

**Untersuchung des Expressionsmusters und der
Neuropathologie konditionaler
Mausmodelle des Morbus Parkinson**

**der Fakultät für Biologie
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN**

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

von
Silke Nuber
aus Krumbach (Schwaben)

**vorgelegte
D i s s e r t a t i o n
2008**

Tag der mündlichen Prüfung: 30. 11. 2007

Dekan: Prof. Dr. H. A. Mallot

1. Berichterstatter: Prof. Dr. O. Rieß

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Schwarz

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Abkürzungsverzeichnis	V
1	Einleitung	1
1.1	Historie, Klinik und Neurochemie	1
1.2	Ätiologie des idiopathischen Parkinson Syndroms (IPS)	3
1.2. 1	Genetische Faktoren und transgene Modelle der Parkinson-Krankheit	3
1.2.1.1	Autosomal-Dominantes Vererbungsmuster	5
1.2.1.1.1	PARK 1: α -Synuclein	5
1.2.1.1.2	PARK 5: UCH-L1	9
1.2.1.2 .3	PARK 8: LRRK2	11
1.2.1.2	Autosomal-Rezessives Vererbungsmuster	12
1.2.1.2.1	PARK 2: Parkin	12
1.2.1.2.2	PARK 6: PINK 1	14
1.2.1.2.3	PARK 7: DJ-1	15
1.2.2	Alterungsprozesse	16
1.2.3	Mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress (Mitochondrial Disease)	16
1.2.4	Proteinfehlfaltung und Aggregation (Conformational Disease)	18
1.2.5	Exogene Toxine und Neurotoxin-Modelle der Parkinson-Krankheit	18
1.2.5.1	MPTP	19
1.2.5.2	Paraquat	19
1.2.5.3	Rotenon	20
1.2.5.3.1	6-OHDA	20
1.2.6	dopaminerge Neurotoxine im Tiermodell	20
1.3	Diagnostik und Therapie	22
1.3.1	Diagnostik	22
1.3.2	Therapie	23
1.4	Problemstellung	24
2	Material und Methoden	26
2.1	Transgene Mäuse	26
2.2	Humane Gewebeproben	26
2.3	Oligonukleotide	26
2.4	Enzyme und Kits	26
2.5	Größenstandards	27
2.6	Membranen und Papier	27
2.7	Antikörper	27
2.8	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	28
2.9	Geräte und Chemikalien	29

2.10	Methoden im Zusammenhang mit der Arbeit und Phänotypisierung der Maus-Modelle	31
2.10.1	Haltung und Versorgung	31
2.10.2	Aufzucht und Vermehrung	31
2.10.3	Biopsie und Euthanasie	31
2.10.4	Behandlung mit Doxyzyklin	31
2.10.5	Phänotypische Charakterisierung	31
2.10.5.1	Modifizierter SHIRPA	31
2.10.5.2	Accelerod: Motorisches Lernen und Motorische Leistung	32
2.10.5.3	Geruchstests	33
2.10.5.4	Visual Cliff und Radial Maze	33
2.10.5.5	Morris Water Maze	34
2.11	Molekular- und Proteinbiochemische Methoden	34
2.11.1	Isolation von DNA, RNA, Gesamtprotein	35
2.11.1.1	Isolation und Konzentrationsbestimmung von genomischer DNA aus Mausgewebe	35
2.11.1.2	Isolation und Konzentrationsbestimmung von Gesamt-RNA aus Maus-Hirngewebe	35
2.11.1.3	Isolation und Konzentrationsbestimmung von Gesamtprotein aus Gewebe	35
2.11.2	Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR	35
2.11.3	Elektrophorese	35
2.11.3.1	Agarosegelelektrophorese	35
2.11.3.2	SDS-PAGE	36
2.11.4	Immunologische Methoden	36
2.11.4.1	Western Blot Analyse (WBA)	36
2.11.4.2	Dot-Blot	36
2.11.4.3	Immunhistochemie	37
2.11.4.3.1	Paraffinschnitte und DAB-Färbung	37
2.11.4.3.2	Vibratomschnitte und DAB-Färbung	37
2.11.4.3.3	Gefrierschnitte und Doppel-Fluoreszenzfärbung	37
2.11.4.3.4	Pre-embedding Elektronen-Mikroskopie	38
2.12	Licht-und Elektronenmikroskopische Auswertung	38
2.13	Microarray-Analyse	38
2.14	Neurogenese-Analyse	39
2.15	Analyse der mitochondrialen Funktion	39
2.16	HPLC-Analysen des Neurotransmittergehaltes	40
2.17	microPET-Analyse	41
3	Ergebnisse	43
3.1	Expressionsmuster im konditionalen Mausmodell	43

3.2	Neuropathologie	53
3.2.1	EM-Analyse: Hippokampale und nigrale Neuropathologie in CaM_syn Mäusen	53
3.2.2	Analysen auf Aggregatvorkommen mittels WBA und Dot-Blot	56
3.2.3	Integrität des dopaminergen Systems in konditionalen Mäusen	57
3.2.3.1	HPLC-Analysen des Neurotransmittergehaltes	57
3.2.3.2	microPET-Analyse konditionaler CaM_syn Mäuse	63
3.2.4	Mitochondriale Funktionsanalyse	64
3.2.5	Analysen auf Transgen-induzierte kompensatorische Mechanismen	66
3.2.5.1	Microarray-Analyse	66
3.2.5.2	Neurogenese	72
3.2.6.	Verhaltensstudien	74
3.2.6.1	Modifizierter SHIRPA zur Analyse des Basisverhaltens	74
3.2.6.2	TMT-Fuchsgeruch-induziertes Angstverhalten in konditionalen PrP_syn30 und CaM_syn30 Mäusen	76
3.2.6.3	Analyse der Motorik in konditionalen PrP_syn und CaM_syn Mäusen	79
3.2.6.4	Analyse der kognitiven Fähigkeiten	82
3.2.6.4.1	Analysen der motorischen Kognition in konditionalen PrP_syn und CaM_syn Mäusen	82
3.2.6.4.2	Analyse der räumlichen Kognition in CaM_syn Mäusen mittels radialen Acht-Arm-Labyrinths	84
3.2.6.4.2	Analyse der räumlichen Kognition in CaM_syn Mäusen mittels Morris Wasserlabyrinth (Morris-Water-Maze)	86
3.3	Zusammenfassende Darstellung der zeitlichen Abfolge der Analyse konditionaler CaM_syn, PrP_syn, CaM_syn30 und PrP_syn30 Mäuse	87
4	Diskussion	89
4.1	Konditionale Expression des humanen α -Syn in IPS-relevanten Regionen	89
4.2	Neuropathologie, begleitender Phänotyp und Reversibilität in CaM_syn Mäusen	92
4.2.1	Neuropathologie des nigrostriatalen Systems	92
4.2.2	Hippokampale Neuropathologie	95
4.2.3	Neuropathologie im Riechhirn (Bulbus olfactorius)	96
4.2.4	Begleitender Phänotyp	97
4.2.4.1	Beeinträchtigungen im motorischen Lernen und der räumlichen Kognition	97
4.2.4.2	Beeinträchtigungen in der Motorik	99
4.3	Neuropathologie, begleitender Phänotyp und Reversibilität in PrP_syn30 Mäusen	101
4.3.1	Neuropathologie und Einfluss auf extraolfaktorische Hirnbereiche	101
4.3.2	Phänotyp in konditionalen PrP_syn30 Mäusen	103
4.4	Analyse der PrP_syn, CaM_syn30, PrP_syn1 und CaM_syn1 dtg Mäuse	105

4.5	Microarray-Analyse	106
4.6	Ausblick	107
5a	Zusammenfassung	110
5b	Summary	113
6	Literatur	115
7	Anhang	143
7.1	Tagungsbeiträge und Auszeichnungen (Poster Communications)	143
7.2	Curriculum vitae	145
7.3	Danksagung	146
7.4	Erklärung	147

II

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A30P	Alanin an Position 30 durch Prolin ersetzt
A53T	Alanin an Position 53 durch Threonin ersetzt
AD	Alzheimer disease
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
Ak	Antikörper
AS	Aminosäuren
α -Syn	alpha-Synuclein
ATP	Adenosin-Triphosphat
BAD	bcl-2 associated death protein
bspw.	beispielsweise
CaM, CaMKII α	Calcium/Calmodulin-abhängige-ProteinkinaseII-alpha Promotor
cDNA	copy DNA
cm	Centimeter
CA	Cornu Ammonis-Region des Hippokampus
D1 und D2	Dopamin-Rezeptoren Typ 1 und Typ 2
DA	Dopamin
DAT	Dopamin-Transporter
DLB	Demenz mit Lewy-Körperchen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPAC	Dihydroxyphenylelessigsäure
Dox	Doxyzyklin
dtg	Doppelt-transgen
E46K	Glutamat an Position 46 durch Lysin ersetzt
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ES-Zellen	Embrionale Stammzellen
et al.	<i>et alii</i>
evtl.	eventuell
GABA	γ -Aminobuttersäure
5-HIAA	5-Hydroxyindolessigsäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits Chromatographie
Hsp	Hitze Schock Protein
HVA	Homovanillin-Säure
IHC	Immunhistochemie
IPS	idiopathisches Parkinson-Syndrom
i.c.	intrakutan

i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
KO	Gen-knockout
L-dopa	L-3,4-dihydroxyphenylalanin
kg	Kilogramm
LK	Lewy-Körperchen
LN	Lewy-Neuriten
µm	Mikrometer
MA	Morbus Alzheimer
MAO A	Monoamin-Oxidase A
MAO B	Monoamin-Oxidase B
mg	Milligramm
MH	Morbus Huntington
Mon	Monate
MPP+	1-Methy-4-phenylpyridinium-Ion
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mRNA	messenger Ribonuklein-Säure
MSA	multiple system atrophy
n	Anzahl
n.a.	nicht analysiert
nm	Nano-Meter
NO	Stickstoff-Oxid
o. Abb.	ohne Abbildung
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
Pael-R	Parkin-assoziiertes Endothelin-Rezeptor-ähnlicher Rezeptor
PD	Parkinson's disease (Parkinsonsche Krankheit)
PDGF	human platelet-derived Promotor factor β
PrP	Prion-Protein-Promotor
RM	Rückenmark
ROS	reactive oxygene species (reaktive Sauerstoff Spezies)
s.	siehe
SCA	Spinocerebelläre Ataxie
sek	Sekunde
SN	Substantia nigra
SNpc, SNc	Substantia nigra pars compacta

SNpr, SNr	Substantia nigra pars reticulata
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
TAC	time activity curve
Tet	Tetrazyklin
tg	Transgen
TH	Tyrosin-Hydroxylase
tTA	Tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator
u.a.	unter anderem
UPM	Umdrehungen pro Minute
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
vs.	versus
WBA	Westernblot-Analyse
WT	Wildtyp Mäuse
WT α -syn	nicht mutiertes alpha-Synuclein
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

1.1 Historie, Klinik und Neurochemie

Im Jahre 1817 veröffentlichte James Parkinson in der Schrift „An Essay on the Shaking Palsy“ die Klinik von sechs seiner Patienten. Deren Krankheit begänne mit einem einseitigen Tremor und führe später zu einem vornübergebeugten Gang und generalisierter Verlangsamung, Kleinschrittigkeit mit Fallneigung bis hin zur Bettlägerigkeit und endete mit dem Tod. In deutscher Sprache wurde die Krankheit, die heute als Morbus Parkinson bekannt ist, von Wilhelm von Humboldt in seinen Briefen von 1825 bis 1834 umfassend beschrieben und durch das Bild der Akinese (Bewegungsarmut), des Rigors (gesteigerte Grundspannung) und der Mikrographie (verkleinertes Schriftbild) erweitert. Er bezeichnete seine Beschwerden jedoch als einen beschleunigten, altersabhängigen Prozess ohne pathologische Ursache, weswegen seine Beobachtungen zunächst nicht der Klinik des Morbus Parkinson zugeordnet wurden. Seit den post-mortem Untersuchungen von Tretiakoff aus dem Jahre 1919 an neun Morbus-Parkinson-Gehirnen, wurde bekannt, dass die pathologische Ursache der Parkinson'schen Erkrankung im Untergang pigmentierter Neurone des Lokus niger liegt und ferner, dass in den noch verbleibenden Neuronen zytoplasmatische Einschlüsse auftreten. Diese wurden bereits 1912 von Friedrich Lewy beschrieben und als Hauptcharakteristikum der Parkinson'schen Erkrankung bestätigt (Forno *et al.*, 1990). Von Friedrich Lewy wurden die nach ihm benannten „Lewy Körperchen“ (LK) und „Lewy-Neuriten“ (LN) insbesondere in den Regionen des Nukleus basalis, der Substantia innominata und im dorsalen motorischen Kern des Nervus Vagus und weniger in der Substantia nigra beobachtet (Lewy, 1912). Die ultrastrukturelle Analyse ergab, dass LK des Hirnstammes und des Mittelhirns aus einem dichten, osmiophilen Kern und 7-15 nm dicken Fibrillen bestehen, die sich zirkulär vom Zentrum in die Peripherie erstrecken (Roy und Wolman, 1969). Im Gegensatz dazu erscheinen kortikale LK filamentös aber weniger strukturiert (Kosaka *et al.*, 1978). Lewy-Neuriten dagegen werden als degenerierte, ubiquitin-positive Neuriten definiert (Lang und Lozano, 1998a). Die bereits von James Parkinson beobachtete Progression der Klinik wurde anhand des Schweregrades von Höhn und Yahr (1967) in die Stadien I-V unterteilt:

Tabelle 1

Darstellung der klinischen Stadien-Einteilung nach Höhn und Yahr (1967)

Stadium	Klinik
Stadium I	Einseitiger Befall
Stadium II	Beidseitiger Befall
Stadium III	Zusätzlich posturale Instabilität
Stadium IV	Patient benötigt Hilfe bei Verrichtungen des täglichen Lebens
Stadium V	Pflegebedürftig, häufig Rollstuhl-abhängig

Heute wird der Morbus Parkinson als idiopathisches Parkinson-Syndrom (IPS) bezeichnet, welches man von den atypischen (idiopathisches Parkinson-Plus-Syndrom) und den symptomatischen (sekundären) Parkinson-Syndrom unterscheidet. Die Kardinalsymptome des IPS sind akinetisch-rigide Bewegungsstörungen, ein fakultativer Tremor sowie reduzierte Stellreflexe. Die Klinik basiert dabei weitgehend auf dem Zelltod neuromelaninhaltiger Neurone der Substantia nigra pars compacta. Der Ausfall der nigrostriatalen Projektionen und der einhergehende Dopamin (DA)-Mangel führen nachfolgend zu einer Enthemmung der GABAergen striatalen Efferenzen, wodurch es zu den Kardinalsymptomen (Bradykinese, Rigor, Tremor, posturale Instabilität) kommt.

Seit den Arbeiten von Braak und Mitarbeitern (2003) wurde widerlegt, dass die Substantia nigra pars compacta die einzige betroffene Hirnregion des IPS ist und gleichzeitig gezeigt, dass symptomatische Morbus-Parkinson-Patienten mit milder Klinik den Startpunkt und solche mit höchstem Schweregrad den Terminus des Erkrankungsspektrums darstellen; die post-mortem Analyse ergab, dass die Läsionen (LK, LN) vom Hirnstamm aus aufsteigen und sich über das Mittel- und Vorderhirn ausbreiten (Braak *et al.*, 2003). Ob die beobachteten Läsionen nachgehend zum Untergang der Neuronen führten, ist nicht bekannt.

Tabelle 2

Durch Klinik erweiterte Darstellung der neuropathologischen Stadien-Einteilung nach Braak (2003)

Stadium	Neuropathologie: Auftreten der Läsionen	Klinik
I	Medulla oblongata und Bulbus olfactorius (dorsaler motorischer Nukleus der Nervus Vagus und anteriorer Nukleus olfactorius)	Präsymptomatisch
II	Stadium I + Teile des kaudalen Raphe-Kerns, magnozellularen Subnukleus der retikulären Formation und des Locus coeruleus/subcoeruleus	Anosmie, REM-Schlafstörung, Depression (Fahn, 2003)
III	Stadium II + Nachweis von LK Substantia nigra pars compacta	
IV	Stadium III + Magnozelluläre Nuklei des basalen Vorderhirns, temporalen Mesokortex, zweiter Sektor des allokortikalen Ammonhorns	Autonome, somatomotorische und limbische Dysfunktion
V	Stadium IV + höher geordnete sensorische Assoziationsfelder des Neokortex / präfrontalen Neokortex	
VI	Stadium V + sensorische Assoziationsgebiete des Neokortex und prämotorische Region sowie primär sensorische und motorische Felder des Neokortex	

Das Auftreten der LK in extranigralen Bereichen, wie dem limbischen System (u.a. Amygdala, Hippokampus, Hypothalamus) und in den Kerngebieten, zuständig für die Regulation vegetativer Funktionen (u.a. Nucleus vagus, Nucleus ambiguus, Locus coeruleus, Hypophyse), sowie des Gastrointestinaltraktes und des Urogenitalsystems (Braak *et al.*, 1995; Braak *et al.*, 2003; Braak *et al.*, 2006) steht im Einklang mit der heutigen Ansicht, dass das IPS keine alleinige

Bewegungserkrankung ist, und es ist bekannt, dass der Kardinalsymptomatik typischerweise Obstipation, Seborrhö, Anosmie, Schlafstörungen und / oder Depressionen vorangehen können (Fahn, 2003). Ebenso findet man im Gehirn von IPS-Patienten einen regional unterschiedlichen Neurotransmitter-Gehalt, der für die kognitiven und vegetativen Symptome ursächlich ist.

Kennzeichnend für das Parkinson-Syndrom ist der striatale DA-Mangel, der als solches nicht in anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie dem Morbus Huntington (Reynolds und Garrett, 1986) und dem Morbus Alzheimer (Langlais *et al.*, 1993), nachgewiesen werden konnte. Ebenso sind auch die DA-Metabolite 3,4 –Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC) und Homovanillinsäure (HVA) sowie die Aktivität der DA-synthetisierenden Enzyme Tyrosin-Hydroxylase (TH) und DOPA-Decarboxylase reduziert (Abb. 1), was insgesamt auf einen Untergang der dopaminergen Neurone hinweist.

