von  $\alpha$ -Synuklein nachweisen. Die Doppelfärbung kann darauf hindeuten, dass hier  $\alpha$ -Synuklein für den Proteinabbau gekennzeichnet wird. Unter Rotenon wird im weiteren Kulturverlauf diese Polyubiquitinierung gehemmt und man kann Kolo­kalisierung von Ubiquitin und  $\alpha$ -Synuklein nur noch in punktförmigen Ansammlungen des Proteins außerhalb des Somas beobachten. Bei diesen Ansammlungen konnte man ab DIV 38 davon ausgehen, dass es sich um Aggregate handelt, was wir wiederum durch die Proteo-Aggregosomen-Färbung belegen konnten. Bei den mit Paraquat behandelten Kulturen zeigte sich von DIV 14 bis DIV 46 eine starke Polyubiquitinierung und Kolo­kalisierung der beiden Proteine in der ganzen Zelle, was vermuten lässt, dass sich hier in den dopaminergen Neuronen die abnormen  $\alpha$ -Synuklein-Proteine ansammeln. Mit der starken Aktivierung des UPS unter Paraquat lässt sich die Abnahme von  $\alpha$ -Synuklein in der Gesamtkultur erklären. Die chronische Hochregulierung von  $\alpha$ -Synuklein in unserem Rotenon-Modell führte am Anfang zur Aktivierung des UPS, die dann wieder auf ein ähnliches Niveau wie in den Kontrollen abfällt. Die verschiedenen Lokalisierungen und Formen von  $\alpha$ -Synuklein in der Zelle, die sich in unserem Zellkulturmodell unter den beiden Toxinen herausbildeten, scheinen einen Einfluss auf den Abbau des Proteins durch Ubiquitinierung zu haben.

Sun und Kollegen konnten zeigen, dass die Behandlung mit Rotenon zur Unterdrückung der proteasomalen Aktivität durch ATP-Mangel führt (Sun et al. 2007). Auch Studien mit chronischer Rotenon-Behandlung in humanen Neuroblastomzellen wiesen darauf hin, dass die selektive dopaminerge Entartung gleichzeitig mit dysfunktionalem UPS und  $\alpha$ -Synuklein-Akkumulation einhergeht (Betarbet et al. 2006). In unserem chronischen Rotenon-Modell wurde durch Fluoreszenzfärbung und den Nachweis der Ubiquitinierung von  $\alpha$ -Synuklein mittels Immunpräzipitation deutlich, dass die jüngeren Zellen am DIV 14, sozusagen als

Abwehrmechanismus, die Fähigkeit zur proteasomalen Aktivität steigern können. Dieser Effekt ist zu späteren Kulturzeitpunkten nicht mehr zu beobachten. Ähnliche Beobachtungen machten Zeevalk und Bernhard bei mesenzephalen Zellkulturen, die gleichzeitig mit der Erhöhung von ROS einen Anstieg von Ubiquitin zeigen konnten (Zeevalk and Bernard 2005). Proteasom-Funktionen können als sekundäre Reaktion auf veränderten zellulären Redox-Status variieren (Okada et al. 1999).

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass das Protein HSC70, welches zum Abbau bestimmte Proteine für die Chaperon-vermittelte Autophagie (CVA) kennzeichnet, in der Lage ist, sowohl  $\alpha$ -Synuklein-Toxizität und Aggregation zu blockieren (Klucken et al. 2004) (Pemberton and Melki 2012). Weiter konnte nachgewiesen werden, dass das Expressionsniveau von HSP70 in der Substantia nigra von Parkinson-Gehirnen im Vergleich zu Kontroll-Hirnproben signifikant reduziert wird (Alvarez-Erviti et al. 2010).

Unter Rotenon konnten wir eine Kolo-kalisation von HSC70 und  $\alpha$ -Synuklein in der Fluoreszenzfärbung zeigen, welche am DIV 14 im Soma und in den Neuriten lokalisiert ist und im Wanderungs- und Akkumulationsprozess des  $\alpha$ -Synuklein ab DIV 30 außerhalb des Somas an den punktförmigen Ansammlungen zu finden ist. Proteinfehlfaltungen können den Abbau von Proteinen über die Chaperon-vermittelten Autophagie hemmen oder fördern (Fonseca et al. 2015). Es ist wahrscheinlich, dass die Anwesenheit von mit Proteinabbau-assoziierten Proteinen und molekularen Chaperonen an  $\alpha$ -Synuklein einen Hinweis darauf geben kann, wie und wann die Zelle diese Proteinablagerungen versucht abzubauen. Dabei scheint die Aggregationsform, die unterschiedliche Größenverteilung und Lokalisierung von  $\alpha$ -Synuklein auf das Verhalten der Proteinabbau-Maschinerie Einfluss zu nehmen. In unserem Zellkulturmodell scheinen die Abbaumechanismen speziell auf die Aggregationsstufe des Proteins zu reagieren. Ähnliche Beobachtungen tätigten Lee und Kollegen an der Zelllinie COS-7 (Lee et al. 2002a).

Im Paraquat-Modell konnte in der Fluoreszenzfärbung nur im geringen Maß eine Kolo-kalisation von HSC70 mit  $\alpha$ -Synuklein beobachtet werden. Diese Ergebnisse stützen die These, dass es sich bei den  $\alpha$ -Synuklein-Akkumulationen im Paraquat-Modell nicht um die Aggregationsform handelt, die wir im Rotenon-Modell auch anhand der Aggregationsfärbung mit dem Proteo-Aggregosomen-Kit nachweisen konnten. Das  $\alpha$ -Synuklein im Paraquat-Modell verbleibt vielmehr im Soma der Zelle und vermag dort, möglicherweise auch durch seine Lokalisierung und Assoziationen mit dem Zellkern, seine für die dopaminerge Zelle toxische Wirkung zu entfalten, indem es die Azetylierung von Histonen hemmt und damit letztlich zur Inaktivierung von Genen führt (Goers et al. 2003) (Kontopoulos et al. 2006b). Interessant wäre noch eine weitere Studie über die genaue Aggregationsform und die noch genauere Lokalisation des  $\alpha$ -Synukleins unter Paraquat in der dopaminergen Zelle.

#### **4.5 $\alpha$ -Synuklein und inflammatorische Veränderungen nach Toxinbehandlung**

Die Rolle der Neuroinflammation im Parkinson-Modell ist Gegenstand vieler Untersuchungen der letzten Jahre. Vor allem Mikrogliazellen sind als immunkompetente Zellen des zentralen Nervensystems wichtig für die Phagozytose, Antigenpräsentation und Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen. In der Substantia nigra befindet sich ein sehr hoher Gehalt an Mikrogliazellen (Lawson 1990). Normalerweise liegen sie in ruhendem Zustand vor und werden erst durch Verletzungen oder pathogene Vorgänge aktiviert (Crosier 2005).

Doch wie bzw. ob sich die Prozesse der Modulation von  $\alpha$ -Synuklein auf Mikroglia-Aktivierung beziehen, ist noch unklar. Erhöhte reaktive Mikroglia sind ein histologisches Merkmal in der Parkinson-Erkrankung und korrelieren positiv mit  $\alpha$ -Synuklein. Es wird vermutet, dass mutiertes  $\alpha$ -Synuklein zu reaktiver Mikroglie beitragen kann (Rojanathammanee et al. 2011) (Béraud et al. 2013). Mikrogliaaktivierung ist nicht nur in der Lage, den Interaktionsweg der Mikroglia mit dem peripheren Immunsystem zu ändern, sondern auch die Art und Weise der Modulation von  $\alpha$ -Synuklein (Sanchez-Guajardo et al. 2013). Es konnte gezeigt werden, dass extrazelluläre  $\alpha$ -Synuklein-Proteine und seine Aggregate von Mikrogliazellen abgebaut werden können (Lee et al. 2008a). Außerdem konnte beobachtet werden, dass mutiertes  $\alpha$ -Synuklein in der Lage ist, Mikroglia-Phänotypen *in vitro* zu modulieren und es wurde gezeigt, dass vor allem fibrilläres  $\alpha$ -Synuklein inflammatorische Vorgänge beeinflusst (Codolo et al. 2013) (Béraud et al. 2013). Weiterhin gibt es Untersuchungen, ob  $\alpha$ -Synuklein auch die phagozytotische Funktion von Mikroglia beeinflusst. Dabei konnte gezeigt werden, dass die unterschiedliche Lokalisation des monomeren sowie des aggregierten  $\alpha$ -Synuklein Einfluss auf die Phagozytose haben (Park et al. 2008).

Während die Effekte von Rotenon auf dopaminerge Neurone gut etabliert sind, gibt es wenige Informationen über die Auswirkungen von Rotenon und Paraquat auf Mikrogliazellen in der dopaminergen Primärzellkultur. In SHSY-Zellen konnte nach Rotenon-Behandlung eine Aktivierung von Mikroglia gezeigt werden (Shaikh and Nicholson 2009). In jungen und älteren Ratten wurde nach Rotenon-Gabe eine basale Erhöhung der Mikroglia mit dem Alter festgestellt (Phinney et al. 2006). Alvarez-Erviti und Kollegen zeigten 2011, dass in BV-2 Zellen eine Behandlung mit mutiertem  $\alpha$ -Synuklein die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen erhöht.

In unserem Zellkulturmodell scheint es einen Zusammenhang zwischen der Mikrogliaaktivierung, der Lokalisation und/oder Akkumulation des  $\alpha$ -Synuklein zu geben. Die Auswirkungen von chronisch niedrig dosierter Rotenon- und Paraquat-Behandlung auf die

alternde dopaminerge Primärzellkultur im Hinblick der Mikrogliaaktivität sind sehr unterschiedlich. Wir konnten im Rotenon-Modell einen signifikanten Anstieg von aktivierter Mikroglia bis DIV 30 nachweisen, der sich dann im Laufe des Kulturalters dem Niveau der Kontrolle annäherte. Ähnlich wie die Aktivitätssteigerung der Ubiquitinierung scheint Rotenon die Aktivierung von Mikrogliazellen auszulösen, wobei zu späteren Zeitpunkten eine Normalisierung einsetzt. Im Paraquat-Modell kommt es zum hochsignifikanten Anstieg der phagozytierenden Mikroglia, welche in der Lage ist,  $\alpha$ -Synuklein und dopaminerge Zellreste aufzunehmen und abzubauen. Diese Beobachtungen könnten auch zur Verringerung des  $\alpha$ -Synuklein unter Paraquat in der Gesamtkultur beitragen. Verglichen mit der Kontrolle wurden die signifikanten morphologischen Veränderungen der Mikroglia in die phagozytierende Form ab DIV 22 deutlich. Dazu konnten wir im Western Blot unter Paraquat einen Anstieg des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-1 $\beta$  nachweisen.