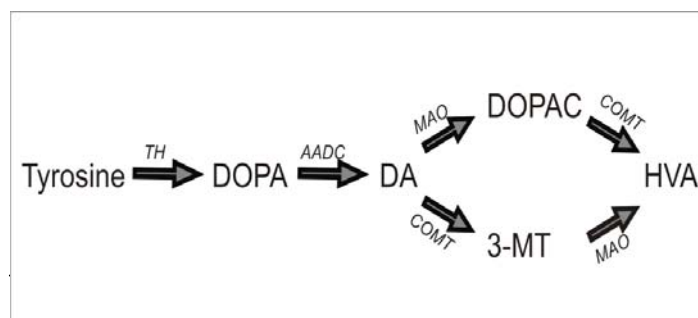


Abb. 1 Metabolismus des Neurotransmitters Dopamin
 AADC, aromatische Aminosäuren-Decarboxylase; COMT, Catechol-O-Methyltransferase; DA, Dopamin; DOPA, Dihydroxyphenylalanin; DOPAC, Dihydroxyphenylelessigsäure; HVA, Homovanillinsäure; MAO, Monoaminoxidase-B; 3-MT, 3-Methoxytyramin; TH, Tyrosin-Hydroxylase

Neben der vorwiegenden Degeneration dopaminergener Neuronen, degenerieren ebenso noradrenerge Neurone des Locus coeruleus (Jellinger *et al.*, 1991), wodurch es zum Mangel an Noradrenalin und dem Hauptmetaboliten 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG) kommt. Ebenso degenerieren serotonerge Neurone der Raphe-Kerne, wodurch es zur Reduktion des Neurotransmitters 5-HT und seinem Hauptmetaboliten 5-Hydroxyindolessigsäure kommt (5-HIAA; Birkmayer *et al.*, 1974). Die Reduktion von Noradrenalin und Metaboliten korreliert dabei mit dem Auftreten einer Demenz und die der serotonergen Neurotransmission mit dem Auftreten einer Depression (Jellinger *et al.*, 1991).

1.2 Ätiologie des idiopathischen Parkinson Syndroms (IPS)

1.2.1 Genetische Faktoren und transgene Modelle der Parkinson-Krankheit

Man nimmt an, dass maximal 5% aller Patienten mit IPS einen monogenen Erbgang vorweisen (Bossy-Wetzel *et al.*, 2004). Seit 1997 konnten 13 Genloci identifiziert werden, dessen Genprodukt in neun der Fälle bekannt ist (Tabelle 3). Der familiäre Morbus Parkinson zeigt im Bezug zu den sporadischen Fällen oftmals atypische Merkmale, wie frühes Erkrankungsalter, Dystonien, früh-aufretende Demenz und fehlende Aggregat-Ablagerungen in histologischen Präparaten. Deshalb ist nicht auszuschließen, dass die monogen-determinierten Formen einer separaten Pathogenese unterliegen.

Tabelle 3
Genetisch definierte Genloci des familiären Morbus Parkinson

Gen	Chromosom	Vererbung	Protein/Synonym	Proteinfunktion/Vorkommen	LK	Referenz
PARK 1	4q21	AD	α -Synuclein	Unbekannt/ LK-Komponente	ja	Polymeropoulos <i>et al.</i> , 1997
PARK 4	4p16	AD	α -Synuclein-Triplikation Duplikation	Unbekannt/ LK-Komponente	ja	Singleton <i>et al.</i> , 2003
PARK 2	6q25.2-27	AR	Parkin	Ubiquitin-Ligase	nein*	Kitada <i>et al.</i> , 1998
PARK 5	4p14	AD	UCHL-1	Ubiquitin-Ligase/Hydrolase	?	Leroy <i>et al.</i> , 1998
PARK 6	1p35-36	AR	PTEN-induced Kinase / Pink1	Mitochondrien-Kinase	?	Valente <i>et al.</i> , 2004a
PARK 7	1p36	AR	DJ-1	Chaperon ? Mitochondrien-Kinase?	?	Bonifati <i>et al.</i> , 2002
PARK 8	12p11.2-q13.1	AD	Dardarin / LRRK2	Unbekannt	nein	Zimprich <i>et al.</i> , 2004; Paisan-Ruiz <i>et al.</i> , 2004
PARK 3	2p13	AD	?	?	ja	Gasser <i>et al.</i> , 2001
PARK 9	1p36	AR	?	?	?	Hampshire <i>et al.</i> , 2001
PARK 10	1p32	?	?	?	?	Hicks <i>et al.</i> , 2002
PARK 11	2q36-37	?	?	?	?	Pankratz <i>et al.</i> , 2003
PARK 12	Xq21-q25	?	?	?	?	Pankratz <i>et al.</i> , 2003
PARK 13	2p12	?	Omi/HtrA2	?	?	Strauss <i>et al.</i> , 2005

AD, Autosomal-Dominant; AR, Autosomal-Rezessiv, LK, Lewy-Körperchen; * typischerweise ohne LK beschrieben, jedoch wurden Ausnahmen mit LK-Pathologie gefunden (von Coelln *et al.*, 2004a; Pramstaller *et al.*, 2005)

Da diese familiären Formen des IPS z.T. auf bekannten Genen basieren (Tabelle 3), ist es möglich deren Funktion im Tiermodell zu untersuchen. Dabei dienen als allgemeine Strategie zur Analyse eines humanen Krankheitsgens im Tiermodell der konventionelle Knockout (KO) bzw. die permanente Überexpression des humanen Krankheitsgens. Der permanente KO bzw. Überexpression von Transgenen limitiert jedoch die Modelle im Hinblick auf die Kontrolle der Gewebespezifität und der zeitspezifischen Steuerung der Expression in der Entwicklung des Tieres. Deshalb wurden darüber hinaus induzierbare bzw. konditionale Modelle (konditionaler KO und konditionale Überexpression) entwickelt (Übersichtsartikel: Gossen und Bujard, 2002; Matsuda und Aiba, 2004). Konditionale Modelle gehören den binären Systemen an, die in zwei Klassen unterteilt werden können (Übersichtsartikel Lewandoski *et al.*, 2001). In der einen agiert eine Liganden-regulierte Rekombinase, die dann das gewünschte Gen neu arrangiert und dadurch aktiviert bzw. inaktiviert. Im Cre/loxP-System bspw. ist die Liganden-Bindedomäne des Progesteron- oder dem Östrogen-Rezeptor mit der Cre-Rekombinase fusioniert und die Gabe von synthetischen Steroiden führt dann zur Aktivierung der Rekombinase und zur Cre-loxP-vermittelten Rekombination und damit zum induzierbaren KO.

Eine reversible Kontrolle der Genexpression wurde durch das Tetrazyklin-kontrollierte Genexpressions-System erreicht (tet-System; Gossen und Bujard 1992). In diesem System transaktiviert ein Tetrazyklin-kontrollierter Effektor, tTA, die Transkription des Transgens. Die Expression von tTA wird von einem gewebespezifischen Promotor gesteuert. tTA bindet mit

hoher Affinität an sowohl Tetrazyklin als auch an eine tet-Operatorsequenz, welche stromaufwärts eines Minimalpromotors lokalisiert ist (TRE: „tet-responsive element“). Letzterer kontrolliert die Expression des gewünschten Transgens. In doppelt-transgenen (dtg) Mäusen, die sowohl für tTA als auch TRE transgen sind, kann die Expression des Transgens durch Tetrazyklin bzw. dessen Derivate, wie bspw. Doxyzyklin (Dox) reprimiert werden (s.a. Abb. 4A; S.45). Zusätzlich zum tTA System gibt es auch das so genannte „reverse tTA System“, das dann so konzeptioniert wurde, dass das mutierte tTA für seine Aktivierung Doxyzyklin benötigt (Gossen *et al.*, 1995) und entsprechend die Transkription des Transgens erst dann stattfindet, wenn Doxyzyklin zugegeben wird.

1.2.1.1 Autosomal-Dominantes Vererbungsmuster

1.2.1.1.1 PARK 1: α -Synuclein

Mutationen, Klinik und Pathologie

PARK 1 wurde von Polymeropoulos 1997 als erster Genlocus des familiären Parkinson-Syndroms identifiziert und darauf folgende Mutations-Analysen des α -Synuclein (α -Syn) Proteins zeigten, dass neben der A53T Mutation noch zwei weitere N-terminale Punktmutationen, A30P (Krüger *et al.*, 1998) und E46K (Zarranz *et al.*, 2004) familiären Parkinson bedingen. Jedoch sind diese Punktmutationen rar. Die in ca. 30 Familien beobachtete A53T-Mutation konnte auf einen initialen Überträger griechisch-italienischen Ursprungs zurückgeführt werden, die A30P- und die E46K-Mutation trat jeweils nur in einer separaten Familie auf. Eine kürzlich durchgeführte Mutationsanalyse von ca. 1900 Parkinson-Patienten bestätigte die Seltenheit dieser Mutationen (Berg *et al.*, 2005). Patienten mit der A30P-Mutation weisen eine Klinik entsprechend der des sporadischen idiopathischen Parkinson-Syndroms (IPS) auf, mit einem Durchschnittserkrankungsalter von ca. 60 Jahren und der Kardinalsymptomatik einschließlich Rigor, Hypokinesie, Ruhetremor und posturaler Instabilität. (Krüger *et al.*, 2001). Dagegen imponiert bei A53T-Mutationsträgern ein früherer Krankheitsbeginn mit rascher Progression und zusätzlicher Demenz (Golbe *et al.*, 1996; Papadimitriou *et al.*, 1999). Die *post-mortem* Untersuchung von A53T-Gehirnen zeigte nigrale Degenerationen mit geringer LK-Pathologie (Duda *et al.*, 2000; Kotzbauer *et al.*, 2004). Betroffene Familienmitglieder der E46K-Mutation zeigten neben Parkinsonismus, atypische Symptome der Demenz mit kortikalen und subkortikalen LK (Zarranz *et al.*, 2004). Kürzlich konnte dargelegt werden, dass auch die Duplikation bzw. Triplikation des Genlocus zum autosomal-dominant vererbten Morbus Parkinson führen (Singleton *et al.*, 2003, Chartier-Harlin *et al.*, 2004), was vermuten lässt, dass neben der strukturellen Abänderung des Proteins durch N-Terminale Mutation auch Gen-Dosis-Effekte in der Pathogenese der Erkrankung beteiligt sind. Diese Annahme wird unterstützt durch den Nachweis, dass Promotor-Polymorphismen im α -Syn Gen ein Risikofaktor für die Erkrankung des

sporadischen IPS sind (Holzmann *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2003) sowie das Erkrankungsalter modifizieren (Hadjigeorgiou *et al.*, 2006).

Hypothesen der α -Syn induzierten Pathogenese

α -Syn gehört neben β -, γ -Syn und Synoretin der Proteinfamilie der Synucleine an, deren gemeinsames Kennzeichen ein saurer Carboxyl-Terminus, ein helikaler N-Terminus und eine hydrophobe zentrale Komponente ist. Im humanen Gehirn wird α -Syn ubiquitär exprimiert. Mori und Mitarbeiter (2002) konnten zeigen, dass α -Syn im humanen Gehirn insbesondere in den tiefen Schichten des Neokortex, der hippokampalen CA2- und CA3-Region und der Substantia nigra angereichert vorliegt und dort sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen, insbesondere im Neuropil aber auch schwach somatisch lokalisiert ist. Ultrastrukturell konnte eine Assoziation mit Mitochondrien, Ribosomen und synaptischen Vesikeln beobachtet werden. Die genaue Funktion von α -Syn ist nicht geklärt. Da α -Syn mit 14-3-3 Proteinen strukturelle Homologie und Bindungspartner teilt (Proteinkinase C, BAD, die Extrazellulär-regulierte Kinase, Tyrosin-Hydroxylase; Ostrerova *et al.*, 1999), und eine Rolle bei der synaptischen Plastizität (George *et al.*, 1995; Petersen *et al.*, 1999) und dem Aufbau des für Membranfusionen notwendigen SNARE (soluble NSF attachment protein receptor-) Komplexes (Chandra *et al.*, 2005) spielt, liegt es nahe, dass α -Syn die Funktion eines Chaperons innehaben könnte. Die Assoziation mit synaptischen Vesikeln und die Lokalisation an präsynaptischen Membranen lässt im Weiteren eine Funktion dieses Proteins bei der synaptischen Transmission vermuten. Der KO des endogenen α -Syn der Maus führte bestätigend zur negativen Regulation der dopaminergen Neurotransmission (Abeliovich *et al.*, 2000; Yavich *et al.*, 2004) und es gibt Hinweise, dass α -Syn die Aktivität des Dopamin-Transporters (DAT) reprimiert, wodurch es zu einer geringeren Aufnahme von DA in die Zelle kommt (Wersinger und Sidhu; 2003). Alle bisher beschriebenen Punktmutationen des α -Syn Gens sind im N-Terminus lokalisiert und könnten so durch einen Funktionszugewinn („gain of function“) der Zytotoxizität beitragen: Bei sowohl der A53T-Mutation, als auch der A30P-Mutation konnte in *in-vitro* Versuchen neben einer fehlerhaften Degradation über den lysosomalen bzw. proteasomalen Pfad (Stefanis *et al.*, 2001, Tanaka *et al.*, 2001) auch eine Beeinträchtigung der Chaperon-vermittelten Autophagie festgestellt werden, die nicht im Zusammenhang mit der Bildung von Aggregaten stand (Cuervo *et al.*, 2004). Ebenso wird auch der Funktionsverlust (loss of function) durch die Aggregatbildung diskutiert: Die A53T-Mutation, aber auch hohe Konzentrationen von nicht-mutierten, und daher Wildtyp-, α -Syn, lösten eine gesteigerte Tendenz der Fibrillenbildung aus (Conway *et al.*, 1989). Auch posttranslationale Modifikationen des α -Syn (Ser129-Phosphorylierung, Nitrosylierung oder Oxidation und C-terminale Verkürzung durch alternatives Spleißen) steigerten die Fibrillenbildung (Übersichtsartikel: Beyer, 2006). Die Sequestrierung von α -Syn durch die Formierung zu Fibrillen kann dadurch zum Funktionalitätsverlust führen, wodurch DA vermehrt in die Zelle aufgenommen, aber ungenügend

in synaptischen Vesikeln gespeichert wird, wodurch es nachfolgend zu dessen Auto-Oxidation und damit zum Zell-Stress und Zelltod kommen kann. Ebenso kann die Bildung zytoplasmatischer α -Syn-positiver Fibrillen sekundär zur Sequestrierung anderer, für die Zellfunktion wichtiger Proteine führen, wie es kürzlich für Ypt1p, einem für den ER-Golgi-Transport essentiellen Protein vermutet wurde (Cooper *et al.*, 2006).

Humanes α -Syn im Tiermodell

Für humanes α -Syn transgene (tg) Tiermodelle wurden erstmals im Jahr 2000 publiziert (Feany und Bender, 2000; Kahle *et al.*, 2000; Masliah *et al.*, 2000; van der Putten *et al.*, 2000). Heute existiert eine Vielzahl tg Modelle, die entweder humanes Wildtyp- α -Syn, oder die mutierten Formen (A53T, A30P) oder artifiziell in Kombination exprimieren. Da die Modelle sich in der Tierart, der Wahl des induzierenden Promotors und im Einbau des Konstrukts in das Tiergenom unterscheiden, ist ein übergreifender Vergleich kaum möglich. Eine Zusammenfassung von einigen bisher publizierten α -Syn tg Mausmodellen ist in Tabelle 4 dargestellt und zeigt, dass sowohl die Wahl des Promotors als auch des α -Syn-Konstruktes (mutiert oder Wildtyp) die Ausbildung einer IPS-relevanten Pathologie beeinflusst. Zu einer IPS-relevanten Pathologie zählte dabei u.a. der Nachweis einer Hirnschädigung, indirekt als Gliose oder auch durch Regulation des Neurotransmittergehaltes oder direkt als Degeneration von Neuronen bzw. des Neuropils. Ebenso relevant war der Nachweis von α -Syn-positiven Aggregaten, wozu auch der biochemische Nachweis von α -Synuclein in der unlöslichen Fraktion sowie posttranslationalen Modifikationen, die die Aggregatbildung beschleunigen (s.o.), zählten. Die Neuropathologie unterstützen sollten insbesondere motorische Defizite, ein geeignetes Nachweisverfahren hierfür ist das Rotarod (Dunham und Miya, 1957) oder die Beobachtung der Lokomotion in einer Arena („Open Field“) aber auch kognitive Beeinträchtigungen, die mittels MorrisWaterMaze (Morris, 1984) waren ein Kriterium für die Modellierung des IPS.

Tabelle 4
Überexpression des humanen α -Syn im Mausmodell

Promotor	Genetik (tg α -Syn)	Expression	Pathologie Alter	IPS-relevante Pathologie Biochemisch	IPS-relevante Pathologie Verhalten	LK LN	Referenz
Thy-1 (Maus)	A53T	Telencephalon, Hirnstamm, Rückenmark; nicht in dopaminergen Zellen der SN	≥ 1 Mon	Gliose Ubiquitin-Pathologie im Hirnstamm und RM; neuromuskuläre-Degeneration	progressive motorische Schwäche (Rotarod)	LN, granuläres Akkumulat	Van der Putten <i>et al.</i> , 2000
	Wildtyp	ähnlich wie A53T	ähnlich wie A53T	neuromuskuläre Degeneration	ähnlich A53T	LN	
Thy-1 (Maus)	A30P	ubiquitär, nur geringe Expression in SN	24 Mon: heterozygot 8-9 Mon: homozygot	Gliose, Ubiquitin-Pathologie, Hyperphosphorylierung im RM und Hirnstamm-Projektionen; differentielle striatale, kortikale Serotonin, 5-HIAA-Regulation selektive Unlöslichkeit von α -Syn	motorische Schwäche (Rotarod), kognitive Beeinträchtigung (MWM)	LN, Proteinase K-resistente Aggregate im Hirnstamm	Kahle <i>et al.</i> , 2000, 2001; Neumann <i>et al.</i> , 2002; Freichel <i>et al.</i> , 2006

Thy-1 (Maus)	Wildtyp	ubiquitär	≥ 1 Mon	selektive Unlöslichkeit von tg α -Syn	n.a.	n.a.	Kahle <i>et al.</i> , 2001
Thy-1 (Maus)	Wildtyp A30P	ubiquitär	≥ 12 Mon	Akkumulation	Gewichtsreduktion, motorische und sensorische Defizite (Beam-Walking)	n.a.	Rockenstein <i>et al.</i> , 2002; Fleming <i>et al.</i> , 2004
PDGF-β (Mensch)	Wildtyp	Hippokampus, Neokortex, Riechhirn, schwach im nigostriatalen System; Neurone und Gliazellen	≥ 12 Mon	Abnahme dopaminergere Nervenendigungen	Motorische Schwäche (Accelerod)	LN, nicht-fibrilläre nukleäre Einschlüsse	Maslah <i>et al.</i> , 2000; Rockenstein <i>et al.</i> , 2002
PrP (Maus)	Wildtyp	hohe Expression in ZNS-Neuronen	Keine Pathologie in 20 Mon Homozygoten	keine Pathologie	keine Pathologie	kein Akkumulat	Giasson <i>et al.</i> , 2002
PrP (Maus)	A53T	Ubiquitär; Neurone und Gliazellen	≥ 9 Mon, Gendosis-abhängig	selektive Unlöslichkeit von α -Syn im RM, Aggregation und Ubiquitin-Pathologie im RM und Hirnstamm; axonale Degeneration im RM selektive Unlöslichkeit von α -Syn im RM, Ubiquitin-Pathologie und Hyperphosphorylierung im Pons und Kleinhirn, Gliose im Hirnstamm; Apoptose, mitochondriale Dysfunktion, axonale Degeneration im RM; axonale und myofibrilläre Atrophie des Skelettmuskels mit Inflammation	Schnell-letale Progression, Abnahme der Aktivität (OpenField)	Eosinophile und elektrone n-dichte Einschlüsse	Lee <i>et al.</i> , 2002; Martin <i>et al.</i> , 2006; Pathologie Parkin-unabhängig; von Coelln <i>et al.</i> , 2006
PrP (Maus)	A53T	ubiquitär	≥ 7 Mon	α -Syn-Akkumulation in der Substantia nigra; Durch zusätzlichen KO des endogenen α -Syn: Verstärkte Pathologie mit Gliose und Degeneration im RM	progressive motorische Schwäche (Rotarod, OpenField); durch KO des endogenen α -Syn: verkürzte Lebenserwartung, Gewichtsreduktion ohne motorische Auffälligkeit	LN; durch KO des endogenen α -Syn: positive Aggregate	Gispert <i>et al.</i> , 2003; SNCA-KO und A53T-Überexpression: Cabin <i>et al.</i> , 2005
TH (Ratte)	Wildtyp A30P A53T	dopaminerge Neurone des nigrostriatalen Systems, Riechhirns	keine Pathologie im Alter von ca. 12 Mon	α -Syn-Akkumulation Soma und Neuropil dopaminergere Zellen ohne striatale Neurotransmitter-Regulation	n.a.	ohne Befund	Matsuoka <i>et al.</i> , 2001
TH (Ratte)	Wildtyp A30P+A53T	nigrostriatales System, olfaktorischer Trakt, zytoplasmatische und nukleäre Expression	≥ 2 Mon	Hochregulation der DAT-Dichte; nach MPTP-Gabe verstärkt herabreguliert; Neurotransmitter-Regulation nur bei A30P+A53T-doppelt-Tg	Reduktion der lokomotorischen Aktivität (OpenField): Erhöhte Sensitivität gegenüber Amphetamin und MPTP; altersabhängige motorische	ohne Befund	Richfield <i>et al.</i> , 2002

					Schwäche bei A30P+A53T-doppelt-Tg		
TH (Ratte)	Wildtyp-C-Terminal-verkürzt in Mäusen mit endogene m α -Syn-KO	dopaminerge Neurone im Riechhirn und nigrostrialem System	14-18 Mon	striatale axonale Schwellung, nigrale Gliose, pyknotisches Perikaryum, selektive Unlöslichkeit, ohne signifikanten dopaminergen Zellverlust in der Substantia Nigra; striatale Regulation des Neurotransmittergehalt es	motorische Schwäche (Beam-Walking) mit erhöhter Amphetamin-Sensitivität	granuläre und fibrilläre LK im Riechhirn ; α -Syn- positive Einschlüsse in der Substantia Nigra	Tofaris <i>et al.</i> , 2006

Abkürzungen: KO, Knockout; LN, Lewy-Neuriten; LK, Lewy-Körperchen; n.a., nicht analysiert; MWM, Morris Water Maze; PDGF- β , Platelet-Derived-Growth-Factor- β -Promotor; PrP, Prionen-Protein-Promotor; RM, Rückenmark; SN, Substantia nigra; TH, Tyrosin-Hydroxylase-Promotor

Neben der Maus fungiert ebenfalls die Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) und der Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*) als Tiermodell, die beide kein Ortholog zum humanen α -Syn aufweisen. Die ubiquitäre oder dopaminerge Expression von Wildtyp- bzw. mutierten (A30P oder A53T) α -Syn in *Drosophila* führte zu einem altersabhängigen Verlust eines Teils der dopaminergen Neurone. Darüber hinaus konnten filamentöse Einschlusskörperchen (mit α -Syn-positiven Kern, jedoch α -Syn-negativen radiären Filamenten), retinale Degeneration und eine einhergehende lokomotorische Dysfunktion beobachtet werden (Feany und Bender; 2000). Im α -Syn-überexprimierenden Fadenwurm konnten sowohl bei der A53T Mutationen als auch, in milderer Form, bei der Wildtyp-Form eine dendritische Pathologie dopaminerner Neurone, jedoch ohne LK-ähnliche Einschlüsse gezeigt werden (Lakso *et al.*, 2003; Kuwahara *et al.*, 2006). Durch die adeno- oder lentivirale Injektion von humanen α -Syn in die Substantia nigra konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass eine lokale Überexpression des Transgens zu α -Syn-positiven Aggregaten und neuronaler Pathologie in Ratten und Primaten führen kann (Kirik *et al.*, 2002, 2003; Lo Bianco *et al.*, 2002). Die Beobachtung, dass humanes α -Syn in Motoneuronen (Lakso *et al.*, 2003) und in Neuronen der Amygdala und des Striatums (Lauwers *et al.*, 2003) zu Pathologien führt, legt nahe, dass die von α -Syn ausgehende Toxizität nicht auf dopaminerge Neurone beschränkt ist.

1.2.1.1.2 PARK 5: UCH-L1

Mutationen, Klinik und Pathologie

Die Mutationsanalyse des *Ubiquitin-Carboxyl-Hydrolase-L-1 (UCH-L1)*-Gens von 72 Familien mit IPS führte zur Identifizierung der I93M Punktmutation bei einem Geschwisterpaar. Beide zeigten eine typische Parkinson-Symptomatik, mit ersten Symptomen im Alter von ca. 50 Jahren (Ruhetremor), und nachfolgendem Rigor, Bradykinese und posturaler Instabilität (Leroy *et al.*, 1998). Bisher liegen noch keine weiteren pathologischen Erkenntnisse im Hinblick auf das Vorhandensein von LK vor. Die (erfolglose) Suche nach weiteren I93M-Mutationsträgern deckte einen Polymorphismus im UCH-L1 Gen (S18Y) auf, welcher vermutlich mit einer verminderten

Suszeptibilität für den Morbus Parkinson einhergeht (Maragnore *et al.*, 1999, Satoh und Kuroda, 2001, Tan *et al.*, 2006).

Hypothesen der UCH-L1 induzierten Pathogenese

UCH-L1 gehört der Gruppe der de-ubiquitinierenden Enzyme an, welche C-terminal gebundene Polyubiquitinketten hydrolysiert und so freies monomerisches Ubiquitin erzeugt, das für den proteolytischen Abbau von Proteinen über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) notwendig ist (Larsen *et al.*, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass die I93M-Mutation zu einer 50% Reduktion der katalytischen Aktivität des UPS führt (Lansbury und Brice, 2002). Jedoch kann im Falle der UCHL-1 Mutation keine Aussage über Funktionsverlust bzw. Funktionszugewinn getroffen werden, da seit den Arbeiten von Liu und Mitarbeitern (2002) bekannt ist, dass das UCH-L1 in seiner Form als Dimer sowohl Ligase- als auch Hydrolase-Aktivität aufweist. Da der S18Y-Polymorphismus die Ligase-Aktivität hemmt, gehen die Autoren davon aus, dass die Ligase-Aktivität eine pathogene Komponente darstellen könnte. Dementsprechend könnte der Verlust der Hydrolase-Aktivität gemeinsam mit einer gesteigerten Ligase-Aktivität den Vorrat monomerischen Ubiquitins und dadurch den UPS-abhängigen Abbau von Proteinen verringern, wodurch die Bildung von Aggregaten, wie bspw. die des α -Syn (McNaught *et al.*, 2002) begünstigt werden könnte. Eine kürzlich durchgeführte Studie zeigte auf, dass in Parkinson und DLB-Patienten UCH-L1 verringert exprimiert wird, was im Einklang mit einer abnormalen α -Syn-Akkumulation stehen kann (Barrachina *et al.*, 2006).

Humanes UCHL-1 im Tiermodell

1984 wurde eine Mauslinie identifiziert, die eine Deletion im UCH-L1 Gen trägt und phänotypisch bereits nach 4 Wochen eine sensorische Ataxie und nachfolgend eine motorische Parese aufweist (Yamazaki *et al.*, 1988). Diese so genannte gad- (gracile axonal dystrophy) Maus zeigte als pathologisches Korrelat eine axonale Degeneration und Sphäroid-Bildung im Dorsal Root Ganglion des Rückenmarks (Mukoyama *et al.*, 1989) sowie eine Akkumulation von Amyloid- β (Ichihara *et al.*, 1995) und in einer nachfolgenden Studie auch β - und γ -Syn in den Sphäroiden (Wang *et al.*, 2004). Es wird diskutiert, ob die abnormale Akkumulation von Proteinen in den Sphäroiden den axonalen Transport beeinträchtigt und dadurch die axonale dying-back Neuropathie auslöst (Wang *et al.*, 2004). Jedoch entsprach die Neuropathologie nicht dem des IPS. Die direkte Beteiligung des UCH-L1 an der Pathogenese des IPS konnte aber kürzlich von Setsuie und Mitarbeitern (2007) anhand eines Mausmodells erbracht werden, welches das humane mutierte [I93M] UCH-L1 auf UCH-L1-KO-Hintergrund ($Uchl1^{gad/gad}$) exprimiert. Die Mäuse zeigten eine progressive Alters- und Gendosis- abhängige Degeneration dopaminerger Neurone ohne LK-ähnliche Pathologie. Es konnten jedoch UCH-L1 und Ubiquitin-positive zytoplasmatische Einschlüsse nachgewiesen werden. Eine einhergehende lokomotorische

Auffälligkeit konnte nicht mittels Rotarod aber mittels automatisierten Käfig-Monitoring aufgezeigt werden.

1.2.1.1.3 PARK 8: LRRK2

Mutationen, Klinik und Pathologie

Mutationen im *Leucin-rich repeat kinase-2- (LRRK2)-* Gen stellen eine häufige Ursache für die Suszeptibilität des IPS dar. Man vermutet, dass diese in ca. 5% aller IPS-Fälle mit positiver Familienanamnese (Verwandte 1. Grades) und in 0,4-1,6% aller sporadischen IPS-Fälle ursächlich sind (Farrer *et al.*, 2005; Gilks *et al.*, 2005, Zabetian *et al.*, 2005). Im Weiteren geht man davon aus, dass die G2019S-Substitution ca. 1-2% aller sporadischen Fälle der Parkinson'schen Erkrankung ausmacht (DiFonzo *et al.*, 2005), jedoch scheint die Prävalenz der LRRK2 Mutationen sowohl im sporadischen als auch familiären Fällen stark von der jeweiligen Population abzuhängen. Bisher wurden sieben LRRK2 Mutationen im Zusammenhang mit dem autosomal-dominanten Morbus Parkinson beschrieben. Fünf von diesen Mutationen sind als pathogen bestätigt, darunter Y1699C, R1441C, G2019S, R1441G, I2020T (Paisan-Ruiz *et al.*, 2004, Zimprich *et al.*, 2004; DiFonzo *et al.*, 2005, Gilks *et al.*, 2005, Kacherguss *et al.*, 2005, Nichols *et al.*, 2005). Klinisch zeigen sich die typischen Kardinalsymptome und ein Beginn der Erkrankung im Alter von ca. 50 Jahren. Als nicht-motorische Symptome treten Anosmie, Obstipation und Demenz auf. Das Autopsie-Material betroffener Patienten zeigte in den meisten Fällen eine Degeneration nigraler dopaminerger Neurone mit LK. Ebenso häufig zeigte die post-mortem Analyse aber auch ein heterogenes Spektrum atypischer Merkmale, wie nigrale Atrophie mit Gliose aber ohne LK-Pathologie, das Auftreten von α -Syn-negativen, aber Ubiquitin-positiven Aggregaten, sowie eine Tau-Pathologie (Zimprich *et al.*, 2004). Letzteres würde man aber typischerweise bei einer Supranukleären Blickparese erwarten. Da die durch die LRRK2-Mutationen ausgelöste Neuropathologie die wichtigen typischen und atypischen IPS-assozierten Kriterien einschließen, könnten diese bei der Aufklärung der verschiedenen Wege der Neurodegeneration des IPS beitragen und wurden dementsprechend von Farrer und Mitarbeitern (2006) als Stein von Rosette bezeichnet.

Hypothesen der LRRK2 induzierten Pathogenese

Im Menschen wurde die mRNA des LRRK2-Gens im Putamen sehr gering und in der Nigra nicht nachgewiesen werden (Simon-Sanchez *et al.*, 2006), jedoch das Protein als Bestandteil von LN und LK im Kortex und Hirnstamm (Giasson *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2006). Innerhalb der Zelle lokalisiert LRRK2 im mikrotubulären Zytoskelett und den inneren Membranen der Mitochondrien, des ER und des Golgi-Komplexes, wodurch es am Aufbau des Zytoskeletts bzw. dessen Regulation oder am vesikulären Transport beteiligt sein könnte (Gloeckner *et al.*, 2006).

Das LRRK2 Protein gehört zur ROCO-Familie und der Protein-Superfamilie der RAS GTPasen (Paisan-Ruiz *et al.*, 2004, Giasson *et al.*, 2006). Es besteht aus mehreren Domänen, darunter sehr wahrscheinlich einer GTPase und einer Kinase-Domäne. Letztere könnte zur Fähigkeit der Autophosphorylierung und Dimerisierung beitragen. Sowohl die G2109S- als auch die I2020T-Mutation lokalisieren in der Kinase-Domäne und zeigen eine Steigerung der Kinase-Aktivität (West *et al.*, 2005; Gloeckner *et al.* 2006), was einer gain-of-function-Mutation entspräche.

LRRK2 im Tiermodell

Bisher wurde noch kein transgenes Modell für die LRRK2-Überexpression publiziert. Es ist bekannt, dass LRRK2 mRNA im Maushirn in Regionen der dopaminergen Transmission (Kortex, olfaktorischer Tuberkel und Striatum) lokalisiert ist (Melrose *et al.*, 2006). Im Moment wird von der National Parkinson Foundation (an Dr. Youren Tong) und der Michael J. Fox Foundation (Dr. Jie Shen) die Generierung und Charakterisierung von Mäusen finanziert, die das Wildtyp- bzw. die R1441C Mutation des *LRRK2* Gens, welche ein heterogenes Spektrum an Neuropathologie verursacht (Zimprich *et al.*, 2004), unter Kontrolle endogener regulatorischer Elemente, exprimieren.

1.2.1.2 Autosomal-Rezessives Vererbungsmuster

1.2.1.2.1 PARK 2: Parkin

Mutationen, Klinik und Pathologie

Mutationen im *Parkin* Gen gelten als häufigste Ursache für die juvenile Form des Parkinson-Syndroms, mit einer Prävalenz von 50% mit autosomal-rezessiver positiver Familien-Anamnese und in ca. 77% der sporadischen Fälle mit einem Erkrankungsbeginn noch vor dem 20. Lebensjahr (Lucking *et al.*, 2000). Für das Parkin-Gen sind mehrere Mutationen, darunter Deletionen, Protein-verkürzende Mutationen und Missense-Mutationen beschrieben (Übersichtsartikel: West und Maidment, 2004). Klinisch zeigen Patienten mit Parkin-Mutation klassische Zeichen des Parkinsonismus mit langsamer Progression, jedoch mit ausgeprägten Dystonien, die vermutlich auch Medikamenten-assoziiert auftauchen. Neuropathologische Merkmale umfassen die Degeneration dopaminergener Neurone der Substantia nigra mit einhergehender Gliose aber ohne LK-Pathologie (Hayashi *et al.*, 2000, van de Warrenburg *et al.*, 2001; Mori *et al.*, 2003). In zwei Nachfolge-Studien wurden jedoch LK beobachtet (von Coelln *et al.*, 2004a; Pramstaller *et al.*, 2005).