Wird nun die dopaminerge Degeneration von aktivierter Mikroglia und/oder von aggregiertem  $\alpha$ -Synuklein verstärkt? Die Ergebnisse der Gruppe um Zhang legen nahe, dass die dopaminerge Schädigung, unabhängig von  $\alpha$ -Synuklein, mit Hilfe von proinflammatorisch-hemmenden Mediatoren Mikroglia aktiviert (Zhang et al. 2005). Weitere Studien mit Rotenon und Paraquat zeigen, dass Neuroinflammation induziert wird. Es ist jedoch nicht bekannt, ob die Toxine direkt Mikroglia aktivieren. Bei Vergleichsbehandlungen mit Lipopolysacchariden (LPS) in primär kultivierten Mikroglia-kulturen zeigen Paraquat und Rotenon nicht die typischen morphologischen Veränderungen an Mikroglia und keine Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen (Klintworth 2009). Also könnte dies bedeuten, dass Paraquat und Rotenon nicht direkt auf die Mikroglia wirken, sondern diese Aktivierung eine Folge der dopaminergen Neuronenschäden oder eventuell verschiedener Modellierungen von  $\alpha$ -Synuklein ist. Zhou und Thomas mit Kollegen zeigten, dass eine Aggregation von  $\alpha$ -Synuklein zu einer verstärkten Radikalbildung in der Mikroglia führen kann (Zhou et al. 2005) (Thomas and Beal 2007). Außerdem gibt es eine Studie, die belegt, dass  $\alpha$ -Synuklein einen schützenden Effekt gegen den durch Paraquat induzierten oxidativen Stress haben kann (Lee et al. 2006). Die Beobachtung, dass aggregiertes  $\alpha$ -Synuklein von dopaminergen Neuronen abgegeben und sezerniert wird, konnten wir, wie auch andere Gruppen, in unserem Zellkulturmodell sowohl unter Rotenon- als auch Paraquat-Behandlung ab DIV 38 tätigen (Zhang et al. 2005) (Thomas and Beal 2007). Außerdem beobachteten wir eine Aufnahme von dopaminergen Zellresten zusammen mit  $\alpha$ -Synuklein durch Fluoreszenzfärbung im Paraquat-Modell. Auf der Grundlage der Erkenntnisse, dass  $\alpha$ -Synuklein den Mikroglia-Phänotyp verändern kann, ist davon auszugehen, dass die  $\alpha$ -Synuklein Form, die unter Paraquat-Einfluss entsteht, den phagozytierenden Zelltyp der Mikroglia fördert. Das aus dem Soma auswandernde aggregierte  $\alpha$ -Synuklein unter Rotenon scheint eher für die aktivierte Mikrogliaform verantwortlich zu sein, wobei auch Phagozytose

ab DIV 38 beobachtet werden kann, wenn auch nicht in dem Maße wie unter Paraquat und im Zusammenhang mit dopaminergen Zellresten.

In der Studie von Park und Kollegen wurde ebenfalls die Möglichkeit untersucht, dass  $\alpha$ -Synuklein die phagozytierende Funktion der Mikroglia beeinflusst (Park et al. 2008). Diese Gruppe konnte in BV-2 Zellen zeigen, dass extrazelluläres monomeres  $\alpha$ -Synuklein die Phagozytose durch Mikroglia fördert und aggregiertes  $\alpha$ -Synuklein tatsächlich die Phagozytose hemmt. Außerdem äußerte diese Gruppe auch den Verdacht, dass die Lokalisation von  $\alpha$ -Synuklein in der Zelle Einfluss auf die Modulation der Mikroglia hat, genau wie wir es in unserem Zellkulturmodell beobachten konnten. Unsere Daten deuten darauf hin, dass unter Rotenon aggregiertes  $\alpha$ -Synuklein zur Zellmembran wandert und diese größeren Aggregationen bis zu einem bestimmten Zeitpunkt auch an der Membran gebunden bleiben und dann im weiteren Verlauf der Kultur freigesetzt werden. Jedoch müssten noch genauere Studien gemacht werden, um festzustellen in welchem Stadium des Aggregationsvorgangs (oligomere oder fibrilläre Form)  $\alpha$ -Synuklein in den Zellen und außerhalb der Zelle vorliegt. Wie schon erwähnt kann  $\alpha$ -Synuklein in monomerer sowie in aggregierter Form aus der Zelle sezernieren (Lee et al. 2002b). Auch hier werden in unserem Modell weitere Studien benötigt, um die Abgabe von  $\alpha$ -Synuklein aus der Zelle und die Transmission vom Neuron auf die Mikroglia zu belegen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass der molekulare Mechanismus, welcher die Phagozytose der Mikroglia regelt, ein weiterer wichtiger Ansatzpunkt, bei neurodegenerativen Erkrankungen, die mit Akkumulation von  $\alpha$ -Synuklein einhergehen, zu sein scheint. Der Abbau des Proteins über das Ubiquitin-Proteasom-System wird in unserem Modell durch beide Toxine verändert und wird scheinbar, wie auch die Mikroglia, durch verschiedene Formen und Lokalisierung des  $\alpha$ -Synukleins beeinflusst.

Auch die altersbedingten Veränderungen von  $\alpha$ -Synuklein in den Kulturen ohne Behandlung lassen vermuten, dass sie das Ergebnis der unterschweligen Degeneration dopaminergere Neurone sind, die in der Parkinson-Krankheit durch Proteinfehlfaltungen und Aktivitätsrückgang des proteasomalen Abbaus symptomatisch werden und durch den Einfluss von beispielsweise Rotenon schon früher auftreten könnten. Man könnte vermuten, dass die altersbedingte Anhäufung von nicht aggregiertem  $\alpha$ -Synuklein ein therapeutisches Ziel für Parkinson-Patienten sein könnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu der Überlegung, dass die Anwesenheit der verschiedenen Formen des  $\alpha$ -Synukleins, ausgelöst durch Paraquat oder verstärkt durch den Einsatz von Rotenon, zur Beeinflussung des UPS und der Mikrogliaaktivität beitragen, so unterschiedlich die beiden Toxine auch in ihrem Wirkmechanismus sein mögen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Einsatz verschiedener Parkinson-Modelle in dieser alternden dopaminergen Primärzellkultur einen guten Ansatz zur Aufklärung möglicher schädigender Eigenschaften von  $\alpha$ -Synuklein liefert.

Die weitere Erforschung dieser Mechanismen könnte maßgeblich zum Verständnis der Pathologie der Parkinson-Krankheit sowie zu neuen Therapiemöglichkeiten beitragen.

## 5. Zusammenfassung

Ein Schlüsselbefund der Parkinson-Krankheit auf zellulärer Ebene ist das Auftreten von Protein-Einschlusskörperchen, sogenannten Lewykörperchen. Der Hauptbestandteil dieser Lewykörperchen ist pathologisch aggregiertes, fibrilläres  $\alpha$ -Synuklein, ein Protein, welches Einfluss auf präsynaptische Vesikel, Protein- und Enzymfunktionen sowie den Dopaminstoffwechsel und den axonalen Transport hat. Bis heute ungeklärt ist die Ursache der Aggregation des Proteins. Zahlreiche Forschungsaktivitäten werden in diese Richtung unternommen. Die pathologischen Mechanismen, die zur abnormen Aggregation von  $\alpha$ -Synuklein führen, bleiben noch weitgehend unbekannt. Ein großer Teil der Literatur unterstützt die Hypothese, dass  $\alpha$ -Synuklein bei Punktmutationen oder erhöhter Expression anfällig für Aggregationen ist und damit Neuronen geschädigt werden. Die Einzelheiten dieses sukzessiven Aggregationsprozesses und die Mechanismen, die dabei letztlich den Zelltod verursachen, bleiben unklar. Alterungsprozesse und Umweltfaktoren sind entscheidende Risikofaktoren. Obwohl es immer mehr Hinweise gibt, dass  $\alpha$ -Synuklein-Aggregate eine wichtige pathophysiologische Rolle spielen, wird bisher noch unzulänglich verstanden, wie die für die dopaminergen Neurone toxische Wirkung entfaltet wird. Als gesicherter Pathomechanismus der Degeneration der dopaminergen Nervenzellen gilt ein erhöhter oxidativer Stress. Es wird vermutet, dass er zur Aggregation des  $\alpha$ -Synukleins beitragen kann.

Ziel dieser vorgelegten Arbeit ist es, durch die Verwendung eines geeigneten Zellkulturmodells zur Aufklärung der beschriebenen pathologischen Mechanismen beizutragen. In dieser Studie wurden zwei artifizielle Modellsubstanzen in einer dopaminergen Primärzellkultur eingesetzt, die Pestizide Rotenon und Paraquat, um die pathologischen Verhältnisse in der Substantia nigra zu simulieren. Sie erzeugen oxidativen Stress durch Hemmung der mitochondrialen Atmungskette bzw. Redoxreaktionen mit molekularem Sauerstoff, was zum dopaminergen Zelltod führt.

Im Rahmen dieser Studie gelang es, beide Parkinson-Zellkulturmodelle anhand der Lokalisierung, des Aggregationsverhaltens, des Einflusses auf die Mikroglia-Aktivierung sowie des Abbaus von  $\alpha$ -Synuklein näher zu charakterisieren. Hierzu wurde  $\alpha$ -Synuklein durch Fluoreszenzfärbung, Westernblot und Immunpräzipitation analysiert.

Eine kurzzeitige Behandlung mit hoch konzentrierten Toxinen löst eine akute Degeneration dopaminergener Neurone aus, die so nicht der des Idiopathischen Parkinsons entspricht. Beim IPS erfolgt die Degeneration über Jahre hinweg. Um auch den Einfluss der zellulären

Alterung auf die  $\alpha$ -Synuklein-Aggregation zu zeigen, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturen über 46 Tage kultiviert und die Pestizid-Konzentration so eingestellt, dass etwa 25-50 % der dopaminergen Neurone absterben.

Es konnte gezeigt werden, dass es nach chronischer Behandlung mit dem jeweiligen Pestizid zu den verschiedenen Zeitpunkten Unterschiede in der Lokalisation sowie in der Konformation von  $\alpha$ -Synuklein gibt. Die zum Vergleich nur bis zum Tag 11 kultivierten Zellkulturen zeigten nach kurzer Behandlung mit hochkonzentrierter Toxin-Menge eine Ansammlung von  $\alpha$ -Synuklein im Soma, aber keine Auswanderung und Lokalisierung in und an den Neuriten, wie es nach chronischer Rotenon-Behandlung beobachtet werden konnte.

Bei den Rotenon-behandelten Zellen ist ein Prozess der Verlagerung und Anhäufung des  $\alpha$ -Synuklein aus dem Soma in die Neuriten bereits ab einem früheren Zeitpunkt zu beobachten als in den Kontrollen, welche sich aber mit zunehmendem Alter ähnlich verhalten. Außerdem konnte in den Kulturen, besonders bei den Rotenon-behandelten dopaminergen Neuronen, ein punktförmiges Verteilungsmuster und größere Ansammlungen des Proteins in den Neuriten beobachtet werden, was für eine aggregierte Form des  $\alpha$ -Synukleins spricht. Diese Aggregate ließen sich durch die Proteo-Aggregosom-Färbung nachweisen. Auch der Nachweis von am Serin 129 phosphoryliertem  $\alpha$ -Synuklein in diesen größeren Ansammlungen gilt als Zeichen für eine aggregierte Form.

Die Beobachtung, dass  $\alpha$ -Synuklein mit zunehmendem Kulturalter aus dem Soma in die Peripherie austritt, konnte bei der chronischen Paraquat-Behandlung so nicht getätigt werden. Unter Paraquat-Behandlung war keine Herauf-Regulierung der Gesamt- $\alpha$ -Synuklein Expression in der Kultur zu beobachten, wie dies sowohl bei Kontrolle als auch bei Rotenon der Fall ist. Wir vermuten im Paraquat-Modell, dass die sich im Soma ansammelnde Form von  $\alpha$ -Synuklein durch vermehrte Einschleusung in den Zellkern zur Toxizität beitragen kann. Auch eine Interaktion von  $\alpha$ -Synuklein mit der Zellmembran könnte unter Paraquat-Einfluss zum dopaminergen Zelltod beitragen.

Durch Immunpräzipitation und Fluoreszenz-Doppelfärbung von  $\alpha$ -Synuklein und Ubiquitin konnten wir den Abbau des fehlgefalteten  $\alpha$ -Synukleins in der Zelle durch Ubiquitinierung nachweisen. Unter Rotenon ist ab DIV 14 eine starke Kolo-kalisation von  $\alpha$ -Synuklein und Ubiquitin zu erkennen, die im Verlauf der Kultur nachlässt und nur noch in punktförmigen Aggregaten außerhalb der Zelle zu sehen ist. Unter Paraquat zeigte sich während der gesamten Kultivierung Polyubiquitinierung und Kolo-kalisation der beiden Proteine in der gesamten Zelle. Die Aggregationsform von  $\alpha$ -Synuklein scheint das Proteinabbau-system durch Ubiquitinierung zu beeinflussen, da wir davon ausgehen, dass es sich bei der  $\alpha$ -Synuklein-Konformation zu verschiedenen Zeitpunkten in den Paraquat-behandelten dopaminergen Neuronen nicht um die Aggregationsform handelt, die wir unter Rotenon beobachten konnten.

Ähnlich wie die Aktivitätssteigerung der Ubiquitinierung scheint Rotenon die Aktivierung von Mikrogliazellen auszulösen, wobei zu späteren Zeitpunkten eine Normalisierung einsetzt. Im Paraquat-Modell kommt es zum hochsignifikanten Anstieg der phagozytierenden Mikroglia, welche in der Lage ist,  $\alpha$ -Synuklein und dopaminerge Zellreste aufzunehmen. Dazu konnten wir im Westernblot unter Paraquat einen Anstieg des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-1 $\beta$  nachweisen. Auf der Grundlage der Erkenntnisse, dass  $\alpha$ -Synuklein den Mikroglia-Phänotyp verändern kann, ist davon auszugehen, dass die  $\alpha$ -Synuklein Form, die unter Paraquat-Einfluss entsteht, den phagozytierenden Zelltyp der Mikroglia aktiviert. Das aus dem Soma auswandernde aggregierte  $\alpha$ -Synuklein unter Rotenon scheint eher für die aktivierte Mikrogliaform verantwortlich zu sein, wobei auch Phagozytose ab DIV 38 beobachtet werden konnte, wenn auch nicht in dem Maße wie unter Paraquat und im Zusammenhang mit dopaminergen Zellresten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben wichtige neue Einblicke in pathogene Vorgänge im dopaminergen Neuron mit Beteiligung von  $\alpha$ -Synuklein. Zudem konnten in dem chronischen Toxin-Langzeit-Zellkulturmodell wichtige Erkenntnisse im Vergleich zur kurzzeitigen Behandlung mit hoch konzentrierten Toxinen erbracht werden, die die Grundlage für weitere Analysen darstellen.

Es konnten gezeigt werden, dass beide Toxine auf verschiedene Art und Weise den Abbau des Proteins über das Ubiquitin-Proteasom-System verändern und scheinbar auch die Mikroglia durch verschiedene Konformationen und Lokalisierung des  $\alpha$ -Synukleins beeinflusst wird. Es werden noch weitere Untersuchungen zur genauen Struktur des  $\alpha$ -Synuklein zu verschiedenen Zeitpunkten benötigt. Auch der Einfluss auf das inflammatorische System muss in Hinblick auf die Beteiligung von Glia-Zellen und anderen Neuronen weiter untersucht werden. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass es eine Verbindung zwischen den Risikofaktoren der Erkrankung, einem erhöhtem  $\alpha$ -Synuklein-Spiegel und der Anhäufung und Lokalisierung des Proteins gibt. Der Einsatz verschiedener Toxine in dieser alternden dopaminergen Primärzellkultur stellt einen guten Ansatz zur Aufklärung möglicher schädigender Eigenschaften von  $\alpha$ -Synuklein in dopaminergen Neuronen dar, die maßgeblich die Entwicklung von Parkinson fördern können.

## 6. Summary

One of the key findings on a cellular regarding the Parkinson disease is the occurrence of protein inclusion bodies, so called Lewy bodies. The main component of these Lewy bodies is pathologically aggregated fibrillar  $\alpha$ -synuclein, a protein which has influence on the pre-synaptic vesicle, protein and enzyme functions as well as on the dopamine metabolism and the axonal transport. The reason for the aggregation of the protein is unclear to this day. Many research activities are taking place in that area. The pathological mechanisms that lead to the abnormal aggregation of the  $\alpha$ -synuclein are largely unknown. A large part of literature supports the hypothesis that  $\alpha$ -synuclein is prone to aggregation when point mutations or elevated expressions happen and neurons are damaged this way. The details of this successive aggregation process and the mechanisms that eventually lead to cell death remain unclear. Aging processes and environmental factors are crucial risk factors. Even though there are more and more hints that the  $\alpha$ -synuclein aggregates play an important pathophysiological role, it's still insufficiently understood how the dopaminergic neurons develop a toxic activity. A verified pathomechanism of the degeneration of the dopaminergic nerve cells is heightened oxidative stress. It is presumed that it can contribute to the aggregation of the  $\alpha$ -synuclein.

The goal of the submitted work is to contribute to the solution of the described pathological mechanisms by using a suitable cell culture model. Two artificial model substances were put into a dopaminergic main cell culture in this study, the pesticides Rotenon and Paraquat, to simulate the pathological conditions in the substantia nigra. They generate oxidative stress by inhibiting the mitochondrial respiratory chain or redox reactions with the molecular oxygen, which leads to dopaminergic cell death.

As part of this study it was possible to specifically characterize both Parkinson cell cultures models successfully by localization, through the aggregation behavior, through the influence on the microglia activation as well through the degradation of the  $\alpha$ -synuclein. To that end the  $\alpha$ -synuclein was analyzed through fluorescence staining, westernblot and immunoprecipitation.

A short term treatment with highly concentrated toxins triggers an acute degeneration of the dopaminergic neurons which doesn't match that of idiopathic Parkinson. With IPS the degeneration takes years. In order to also show the influence of cellular ageing on the  $\alpha$ -synuclein aggregation, the cell cultures that were used in this work were cultivated for 46 days and the pesticide concentration was adjusted so that about 25-50% of the dopaminergic neurons die off.

It was possible to show that after chronic treatment with the respective pesticide there are differences at specific time points in the localization as well as in the conformation of  $\alpha$ -synuclein. The cell cultures that were only cultivated up to day 11 to have a comparison

showed an accumulation of  $\alpha$ -synuclein in the soma after short term treatment with a highly concentrated toxin, but no transmigration and localization on and in the dendrites, like it could be seen after chronic rotenone treatment.

With the rotenone treated cells, the process of relocation and accumulation of the  $\alpha$ -synuclein from the soma into the dendrites could be seen way earlier as in the controls which behave the same way as they get older. Furthermore a dot-like distribution pattern and larger accumulations of the protein in the dendrites could be seen in the cultures, especially in the rotenone treated dopaminergic neurons, which indicates an aggregated form of the  $\alpha$ -synuclein. These aggregates could be proved by proteo-agrosom staining. The evidence of the phosphorylated  $\alpha$ -synuclein on Serin 129 in these large accumulations is also a sign for an aggregated form.

It couldn't be shown on the chronic paraquat treatment that the  $\alpha$ -synuclein leaks from the soma into the periphery as the cell culture ages. During the paraquat treatment no upwards adjustment of the total  $\alpha$ -synuclein expression of the culture could be seen which was not the case with the control and the when treated with rotenone. We suspect that in the paraquat model the form of  $\alpha$ -synuclein that accumulates in the soma can contribute to the toxicity by increasing implantation into cell core. An interaction of  $\alpha$ -synuclein with the cell membrane can also contribute to dopaminergic cell death when under paraquat influence.

By using immunoprecipitation and fluorescence double staining of  $\alpha$ -synuclein and ubiquitin, we were able to prove the breakdown of the misfolded  $\alpha$ -synuclein in the cell through ubiquitination. Under the influence of rotenone, a strong colocalisation of  $\alpha$ -synuclein and ubiquitin can be seen, starting from DIV 14, which declines throughout the culture and can only be seen as dot-like aggregates outside of the cell. A polyubiquitination and colocalisation of both proteins in the whole cell could be seen when under the influence of paraquat. The aggregation form of  $\alpha$ -synuclein seems to influence the protein break system through ubiquitination, because we suspect that the  $\alpha$ -synuclein conformation in the paraquat treated dopaminergic neurons at different points of time is not the aggregation form that we've seen when under the influence of rotenone.

Similar to the rise in activity of the ubiquitination, rotenone seems to trigger an activation of microglial cells although a normalization is happening later. A highly significant rise of the phagocytic microglia which is able to absorb  $\alpha$ -synuclein and cell residue happens in the paraquat model. We could also prove a rise of the pro inflammatory cytokine Interleukin-1 $\beta$  in the westernblot when under the influence of paraquat. Based on the knowledge that  $\alpha$ -synuclein can change the microglia phenotype, we can assume that the  $\alpha$ -synuclein form that develops under the influence of paraquat, activates the phagocytic cell type of the microglia.

The aggregated  $\alpha$ -synuclein that emigrates from the soma under the influence of rotenone seems to rather be the cause for the activated microglia form although a phagocytosis starting at DIV 38 could also be seen even if not in the same quantity as under the influence of paraquat and in the context of dopaminergic cell residue.