Hypothesen der Parkin induzierten Pathogenese

Mit einer N-terminalen Ubiquitin-homologen Domäne und C-terminal lokalisierten RING-Finger Motiven zeigt Parkin die Merkmale von E2-abhängigen E3-Ubiquitin-Ligasen. Es fungiert als Substrat-Erkennungs-Enzym für den UPS-assoziierten Proteinabbau. Hierfür wird in einem energieabhängigen Prozess Ubiquitin von einer E1-Ligase gebunden und in einem zweiten Schritt auf eine E2-Ligase übertragen. Parkin erkennt als E3 Ligase Ubiquitin der E2-Ligase und überträgt diesen auf einen Lysinrest abzubauenen Substrates. Nach wiederholtem Durchlaufen dieses Prozesses sind die Substrate mit Ubiquitinketten modifiziert, und das multiubiquitylierte Protein spezifisch vom Proteasom erkannt und abgebaut. Daher ist anzunehmen, dass ein Verlust der Parkin-Funktion zu Akkumulation toxischer Substrate mit nachfolgendem Zelltod führt. Als Parkin-Substrate konnten bereits mehrere Proteine identifiziert werden, u.a. glykolisiertes α -Syn (Shimura *et al.*, 2001), Pael-R (Parkin-assoziiierter Endothelin-Rezeptor ähnlicher Rezeptor; Imai *et al.*, 2001), Synphilin (Chung *et al.*, 2001), CDCrel 1 und CDCrel 2 (Zhang *et al.*, 2000), sowie Synaptotagmin IX (Huynh *et al.*, 2003) und DAT (Jiang *et al.*, 2004). Studien zeigten eine protektive Rolle von Parkin im Zusammenhang mit dem Pael-R induzierten ER-Stress und der durch Überexpression von α -Syn induzierten Toxizität (Imai *et al.*, 2001; Petrucelli *et al.*, 2002; Oluwatosin-Chigbu *et al.*, 2003). Neueste Studien stellen die bisher identifizierten Substrate aber in Frage, da Parkin anscheinend oligomerisiert und zumindest als Tetramer vorliegt und in dieser Form die Bindung an die oben erwähnten Substrate nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Vandenberghe *et al.*, 2006; unveröffentlicht). Eine Funktionsanalyse von mutierten Parkin zeigte ein heterogenes Spektrum, einschließlich der gesteigerten Tendenz zur Ablagerung in Aggresomen und Verlust der Bindungs- und Ubiquitinierungsaktivität sowie eine gesteigerte Auto-Ubiquitinierung als loss-of-function Mutationen (Sriram *et al.*, 2005). Im Weiteren wird auch die Spezifität als UPS-E3-Ligase diskutiert, da eine kürzlich durchgeführte Studie eine Parkin-abhängige Monoubiquitylierung aufzeigte, die dann aber spezifisch für den endolysosomalen Abbau wäre (Matsuda *et al.*, 2006).

Parkin im Tiermodell

Um die protektive Rolle von Parkin in der Pathogenese der Parkinson'schen Erkrankung aufzuklären, wurden Mäuse generiert, die eine Deletion des Parkin-Gens tragen (Goldberg *et al.*, 2003, Itier *et al.*, 2003; Perez und Palmiter *et al.*, 2004; von Coelln *et al.*, 2004b). Die Deletion des Exons 3 im Parkin-Mausmodell führte zur Beeinträchtigung der dopaminergen Neurotransmission, aber ohne assoziierten Zelltod (Itier *et al.*, 2003; Goldberg *et al.*, 2003). Dagegen konnten von vonCoelln und Mitarbeiter (2004b) durch die Deletion des Exons 7 einen signifikanten Verlust dopaminergener Neurone im *Locus coeruleus* nachweisen. Die Deletion des Exons 2 führte jedoch weder zum Verlust dopaminergener Neurone noch zur Regulation des striatalen DA (Perez und Palmiter *et al.*, 2004). In *C. elegans* führten Deletionen im PDR-Gen,

dem Ortholog zum humanen Parkin, ebenfalls zu keinem Verlust dopaminerger Neurone (Springer *et al.*, 2005). Jedoch wurde eine Hypersensitivität gegenüber ER-Stress aufgedeckt, ein Effekt der durch die zusätzliche Überexpression von A53T- α -Syn gesteigert wurde. In Verbindung mit der von α -Syn induzierten Toxizität wurden weitere Studien mit widersprüchlichem Ergebnis publiziert: So zeigten Yamada *et al.*, (2005) in der Ratte, Haywood und Staveley (2006) in der Fruchtfliege und Yasuda *et al.*, (2007) im Primaten, dass Wildtyp-Parkin die von α -Syn induzierte Neurotoxizität mildert, was von vonCoelln und Mitarbeiter (2006) in der Maus nicht beobachtet wurde. Dadurch bleibt die Interaktion zwischen α -Syn und Parkin im Tiermodell unklar.

1.2.1.2.2 PARK 6: PINK 1

Mutationen, Klinik und Pathologie

Patienten mit Punkt-Mutationen im *PTEN-induced Kinase-1 (PINK1)*-Gen zeigten einen früh auftretenden Parkinsonismus mit langsamer Progredienz, jedoch sind ebenso Mutationen bekannt, die mehr dem klinischen Bild des sporadischen IPS entsprechen (Hatano *et al.*, 2004, Valente *et al.*, 2004a). Die pathogenen PINK-1 Mutationen, von welchen im Moment über 20 bekannt sind, gelten nach den Parkin-Mutationen als zweithäufigste Ursache für den autosomal-rezessiv vererbten Parkinsonismus (Hatano *et al.*, 2004; Valente *et al.*, 2004a). Humanpathologische Daten sind noch nicht bekannt.

Hypothesen der PINK1 induzierten Pathogenese

Das PINK1-Protein besteht aus einer Serin/Threonin-Kinase-Domäne und einem N-terminal lokalisierten mitochondrialen Lokalisationssignal (Valente *et al.*, 2004b). Aktiviert wird es durch die Lipidphosphatase PTEN (Phosphatase und Tensin-Homolog), einem negativen Regulator des PI3K/Akt-Signalwegs. Folgestudien ergaben, dass PINK1 an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist (Silvestri *et al.*, 2005). Petit und Mitarbeiter (2005) konnten ferner zeigen, dass PINK1 eine protektive, da anti-apoptotische Funktion, innehat. Dadurch könnte PINK1 der negative Autoregulator von PTEN sein, welches als Tumor-Suppressor eine pro-apoptotische Aktivität ausübt (Sulis und Parson, 2003). In dieser Studie konnte im Weiteren gezeigt werden, dass die Mutationen E240K und L489P die von PINK1 beobachtete Protektion aufheben (Petit *et al.*, 2005), was eine loss-of-function Mutation nahe legt.

PINK1 im Tiermodell

Bisher wurden noch keine Tiermodelle publiziert, die humanes PINK1 in seiner Wildtyp- bzw. in der mutierten Form überexprimieren. Jedoch konnte in *Drosophila* durch Deletion bzw. Minderung der Expression des endogenen PINK1- Gens eine Störung der Integrität des

Flugmuskels gezeigt werden. Die degenerierten Myofibrillen zeigten mitochondriale Pathologie (Clark *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006). In beiden Studien konnte die zusätzliche Überexpression von Parkin die Ausbildung dieser Pathologie verhindern. Es liegt daher nahe, dass Parkin und PINK1 eine protektive Rolle im zellulären Pfad aufweisen, der über mitochondriale Dysfunktion zum Zelltod führt.

1.2.1.2.3 PARK 7: DJ-1

Mutationen, Klinik und Pathologie

Zu den bisher identifizierten Mutationen im *DJ-1*-Gen zählen exonische Deletionen (Exon 1-5), und Missense-Mutationen, darunter M26I, E64D, R98Q, A104T, D149A, L166P (Bonifati *et al.*, 2002; Hague *et al.*, 2003). Die Symptomatik der Parkinson-Patienten mit DJ-1 Mutation ähnelt der von Parkin-Mutationsträgern, mit einer durchschnittlichen Manifestation im Alter von 43 Jahren, beginnender asymmetrischen Symptomatik, langsamer Progredienz und begleitender Dystonie (Dekker *et al.*, 2003). DJ-1 konnte nicht bzw. nur sehr selten als ein Bestandteil der LK beobachtet werden (Bandopadhyay *et al.*, 2004), jedoch konnte man zeigen, dass es in glären Einschlusskörperchen bei MSA-Patienten mit α -Syn kolokalisiert und ebenso ein Bestandteil der pathologischen tau-immunopositiven Einschlüsse beim Morbus Alzheimer ist (Neumann *et al.*, 2004; Rizzu *et al.*, 2004).

Hypothesen der DJ-1 induzierten Pathogenese

DJ-1 konnte im humanen Gehirn ubiquitär insbesondere im Frontalkortex aber auch in subkortikalen Regionen, wie dem Nukleus caudatus, der Substantia nigra und im Hippokampus nachgewiesen werden, jedoch insbesondere in Gliazellen und weniger in Neuronen (Bonifati *et al.*, 2003; Bandopadhyay *et al.*, 2004). Es wird vermutet, dass DJ-1 die Funktion eines vom Redox-Potential-abhängigen Chaperons ausübt (Choi *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2006). Ebenso könnte es als Protease (Olzmann *et al.*, 2004) oder Antioxidans (Taira *et al.*, 2004) fungieren. Die Überexpression von DJ-1 schützte in einem Versuch vor oxidativen Stress und legte dadurch eine protektive Rolle nahe, und dieser Effekt wurde bestätigend durch eine siRNA-bedingte Herabregulation des DJ-1-Genproduktes oder Mutationen im DJ-1 Gen aufgehoben (Taira *et al.*, 2004). Ebenso konnte gezeigt werden, dass oxidiertes DJ-1 die α -Syn-Fibrillen-Bildung hemmt (Shendelman *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2006). Mutationen im DJ-1 Gen könnten daher zu einer Verringerung oder Verlust der antioxidativen Aktivität und so zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber oxidativem Stress führen.

DJ-1 im Tiermodell

Bisher existiert kein für *DJ-1*-tges Tiermodell. Der KO der beiden orthologen Gene DJ-1 α und DJ-1 β in *Drosophila* bzw. des Orthologs im Zebrafisch zeigte keinen dopaminergen Zellverlust, jedoch eine erhöhte Sensitivität gegenüber Toxinen, die in Zellen zu oxidativem Stress führen (Meulener *et al.*, 2005; Breaud *et al.*, 2007). Kürzlich konnte in einem Rattenmodell gezeigt werden, dass die durch 6-OHDA-Injektion artifizielle Zerstörung dopaminerger Neurone durch eine Post-Injektion von Wildtyp-DJ-1 aber nicht durch L166P mutiertes DJ-1 verhindert werden konnte (Inden *et al.*, 2006). Daher liegt es nahe, dass DJ-1 eine neuroprotektive Rolle gegenüber oxidativen Stressoren besitzt.

1.2.2 Alterungsprozesse

Ein weiterer wichtiger Faktor in der Ätiologie des IPS ist das Alter. Die Parkinson-Krankheit tritt typischerweise im höheren Lebensalter auf. Da die Lebenserwartung ständig steigt, wird vermutet, dass sich innerhalb der nächsten 25 Jahre die Anzahl der Parkinson-Patienten verdoppeln wird (Dorsey *et al.*, 2007). Das Alter wird dadurch zum höchsten Risikofaktor für das IPS. Allein in China wird mit einer Zunahme der Diagnose des IPS unter 50jährigen von ca. 10% gerechnet (Abb. 2). In Diskussion für eine altersabhängige Auslösung des IPS stehen im Moment die Hochregulierung des α -Syn in nigralen Zellen (Chu und Kordower, 2007), sowie die altersabhängige Reduzierung der Proteasomen-Aktivität in Basalganglien (Zeng *et al.*, 2005), verminderte neuronale Autophagie (Übersichtsartikel: Cuervo *et al.*, 2005) und reduzierte mitochondriale BER (base excision repair)-Aktivität neuronaler Mitochondrien (Übersichtsartikel Weissman *et al.*, 2006). Ebenso wurde generell ein altersabhängige Verlust des Mittelhirn-Volumens beobachtet (Sohmiya *et al.*, 2001, 2004). Jedoch entspricht dieser Verlust nicht dem Neurodegenerationsmuster der Parkinson'schen Erkrankung, das hier vornehmlich die lateral-ventrale Schicht betrifft (Fearnley und Lees, 1991).

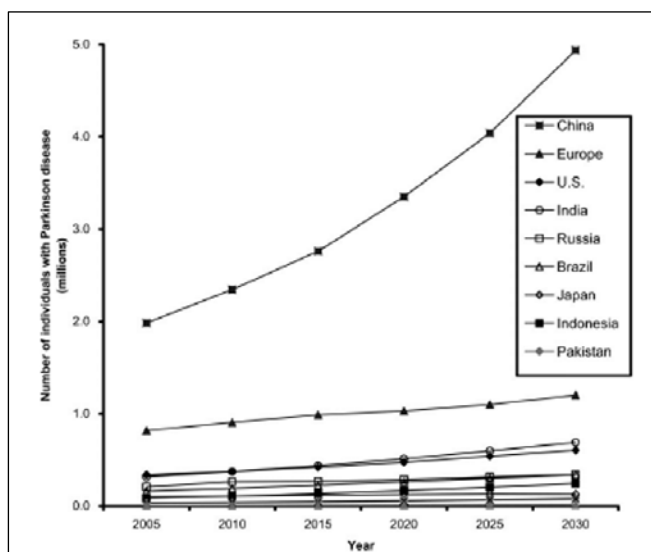


Abb. 2 Hypothetische Entwicklung der Prävalenz des idiopathischen Parkinson-Syndroms in Europa

Gezeigt wird die geschätzte Prävalenz bei 50jährigen Individuen in den am stärksten bevölkerten Nationen im Zeitraum von 2005 bis 2030. Die Werte Europas wurden basierend auf Angaben für Deutschland, Frankreich, Großbritannien/Nordirland, Italien und Spanien ermittelt. (nach Dorsey *et al.*, 2007)

1.2.3 Mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress (Mitochondrial Disease)

Durch die Beobachtung, dass die Blockade des Komplex I der mitochondrialen Elektronentransportkette (über das Neurotoxin 1-methyl-4 phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine; MPTP), das Auftreten einer Parkinson-ähnlichen Symptomatik beim Menschen (Davis *et al.*, 1979; Langston *et al.*, 1983) und im Tiermodell bedingt (Burns *et al.*, 1983; Heikkila *et al.*, 1984), legte die mitochondriale Dysfunktion als Basis für die Entstehung des IPS nahe. Folgestudien zeigten ferner eine MPTP-abhängige mitochondriale Inhibition der ATP-Produktion (Vyas *et al.*, 1986; Greenamyre *et al.*, 1999), veränderte Calcium-Homöostase (Sheehan *et al.*, 1997), den Anstieg von reaktiver Sauerstoff-Spezies (englisch: reactive oxygen species; ROS; Przedborski and Jackson-Lewis; 1998) und eine damit verknüpfte oxidativ-bedingte Veränderung der Proteinfunktion (Jenner, 1998; Przedborski *et al.*, 2003). Mitochondriale Dysfunktion fand man unterstützend ebenso basierend auf Mutation, Herabregulation oder dem KO von Genen, die für seltene Fälle des familiären Parkinson-Syndroms verantwortlich sind (s. 2.1); darunter humanes α -Syn (Smith *et al.*, 2005), die Ubiquitin E3 Ligase Parkin (Palacino *et al.*, 2004), DJ-1 (Yokota *et al.*, 2003) und PINK1 (Park *et al.*, 2006). Eine Zusammenfassung über den hypothetischen Einfluss dieser und sekundär beteiligter Gene an mitochondrialer Dysfunktion und oxidativem Stress ist in Abbildung 3 dargestellt (aus Übersichtsartikel Wood-Kaczmar *et al.*, 2006).

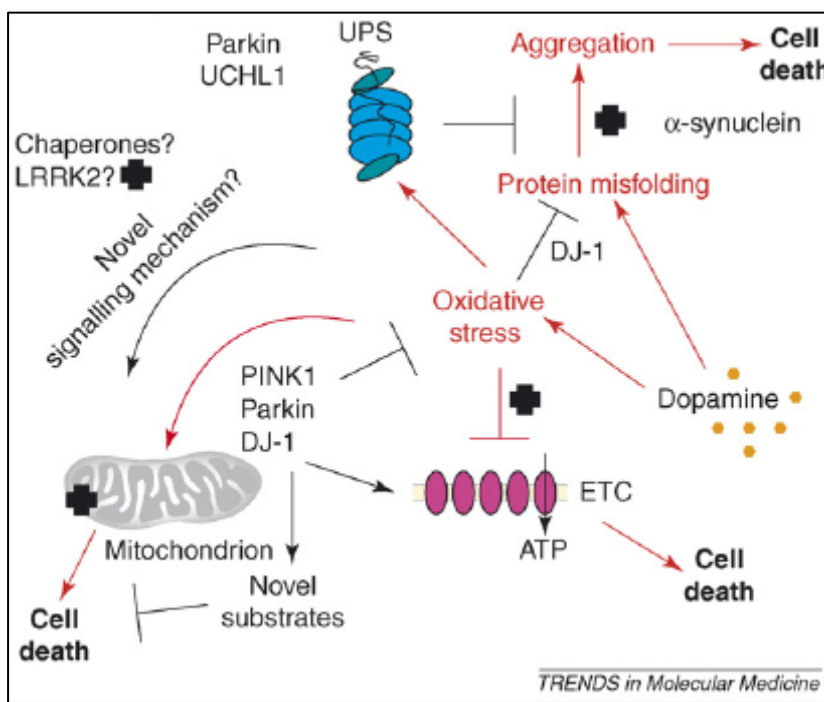


Abb. 3: Mögliche Ursachen des Zelltodes und protektive Mechanismen des idiopathischen Parkinson-Syndroms. Dargestellt sind die selektive Degeneration nigraler Neurone durch mitochondriale Dysfunktion und oxidativem Stress, ein Prozess von dem bekannt ist, dass er durch Dopamin gefördert werden kann. Rote Pfeile markieren stress-induzierende Pfade und schwarze Pfeile mögliche protektive Pfade; Abkürzungen: ETC (electron transport chain): Elektronentransport-Kette; UPS: Ubiquitin-Proteasom-System (aus Wood-Kaczmar *et al.*, 2006).

Als Ursache des oxidativen Stress (Lipidperoxidation, Proteinoxidation, oxidative Veränderungen der DNA und RNA), konnten neben mitochondrialer Dysfunktion ebenso eine gesteigerte Konzentration von Übergangsmetallen, wie Eisen (Sofic *et al.*, 1988) und Kupfer (Rossi *et al.*, 2004) und verminderte Abwehrmechanismen gegenüber freien Radikalen (Foley und Riederer, 2000) nachgewiesen werden. Auch konnte man zeigen, dass der Metabolismus von DA zur

Produktion von Wasserstoff-Peroxid führte, was eine erhöhte Sensitivität dopaminerger Neurone bezüglich des oxidativen Stress nahe legte (Adams *et al.*, 1972). Daher scheinen dopaminerge Zellen für oxidativen Stress prädisponiert: durch den Abbau von DA werden potenziell toxische Verbindungen, wie Wasserstoff-Peroxid und Ammoniak produziert, durch die Fenton-Reaktion ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \cdot\text{O}_2 + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$) weitere Hydroxylradikale freigesetzt und das in den Zellen befindliche Neuromelanin wirkt als zusätzlicher Speicher von Fe^{3+} , dessen Struktur in Patienten mit IPS verringert ist (Fasano *et al.*, 2006). Ebenso konnte man zeigen, dass Komplex-I der Elektronentransportkette in Parkinson-Patienten oxidativ geschädigt ist (Keeney *et al.*, 2006), wodurch es wiederum zur Erhöhung der ROS-Produktion kommt. Die vermehrte Bildung von ROS induziert wiederum die mitochondriale Dysfunktion, wodurch die Radikalbildung weiter angetrieben wird, und es kommt zu einer positiven Rückkopplung. Dabei ist unklar, ob oxidativer Stress nun primärer Effekt oder eine Konsequenz der oben genannten Faktoren ist („[...] Which Comes First, the Chicken or the Egg [...]“, Jenner *et al.*, 2003).

1.2.4 Proteinfehlfaltung und Aggregation (Conformational Disease)

Ein gemeinsames Merkmal vieler neurodegenerativer Erkrankungen ist die Amyloidbildung von Proteinen, wie man sie bspw. beim Morbus Alzheimer ($\text{A}\beta$ -Amyloid, Plaques und neurofibrilläre „tangles“), Morbus Parkinson (α -Syn, LK), Prionenerkrankung (Plaques), Morbus Huntington (Huntingtin-Proteinaggregate) und dem Morbus Pick (Pick-Körperchen) vorfindet. Die Ablagerungen zeigen ultrastrukturelle Gemeinsamkeiten, wie eine unverzweigte Struktur mit hohem Anteil an β -Faltblatt, das Vorhandensein eines fibrillären Kerns, einer Kreuz- β -Struktur der Fasern und einen Fibrillendurchmesser von 5-13 nm (Übersichtsartikel; Tycko *et al.*, 2004). Die Fibrillenbildung unterliegt dabei einer Kaskade, die die Bildung verschiedener Intermediate beinhaltet: Das Protein bildet zunächst kleine sphärische Oligomere, die sich im weiteren Verlauf zu kritischen Oligomeren mit β -strukturhaltiger Konformation umwandeln, wobei das β -Faltblatt eine Polarisation innerhalb des Oligomers bewirkt und die Bildung zu linearen Protofibrillen begünstigt (Modler *et al.*, 2003). Die Protofibrillen werden in der letzten Stufe der Amyloidbildung zu Wasser-unlöslichen Fibrillen konvertiert (Rochet und Lansbury, 2000; Dobson 2003). Mutationen im α -Syn-Gen beschleunigen die Bildung von Oligomeren (A53T > A30P > Wildtyp; Conway *et al.*, 2000), die dann im weiteren Verlauf zu Protofibrillen konvertiert werden können (s.o.). Der Abbau von fehlgefalteten, mutierten und oxidativ-geschädigten Proteinen erfolgt über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Inwiefern fehlgefaltete Proteine direkt den Zelltod auslösen können, ist nicht hinreichend geklärt. Jedoch konnte am Beispiel der α -Syn-Protofibrillen gezeigt werden, dass diese die Bildung von toxischen Membranporen induzieren können, ähnlich wie bestimmte bakterielle Toxine (Volles und Lansbury, 2002). Eine Verbindung zwischen UPS, der Bildung von Protofibrillen und α -Syn wurde durch Synphilin-1 gezeigt, da es mit α -Syn interagiert, ein Substrat von Parkin ist und als Komponente der LK

identifiziert werden konnte (Wakabayashi *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2001). Die Rolle von Synphilin-1 ist noch nicht geklärt, es konnte aber gezeigt werden, dass Mutationen im *Synphilin-1* Gen zum Morbus Parkinson führen (R621C; Marx *et al.*, 2003) und dass diese Basensubstitution zum Verlust des Bindevermögens an Phospholipid-Membranen führt (Takahashi *et al.*, 2006).

1.2.5 Exogene Toxine und Neurotoxin-Modelle der Parkinson-Krankheit

Der Kontakt mit bestimmten Toxinen könnte das IPS auslösen. Zwillingsstudien zeigten, dass der Einfluss genetischer Faktoren bei einem IPS-Erkrankungsalter über 50 Jahre von sehr geringen, jedoch der von Umweltfaktoren von großer Bedeutung ist (Tanner *et al.*, 1999). Insbesondere die Exposition mit bestimmten, in der Landwirtschaft verwendeten Chemikalien konnte mit dem IPS in Verbindung gebracht werden, davon sind MPTP, Rotenon und Paraquat als mitochondriale Komplex-I-Hemmer bekannt. Ebenfalls kann 6-OHDA den dopaminergen Zelltod durch Hemmung des mitochondrialen Komplex-I auslösen, ist jedoch kein epidemiologischer Risikofaktor und wird hier aufgrund seiner selektiven Neurotoxizität der Vollständigkeit halber genannt.

1.2.5.1 MPTP

1983 zeigte die Untersuchung von Langston und Mitarbeitern des synthetischen Heroins, das in einigen Fällen zu sekundärem Parkinsonismus führte (Davis *et al.*, 1979) neben dem eigentlichen Wirkstoff 1-methyl-4-phenyl-4-propion-oxypiperidine ebenso die Verunreinigung durch MPTP. In Folgestudien konnte MPTP als Verursacher der dopaminergen Neurodegeneration, einhergehend mit dem Auftreten einer Gliose aber ohne LK-Pathologie, bestätigt und somit als Auslöser für das sekundäre IPS identifiziert werden (Langston *et al.*, 1999). Nach dem heutigen Toxizitätsmodell penetriert MPTP durch die Bluthirnschranke und wird dort von Astrozyten endozytiert (Marini *et al.*, 1992). MPTP wird in den Lysosomen der Gliazellen durch die Monoaminoxidase B (MAO-B) in das toxische Agens MPP^+ umgewandelt und über den DAT im Bereich der nigrostriatalen Projektionen mit hoher Affinität aufgenommen (Heikkila *et al.*, 1985). Nach Akkumulation in den Mitochondrien hemmt MPP^+ die Komplex-I-Aktivität wodurch es zur Produktion von ROS einhergehend mit oxidativem Stress kommt, was letztendlich zum Zelltod führt. Jedoch kommt MPTP als solches nicht in der Natur vor. Es konnten aber strukturell verwandte MPTP-ähnliche Moleküle gefunden werden, die ebenso eine Komplex-I-Hemmung verursachen und ein natürliches Toxin sind, darunter bspw. β -Carboline, die bspw. im Kaffee, Schokolade und bestimmten Fruchtsäften vorkommen (Herraiz und Gallisteo 2003).

1.2.5.2 Paraquat

Epidemiologische Studien zeigten dass der Kontakt mit dem Herbizid Paraquat zu einem erhöhten Risiko für ein IPS führt (Liou *et al.*, 1997). Strukturell sind sich MPP^+ und Paraquat (1,1'-

dimethyl-4,4'-bipyridinium) ähnlich. Es konnte gezeigt werden, dass Paraquat den Efflux von Glutamat im Striatum steigert, wodurch es zu einer durch reaktive Stickstoffverbindungen (reactive nitrogen species; RNS)- induzierten Exzitotoxizität kommt, in deren Verlauf Ca^{2+} in die Zelle einströmt und die Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) aktiviert. Das gebildete Stickstoffmonoxid (NO) löst dann die Bildung weiterer Radikale (ONOO^- , $\text{O}_2^{\cdot-}$) aus, was in der dopaminergen Zelle zu oxidativem Stress führt (Shimizu *et al.*, 2003). Paraquat konnte ebenfalls als Komplex-I-Hemmer der mitochondrialen Elektronentransportkette identifiziert werden (Liou *et al.*, 1997), wodurch es zur ATP-Synthese-Hemmung und mitochondrialer Depolarisation und nachfolgend zum Zelltod kommt (Greenamyre *et al.*, 2001). Ebenso konnte gezeigt werden, dass Paraquat die α -Syn-Konzentration steigert und die α -Syn-Fibrillen-Bildung beschleunigt (Manning-Bog *et al.*, 2002).

1.2.5.3 Rotenon

Obgleich das Insektizid Rotenon mit einer Halbwertszeit von 1-3 Tagen sehr instabil ist (Hisata, 2002) konnte es doch epidemiologisch mit einem erhöhten IPS-Risiko in Verbindung gebracht werden (Kamel *et al.*, 2007). Durch seine lipophilen Eigenschaften penetriert Rotenon leicht durch die Bluthirnschranke und Zellmembranen und kann sich in Mitochondrien anreichern. Dort beeinträchtigt es die oxidative Phosphorylierung durch Bindung an PSST, einer Untereinheit des mitochondrialen Komplexes-I (Schuler und Casida, 2001), wodurch es wiederum zum oxidativen Stress kommen kann (siehe auch 2.5.1 und 2.5.2). Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass Rotenon die Bildung von Tubulin beeinträchtigt (Marshall und Himes, 1978). Jedoch scheint Rotenon insbesondere striatale Nervenfasern und weniger die Substantia nigra zu schädigen (Ferrante *et al.*, 1997).

1.2.5.4 6-OHDA

6-OHDA konnte im Urin von Patienten mit IPS nachgewiesen werden (Andrew *et al.*, 1993) und zeigte eine spezifische Neurotoxizität gegenüber monoaminergen Neuronen (Ungerstedt, 1968). Da es die Blut-Hirn-Schranke nicht überschreiten kann, wird der dopaminerge Zelltod modellhaft durch Injektion in das ventrale Mittelhirn erreicht (Roberts *et al.*, 1975). Durch aktive Aufnahme über den DAT reichert sich 6-OHDA im Zytosol an und kann durch Autoxidation mit einhergehender Radikalbildung ($\text{O}_2^{\cdot-}$) zum Zelltod führen. Ebenso konnte gezeigt werden, dass 6-OHDA direkt die mitochondriale Komplex-I-Aktivität hemmt (Glinka *et al.*, 1996).

1.2.6 Dopaminerge Neurotoxine im Tiermodell

Während die meisten tg Tiermodelle keine klare nigrostriatale Neurodegeneration zeigen, konnte diese mit Hilfe von den oben genannten Neurotoxinen erreicht werden. Der Neurotoxin-Tiermodelle des IPS führten so zu einem besseren Verständnis der dem dopaminergen Zelltod

unterliegenden Neurozytotoxizität. Ebenso sind insbesondere MPTP-Tiermodelle zur Testung neuer therapeutischer Strategien unerlässlich (Übersichtsartikel: Speciale *et al.*, 2002). Jedoch lösen Neurotoxine eine akute Degeneration dopaminerger Neurone aus, die nicht der des IPS entspricht und aufgrund der akuten Induktion keine neuroprotektive Studien zulässt. Beim IPS verkörpert die Degeneration einen Prozess über die Jahre hinweg; zudem führen alle Toxine in erhöhter Konzentration zu peripheren Schädigungen und erhöhten Morbidität. Ein weiterer Nachteil ist, dass je nach Injektion und verwendeter Tierlinie und sogar Administrator, die Ergebnisse innerhalb der Tiergruppe extrem variieren können (Übersichtsartikel: Deumens *et al.*, 2001).

Tabelle 5
Mitochondriale Neurotoxine im Tiermodell für den Morbus Parkinson

Toxin / Läsionsstelle	Pathologie Induktion	Pathologie Biochemisch	Pathologie Verhalten	LK LN	Pathologie abweichend vom IPS	Referenz
6-OHDA Medialer Vorderhirnstrang	1-4 Tage post-Injektion	Gliose, striataler DA-Spiegel reduziert, Zelltod in <i>SNpc</i>	Spontane kontralaterale Rotation, verstärkt durch Apomorphin; Ipsilateral durch D-Amphetamin; Akinesie; kognitive Beeinträchtigung	nein	akute Induktion; nicht-apoptotischer Zelltod; extrazelluläre DA-Konzentration in der SN unverändert; unspezifischer Verlust der nahe gelegenen (bspw. VTA-dopaminerger) Neurone; kompensatorisches Sprouting; <i>Locus coeruleus</i> intakt; > 95% Zellverlust; Variationen zwischen Tieren	Heikkila <i>et al.</i> , 1989 Deumens <i>et al.</i> , 2001
6-OHDA SNpc	7 Tage post-Injektion	Dopaminerger Zelltod der lateralen <i>SNpc</i> und korrelierende axonale Degeneration im Striatum	> 90% DA-Verlust: Apomorphin induzierte kontralaterale Rotation, Akinese, motorische Schwäche	nein	akute Induktion ohne Progression; keine extranigrale Pathologie; Variationen zwischen Tieren	Carman <i>et al.</i> , 1992; Deumens <i>et al.</i> , 2001
6-OHDA Striatum	56 Tage post-Injektion	Apoptose, Verlust striataler dopaminerger Fasern und Neurone der <i>SNpc</i> ; striatale Reduktion von DA und Metaboliten	Akinesie, kognitive Beeinträchtigung, motorische Schwäche (Rigor, Tremor)	nein	akute Induktion; unspezifischer Zelltod in der Injektionszone; kompensatorische Neurotransmitterregulation im Striatum außerhalb der Läsionsstelle; Variation zwischen Tieren	Lee <i>et al.</i> , 1996; Deumens <i>et al.</i> , 2001
MPTP	1-7 Tage post Injektion (i.p.)	Degeneration striataler dopaminerger Fasern und Neurone der <i>SNpc</i> ; striatale Reduktion von DA und Metaboliten	Akinese, Rigor, selten Tremor	ja*	akute Induktion, LK-Pathologie dagegen nur in MPTP-Affen mit hohem Alter keine Induktion in Ratten, Progressions-Stopp im chronischen Modell nach ca. 3 Wochen; Variation zwischen Tieren	Forno <i>et al.</i> , 1986; Liersch <i>et al.</i> , 2001; Von Bohlen und Halbach, 2004
Rotenon	1-7 Tage post Injektion (i.v., i.c.)	Schädigung des nigrostriatalen Systems; Neuronaler Verlust im	Rigor, Katalepsie, motorische Schwäche; Rigor	ja	Akute Induktion; unspezifische striatale Läsionen serotonerger Neurone; in einigen Fällen fehlende nigrale Läsionen;	Heikkila <i>et al.</i> , 1985; Greenamyre <i>et al.</i> , 1999 Betarbet <i>et</i>

	<i>Globus pallidum</i>				<i>al.</i> , 2000; Von Bohlen und Halbach, 2004	
Paraquat	≥7 Tage post Injektion	Schädigung striataler Fasern, Neurodegeneration in SNpc; signifikante striatale Reduktion von DA und Metaboliten	Motorische Schwäche	nein **	Akute Induktion; Ergebnisse variabel; unspezifische extranigrale Pathologie; Kompensatorische Effekte;	McCormack <i>et al.</i> , 2002; Manning-Bog <i>et al.</i> , 2002; Von Bohlen und Halbach, 2004

* mit struktureller Abweichung von humanen LK; ** LK-ähnliche Pathologie nur in α-Syn-tg Mäusen; SNpc, Substantia nigra pars compacta; DA, Dopamin; i.c.: intrakutan; i.p. intraperitoneal; i.v. intravenös

1.3 Diagnostik und Therapie

1.3.1 Diagnostik

Für die Diagnose des IPS sollten die Kardinalsymptome (einseitiger Beginn der Erkrankung, Ruhetremor, Rigor, Bradykinese und im späteren Stadium posturale Instabilität) oder zumindest 3 von diesen Merkmalen vorhanden sein. Differentialdiagnostisch ist das IPS von der PSP (supranukleäre Blicklähmung; progressive supranuclear palsy), MSA (Multi-System-Atrophie; multiple system atrophy), CBD (Kortikobasale Degeneration) und der LBD (Demenz mit LK; dementia with lewy-bodies) zu trennen (Tabelle 6; Gerlach *et al.*, 2003).