The results of this work show important new insights into the pathogenic processes of the dopaminergic neuron with the involvement of  $\alpha$ -synuclein. It was also possible to render important insights from the chronic toxin long-term cell culture model when compared to the short term treatment with highly concentrated toxins which creates the basis for further analyses.

It could be shown that both toxins change the breakdown of the protein via the ubiquitin proteasome system through different methods and it seems that the microglia is also influenced through various conformations and the localization of the  $\alpha$ -synuclein. Further investigations about the exact structure of the  $\alpha$ -synuclein at different points in time are needed. The influence on the inflammatory system in view of the involvement of the glia cells and other neurons has to be further researched as well. Our results indicate that there is a connection between the risk factors of the disease, the heightened  $\alpha$ -synuclein level and the accumulation and localization of the protein. The use of different toxins in this aging dopaminergic cell culture is a good approach to learn about possible harmful effects of  $\alpha$ -synuclein in dopaminergic neurons which can significantly promote the development of Parkinson.

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Lage der Substantia nigra im Horizontalschnitt.....	1
Abbildung 2	Verschaltung für die bei der Parkinson-Erkrankung relevanten Gehirnregionen.....	2
Abbildung 3	<sup>18</sup> F-Dopa SPECT Analyse.....	3
Abbildung 4	Lewy-Körperchen in der Substantia nigra .....	6
Abbildung 5	Schematische Darstellung des humanen $\alpha$ -Synuklein .....	10
Abbildung 6	Schematische Darstellung der $\alpha$ -Synuklein Aggregation .....	12
Abbildung 7	Mögliche Mechanismen des $\alpha$ -Synuklein Transfer von Zelle zu Zelle .....	15
Abbildung 8	Die drei Stadien der Mikroglia .....	16
Abbildung 9	Schematische Darstellung der Wirkung von $\alpha$ -Synuklein auf Mikroglia .....	17
Abbildung 10	Schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom-System .....	18
Abbildung 11	Schematische Darstellung von CVA, UPS und Autophagie.....	20
Abbildung 12	Struktur- und Summenformel Rotenon.....	21
Abbildung 13	Struktur- und Summenformel von Paraquat.....	22
Abbildung 14	Am 14. Embryonaltag entnommene Embryonen .....	32
Abbildung 15	Darstellung des Mittelhirns am embryonalen Mausgehirn .....	32
Abbildung 16	mit BZ-II-Analyzer erstellte Maske zur Auswertung der Menge an $\alpha$ -Syn.....	38
Abbildung 17	Überlebensrate der dopaminergen Neurone nach Rotenon .....	41
Abbildung 18	Überlebensrate der dopaminergen Neurone nach Paraquat .....	42
Abbildung 19	Morphologie der dopaminergen Neurone unter Rotenon- bzw. Paraquat-Einfluss ..	42
Abbildung 20	Darstellung von $\alpha$ -Synuklein im Verlauf der Zeit nach Toxin-Behandlung .....	43
Abbildung 21	Fluoreszenzintensität von $\alpha$ -Synuklein pro Well.....	43
Abbildung 22	Verteilung von $\alpha$ -Synuklein in der dopaminergen Primärzellkultur am DIV 14 .....	44
Abbildung 23	Verteilung von $\alpha$ -Synuklein in der dopaminergen Primärzellkultur am DIV 30 .....	45
Abbildung 24	Verteilung von $\alpha$ -Synuklein in der dopaminergen Primärzellkultur am DIV 46 .....	46
Abbildung 25	Verteilung von $\alpha$ -Synuklein in den dopaminergen Neuronen am DIV 14.....	47
Abbildung 26	Verteilung von $\alpha$ -Synuklein in den dopaminergen Neuronen am DIV 22.....	48
Abbildung 27	Verteilung von $\alpha$ -Synuklein in den dopaminergen Neuronen am DIV 30.....	49
Abbildung 28	Verteilung von $\alpha$ -Synuklein in den dopaminergen Neuronen am DIV 38.....	50
Abbildung 29	Verteilung von $\alpha$ -Synuklein in den dopaminergen Neuronen am DIV 46.....	51
Abbildung 30	Lokalisation von $\alpha$ -Syn im Zellkern nach Pq und Ro im TH+ Neuron .....	52
Abbildung 31	Overlays von TH und $\alpha$ -Synuklein in den TH+ Neuronen im Überblick .....	53
Abbildung 32	Intensität von $\alpha$ -Syn in der TH+ Zelle(A), im Soma(B), in den Neuriten(C) .....	54
Abbildung 33	Überlebensrate der TH+ Neuronen nach 80 nM Ro und 40 $\mu$ M Pq.....	55
Abbildung 34	$\alpha$ -Syn in den TH+ Neuronen am DIV 11 nach 24 h 80 nM Rot bzw. 40 $\mu$ M Pq.....	56
Abbildung 35	Darstellung von $\alpha$ -Syn nach 24h mit 80 nM Rotenon bzw. 40 $\mu$ M Paraquat .....	56
Abbildung 36	TH, $\alpha$ -Syn, Proteo-Aggregosomen Kit in der Kontrollkultur im Überblick.....	58
Abbildung 37	TH, $\alpha$ -Syn, Proteo-Aggregosomen-Kit in der Rotenon-Kultur im Überblick .....	59
Abbildung 38	$\alpha$ -Syn und Proteo-Aggregosomen-Kit DIV 38 .....	59
Abbildung 39	TH, $\alpha$ -Syn, Proteo-Aggregosomen Kit in der Paraquat-Kultur im Überblick .....	60

Abbildung 40	TH, $\alpha$ -Syn, phosphoryliertes $\alpha$ -Syn in den Kontroll-Kulturen.....	61
Abbildung 41	TH, $\alpha$ -Syn, phosphoryliertes $\alpha$ -Syn unter Rotenon-Behandlung .....	62
Abbildung 42	$\alpha$ -Synuklein und phos $\alpha$ -Synuklein am DIV 46 .....	62
Abbildung 43	TH, $\alpha$ -Syn, phosphoryliertes $\alpha$ -Syn unter Paraquat-Behandlung .....	63
Abbildung 44	TH, $\alpha$ -Syn, Synaptophysin in der Kontroll-Kultur im Überblick.....	64
Abbildung 45	TH, $\alpha$ -Syn, Synaptophysin in der Roteon-Kultur im Überblick .....	65
Abbildung 46	TH, $\alpha$ -Syn, Synaptophysin in der Paraquat-Kultur im Überblick .....	66
Abbildung 47	Analyse der Kolokalisation zwischen Synaptophysin und $\alpha$ -Syn .....	67
Abbildung 48	$\alpha$ -Synuklein und Membrane Stain in der Kontroll-Kultur im Überblick .....	68
Abbildung 49	$\alpha$ -Synuklein und Membrane Stain in der Rotenon-Kultur .....	69
Abbildung 50	$\alpha$ -Synuklein und Membrane Stain in der Paraquat-Kultur .....	69
Abbildung 51	Ubiquitinierung von $\alpha$ -Syn im Verlauf der Zeit nach Rotenon-Behandlung.....	70
Abbildung 52	Ubiquitinierung von $\alpha$ -Syn im Verlauf der Zeit nach Paraquat-Behandlung.....	71
Abbildung 53	TH, $\alpha$ -Syn, Ubiquitin in den dop. Neuronen bei den Kontroll-Kulturen.....	72
Abbildung 54	TH, $\alpha$ -Syn, Ubiquitin in den dop. Neuronen bei Rotenon-Behandlung .....	73
Abbildung 55	TH, $\alpha$ -Syn, Ubiquitin in den dop. Neuronen bei Paraquat-Behandlung .....	74
Abbildung 56	Analyse der Kolokalisation zwischen Ubi und $\alpha$ -Syn in der Gesamtkultur .....	75
Abbildung 57	TH, $\alpha$ -Syn, HSC70 in den dop. Neuronen in der Kontroll-Kultur .....	76
Abbildung 58	TH, $\alpha$ -Syn, HSC70 in den dop. Neuronen unter Rotenon-Behandlung .....	77
Abbildung 59	TH, $\alpha$ -Syn, HSC70 in den dopaminergen Neuronen unter Paraquat-Behandlung ...	78
Abbildung 60	Mikroglia-Phänotypen .....	79
Abbildung 61	Anzahl der ruhenden(A), aktivierten(B) und phagozytierten(C) Mikroglia .....	80
Abbildung 62	Darstellung von Interleukin-1 $\beta$ nach Rotenon bzw. Paraquat .....	81
Abbildung 63	TH, $\alpha$ -Syn und Mikroglia in den Kontroll-Kulturen .....	82
Abbildung 64	TH, $\alpha$ -Syn und Mikroglia unter Rotenon-Behandlung .....	83
Abbildung 65	TH, $\alpha$ -Syn und Mikroglia unter Paraquat-Behandlung .....	84
Abbildung 66	Aufnahme von TH und/oder $\alpha$ -Synuklein in Mikroglia .....	85

## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Bekannte Mutationen von chromosomal codierten Proteinen beim Morbus Parkinson .....	4
Tabelle 2	Geräte .....	26
Tabelle 3	Verbrauchsmaterialien .....	27
Tabelle 4	Primär- und Sekundärantikörper .....	28
Tabelle 5	Chemikalien und Kits .....	30
Tabelle 6	Zusammenfassung der Ergebnisse im Vergleich .....	86

## 9. Literaturverzeichnis

Bibliography}

Abdul M, Ma Q, Takeda K, Aizawa T. 2004. Demonstration of a role for  $\alpha$ -synuclein as a functional microtubule-associated protein. *Int.J. Alzheimer's Dis.* 6: 2877.

Abeliovich A, Schmitz Y, Fariñas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, et al. 2000. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25: 239–52.

Alderson TR, Markley JL. 2014. Biophysical characterization of alpha-synuclein and its controversial structure. *Intrinsically Disord Proteins* 1: 1–43.

Alexi T, Borlongan C V, Faull RLM, Williams CE, Clark RG, Gluckman PD, Hughes PE. 2000. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Prog. Neurobiol.* 60: 409–470.

Allen PJ, Feigin A. 2013. Gene-based Therapies in Parkinson's Disease. *Neurotherapeutics* 11: 60-67.

Alvarez-Erviti L, Couch Y, Richardson J, Cooper JM, Wood MJ a. 2011a. Alpha-synuclein release by neurons activates the inflammatory response in a microglial cell line. *Neurosci. Res.* 69: 337–42.

Alvarez-Erviti L, Rodriguez-Oroz MC, Cooper JM, Caballero C, Ferrer I, Obeso J a, Schapira AH V. 2010. Chaperone-Mediated Autophagy Markers in Parkinson Disease Brains. *Arch. Neurol.* 198: 1–9.

Alvarez-Erviti L, Seow Y, Schapira AH, Gardiner C, Sargent IL, Wood MJ a, Cooper JM. 2011b. Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. *Neurobiol. Dis.* 42: 360–7.

Anglade P, Vyas S, Hirsch EC, Agid Y. 1997. Apoptosis in dopaminergic neurons of the human substantia nigra during normal aging. *Histol. Histopathol.* 12: 603–10.

Ardah MT, Paleologou KE, Lv G, Abul Khair SB, Kazim AS, Minhas ST, Al-Tel TH, Al-Hayani A a, Haque ME, Eliezer D, El-Agnaf OM a. 2014. Structure activity relationship of phenolic acid inhibitors of  $\alpha$ -synuclein fibril formation and toxicity. *Front. Aging Neurosci.* 6: 197.

Auluck PK, Caraveo G, Lindquist S. 2010.  $\alpha$ -Synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26: 211–33.

Auluck PK, Chan HYE, Trojanowski JQ. 2002. Chaperone Suppression of  $\alpha$ -Synuclein Toxicity in a *Drosophila* Model for Parkinson's Disease. *Science* 295: 865–868.

Bain PG. 2002. The management of tremor. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 72 Suppl 1: I3–I9.

Barbour R, Kling K, Anderson JP, Banducci K, Cole T, Diep L, Fox M, Goldstein JM, Soriano F, Seubert P, Chilcote TJ. 2008. Red Blood Cells Are the Major Source of Alpha-Synuclein in Blood. *Neurodegener. Dis* 5: 55–59.

Benmoyal-Segal L, Soreq H. 2006. Gene-environment interactions in sporadic Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 97: 1740–55.

- Béraud D, Hathaway H a, Trecki J, Chasovskikh S, Johnson D a, Johnson J a, Federoff HJ, Shimoji M, Mhyre TR, Maguire-Zeiss K a. 2013. Microglial activation and antioxidant responses induced by the Parkinson's disease protein  $\alpha$ -synuclein. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 8: 94–117.
- Bertoncini CW, Griesinger C, Zweckstetter M, Blackledge M. 2005. Defining Long-Range Order and Local Disorder in Native  $\alpha$ -Synuclein Using Residual Dipolar Couplings. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 17968–17969.
- Betarbet R, Canet-Aviles RM, Sherer TB, Mastroberardino PG, McLendon C, Kim J-H, Lund S, Na H-M, Taylor G, Bence NF, Kopito R, Seo BB, et al. 2006. Intersecting pathways to neurodegeneration in Parkinson's disease: effects of the pesticide rotenone on DJ-1,  $\alpha$ -synuclein, and the ubiquitin-proteasome system. *Neurobiol. Dis.* 22: 404–20.
- Bjorklund A, Kordower JH. 2013. Cell Therapy for Parkinson's Disease : What Next ? Adrenal Chromaffin Cells and the Early Clinical Trials The First Trials Using Fetal VM Tissue Grafts. *Mov. Dis.* 28: 110–115.
- Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E. 2000. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 62: 63–88.
- Bodner RA, Outeiro TF, Altmann S, Maxwell MM, Cho SH, Hyman BT, Mclean PJ, Young AB, Housman DE, Kazantsev AG. 2006. Pharmacological promotion of inclusion formation : A therapeutic approach for Huntington's and Parkinson's diseases. *PNAS* 103: 4246–4251.
- Borghi R, Marchese R, Negro A, Marinelli L, Forloni G, Zaccheo D, Abbruzzese G, Tabaton M. 2000. Full length  $\alpha$ -synuclein is present in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease and normal subjects. *Neurosci. Lett.* 287: 65–67.
- Braak H, Tredici K Del, Rüb U, Vos R a. . de, Jansen Steur EN., Braak E. 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 24: 197–211.
- Brandis K. 2006. Oxidative Stress ,  $\alpha$ -Synuclein , and Apoptosis in Parkinson's Disease. *Neurosci. Lett.* 2: 22–27.
- Breydo L, Wu JW, Uversky VN. 2012.  $\alpha$ -Synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1822: 261–85.
- Brooks DJ. 2012. Parkinson's disease: diagnosis. *Parkinsonism Relat. Disord.* 18 Suppl 1: S31–3.
- Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Südhof TC. 2010.  $\alpha$ -Synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science* 329: 1663–7.
- Cabin DE, Shimazu K, Murphy D, Cole NB, Gottschalk W, McIlwain KL, Orrison B, Chen A, Ellis CE, Paylor R, Lu B, Nussbaum RL. 2002. Synaptic Vesicle Depletion Correlates with Attenuated Synaptic  $\alpha$ -Synuclein. *J Neuroscience* 22: 8797–8807.
- Caboni P, Sherer TB, Zhang N, Taylor G, Na HM, Greenamyre JT, Casida JE. 2004. Rotenone , Deguelin , Their Metabolites , and the Rat Model of Parkinson's Disease. *Chem. Res. Toxicol.* 17: 1540–1548.

- Calne DB, Langston JW. 1983. Aetiology of Parkinson's Disease. *THELANCET* 1457–1459.
- Canron M-H, Perret M, Vital A, Bézard E, Dehay B. 2012. Age-dependent  $\alpha$ -synuclein aggregation in the *Microcebus murinus* lemur primate. *Sci. Rep.* 2: 910.
- Cells DS, Watabe M, Nakaki T. 2004. Rotenone Induces Apoptosis via Activation of Bad in Human. *Pharmacology* 311: 948–953.
- Chang C, Lang H, Geng N, Wang J, Li N, Wang X. 2013. Exosomes of BV-2 cells induced by alpha-synuclein: important mediator of neurodegeneration in PD. *Neurosci. Lett.* 548: 190–5.
- Chen JG, Eldridge DL, Lodeserto FJ, Ming DY, Kristen M, Vanderford JL, Sporn TA, Schulman SR. 2010. Paraquat Ingestion : A Challenging Diagnosis. *Pediatrics* 125: 1505-1509
- Choi W, Palmiter RD, Xia Z. 2011. Loss of mitochondrial complex I activity potentiates dopamine neuron death induced by microtubule dysfunction in a Parkinson's disease model. *JCB* 192: 873-882
- Chorfa A, Bétemps D, Morignat E, Lazizzera C, Hogeveen K, Andrieu T, Baron T. 2013. Specific pesticide-dependent increases in  $\alpha$ -synuclein levels in human neuroblastoma (SH-SY5Y) and melanoma (SK-MEL-2) cell lines. *Toxicol. Sci.* 133: 289–297.
- Chu Y, Kordower JH. 2007. Age-associated increases of alpha-synuclein in monkeys and humans are associated with nigrostriatal dopamine depletion: Is this the target for Parkinson's disease? *Neurobiol. Dis.* 25: 134–49.
- Cicchetti F, Lapointe N, Roberge-tremblay A, Saint-pierre M, Jimenez L, Ficke BW, Gross RE. 2005. Systemic exposure to paraquat and maneb models early Parkinson ' s disease in young adult rats. *Neurobiol. Dis.* 20: 360–371.
- Ciechanover A, Brundin P. 2003. The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* 40: 427–46.
- Clayton DF, George JM. 1998. The synucleins : a family of proteins involved in synaptic function , plasticity , neurodegeneration and disease. *Integr. Vlsi J.* 249–254.
- Clayton DF, George JM. 1999. Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *J. Neurosci. Res.* 58: 120–9.
- Cochemé HM, Murphy MP, Cocheme HM. 2008. Complex I Is the Major Site of Mitochondrial Superoxide Production by Paraquat \*. *J.Biol.Chem.* 283: 1786–1798.
- Codolo G, Plotegher N, Pozzobon T, Brucale M, Tessari I, Bubacco L, Bernard M de. 2013. Triggering of inflammasome by aggregated  $\alpha$ -synuclein, an inflammatory response in synucleinopathies. *PLoS One* 8: e55375.
- Cuervo AM. 2004. Autophagy : Many paths to the same end. *Mol. Cell. Biochem.* 263: 55–72.
- Danzer KM, Kranich LR, Ruf WP, Cagsal-Getkin O, Winslow AR, Zhu L, Vanderburg CR, McLean PJ. 2012. Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers. *Mol. Neurodegener.* 7: 42.
- Dedmon MM, Christodoulou J, Wilson MR, Dobson CM. 2005. Protein Structure and Folding : Heat Shock Protein 70 Inhibits  $\alpha$  -Synuclein Fibril Formation via Preferential Binding

- to Prefibrillar Species Heat Shock Protein 70 Inhibits  $\alpha$ -Synuclein Fibril Formation via Preferential Binding to Prefibrillar Species \*. *J. Biol. Chem.* 14733–14740.
- Deleersnijder A, Gerard M, Debyser Z, Baekelandt V. 2013. The remarkable conformational plasticity of alpha-synuclein: blessing or curse? *Trends Mol. Med.* 19: 368–77.
- Dinis-Oliveira RJ, Remião F, Carmo H, Duarte J a, Navarro a S, Bastos ML, Carvalho F. 2006. Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 27: 1110–22.
- Duda JE, Lee VM, Trojanowski JQ. 2000. Neuropathology of Synuclein Aggregates : New Insights Into Mechanisms of Neurodegenerative Diseases. *Journal of Neur. Res.* 127: 121–127.
- Dunker AK, Lawson JD, Brown CJ, Williams RM, Romero P, Oh JS, Oldfield CJ, Campen AM, Ratliff CM, Hipps KW, Ausio J, Nissen MS, et al. 2001. IDP 3263: 26–59.
- Dunning CJR, Reyes JF, Steiner J a, Brundin P. 2012. Can Parkinson's disease pathology be propagated from one neuron to another? *Prog. Neurobiol.* 97: 205–19.
- Eisbach SE, Outeiro TF. 2013. Alpha-synuclein and intracellular trafficking: impact on the spreading of Parkinson's disease pathology. *J. Mol. Med. (Berl).* 91: 693–703.
- El-Agnaf OM a, Salem S a, Paleologou KE, Curran MD, Gibson MJ, Court J a, Schlossmacher MG, Allsop D. 2006. Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J.* 20: 419–25.
- El-agnaf OMA, Jakes R, Curran MD, Y DM, Bianchi E, Pessi A, Neill D, Wallace A. 1998. Aggregates from mutant and wild-type K -synuclein proteins and NAC peptide induce apoptotic cell death in human neuroblastoma cells by formation of L -sheet and amyloid-like  $\phi$  laments. *FEBS Lett.* 71–75.
- Eliezer D, Kutluay E, Jr RB, Browne G. 2001. Conformational Properties of a -Synuclein in its Free. *J.Mol.Biol.* 1061–1073.
- Eschbach J, Danzer KM. 2014.  $\alpha$ -Synuclein in Parkinson's Disease: Pathogenic Function and Translation into Animal Models. *Neurodegener. Dis.* 1–17.
- Fearnley JM, Lees AJ. 1991. Ageing and Parkinson's Disease: Substantia Nigra Regional Selectivity. *Brain* 114: 2283–2301.
- Feng LR, Maguire-zeiss KA. 2010. Gene Therapy in Parkinson's Disease: Rationale and Current Status. *CNS Drugs* 24: 177–192.
- Ferrante RJ, Browne SE, Shinobu LA, Bowling AC, Baik MJ, Macgarvey U, Kow NW, Brown H, Beal MF. 1997. Evidence of Increased Oxidative Damage in Both Sporadic and Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neurochem.* 2064–2074.
- Fonseca T, Villar-Piqué A, Outeiro T. 2015. The Interplay between Alpha-Synuclein Clearance and Spreading. *Biomolecules* 5: 435–471.
- Fornai F, Schlüter OM, Lenzi P, Gesi M, Ruffoli R, Ferrucci M, Lazzeri G, Busceti CL, Pontarelli F, Battaglia G, Pellegrini A, Nicoletti F, et al. 2005. Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 3413–8.