Tabelle 6

Charakteristika der Multisystematrophien und Differentialdiagnose zum IPS (nach Gerlach *et al.*, 2003)

	<i>SND</i>	<i>sOPCA</i>	<i>CBD</i>	<i>PSP</i>	<i>IPS</i>
Rigor / Akinese	++	+	++ / +++	++ / +++	++ / +++
Zerebelläre Zeichen	+	++	-	-	-
Pyramidenbahnzeichen	-	++	++	+	-
Posturale Instabilität	+	+	+	+++	+
Demenz	-	-	+	+	+
Okulomotorik-Störungen	+	(+)	+	+++	+
Dysphagie	-	+	++	++	+
Retrocollis	-	-	-	++	-
Sphinkter-Störung	+	+	-	-	-
Impotenz	+	+	++	+	+

IPS, idiopathisches Parkinson-Syndrom; CBD, kortikobasale Degeneration; PSP, progressive supranukleäre Blicklähmung; SND, striato-nigrale Degeneration (MSA-P); sOPCA, sporadische Form der olivopontozerebellären Atrophie (MSA-C)

Eine Fehldiagnose liegt heute noch im Bereich von 10-25 % vor (Hughes *et al.*, 1992, 2001; Rajput *et al.*, 1991). Um die einzelnen Erkrankungen besser unterscheiden zu können, wurde nach krankheitsspezifischen Biomarkern geforscht. Potentielle Biomarker sind in Tabelle 7 dargestellt:

Tabelle 7Potentielle Biomarker des IPS (abgeändert nach Savitt *et al.*, 2006)

Bildgebungsverfahren (SPECT; PET)
Reduzierter striataler Metabolismus: ¹⁸ F-Deoxyglucose Imaging Reduzierte Dopa-Aufnahme und Decarboxylierung: ¹⁸ F-Dopa PET Veränderte Bindungseigenschaften des Dopamin D2-Rezeptors: ¹¹ C-Racloprid PET Reduziertes Bindungspotenzial des DAT: ¹²³ I β-CIT SPECT; ¹¹ C-d-threo-Methylphenidat Eisenakkumulation in der Substantia nigra: Ultraschallsonografie Kardiomyopathie: Herzsintigrafie
Klinik
Persönliche Befragung Neuropsychiatrische Analyse Evaluierung des Schlafverhaltens TMS (Transkranielle Magnetstimulation) / evozierte Potentiale Analyse auf Geruchsstörung
Biochemisch
Gen-Analyse Messung der Aktivität des mitochondrialen Komplex I α-Syn-Konzentration and α-Syn-Isoformen im Blut

¹²³I-β-CIT, iodine 123-2β-carboxymethoxy-3β-(4-iodophenyl)tropan

1.3.2 Therapie

Als Basis-Therapie gilt die DA-Substitution durch L-Dopa, am wirksamsten in Kombination mit einem Decarboxylasehemmer (Carbidopa, Benserazid). Jedoch zeigten Langzeitstudien, dass die L-Dopa-Monotherapie zu motorischen Wirkungsschwankungen führt, mit verkürzter Wirkdauer, Dyskinesien und Off-Phasen (Nutt und Holford, 1996; Lang und Lozano, 1998b). Die initiale Therapie mit DA-Agonisten (Bromokriptin, Cabergolin, a-Dihydroergokriptin, Lisurid, Pergolid, Pramperixol, Ropinirol) ist daher erste Wahl. Mit COMT-Hemmern (Entacapon, Tolcapon) kann man (neben Decarboxylasehemmern) den zweiten Abbauweg von DA, bzw. des Substituenten L-Dopa, inhibieren. Eine Kombinationstherapie von L-Dopa, Carbidopa und Entacapon soll die Wirkungsfluktuation unterbinden. Die Hemmung des DA-Abbaus kann ebenfalls durch MAO-B-Hemmer (Selegelin, Rasagilin) erfolgen. Da beobachtet wurde, dass die neuronale Degeneration zu einer vermehrten glutamergen Aktivität führt (Choi *et al.*, 1988) wird das IPS auch mit NMDA-Rezeptorantagonisten (Amantadin, Budipin) behandelt, zumeist in Kombination mit L-Dopa. Bleibt die medikamentöse Behandlung ohne Erfolg, kann mit Tiefenhirnstimulation eine Besserung der Motorik erzielt werden. Bei der Tiefenhirnstimulation wird eine Elektrode bspw. in den Nucleus subthalamicus implantiert, der durch diese chronisch hochfrequent stimuliert werden kann. Im Rahmen der Analyse konnte eine verkürzten Off-Phase, verminderten Dyskinesien, Besserung des Tremors und eine Reduktion der notewendigen L-Dopa-Dosis gezeigt werden (Benabid *et al.*, 2005). Die Besserung der Symptomatik durch Transplantation dopaminerger Zellen ist Ziel der aktuellen Forschung und als erfolgreich verspricht sich die Transplantation von embryonalen dopaminerger Zellen der Retina (Watts *et al.*, 2003).

1.4 Problemstellung

α -Syn ist das bisher am genauesten untersuchte Parkinson-Gen. Mutation in diesem Gen als auch die Multiplikation des Genortes alleine führen im Menschen zum familiären IPS. Die Beteiligung des α -Syn-Gens an Prozessen der Neurodegeneration zeigte sich darüber hinaus in der Expressionsregulation in alternden Menschen (Chu und Kordower, 2007) und in Toxinmodellen, die gezielt das nigrostriatale System betreffen (Mannig-Bog *et al.*, 2002). Jedoch zeigte die permanente Überexpression von α -Syn im Tiermodell nicht die erwünschte nigrostriatale Degeneration als Basis für Modellierung des humanen IPS (Tabelle 3), was die Frage aufwirft, ob α -Syn tatsächlich alleiniger Verursacher des IPS ist. Dies ist insbesondere wichtig im Hinblick auf neue Therapiestrategien die α -Syn bzw. α -Syn-involvierte zelluläre Pfade betreffen. Durch Verwendung neuer neuronenspezifischer Promotoren könnte das Expressionsmuster in Richtung „Pro-Parkinson-Symptomatik“ verschoben werden. Dabei sind tg Tiermodelle *per se* den durch Toxin-induzierten Modellen vorzuziehen, da letztere die langsame Progredienz der Parkinson-Symptomatik nicht modellieren (Tabelle 4) und sehr spezifisch nur eine Degeneration des nigrostriatalen dopaminergen Systems erzielen, wohingegen beim IPS präklinisch Anosmie und als Spätmanifestation häufig kognitive Defizite auftreten, was für eine Beteiligung extranigraler Hirnbereiche spricht. Darüber hinaus zeigen alle bisher publizierten Modelle eine permanente Expression des humanen α -Syn Gens, was keine Aussage zulässt, ob eine, und dann nachweislich, durch humanes α -Syn induzierte Pathologie reversibel ist. Dies jedoch bietet essentielle Hinweise auf das zeitliche Fenster einer auf α -Syn gezielten Therapiestrategie.

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung eines konditionalen Mausmodells, welches das humane α -Syn induzierbar unter Kontrolle verschiedener neuronaler Promotoren exprimiert. Im Zuge der aktuellen Forschung soll sowohl in Mäusen, die das Wildtyp α -Syn als auch dessen mutierte Form (A30P) unter zwei verschiedenen neuronenspezifischen Promotoren exprimieren, dessen Eignung als induzierbares Modell und als Basis für die Grundlagenforschung der durch α -Syn involvierten Neurotoxizität analysiert werden, was folgende Analyse einschließt:

1. Regionale Expressionsstärke und Expressionsmuster des tg α -Syn im Hinblick auf für den Morbus Parkinson relevante Hirnbereiche, einschließlich Vergleich und Wahl der geeigneten Linien für Detailstudien
2. Regulierbarkeit der regionalen Expression in juvenilen und adulten Mäusen als Voraussetzung für die Analyse auf Reversibilität der Symptomatik im induzierbaren Modell.

Im Hinblick auf das Modellieren des humanen IPS soll in ausgewählten Linien weitergehend analysiert werden:

3. Immunohistopathologische Veränderungen auf struktureller und ultrastruktureller Ebene mit Augenmerk auf die Ausbildung einer LK-ähnlichen Pathologie, welche momentan in Hinblick auf die Neurotoxizität in Diskussion ist (Gispert *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2004; Inden *et al.*, 2005;

Bodner *et al.*, 2006) und Validierung des Ergebnisses anhand eines (von der ultrastrukturellen Ebene unabhängigen) biochemischen Tests.

4. Biochemische Veränderungen des Neurotransmittergehaltes im nigrostriatalen System, wie sie zwar im humanen IPS, aber bisher nur in einem tg Mausmodell mit artifiziell veränderten α -Syn (Tofaris *et al.*, 2006) beobachtet wurden.

5. Nachweis kompensatorischer Mechanismen, die aktiviert werden, um die Neurone von der α -Syn induzierten Zytotoxizität zu schützen. In Frage kommen hier die Regulation der Neurogenese, von welcher bekannt ist, dass sie durch Neurotoxine wie MPTP und 6-OHDA induziert wird (Yamada *et al.*, 2004; Shan *et al.*, 2006; Winner *et al.*, 2006), jedoch kontrovers fehlend in einem α -Syn-tg Mausmodell (Winner *et al.*, 2004), sowie Veränderungen auf Transkriptomebene; dies soll Aussage über den pathologischen und kompensatorischen Einfluss der Expression des humanen α -Syn treffen und als Vorlage für die zukünftige Suche potenzieller Interaktionspartner in der Pathogenese der Parkinson'schen Erkrankung dienen.

6. Integrität des dopaminergen Systems mittels PET-Bildgebung in einer Pilotstudie als zukünftigen Biomarker für den *in-vivo* Nachweis einer Neurotoxizität und Progression

7. Verhaltensauffälligkeit in Analysen, zugeschnitten auf das jeweilige Expressionsmuster im transgenen Maushirn, insbesondere im Hinblick auf lokomotorische und kognitive Beeinträchtigung

8. Analyse der mitochondrialen Funktion, da Hemmung der Komplex-I-Aktivität im Zusammenhang mit oxidativen Stress ein Auslöser für Zelltod (Abb. 3) und dadurch der Nachweis einer direkten α -Syn induzierten Neurotoxizität, unabhängig oder zusätzlich zur vermuteten Aggregations-vermittelten Neurotoxizität, erfolgen kann

9. Nachweis des Vorliegens einer Reversibilität in symptomatischen und asymptomatischen Mäusen, wobei letzteres ebenso eine Aussage auf die Beeinflussung der (Langzeit-) Doxyzyklingabe (als Voraussetzung zum Abschalten des Transgens) auf die Veränderungen des Resultats insbesondere durch Gleichbehandlung von Kontroll-Mäusen zulässt

II Material und Methoden

2.1. Transgene Mäuse

Für humanes [wt] α -Syn bzw. mutiertes [A30P] α -Syn transgene (tg) Mäuse wurden von Dr. I. Schmitt (Neurologie, Universität Bonn) generiert und für die weitergehende Analysen freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Für die Generation wurden Wildtyp (Nukleotide 46-520; GenBank-Nummer: NM_00345) bzw. mutiertes [A30P] α -Syn (Krüger *et al.*, 1998) stromabwärts des pUHD 10-3 Expressionsvektors (Gossen und Bujard, 1995) in die *Xba*I Schnittstelle kloniert. Die Erzeugung der CaMKII α -tTA-exprimierende Mäuse wurden bereits beschrieben (Mayford *et al.*, 1996) und diese Tiere sind kommerziell erhältlich (Jackson Laboratory, Maine, USA) wohingegen PrP-tTA exprimierende Mäuse freundlicherweise von Prof. Dr. S.B. Prusiner (Institute of Neurodegenerative Disease, San Francisco, USA) zur Verfügung gestellt und dessen Konstrukte und Generierung bereits beschrieben wurden (Tremblay *et al.*, 1998). Transgene Nachkommen wurden mit Mäusen der Linie C57/Bl6 (Jackson Laboratories) rückgekreuzt. Die Haltung der Mäuse erfolgte in transparenten Kunststoffkäfigen mit Edelstahlgitter (E. Becker & Co GmbH, Castrop Rauxel, D), einer Raumtemperatur von 21-23°C, Luftfeuchtigkeit 45-60%, und einem Tag- und Nachtrhythmus von 12h Licht und 12h Dunkelheit. Als Aggregat-Positiv-Kontrolle wurden Thy-[A30P] α -Syn Mäuse verwendet, die von Prof. Dr. P. Kahle (Hertie-Institut, Universität Tübingen) generiert (Kahle *et al.*, 2000) und freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Als Negativ-Kontrolle des Nachweises humanen α -Syn wurden α -Syn^{-/-} Knockout (KO)-Mäuse verwendet (Abeliovich *et al.*, 2000), die kommerziell erhältlich sind (Jackson Laboratory).

2.2. Humane Gewebeproben

Post-mortem Gewebeproben des präfrontalen Kortex von unauffälligen Kontrollperson wurden freundlicherweise von PD Dr. A. Bornemann (Inst. für Hirnforschung, Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt.

Sektionen von Morbus-Parkinson-Patienten als Positiv-Kontrolle des Aggregat-Nachweises wurden freundlicherweise von PD Dr. D. Berg (Hertie-Institut, Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt.

2.3. Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'-3')
tTA-807	GAC GAG CTC CAC TTA GAC GG
tTA-1006	TAC TCG TCA ATT CCA AGG GC
pTRE-F	GAG ACG CCA TCC ACG CTG T
pTRE-R	CAG TCT AGT TGT GGT TTG TCC A

2.4. Enzyme und Kits

High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D)

Kit zur Gewinnung von RNA aus präpariertem Hirngewebe:

RNeasy Mini Kit bzw. RNeasy Midi Kit (Qiagen, Hilden, D)

Kit für die histologische Färbung:

Vectastain ABC Elite (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)

Western-Blot-Detektionssystem:

ECL / ECL-Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, Münster, D)

DAB- Substrat-Chromagen-Reagens:

SigmaFast 3,3' Diaminobenzidine Tablet Sets (Sigma Aldrich, München, D)

AEC- Substrat-Chromagen-Reagenz:

AEC (3-Amino-9- Äthylcarbazol) (Sigma)

Proteinase K (Sigma)

Taq-Polymerase: Biotherm Taq DNA Polymerase (Gene Craft; Münster, D)

2.5. Größenstandards

DNA-Standards:

λ -DNA/*Hind*III (MBI, Fermentas, St Leon-Rot, D):

23130 bp, 9416 bp, 6557 bp, 4361 bp, 2322 bp, 2027 bp, 564 bp

pUC 19-DNA/*Msp*I (MBI, Fermentas):

501 bp, 489 bp, 404 bp, 331 bp, 242 bp, 190 bp, 147 bp, 111 bp, 110 bp, 67 bp, 34 bp, 26 bp

Protein-Standard:

MultiMark Multi-Colored Standard (Invitrogen, Karlsruhe, D):

250 kDa, 148 kDa, 60 kDa, 42 kDa, 30 kDa, 22 kDa, 17 kDa, 6 kDa, 4 kDa

2.6. Membranen und Papier

Protein-Blot Membranen: Optitran BA-S 83 (Nitrozellulose): Schleicher & Schuell, Dassel, D

Whatman-Papier (GB002): Schleicher & Schuell, Dassel, D

2.7. Antikörper

Tabelle 7

Verwendete primäre Antikörper

Spezifität	Wirt	Firma/Publikation/Name	Versuch	Verdünnung
α -Syn (humanspezifisch)	Ratte-Mk	Kahle <i>et al.</i> , 2000;15G7; Zur Verfügung gestellt von Dr. M. Neumann (Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung; Universität München)	WBA	1:5
			IHC-P	1;2+
			IHC-G	1:5
			IHC-V	1:10
			IHC-EM	1:2
α -Syn (humanspezifisch)	Maus-Mk	LB 509 (Zymed Laboratories, CA USA)	Dot-Blot	1:5
			WBA	1:200
α -Syn (humanspezifisch)	Maus-Mk	Syn 204 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)	IHC-P	1:300+
			WBA	1: 200
α -Syn (humanspezifisch)	Maus-Mk	Syn 211 (Santa Cruz)	IHC-P	1:
			WBA	1: 1000
α -Syn (humanspezifisch)	Rabbit-PK	SA3400 (Biomol Int., PA, USA)	IHC-P	1:
			WBA	1: 1000
α -Syn (Mausspezifisch)	Rabbit-Pk	Kahle <i>et al.</i> , 2000;7544; Zur Verfügung gestellt von Dr. P. Kahle	WBA	1:200
			IHC-G	1:1000
α -Syn Tyrosine-Hydroxylase	Kaninchen-Pk	AB 5038 (Chemicon, CA, USA)	IHC-P	1:500+
			IHC-G	1:500
			IHC-V	1:1000
			IHC-EM	1:300
			WBA	1:10.000
β -actin	Maus-Mk	A4700 (Sigma Aldrich, München, D)	IHC-P	1:500
			IHC-V	1:2000
Calbindin	Kaninchen-Pk	CB-38a (Swant, Bellinzona, Schweiz)	IHC-P	1:500+
			IHC-V	1:2000
Parvalbumin	Kaninchen-Pk	PV 28 (Swant)	IHC-P	1:500+
			IHC-V	1:2000
GFAP	Maus-Mk	MAB 360 (Chemicon)	IHC-P	1:500
			IHC-V	1:500

PK: polyklonal; Mk: monoklonal; +: Mikrowellenbehandlung zur Verstärkung der Antigenität; P: Paraffin-eingebettete Sektionen; G: Gefrierschnitte; V: Vibratomschnitte; EM: Vibratomschnitte für die ultrastrukturelle Analyse

PAGE-Laufpuffer:	192	mM	Glycin
	25	mM	Tris
	1%	[w/v]	SDS
Ladepuffer (Laemmli):	2%	[w/v]	SDS
	5%	[v/v]	β -Mercaptoethanol
	1%	[v/v]	Glycerin
	0,05%	[w/v]	Bromphenolblau
	62,5	mM	Tris pH 6,8
TBE (Tris-Borat-EDTA):	100	mM	Tris
	100	mM	Borsäure
	2	mM	EDTA pH 8.0
Ladepuffer:	8%	[v/v]	Ficoll-400
	0,05%	[w/v]	Bromphenolblau in TBE
d) für die Immunhistochemie			
PBS:	10	mM	Na_2HPO_4
	2	mM	NaH_2PO_4
	150	mM	NaCl
PBS ^{Brij} :	0,3%	[v/v]	Brij in PBS
Citratpuffer:	9ml	100 mM	Citronensäure
	41ml	100 mM	Natriumcitrat
	add	450 ml	aqua _{bidest}
Blocklösung:	10%	[v/v]	Normalserum in PBS für EM ohne Zusätze
	10%	[v/v]	Normalserum in PBS für Vibratom-und Gefrierschnitte bzw.
	5%	[v/v]	Normalserum in PBS für Paraffinschnitte mit
	0,3%	[v/v]	Triton X-100 in PBS