- Fortin DL, Nemani VM, Nakamura K, Edwards RH. 2010. The Behavior of  $\alpha$ -Synuclein in Neurons. *Mov. Disord.* 25: 21–26.
- Freire C, Koifman S. 2012. NeuroToxicology Pesticide exposure and Parkinson ' s disease : Epidemiological evidence of association. *Neurotoxicology* 33: 947–971.
- Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K, Iwatsubo T. 2002.  $\alpha$ -Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat. Cell Biol.* 4: 160–4.
- Gao H, Kotzbauer PT, Uryu K, Leight S, Trojanowski JQ, Lee VM. 2008. Neuroinflammation and Oxidation / Nitration of  $\alpha$ -Synuclein Linked to Dopaminergic Neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* 28: 7687–7698.
- Gasser T. 2007. Update on the Genetics of Parkinson ' s Disease. *Mov. Disord.* 22: 343–350.
- George JM. 2001. Protein family review The synucleins. *Genome Biol.* 3002.1–3002.6.
- George JM, Jin H, Woods WS, Clayton DF. 1995. Characterization of a Novel Protein Regulated during the Critical Period for Song Learning in the Zebra Finch. *Neuron* 15: 361–372.
- Gerlach M, Double K, Arzberger T, Leblhuber F. 2003. Dopamine receptor agonists in current clinical use : comparative dopamine receptor binding profiles defined in the human striatum. *J. Neural Transm.* 1119–1127.
- Giasson BI, Lee VM. 2000. A new link between pesticides and Parkinson ' s disease. *Nat. Neurosc.* 3: 12–13.
- Giasson BI, Murray I V, Trojanowski JQ, Lee VM. 2001. A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of  $\alpha$ -synuclein is essential for filament assembly. *J. Biol. Chem.* 276: 2380–6.
- Gille G, Rausch W, Hung S, Moldzio R, Janetzky B. 2002. Pergolide protects dopaminergic neurons in primary culture. *J. Neural Transm.* 109: 633–643.
- Goers J, Manning-Bog AB, McCormack AL, Millett IS, Doniach S, Monte D a Di, Uversky VN, Fink AL. 2003. Nuclear localization of  $\alpha$ -synuclein and its interaction with histones. *Biochemistry* 42: 8465–71.
- Goldberg MS, Jr PTL. 2000. Is there a cause-and-effect relationship between  $\alpha$ -synuclein fibrillization and Parkinson ' s disease ? *Nat. Cell Biol.* 2: 115–119.
- Gorbatyuk OS, Li S, Nguyen FN, Manfredsson FP, Kondrikova G, Sullivan LF, Meyers C, Chen W, Mandel RJ, Muzyczka N. 2010.  $\alpha$ -Synuclein expression in rat substantia nigra suppresses phospholipase D2 toxicity and nigral neurodegeneration. *Mol. Ther.* 18: 1758–68.
- Gosavi N, Lee H-J, Lee JS, Patel S, Lee S-J. 2002. Golgi fragmentation occurs in the cells with prefibrillar  $\alpha$ -synuclein aggregates and precedes the formation of fibrillar inclusion.

J. Biol. Chem. 277: 48984–92.

Greenamyre JT, Betarbet R, Sherer TB. 2003. The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environment and mitochondria. *Parkinsonism Relat. Disord.* 9: 59–64.

Haglund K, Dikic I. 2012. The role of ubiquitylation in receptor endocytosis and endosomal sorting. *J. Cell Sci.* 125: 265–75.

Hamann J, Wernicke C, Lehmann J, Reichmann H, Rommelspacher H, Gille G. 2008. 9-Methyl-beta-carboline up-regulates the appearance of differentiated dopaminergic neurones in primary mesencephalic culture. *Neurochem. Int.* 52: 688–700.

Hariz M. 2014. Parkinsonism and Related Disorders Deep brain stimulation: new techniques. *Park. Relat. Disord.* 20: S192–S196.

Harms AS, Cao S, Rowse AL, Thome AD, Li X, Mangieri LR, Cron RQ, Shacka JJ, Raman C, Standaert DG. 2013. MHCII is required for  $\alpha$ -synuclein-induced activation of microglia, CD4 T cell proliferation, and dopaminergic neurodegeneration. *J. Neurosci.* 33: 9592–600.

Hashimoto M, Rockenstein E, Crews L. 2003. Role of Protein Aggregation in Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *NeuroMolecular Med.* 4: 21–34.

Hawkes CH, Del K, Braak H. 2010. Parkinsonism and Related Disorders A timeline for Parkinson's disease. *Park. Relat. Disord.* 16: 79–84.

Hawkes CH, Tredici K, Del K, Braak H. 2007. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 33: 599–614.

Hellstrand E, Nowacka A, Topgaard D, Linse S, Sparr E. 2013. Membrane lipid co-aggregation with  $\alpha$ -synuclein fibrils. *PLoS One* 8: e77235.

Hershko A, Ciechanover A. 1998. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 425–79.

Hirata Y, Nagatsu T. 2005. Rotenone and CCCP inhibit tyrosine hydroxylation in rat striatal tissue slices. *Toxicology* 216: 9–14.

Jakes R, Spillantini MG, Goedert M. 1994. Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS* 345: 27–32.

Jang A, Lee H, Suk J, Jung J, Kim K, Lee J. 2010. Non-classical exocytosis of  $\alpha$ -synuclein is sensitive to folding states and promoted under stress conditions. *J. Neurochem.* 5: 1263–74

Kaiser P, Huang L. 2005. Global approaches to understanding ubiquitination. *Genome Biol.* 6: 233.

Kalia L V, Kalia SK, Chau H, Lozano AM, Hyman BT, McLean PJ. 2011. Ubiquitylation of  $\alpha$ -synuclein by carboxyl terminus Hsp70-interacting protein (CHIP) is regulated by Bcl-2-associated athanogene 5 (BAG5). *PLoS One* 6: e14695.

Karpinar DP, Babu M, Baliya G, Ku S, Opazo F, Rezaei-ghaleh N, Wender N, Kim H, Heise H, Kumar A, Fichtner L, Voigt A, et al. 2009. Pre-fibrillar  $\alpha$ -synuclein variants with impaired  $\beta$ -structure increase neurotoxicity in Parkinson's disease models. *EMBO J.* 28: 3256–3268.

Kiebertz K, Wunderle KB. 2013. Parkinson's Disease: Evidence for Environmental Risk Factors Evidence of an Association With PD That Falls Short of Causal Inference Risk

Factors With Sufficient Evidence to Suggest a Causal Relationship to PD. *Mov. Disord.* 28: 8–13.

Klintworth. 2009. Rotenone and paraquat do not directly activate microglia or induce inflammatory cytokine release *Neurosci. Lett.* 462: 1–5.

Klucken J, Shin Y, Masliah E, Hyman BT, McLean PJ. 2004. Hsp70 Reduces alpha-Synuclein Aggregation and Toxicity. *J. Biol. Chem.* 279: 25497–502.

Kontopoulos E, Parvin JD, Feany MB. 2006a. Alpha-synuclein acts in the nucleus to inhibit histone acetylation and promote neurotoxicity. *Hum. Mol. Genet.* 15: 3012–23.

Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Freeman TB, Olanow CW. 2008. Lewy body – like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson ' s disease. *Nat. Med.* 1–3.

Kreutzberg GW. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19: 312–8.

Lansbury PT, Lashuel HA. 2006. A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic. *October* 443: 774–779.

Lau LML De, Breteler MMB. 2006. Epidemiology of Parkinson ' s disease. *Rev. Lit. Arts Am.* 5: 525–535.

Le W, Sayana P, Jankovic J. 2013. Animal Models of Parkinson's Disease: A Gateway to Therapeutics? *Neurotherapeutics* 92–110.

Lee CS, Park SY, Ko HH, Song JH, Shin YK, Han ES. 2005a. Inhibition of MPP<sup>+</sup>-induced mitochondrial damage and cell death by trifluoperazine and W-7 in PC12 cells. *Neurochem. Int.* 46: 169–78.

Lee H, Khoshaghideh F, Patel S, Lee S. 2004. Clearance of  $\alpha$ -Synuclein Oligomeric Intermediates via the Lysosomal Degradation Pathway. *Neuron* 24: 1888 –1896.

Lee H, Lee S. 2002. Characterization of Cytoplasmic  $\alpha$  -Synuclein Aggregates. *Biochemistry* 277: 48976 –48983.

Lee H, Patel S, Lee S. 2005b. Intravesicular Localization and Exocytosis of  $\alpha$ -Synuclein and its Aggregates. *Neurobiol. Dis.* 25: 6016 – 6024.

Lee H-J, Shin SY, Choi C, Lee YH, Lee S-J. 2002b. Formation and removal of alpha-synuclein aggregates in cells exposed to mitochondrial inhibitors. *J. Biol. Chem.* 277: 5411–7.

Lee H-J, Suk J-E, Bae E-J, Lee J-H, Paik SR, Lee S-J. 2008a. Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular alpha-synuclein. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40: 1835–49.

Lee H-J, Suk J-E, Bae E-J, Lee S-J. 2008b. Clearance and deposition of extracellular alpha-synuclein aggregates in microglia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372: 423–8.

Lee YJ, Choi B, Lee EH, Choi KS, Sohn S. 2006. Immobilization stress induces cell death through production of reactive oxygen species in the mouse cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* 392: 27–31.

Li J, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ, Lashley T, Quinn NP, Rehn Crona S, Bjo A. 2008. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson ' s disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat. med.* 7–9.

Liebert MA, Neurotoxicity D, Wu X, Block ML, Zhang WEI, Qin L, Wilson B, Zhang W, Veronesi B, Hong J. 2005. The Role of Microglia in Paraquat-Induced Dopaminergic Neurotoxicity. *Antioxid. Redox Signal.* 7: 654–661.

Lim GGY, Zhang C. 2013. Role of Autophagy in Parkinson ' s Disease. *Autophagy-A double Edged Sword-Cell survival or Death*, p Chapter 17.

Lindersson E, Beedholm R, Højrup P, Moos T, Gai W, Hendil KB, Jensen PH. 2004. Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers. *J. Biol. Chem.* 279: 12924–34.

Luk KC, Lee VM. 2014. Modeling Lewy Pathology Propagation in Parkinson's Disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 20: 1–7.

Ma K-L, Song L-K, Yuan Y-H, Zhang Y, Han N, Gao K, Chen N-H. 2013. The nuclear accumulation of alpha-synuclein is mediated by importin alpha and promotes neurotoxicity by accelerating the cell cycle. *Neuropharmacology* 1–11.

Mak SK, McCormack AL, Langston JW, Kordower JH, Di DA. 2009. Decreased  $\alpha$ -synuclein expression in the aging mouse substantia nigra. *Exp. Neurol.* 220: 359–365.

Manning-bog AB, McCormack AL, Li J, Uversky VN, Fink AL, Monte DA Di. 2002. The Herbicide Paraquat Causes Up-regulation and Aggregation of  $\alpha$ -Synuclein in Mice. *J.Biol. Chem.* 277: 1641–1644.

Maroteaux L. 1988. Synuclein : A Neuron-Specific Presynaptic Nerve Terminal Protein Localized to the Nucleus and Presynaptic Nerve Terminal. *J.Neurosci.* 8: 2804–2815.

Masliah E, Iwai A, Mallory M, Uda K, Saitoh T. 1996. Altered Presynaptic Protein NACP Is Associated with Plaque Formation and Neurodegeneration in Alzheimer ' s Disease. *AJP* 148: 201–210.

Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann DM a, Hasegawa M. 2013. Prion-like spreading of pathological  $\alpha$ -synuclein in brain. *Brain* 136: 1128–38.

McLean PJ. 2000. Membrane Association and Protein Conformation of alpha -Synuclein in Intact Neurons. *EFFECT OF PARKINSON'S DISEASE-LINKED MUTATIONS.* *J. Biol. Chem.* 275: 8812–8816.

Mcnaught KSP, Olanow CW. 2003. Proteolytic Stress : A Unifying Concept for the Etiopathogenesis of Parkinson ' s Disease. *Ann Neurol* 53: 73–86.

Miller RL, James-Kracke M, Sun GY, Sun AY. 2009. Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease. *Neurochem. Res.* 34: 55–65.

Minagar A, Shapshak P, Fujimura R, Ownby R, Heyes M, Eisdorfer C. 2002. The role of macrophage / microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders : HIV-associated dementia , Alzheimer disease , and multiple sclerosis. *JNS* 202: 13–23.

Moretto A, Colosio C. 2013. The role of pesticide exposure in the genesis of Parkinson ' s

- disease : Epidemiological studies and experimental data. *Toxicology* 307: 24–34.
- Mukaetova-ladinska EB, McKeith IG. 2006. Pathophysiology of synuclein aggregation in Lewy body disease. *Mech Ageing Dev* 127: 188–202.
- Murphy DD, Rueter SM, Trojanowski JQ, Lee VM. 2000. Synucleins Are Developmentally Expressed , and  $\alpha$ -Synuclein Regulates the Size of the Presynaptic Vesicular Pool in Primary Hippocampal Neurons. *JNS* 20: 3214–3220.
- Murray IVJ, Giasson BI, Quinn SM, Koppaka V, Axelsen PH, Ischiropoulos H, Trojanowski JQ, Lee VM-Y. 2003. Role of alpha-synuclein carboxy-terminus on fibril formation in vitro. *Biochemistry* 42: 8530–40.
- Musgrove REJ, King a E, Dickson TC. 2011. Neuroprotective upregulation of endogenous  $\alpha$ -synuclein precedes ubiquitination in cultured dopaminergic neurons. *Neurotox. Res.* 19: 592–602.
- Nden MI, Itamura YK, Be MA, Amaki AT, Akata KT. 2011. Parkinsonian Rotenone Mouse Model : Reevaluation of Long-Term Administration of Rotenone in C57BL / 6 Mice. *Biol. Pharm. Bull.* 34: 92–96.
- Obeso J a, Marin C, Rodriguez-Oroz C, Blesa J, Benitez-Temiño B, Mena-Segovia J, Rodríguez M, Olanow CW. 2008. The basal ganglia in Parkinson's disease: current concepts and unexplained observations. *Ann. Neurol.* 64 Suppl 2: S30–46.
- Okada K, Wangpoengtrakul C, Osawa T, Toyokuni S, Tanaka K, Uchida K. 1999. 4-Hydroxy-2-nonenal-mediated Impairment of Intracellular Proteolysis during Oxidative Stress. *JBC* 34: 23787-23793
- Okochi M, Walter J, Nakajo S, Baba M, Iwatsubo T, Meijer L, Philipp J, Haass C, Koyama A, Kahle PJ. 2000. CELL BIOLOGY AND METABOLISM : Constitutive Phosphorylation of the Parkinson ' s Disease Associated  $\alpha$  Constitutive Phosphorylation of the Parkinson ' s Disease Associated  $\alpha$ -Synuclein \*. *J. Biol. Chem.* 275: 390–397.
- Olanow CW. 2007. The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease--2007. *Mov. Disord.* 22 Suppl 1: S335–42.
- Olanow CW, Schapira AH V. 2013. Therapeutic prospects for Parkinson disease. *Ann. Neurol.* 74: 337–47.
- Olanow CW, Tatton WG. 1999. ETIOLOGY AND PATHOGENESIS OF PARKINSON ' S DISEASE. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 123–144.
- Osterova 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. *JNS* 19: 5782–5791.
- Pan T, Kondo S, Le W, Jankovic J. 2008. The role of autophagy-lysosome pathway in neurodegeneration associated with Parkinson ' s disease. *Brain* 131: 1969–1978.
- Pan-Montojo F, Schwarz M, Winkler C, Arnhold M, O'Sullivan G a, Pal A, Said J, Marsico G, Verbavatz J-M, Rodrigo-Angulo M, Gille G, Funk RHW, et al. 2012. Environmental toxins trigger PD-like progression via increased alpha-synuclein release from enteric neurons in mice. *Sci. Rep.* 2: 898.
- Park J-Y, Paik SR, Jou I, Park SM. 2008. Microglial phagocytosis is enhanced by monomeric

- alpha-synuclein, not aggregated alpha-synuclein: implications for Parkinson's disease. *Glia* 56: 1215–23.
- Parkinson J. 2002. An essay on the shaking palsy. 1817. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 14: 223–36
- Paxinou E, Chen Q, Weisse M, Giasson BI, Norris EH, Rueter SM, Trojanowski JQ, Lee VM, Ischiropoulos H. 2001. Induction of alpha-synuclein aggregation by intracellular nitrative insult. *J. Neurosci.* 21: 8053–61.
- Payton JE, Perrin RJ, Woods WS, George JM. 2004. Structural Determinants of PLD2 Inhibition by a -Synuclein. *J. Mol.Biol.* 337: 1001–1009.
- Pemberton S, Melki R. 2012. The interaction of Hsc70 protein with fibrillar alpha Synuclein and its therapeutic potential in Parkinson disease. *Commun Integr. Biol* 1: 94–95.
- Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmond MJ. 2002. A Role for  $\alpha$ -Synuclein in the Regulation of Dopamine Biosynthesis. *JNS* 22: 3090–3099.
- Petersen K, Olesen OF, Mikkelsen JD. 1999. DEVELOPMENTAL EXPRESSION OF  $\alpha$ -SYNUCLEIN IN RAT HIPPOCAMPUS AND CEREBRAL CORTEX. *Neuroscience* 91: 651–659.
- Phinney AL, Andringa G, Bol JGJM, Wolters EC, Muiswinkel FL van, Dam A-MW van, Drukarch B. 2006. Enhanced sensitivity of dopaminergic neurons to rotenone-induced toxicity with aging. *Parkinsonism Relat. Disord.* 12: 228–38.
- Polanski W, Enzensperger C, Reichmann H, Gille G. 2010. The exceptional properties of 9-methyl-beta-carboline: stimulation, protection and regeneration of dopaminergic neurons coupled with anti-inflammatory effects. *J. Neurochem.* 113: 1659–75.
- Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe L, Johnson WG, Ide SE, Di G, Sanges G, Stenroos ES, Pho LT, Schaffer AA, Lazzarini AM, Nussbaum RL, et al. 1996. Mapping of a Gene for Parkinson ' s Disease to Chromosome 4q21-q23. *Science* 274: 3–5.
- Prasad K, Winnik B, Thiruchelvam MJ, Buckley B, Mirochnitchenko O, Richfield EK. 2007. Prolonged Toxicokinetics and Toxicodynamics of Paraquat in Mouse Brain. *EHP* 10: 1448–1453.
- Radad K, Gille G. 2008. Dopaminergic neurons are preferentially sensitive to long-term rotenone toxicity in primary cell culture. *Toxicol. Vitr.* 22: 68–74.
- Ramsden DB, Parsons RB, Ho SL, Waring RH, Hospital E. 2001. The aetiology of idiopathic Parkinson ' s disease. *J Clin Pathol:Mol Pathol* 54 369–380.
- Rao SS, Hofmann LA, Shakil A. 2006. Parkinson's Disease: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physican* 74: 2046-54
- Rappold PM, Cui M, Chesser AS, Tibbett J, Grima JC, Duan L, Sen N, Javitch JA, Tieu K. 2011. Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3. *PNAS.* 51: 20766-20771
- Ren Y, Feng J. 2007. Rotenone selectively kills serotonergic neurons through a microtubule-dependent mechanism. *J. Neurochem.* 103: 303–11.