2.9. Geräte und Chemikalien

Elektrophorese-Kammern

Model 40-1214 bzw. 40-0708: Peqlab Biotechnologie, Erlangen, D
 Blue Vertical BV 100/C: Serva Elektrophoresis GmbH, Erlangen, D
 Blue Blot 100: Serva Elektrophoresis GmbH, Erlangen, D

Spannungsgeber

Consort Electrophoresis Power Supply E385: Sigma Aldrich, München, D

pH-Meter

MP 230: Mettler, Toledo, Giessen, D

Photometer

BioPhotometer: Eppendorf, Hamburg, D

Ultrospec 3100pro (UV/Vis): Amersham Bioscience, Freiburg, D

Gerät für die Hirnsektionen

Vibratom: Leica VT 1000S: Leica Instruments Nussloch, D

Kryostat: SM2000R mit Kühlvorrichtung Frigomobil: Leica Instruments Nussloch, D

Microtom: RM 2155: Leica Instruments Nussloch, D

Microtom: Leica Ultracut UCT: Leica Instruments Nussloch, D

Einbettkarussell

Leica TP1020: Leica, Bensheim, D

Giesstation

Leica EG1160: Leica, Bensheim, D

Zentrifuge

Mit Kühlvorrichtung: Centrifuge 5415R (Rotor F45-24-11): Eppendorf, Hamburg, D

Thermomixer

Modell 5436: Eppendorf, Hamburg, D

Wasseraufbereitung

QuantumTM EX 06196: Millipore, Schwalbach, D

PCR-Gerät

GenAmp PCR Systems 9600: Perkin-Elmer, Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, D

PTC-200 Peltier Thermal Cycler: MJ Research Inc., MA, USA

Gel-Fotodokumentationsanlage

Biostep Systems mit Argus X1-Software: Biostep, Jahnsdorf, D

microPET Scanner

FOCUS 120: Siemens Preclinical Solutions, TN, USA

Rotarod

Modell 7750: TSE GmbH, Bad Homburg, D

ActiMot

Modell 302020: TSE GmbH, Bad Homburg, D

Mikroskope

Axioplan 2 imaging; Objektive: Plan-Neofluar (2,5x, 10x, 20x) mit Axio Vision 4.3 Software und AxioCaMHR-Kamera: Carl Zeiss, Oberkochen, D

Philips EM 420 mit DITABIS (Digital Biomedical Imaging System, Pforzheim, Germany): Philips Electron Optics, Eindhoven, The Netherlands

Eclipse 80i; Objektive: Plan Apo VC (2x, 40x) mit Software Stereo Investigator (MicroBrightField, VT, USA) und DS-5Mc Kamera: Nikon, Tokyo, J

UltraTurrax:

Modell T25: Janke und Kunkel GmbH, Ika-Labortechnik, Staufen, D

Die verwendeten Chemikalien u.a. Laborbedarf stammen hauptsächlich von den Firmen Carl Roth GmbH, Karlsruhe; VWR International GmbH, Darmstadt und Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg und Sigma Chemie, Deisenhofen.

Spezielle Chemikalien, sofern nicht bereits erwähnt, sind im Methoden-Teil mitaufgeführt.

2.10. Methoden im Zusammenhang mit der Arbeit und Phänotypisierung der Mausmodelle

2.10.1 Haltung und Versorgung

Mäuse wurden in Kunststoff-Käfigen in Gruppen von höchstens 5 Tieren für TypII-long (530 cm² Bodenfläche) und von höchstens 10 Tieren für Typ III (810 cm²) Bodenfläche gehalten. Die Innenausstattung bestand aus staubfreiem Weichholzgranulat, welches einmal pro Woche erneuert wurde. Trocken-Futter und Wasser wurde *ad libitum* angeboten.

2.10.2 Aufzucht und Vermehrung

Nachkommen wurden im Alter von mindestens 21 Tagen abgesetzt und nach Geschlecht getrennt. Nach Erlangen der Zuchtreife (mind. 8-10 Wochen) wurden die Mäuse in der Regel 1:2 verpaart, wobei die Dauer der Trächtigkeit und die durchschnittliche Wurfgröße bei ca. 6-8 Mäusen lagen.

2.10.3 Biopsie und Euthanasie

Für die Schwanzspitzenbiopsie wurden die Mäuse mittels Äther oder Isofluran (Essex Pharma GmbH, München, D) betäubt, wobei gleichzeitig eine Ohrmarkierung mit Hilfe einer Lochzange erfolgte. Eine Euthanasie erfolgte mittels CO₂ oder Dekapitation.

2.10.4 Behandlung mit Doxyzyklin

Zur Herabregulierung der Genexpression („Gen aus“) in doppelt-transgenen (dtg) Mäusen wurden diese für ein Minimum von 4 Wochen mit 2 mg/ml Doxyzyklin (Sigma) behandelt, wobei das Antibiotikum mit 5% D-Saccharose zur Maskierung des bitteren Geschmacks, versetzt wurde. Bei einer Langzeit-Behandlung (> 4 Wochen) wurde der D-Saccharose-Zusatz zur Vermeidung einer Hyperglykämie (Kawasaki *et al.*, 2005) wöchentlich um 0,2 Prozentpunkte verringert, bis zu einer Endkonzentration von 0,2%. Das mit Doxyzyklin versetzte Trinkwasser wurde einmal pro Woche erneuert und in lichtundurchlässigen Flaschen (Tecniplast, Hohenpeißenberg, D) gereicht.

2.10.5 Phänotypische Charakterisierung

2.10.5.1 Modifizierter SHIRPA

Diese Standardmethode (entwickelt von Irwin, 1968) erstellt ein primäres Verhaltensprofil und gibt Hinweise auf Beeinträchtigungen oder Veränderungen hinsichtlich des Gangbildes, der Aktivität, motorischen Koordination, Aggression und Reizbarkeit, des Aussehens (Tränenfluss, Piloarrektion) und des Muskeltonus. Zur quantitativen Erfassung wird ein Punktesystem angewendet. Zum Equipment zählen eine transparente Arena (Ratten-Käfigschale; 55 x 33 x 18 cm) mit 15 markierten Quadraten mit einer Seitenlänge von 11 cm. Ein transparentes Beobachtungs-Behältnis („Viewing jar“), bestehend aus einer quadratischen Plattform (20 cm Seitenlänge) und einem transparenten Zylinder (Durchmesser: 15 cm; Höhe: 20 cm). Eine kleine transparente Röhre (Durchmesser: 3,5 cm; Länge: 10cm) zur Analyse des Stell-Reflexes, eine Waage zur Gewichtserfassung, Pinsel für den Cornea- und Ohrmuschelreflex und eine Stoppuhr zur Zeiterfassung.

Die Methode wurde modifiziert und folgende Punkte flossen in den Test mit ein:

Analyse im Viewing jar (die Vergabe der „0“ deutet auf guten Gesundheitsstatus hin)

Körperposition: 0 = Aktiv; 1 = Inaktiv; 2 = Hyperaktiv

Tremor: 0 = nicht vorhanden; 1 = vorhanden

Augenlid: 0 = auf; 1 = zu

Fell: 0 = sauber, glänzend; 1 = struppig

Schnurrhaar: 0 = vorhanden; 1 = nicht vorhanden

Tränensekretion: 0 = nicht vorhanden; 1 = vorhanden

Darmentleerung: 0 = vorhanden; 1 = nicht vorhanden

Analyse in der Arena (die Vergabe der „1“ deutet auf ein Normalverhalten hin):

Reaktion auf Transfer: 0 = verlängerte Starre; 1 = kurzes Verharren; 2 = sofortige Bewegung

Aktivität: Anzahl der überquerten Felder innerhalb von 30 sek (0 = < 10; 1 = > 10)

Gang: 0 = nicht flüssig; 1 = flüssig

Schwanzhaltung: 0 = schleifend; 1 = horizontal gestreckt; 2 = vertikal (nach oben) gestreckt

Reaktion auf Berührung: 0 = keine Reaktion; 1 = Reaktion; 2 = Flucht bereits vor Berührung

Hautfarbe der Extremitäten: 0 = bleich; 1 = pink; 2 = rot

Analyse über der Arena (Halten am Schwanz; die Vergabe „0“ deutet auf Normalverhalten hin):

Passivität: 0 = Zappeln; 1 = Zappeln nur bei Genickhaltung; 2 = Zappeln nur in Rückenlage

Vorwärts-Windung des Rumpfes: 0 = nicht vorhanden; 1 = vorhanden

Ergreifen von Extremitäten: 0 = nicht vorhanden; 1 = vorhanden

Gitter-Test: 0 = Maus hält sich am umgedrehten Gitter; 1 = Maus hält sich nicht

Reflex- und Aggressionsverhalten (0 deutet auf ein niedriges Aggressionsverhalten und normale Reflexe hin):

Ohrmuschel-Reflex: 0 = vorhanden; 1 = nicht vorhanden

Cornea-Reflex: 0 = vorhanden; 1 = nicht vorhanden

Stell-Reflex: 0 = vorhanden; 1 = nicht vorhanden

Lautäußerung während der Beobachtung: 0 = keine; 1 = Lautäußerung

Beißen: 0 = kein; 1 = Beißen

Die Analyse mittels SHIRPA erfolgte für Mäuse der Linie **CaM_syn** [*Transgen*: $n = 17$ (männlich: $n = 8$; weiblich: $n = 9$); Durchschnittsalter: 48 Wochen; *Kontrolle*: $n = 11$ (männlich: $n = 7$; weiblich: $n = 4$); Durchschnittsalter: 54 Wochen], **CaM_syn30** [*Transgen*: $n = 7$ (männlich: $n = 2$; weiblich: $n = 5$); Durchschnittsalter: 58 Wochen; *Kontrolle*: $n = 8$ (männlich: $n = 3$; weiblich: $n = 5$); Durchschnittsalter: 57 Wochen] und **PrP_syn30** [*Transgen*: $n = 9$ (männlich: $n = 3$; weiblich: $n = 6$); Durchschnittsalter: 60 Wochen; *Kontrolle*: $n = 12$ (männlich: $n = 3$; weiblich: $n = 9$); Durchschnittsalter 58 Wochen; *Dox-Transgen*: $n = 12$ (männlich: $n = 5$; weiblich: $n = 7$); Durchschnittsalter: 54 Wochen; *Dox-Kontrolle*: $n = 9$ (männlich: $n = 4$; weiblich: $n = 5$); Durchschnittsalter: 55 Wochen].

Für die statistische Auswertung wurden die Punkte der Gruppen (Kontrolle, Transgen) summiert und gemittelt. Die statistische Auswertung der gemittelten Werte erfolgte mittels Student's *t*-Test und ein Wert von $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant bewertet.

2.10.5.2 Accelerod: Motorisches Lernen und Motorische Leistung

Die Analyse der lokomotorischen Fähigkeiten wurde jeweils mit Beginn der Dunkelphase durchgeführt. Für die Analyse der motorischen Leistung wurden die Mäuse an 5 aufeinander folgenden Tagen auf dem Accelerod trainiert und es erfolgten 2 Trainingsdurchgänge pro Tag, wobei die konstante Geschwindigkeit innerhalb des Trainingstages um 4 UpM bis zu einer Maximalgeschwindigkeit von 20 UpM gesteigert wurde (Tag 1: 4 UpM, 8 UpM; Tag 2: 8 UpM, 12 UpM; Tag 3: 12 UpM, 16 UpM; Tag 4: 16 UpM, 20 UpM; Tag 5: 20 UpM, 20 UpM) und zwischen beiden Durchgängen eine Pause von ca. 60 min eingehalten wurde. Die Trainingszeit für die konstanten Geschwindigkeiten betrug 200 sek. Es folgte an 5 aufeinander folgenden Tagen („Session“) der eigentliche Test auf motorische Leistung mit 2 Durchgängen pro Tag. Dazu wurde die Geschwindigkeit der Apparatur so gesetzt, dass diese innerhalb von 5 min kontinuierlich von 4 UpM auf 40 UpM beschleunigt (Accelerod) und die Zeitspanne gemessen, in welcher die Maus sich auf dem Rotarod halten kann, mit einer Maximal-Laufzeit von 6 Min. Dieser Test wurde über einen Zeitraum von 1,5 Jahren ca. alle 6 Wochen durchgeführt. Am Beginn und am Ende der Arbeitssitzung (Training und Test) wurde das Gewicht der Mäuse erfasst. Zur Analyse der Reversibilität der Symptomatik, wurden die Mäuse in einem Alter von 52 Wochen oder von Geburt an mit Doxyzyklin behandelt und die Messung bis zu einem Alter von 58 Wochen fortgesetzt.

Zur Analyse des motorischen Lernens wurde das Ergebnis der Messung 1 des ersten Testtages mit der Leistung in Messung 2 des ersten Testtages der ersten Session verglichen.

Für die statistische Auswertung wurden die Werte pro Gruppe gemittelt und mittels Jmp 5.1 (SAS Institut, NC, USA) Software) ausgewertet. Für die Berechnung der Tendenz der motorischen

Leistung der Linie CaM_syn wurde eine lineare Regressionsanalyse, mit der zugrundeliegenden Formel: $y = b + m_1 \cdot t$ für den Fall dass $t < T$ und $y = b + m_1 \cdot T + m_2 \cdot (t - T)$ herangezogen, letzteres wenn sich die Tendenz der motorischen Leistung innerhalb des Analysezeitraumes der Mäuse unterschieden hatte („Leistungsknick“). Für die Analyse des Gewichtes wurde ebenfalls eine lineare Regressionsanalyse herangezogen. Ein *t*-Test für gepaarte Beobachtungen erfolgte für den Vergleich der Steigung vor und nach der Behandlung und für den Vergleich für motorisches Lernen zwischen der 1. und der 2. Messergebnis. Es wurden Mäuse der Linie **CaM_syn** [*Transgen*: $n = 8$ (männlich: $n = 4$; weiblich: $n = 4$); *Kontrolle*: $n = 8$ (männlich: $n = 4$; weiblich: $n = 4$); Messalter: Gen an: 18 – 58 Wochen; Gen aus: 58 - 78 Wochen; *Behandelt-Transgen*: Gene-off Geburt: $n = 12$ (männlich: $n = 7$; weiblich: $n = 5$); Durchschnittsalter bei der Messung: 8 Wochen – 46 Wochen; *Behandelt-Kontrolle*: $n = 23$ (männlich: $n = 10$; weiblich: $n = 13$); Durchschnittsalter bei der Messung: 8 Wochen – 42 Wochen] und **PrP_syn** [*Transgen*: $n = 24$ (männlich: $n = 15$; weiblich: $n = 9$); Durchschnittsalter bei der Messung: 15 – 73 Wochen (Ausnahme weibliche Mäuse: 15 – 46 Wochen) sowie *Behandelt-Transgen*: Gen aus Geburt $n = 18$ (männlich: $n = 10$; weiblich: $n = 8$); Durchschnittsalter bei der Messung: 8 – 49 Wochen (Ausnahme weibliche Mäuse: 8 – 46 Wochen). Für die statistische Auswertung der Linie PrP_syn wurde die unter CaM_syn aufgeführten Kontrollen herangezogen, da gleiche Linienzugehörigkeit bestand. Die Auswertung der Performance der PrP_syn Mäuse erfolgte mittels Student's t Test sowie eine Regressionsanalyse mittels ANOVA ohne Tendenzberechnung und ein Wert von $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant bewertet.

2.10.5.3 Geruchstest

Für den Geruchstest wurden Mäuse in eine Arena (92 cm x 92 cm) überführt, die automatisch die Bewegungsabläufe mit Hilfe von Sensoren (32 Sensoren pro Seite; Abstand 28 mm) erfasst (ActiMot, TSE, Bad Homburg). Die Auswertung der Laufbilder erfolgte mit Hilfe der zugehörigen ActiMot-Software. Für die Analyse wurden Mäuse am 1. Tag des Experimentes für 10 min käfigweise, dann für 5 min alleine an die Apparatur gewöhnt. Es folgten 2 Testtage, an welchen die Maus entweder für 10 min auf eine TMT (Trimethylthiazolin) -induzierte Angstreaktion oder im Kontroll-Experiment Wasser ausgesetzt wurde. Hierfür wurde ein Filterpapier (4 cm x 5 cm) mit 35 μ l Leitungswasser (Kontroll-Experiment) oder 35 μ m TMT (PheroTech, Delta, Kanada) in einer der Arena-Ecken gelegt. Die Filterpapier-Ecke und die Startecke der Mäuse wurden zufällig gewechselt um eine kognitive Vermeidung zu verhindern. In die Analyse wurden Mäuse der Linie **PrP_syn30** [*Transgen*: $n = 24$ (männlich: $n = 11$; weiblich: $n = 13$); *Kontrolle*: $n = 23$ (männlich: $n = 10$; weiblich: $n = 13$); Durchschnittsalter bei der Messung: 58 Wochen, verwendet. Nach diesem Test wurde zur Analyse der Reversibilität die Genexpression für ca. 21 Wochen abgeschaltet und der Test mit den Mäusen wiederholt; für diesen Test flossen alle bis auf 4 Kontroll-Mäuse (männlich $n = 2$; weiblich $n = 2$; da verstorben) ein. Ebenso wurde eine Gruppe analysiert, die von Geburt an mit Antibiotika behandelt wurde: *Transgen*: $n = 11$ (männlich: $n = 4$; weiblich: $n = 7$); *Kontrolle*: $n = 10$ (männlich: $n = 4$; weiblich: $n = 6$); Durchschnittsalter bei der Messung: 54 Wochen, und Mäuse der Linie **CaM_syn30** [*Transgen*: $n = 11$ (männlich: $n = 2$; weiblich $n = 9$); *Kontrolle*: $n = 13$ (männlich: $n = 5$; weiblich: $n = 8$); Durchschnittsalter bei der Messung: 57 Wochen. Von allen Mäusen wurde am Tag der Eingewöhnung das Gewicht erfasst. Die statistische Auswertung des Tests erfolgte mittels ANOVA. Ein Wert von $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

Die Analyse wurde unter ZP 4/02 und HG 4/06 durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt und entsprechend durchgeführt.