- Ren Y, Liu W, Jiang H, Jiang Q, Feng J. 2005. Selective Vulnerability of Dopaminergic Neurons to Microtubule Depolymerization. *J. Biol. Chem.* 280: 34105–34112.
- Rideout H, Stefanis L. 2002. Proteasomal Inhibition-Induced Inclusion Formation and Death in Cortical Neurons Require Transcription and Ubiquitination. *Mol. Cell. Neurosci.* 21: 223–238.
- Riederer MGP. 2003. Aktuelle präklinische Befunde zu Anti-Parkinson-Mitteln. *Nervenarzt* 74: 2–6.
- Rochet J, Outeiro TF, Conway K a, Ding TT, Volles MJ, Lashuel H a, Bieganski RM, Lindquist SL, Lansbury PT. 2004. Interactions among  $\alpha$ -synuclein , dopamine , and biomembranes. *J. Mol. Neurosci.* 23: 23–33.
- Rodriguez M, Rodriguez-Sabate C, Morales I, Sanchez A, Sabate M. 2015. Parkinson's disease as a result of aging. *Aging Cell* 14: 293–308.
- Rojanathammanee L, Murphy EJ, Combs CK. 2011. Expression of mutant alpha-synuclein modulates microglial phenotype in vitro. *J. Neuroinflammation* 8: 44.
- Samii A, Nutt JG, Ransom BR. 2004. Parkinson's disease. *Lancet* 363: 1783–93.
- Sanchez-Guajardo V, Barnum CJ, Tansey MG, Romero-Ramos M. 2013. Neuroimmunological processes in Parkinson's disease and their relation to  $\alpha$ -synuclein: microglia as the referee between neuronal processes and peripheral immunity. *ASN Neuro* 5: 113–39.
- Schell H, Hasegawa T, Neumann M, Kahle PJ. 2009. Nuclear and neuritic distribution of serine-129 phosphorylated alpha-synuclein in transgenic mice. *Neuroscience* 160: 796–804.
- Schneeberger A, Mandler M, Mattner F, Schmidt W. 2012. Parkinsonism and Related Disorders Vaccination for Parkinson ' s disease. *Park. Realt. Disord.* 18: S11–S13.
- Schuler F, Casida JE. 2001. The insecticide target in the PSST subunit of complex I †. *Pest Manag Sci.* 940: 932–940.
- Seo J, Kim H, Park CH, Choi SH, Cho S, Lee WJ, Suh Y. 2004.  $\alpha$  -Synuclein induces apoptosis by altered expression in human peripheral lymphocytes in Parkinson's disease. *FASEB.* 8: 1–21.
- Shaikh SB, Nicholson LF. 2009. Effects of chronic low dose rotenone treatment on human microglial cells. *Mol. Neurodegener.* 4: 55.
- Shastry BS. 2001. Parkinson disease: etiology, pathogenesis and future of gene therapy. *Neurosci. Res.* 41: 5–12.
- Sherer TB, Betarbet R, Stout AK, Lund S, Baptista M, Panov A V, Cookson MR, Greenamyre JT. 2002. An In Vitro Model of Parkinson ' s Disease : Linking Mitochondrial Impairment to Altered  $\alpha$ -Synuclein Metabolism and Oxidative Damage. *Science.* 22: 7006–7015.
- Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, Miller GW, Yagi T, Matsuno-yagi A, Greenamyre JT. 2003. Mechanism of Toxicity in Rotenone Models of Parkinson ' s Disease. *JNS* 23: 10756 –10764.
- Shults CW. 2006. Lewy bodies. *PNAS* 103: 1661–8.

- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, et al. 2003.  $\alpha$ -Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease. *Science* 302: 841.
- Snyder H, Mensah K, Theisler C, Lee J, Matouschek A, Wolozin B. 2003. Aggregated and Monomeric  $\alpha$ -Synuclein Bind to the S6' Proteasomal Protein and Inhibit Proteasomal Function \*. *Biochemistry* 278: 11753–11759.
- Spillantini MG. 1998.  $\alpha$ -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 6469–6473.
- Stöckl MT, Zijlstra N, Subramaniam V. 2013.  $\alpha$ -Synuclein oligomers: an amyloid pore? Insights into mechanisms of  $\alpha$ -synuclein oligomer-lipid interactions. *Mol. Neurobiol.* 47: 613–21.
- Sun F, Kanthasamy A, Anantharam V, Kanthasamy AG. 2007. Environmental neurotoxic chemicals-induced ubiquitin proteasome system dysfunction in the pathogenesis and progression of Parkinson's disease. *Pharmacol. Ther.* 114: 327–44.
- Tanaka Y, Engelender S, Igarashi S, Rao RK, Wanner T, Tanzi RE, Sawada, L Dawson V, Dawson TM, Ross CA. 2001. Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. *Hum. Mol. Genet.* 10: 919–26.
- Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, Marras C, Bhudhikanok GS, Kasten M, Chade AR, Comyns K, Richards MB, et al. 2011. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ. Health Perspect.* 119: 866–72.
- Thomas B, Beal MF. 2007. Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 16: R183–94.
- Tofaris GK, Spillantini MG. 2005. Alpha-synuclein dysfunction in Lewy body diseases. *Mov. Disord.* 12: S37–44.
- Trojanowski JQ. 2000. "Fatal Attractions" of Proteins Underlying Alzheimer's Disease and Other. *Ann NY Acad. Sci.* 924: 62–67.
- Ueda K, Masliah E, Xia YU, Iwai A, Yoshimoto M, Otero DAC, Kondo JUN. 1993. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *90: 11282–11286.*
- Volles MJ, Lansbury PT. 2002. Vesicle Permeabilization by Protofibrillar R-Synuclein Is Sensitive to Parkinson's Disease-Linked Mutations and Occurs by a Pore-like Mechanism. *Society* 12: 4595–4602.
- Volles MJ, Lee S, Rochet J, Shtilerman MD, Ding TT, Kessler JC, Lansbury PT. 2001. Vesicle Permeabilization by Protofibrillar R-Synuclein: Implications for the Pathogenesis and Treatment of Parkinson's Disease. *Biochemistry* 40: 7812–7819.
- 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* 5: 494–506.
- Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC. 2003. Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J. Biol. Chem.* 278: 25009–13.

Weng Y, Yen T, Chen M, Kao P, Tzen K, Chen R, Wey S, Lu C. 2004. Sensitivity and Specificity of 99m Tc-TRODAT-1 SPECT Imaging in Differentiating Patients with Idiopathic Parkinson ' s Disease from Healthy Subjects. J. Nucl. Med. 45: 393–401.

Wersinger C, Prou D, Vernier P, Sidhu A. 2003. Modulation of dopamine transporter function by alpha-synuclein is altered by impairment of cell adhesion and by induction of oxidative stress. FASEB J. 17: 2151–3.

Witt SN. 2014. Molecular chaperones, alpha-synuclein and neurodegeneration. Mol Neurobiol. 47: 552–560.

Zeevalk GD, Bernard LP. 2005. Forum Original Research Communication. Antioxid. Redox Signal. 7: 662–672.

Zhang W, Wang T, Pei Z, Miller DS, Wu X, Block ML, Wilson B, Zhang W, Zhou Y, Hong J, Zhang J. 2005. Aggregated  $\alpha$ -synuclein activates microglia : a process leading to disease progression in Parkinson ' s disease. FASEB 19: 533–542.

Zhou Y, Wang Y, Kovacs M, Jin J, Zhang J. 2005. Microglial activation induced by neurodegeneration: a proteomic analysis. Mol. Cell. Proteomics 4: 1471–9.

## Internet

NIH U.S. National Library of Medicine, Substantia Nigra and Parkinson disease, A.D.A.M., Inc. [Aufruf an 09.03.2017] <https://medlineplus.gov/ency/imagepages/19515.htm>

Wikipedia the free Encyclopedia, File: DA-loops in PD. Jpg [Aufruf 09.03.2017] [https://eu.wikipedia.org/wiki/File:DA-loops\\_in\\_PD.jpg](https://eu.wikipedia.org/wiki/File:DA-loops_in_PD.jpg)

Parkinson's Disease Foundation, Inc, Understanding Parkinson's, What is Parkinson's Disease? [Aufruf am 09.03.2017] [www.pdf.org/eu/clinicaltrials](http://www.pdf.org/eu/clinicaltrials)

Affiris, Boast Vaccination Data Encourage Continued Development of Affiris Therapeutic Parkinson's Disease Vaccine against Alpha-Synuclein [Aufruf 09.03.2017] [www.affiris.com/mb/wp-content/uploads/2016/09/Pressemeldung-07092016.pdf](http://www.affiris.com/mb/wp-content/uploads/2016/09/Pressemeldung-07092016.pdf)

Bundesinstitut für Risikobewertung Chemikaliensicherheit, Rotenon, Stellungnahme: Assoziation zwischen Parkinson-Krankheit und Rotenon(06.12.2012) [Aufruf 09.03.2017] [www.bfr.bund.de/cm/343/assoziation\\_zwischen\\_der\\_parkinson\\_krankheit\\_und\\_rotenon.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/343/assoziation_zwischen_der_parkinson_krankheit_und_rotenon.pdf)

## Danksagung

Nach vielen Jahren intensiver Arbeit ist es nun geschafft: meine Dissertation.

Zu besonderem Dank bin ich Frau PD Dr.rer.nat.et rer.medic.habil. Gabriele Gille verpflichtet. Ich danke Ihnen für die vertrauensvolle Annahme als Doktorandin, für die Möglichkeit diese Dissertation erstellen zu können und dafür, dass Sie mir, bis zu Ihrem viel zu frühen Tod, in allen Bereichen bei der Durchführung dieser wissenschaftlichen Arbeit zur Seite stand.

Meinen Dank möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. Heinz Reichmann aussprechen, der mir die Durchführung der Experimente in den Laborräumen der Neurologie ermöglichte.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr.rer. med. Andreas Hermann und Herrn Prof. Dr.rer.nat Elmar Kirches aus Magdeburg für die Übernahme der Begutachtung der Dissertation.

Ganz besonders danke ich dem Laborteam der Neurologischen Forschung Dresden, vor allem Anett Böhme, die mir immer unterstützend zur Seite gestanden hat.

Nicht zuletzt möchte ich ganz besonders der Roland-Ernst-Stiftung für die finanzielle Förderung der Arbeit danken.

Bedanken möchte ich mich bei meinem Mario und meiner Jette für die Geduld, meinen Eltern und Schwiegereltern, meiner Cousine Anett für das unermüdliche Korrekturlesen, meinen Freunden und der ganzen Familie für die liebevolle Unterstützung.

**Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus**

**Promotionsordnung vom 24. Juli 2011**

**Erklärungen zur Eröffnung des Promotionsverfahrens**

1. Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

2. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:  
Frau PD Dr. rer. nat. et rer. medic. habil. Gabriele Gille  
Herr Prof. Dr. med. Dr.rer. med. Andreas Hermann

3. Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

4. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

5. Die Inhalte dieser Dissertation wurden in folgender Form veröffentlicht: /

6. Ich bestätige, dass es keine zurückliegenden erfolglosen Promotionsverfahren gab.

7. Ich bestätige, dass ich die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden anerkenne.

8. Ich habe die Zitierrichtlinien für Dissertationen an der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden zur Kenntnis genommen und befolgt.

Dresden,

.....

Sandra Oster

**Hiermit bestätige ich die Einhaltung der folgenden aktuellen gesetzlichen Vorgaben im Rahmen meiner Dissertation**

- das zustimmende Votum der Ethikkommission bei Klinischen Studien, epidemiologischen Untersuchungen mit Personenbezug oder Sachverhalten, die das Medizinproduktegesetz betreffen  
Aktenzeichen der zuständigen Ethikkommission
- die Einhaltung der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes  
Aktenzeichen der Genehmigungsbehörde zum Vorhaben/zur Mitwirkung  
24-9168.24-1/2011-18
- die Einhaltung des Gentechnikgesetzes  
Projektnummer
- die Einhaltung von Datenschutzbestimmungen der Medizinischen Fakultät und des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus.

Dresden,

.....

Sandra Oster