2.10.5.4 Visual Cliff und Radial Maze

Die Analyse des Arbeitsgedächtnisses erfolgte mit Hilfe eines 8-Arm-Radial Maze (Olton und Samuelson, 1976), in welchem die Tiere darauf trainiert werden, eine Futterbelohnung (Casein-Futterpellet), die sich am Ende der Arme befindet, einzusammeln. Hierfür wurde ein für jede Maus bestimmter Arm am Ende mit einem Futterpellet versehen und die Maus startete randomisiert an den 7 anderen Armen des Labyrinths (s. Abb. 24A, S. 85). Für die Analyse wurde die Dauer ausgewertet, die das Tier zum Erreichen des Futterpellets brauchte (ohne Maximaldauer), sowie

die Anzahl des Eintrittes in Fehlalarme, die nicht belohnt wurden (RME: reference memory error). Zur Steigerung der Motivation war das Futterpellet des Testes während der Testzeit die einzige Futterquelle. Übernacht wurde das Futter jedoch wie gewohnt *ad libitum* gereicht, wodurch eine Futterdeprivation mit einhergehender Gewichtsreduktion vermieden wurde. Die Tiere wurden zweimal für je 10 min an die Apparatur gewöhnt, wobei bereits hier beim 2. Durchgang das Futterpellet in den jeweiligen Futterarm gelegt wurde. Für den Test folgten je ca. 5 Durchgänge pro Tag an acht aufeinander folgenden Tagen, wobei zwischen den Durchgängen mindestens 30 min Pause lagen. Die Analyse wurde mit männlichen Mäusen der Linie **CaM_{syn}** und entsprechenden Kontrollmäusen [*Transgen*: $n = 6$; *Kontrolle*: $n = 7$; Durchschnittsalter: 58 Wochen] durchgeführt. Mit Hilfe einer Kamera (Sony; Model: DCR-TRV19E) wurden die Daten elektronisch aufgezeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA zur Erfassung einer Signifikanz der gemittelten Werte über den gesamten Zeitraum und mittels Student's *t* Test für die einzelnen Tage. Die Durchführung des Testes erfolgte nach Mitteilung an das Regierungspräsidium Tübingen (Mitteilung vom 01.03.2005). Um sicher zu stellen, dass alle Tiere über eine normale visuelle Intelligenz als Voraussetzung für eine vergleichende Analyse im Radial Maze verfügen, wurde vor dem Test ein Visual Cliff-Test durchgeführt (modifiziert nach Lione *et al.*, 1999). Hierfür wurden 2 gleich große Glasplatten auf einem Tisch so übereinander gelegt positioniert, dass sich eine Erhebung zwischen den Platten direkt an der Tischkante ergab, wodurch es zu einer visuellen Kante (Cliff) kam (s. Abb. 23A, S. 84). Die Kante wurde zum Schutz der Tiere mit transparentem Tesafilm abgeklebt und es ergab sich eine Gesamtfläche von 42 cm x 29 cm. Ca. 150 cm unter der über die Tischkante ragenden Glasplatte wurde eine 60W - Lampe positioniert, um den Eindruck des Cliffs zu verstärken. Die Mäuse wurden jeweils zentral platziert und für 5 min analysiert, ob es zu einer signifikanten (zeitlichen) Vermeidung der offenen Seite im Vergleich zur Tischseite kam. Die Statistik erfolgte mittels Student's *t*-Test und als signifikant wurde $p < 0,05$ betrachtet.

2.10.5.5 Morris Water Maze

Das Morris Water Maze Experiment zum Erfassen des räumlichen Lernens und Gedächtnisses wurde freundlicherweise von K. Mahesh (AG Prof. Dr. Winkler, Universität Regensburg), wie bereits beschrieben, durchgeführt (Winkler *et al.*, 2000). Die Testapparatur bestand aus einem runden Wasserbecken (Durchmesser: 12,5 cm), welches in 4 virtuelle Quadranten (NO, NW, SO, SW) eingeteilt wurde. Mit Hilfe visueller Landmarken lernen die Tiere durch räumliche Orientierung einer Plattform (mit konstanter Position) zu lokalisieren und so dem Wasser zu entkommen. Für das Training wurden die Mäuse an 5 aufeinander folgenden Tagen mit je 2 Durchgängen pro Tag an wechselnden Startpunkten in das Becken eingesetzt und mussten lernen, die 1 cm unter der Wasseroberfläche befindliche (verborgene) Plattform zu lokalisieren. Das Intertrial-Intervall betrug 240 sek. Dem Training folgte ein „Probe Trial“, in welchem die Plattform entfernt und die Zeit gemessen wurde, die die Mäuse im Zielquadranten mit der Suche verbringen, mit einem Durchgang einer Maximalsuchzeit von 60 sek. Ein weiterer Probe Trial wurde 7 Tage später zur Evaluierung des räumlichen Langzeitgedächtnisses (2 Durchgänge) durchgeführt. Um visumotorische Defizite ausschließen zu können, wurde darauf folgend die Plattformposition mit einem visuellen Reiz (bunte Fahne, aufragend, ca. 7 cm über der Wasseroberfläche) versehen und an 2 aufeinander folgenden Tagen mit je 2 Durchgängen die Zeit bis zur Auffindung der Plattform gemessen. Zur Evaluierung des Arbeitsgedächtnisses (Umsetzen einer zuvor erworbene Suchstrategie auf eine andere Position) wurde die sog. Switching-Strategie (strategy switching) eingesetzt, in welcher die Plattform von SW nach NO positioniert wurde und das Lernverhalten in weiteren 4 Durchgängen von je 60 sek erfasst. Für den Test wurden weibliche Mäuse der Linie **CaM_{syn}** (*Transgen*: $n = 4$; *Kontrolle*: $n = 4$) herangezogen. Die Werte wurden gemittelt und die Statistik erfolgte mittels ANOVA; mit $p < 0.05$ als Signifikanzgrenze.

2.11 Molekular- und Proteinbiochemische Methoden

Soweit nicht anderweitig angegeben, basierte die jeweilige Methodik auf Sambrook *et al.* (1989).

2.11.1 Isolation von DNA, RNA, Gesamtprotein

2.11.1.1 Isolation und Konzentrationsbestimmung von genomischer DNA aus Mausgewebe

Für die Genotypisierung wurden Mäuse mit Isofluran betäubt und ca. 0,5 cm der Schwanzspitze (Tail) mit Hilfe eines Skalpells abgetrennt. Der Proteinverdau erfolgte über Nacht bei 55°C, 400 UpM in 700 µl Proteinase K-Puffer (250 µg Proteinase K in Tail-Buffer) und die Aussalzung durch Zugabe von 300 µl 5 M gesättigter NaCl-Lösung in einer 10 min Inkubation auf Eis. Durch wiederholte Zentrifugation (10 min, 12.000 UpM, 4°C) erfolgte die Abtrennung von Geweberesten. Der mitpräparierte RNA-Anteil wurde durch Zugabe von 40 µg RNase A für 10 min bei 37°C entfernt und die DNA durch Zugabe von 1 ml Isopropanol mit einer Inkubation für 20 min auf Eis gefällt. Die Sedimentation der DNA erfolgte durch Zentrifugation (30 min, 12.000 UpM, 4°C). Nach einem Waschschrift (80% (v/v) Ethanol) wurde die Tail-DNA bei 31°C getrocknet und das Sediment in 100 µl TE aufgenommen. Eine DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch mit einer Verdünnung von 1:50 in TE.

2.11.1.2 Isolation und Konzentrationsbestimmung von Gesamt-RNA aus Maus-Hirngewebe

Die Präparation erfolgte gemäß der Anweisung der Firma Qiagen je nach eingesetzter Gewebemenge mit dem RNeasy Mini Kit bzw. RNeasy Midi Kit. Für die Bestimmung der Konzentration wurde die RNA 1:50 in DEPC-H₂O verdünnt und photometrisch gemessen.

2.11.1.3 Isolation und Konzentrationsbestimmung von Gesamtprotein aus Gewebe

Für die Extraktion wurde das Gewebe mit entweder 1 ml (Leber, Gesamthirn) oder 0,5 ml (Muskel, Niere, Herz, Ovar, Testis, verschiedene Hirn-Subregionen) TES-complete versetzt und mit Hilfe eines Gewebehomogenisators (Ultra Turrax) bei 30.000 UpM für 30 sek zerkleinert. Nach Zugabe des Detergenz (Nonidet NP-40) und einer Inkubation von mind. 20 min auf Eis folgten zwei Zentrifugationsschritte (je 20 min, 20.000 g, 4°C) zur Reinigung des Proteinlysates, das nachfolgend mit 10% (v/v) Glycerin versetzt bei -80°C gelagert wurde. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Diese Methode nutzt die Eigenschaft von Coomassie brilliant blue G-250 bei Bindung an Proteinen das Absorptionsmaximum von 465 nm ohne Protein zu 595nm mit Protein zu verschieben. Hierfür wurde das Proteinlysat mit aqua_{bidest} auf 800 µl verdünnt und mit 200 µl Färbereagenz (Protein Assay Dye Reagent Concentrate; BioRad) versetzt. Der Proteingehalt wurde im Vergleich zu einer RSA-Eichkurve bekannter Konzentration (Proteinstandard II; BioRad) bestimmt.

2.11.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

Für die Amplifikation wurde zu je 1 µl der isolierten Tail-DNA (ca. 200 ng) 10 pM Oligonukleotide (tTA-807 und tTA-1006 bzw. pTRE-F und pTRE-R) 0,16 µM dNTPs, 1x Reaktionspuffer (mit 15 mM MgCl₂; Genecraft, Biotherm, Münster, D) 1 E Taq-Polymerase und im Falle der pTRE-Oligonukleotide zusätzlich noch 1x Q-Solution (Qiagen) zugesetzt. PCR-Programm: 1x 4 min 94°C; 35x [30 sek 94°C, 1 min 55°C, 1 min 72°C]; 1x 6 min 72°C.

2.11.3 Elektrophorese

2.11.3.1 Agarosegelelektrophorese

Zur Genotypisierung wurden die amplifizierten DNA-Proben in 1,5 % Agarose-Gelen aufgetrennt. Für die Gele wurde als Laufpuffer TBE (0,1 M Tris, 0,1 M Borsäure, 2 mM EDTA pH 8,0) verwendet. Zum Sichtbarmachen der DNA wurde dem Agarose-Gel 1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt und das Gel auf einem UV-Tisch betrachtet. Eine Visualisierung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Biostep Systems für Dokumentation (Biostep, Jahnsdorf, D) und der Argus X1-Software, um die Digital-Kamera zu steuern.

2.11.3.2 SDS-PAGE

Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli (1976) verwendet. Das Trenngel (6,8 x 8,5 cm) wurde in Abhängigkeit zum Molekulargewicht der Protein 10% - 17% [x % (w/v) Acrylamid/Methylenbisacrylamid (29:1); 0,1 % (w/v) SDS; 0,375 M Tris-HCl pH 8,8] gegossen und von einem 5% Sammelgel (5 % (w/v) Acrylamid; 0,1 % (w/v) Methylenbisacrylamid; 0,1 % (w/v) SDS; 0,125 M Tris-HCl pH 6,8) überschichtet. Auf den Randspuren wurden der vorgefärbte Proteinstandard (Multimark) aufgetragen.

2.11.4 Immunologische Methoden

2.11.4.1 Western Blot Analyse (WBA)

Mit Hilfe einer Tank-Blot Apparatur (Serva) wurden die Proteine des SDS-Gels entweder über Nacht (35V, 4°C) oder innerhalb von 2 Stunden (70V, 4°C) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die nachfolgenden Schritte wurden auf einem Taumeltisch durchgeführt. Vor der Reaktion des Blots mit dem Primär-Antikörper (Primär-Ak) wurden die freien Proteinbindungsstellen der Membran mit einem Blocker [4% (w/v) SlimFast Vanille] abgesättigt. Nach Inkubation mit dem Primär-Ak (Tabelle 7) über Nacht oder für 1,5h bei Raumtemperatur folgte auf das Waschen mit TBST (4 x 15 min) und die Inkubation mit einem Peroxidasegekoppelten Sekundär-Ak, welcher gegen den Wirt des Primär-Ak gerichtet ist (Tabelle 8). Die Detektion erfolgte mittels ECL-Reaktion (Oxidation von Luminol) nach Anleitung des Herstellers (Amersham). Für die Neudetektion derselben Membran mit einem anderen Ak (bspw. zur Ladekontrolle) wurde diese für zweimal für 10 min in 25 mM Glycin pH 2,0 / 1 % SDS inkubiert und mit TBST gewaschen (2 x 15 min). Für die Bestimmung der optischen Dichte der Proteinbanden zur Erfassung der relativen Expression wurde die Image-Quant 5.0 Software (Amersham) verwendet.

2.11.4.2 Dot-Blot

Die Etablierung eines geeigneten Dot-Blots zum Nachweis von α -Syn immunpositiven Aggregaten erfolgte in freundlicher Zusammenarbeit mit Dr. L. Stoltze (Hertie-Institut; Universität Tübingen). Die präparierten Maus-Hirngewebe wurden mit PBS in einer finalen Konzentration von 10% (v/v) (und ohne Zusatz von SDS) homogenisiert. Nach Aktivierung der Nitrozellulosemembran (MAIPN4510r, Millipore; 0,45 μ m) mit 70% (v/v) Ethanol und Waschen mit PBS wurde die Proben (180 μ l einer 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , und 10^{-5} -Verdünnung, wobei die Verdünnung von 10^{-2} etwa einem Probenauftragsvolumen von 200 ng entsprach) unter Vakuum (VacuPette; Millipore) auf die mit der Nitrozellulosemembran versehene 96-Well-Platte (MAIPN4510r, Millipore, s.o.) übertragen und mittels Hitze (50°C, 1h) an diese fixiert. Nach Erzeugen einer erneuten „Durchlässigkeit“ durch einen Waschschriff mit 0,5 % Triton X-100 versetztes PBS wurden überschüssige Proteinbindungsstellen mit Superblock (Pierce) für 30 min gesättigt und die Membran mit dem Primär-Ak [15G7; 1:5; verdünnt in PBS mit Zusatz von 0.1% Tween-20 und 0,1 % Milchpulver (Naturaflor)] für 1h bei RT auf dem Taumeltisch inkubiert. Nach Dekantieren des Primär-Ak folgten auf Waschschriffen (5x mit PBS/0,1 % Tween-20-Gemisch) die Inkubation mit HRP-gekoppelten Sekundär-Ak (anti-Ratte; 1:3000) für 1h auf dem Taumeltisch, bei RT. Nach 7 weiteren Waschschriffen (PBS/0,1% Tween-20) wurde die Platte luftgetrocknet und es folgte die Detektion mit Hilfe des AEC-Reagenzes (A-5754; Sigma), nach Anleitung des Herstellers für 15 min auf einem Taumeltisch) und Abstoppen der Reaktion mit aqua_{bidest.} Die Auswertung erfolgte binokular-mikroskopisch. Die Analyse auf Aggregate erfolgte mit Mäusen der Linie **CaM_syn** (Transgen: 13 Monate und männlich; 26 Monate und weiblich; Kontrolle: 26 Monate: 1 männliche und 1 weibliche Maus) sowie mit Positiv-Kontrollen (**Thy-[A30P] α -Syn**: 3 weibliche Mäuse: 5, 10, 18 Monate) und **humanen post-mortem Hirngewebe** eines DLB-Patienten (Positiv-Kontrolle) und eines gesunden Menschen (Negativ-Kontrolle).

2.11.4.3 Immunhistochemie

2.11.4.3.1 Paraffinschnitte und DAB-Färbung

Mäuse wurden nach der tiefen Anästhesierung mit CO₂ mit 4% PFA transkardial perfundiert und das Gehirn über Nacht in 4% PFA post-fixiert. Die Dehydrierung und Überführung in Paraffin erfolgte in einem Gewebe-Einbettkarussell (Leica TP 1050) für je 1,5h (Ethanol: 1x 70%, 2x 96%, 3x 100%; danach in: 3x Xylol; 3x Paraffin, 60°C). 7-µm-Paraffinschnitte wurden nach Rehydrierung über eine absteigende Alkoholreihe optional zur Verstärkung der Antigenität Mikrowellen-behandelt (3 x 5 min in Citratpuffer) und nach Abkühlen auf RT 2x mit PBS gewaschen. Das Blockieren der endogenen Peroxidase (die im letzten Färbeschritt unspezifische Reaktionen auslösen kann) erfolgte mittels 0,3 % Wasserstoffperoxid in aqua_{bidest} für 20 min. Nach drei weiteren Waschschritten (zweimal 5 min in PBS, einmal 5 min in PBS^{Brij}) wurden unspezifische Bindungskapazitäten mit Blockierungslösung [5 % Normalserum (Wirt des sekundären Ak), 0,3 % Triton X-100 in PBS] geblockt und es folgte die Inkubation mit Primär-Ak (Tabelle 7) über Nacht (ca. 16h) oder für 2-3h bei RT in einer feuchten Kammer. Nach erneutem Waschen mit PBS^{Brij} wurden die Schnitte mit biotinylierten sekundären Ak inkubiert (1h bei RT). Nach Waschen mit PBS^{Brij} wurden die Sektionen in Avidin-Biotin-Komplex (gekoppelt mit Peroxidase) nach Angaben des Herstellers (Vector) für 1 h inkubiert, mit PBS^{Brij} gewaschen und abschließend mit Diaminobenzidin (DAB; *SigmaFast*; Sigma) detektiert, wobei die Farbreaktion nach ca. 7-15 min mit aqua_{bidest} gestoppt wurde. Es folgte optional eine leichte Gegenfärbung mit Hämatoxinilin (40 sek Mayer's Hämalaunlösung; Merck; 20 sek Entfärben in 70% Ethanol/0,1 % HCl; 10 min bläuen unter fließend Leitungswasser). Die Sektionen wurden anschließend dehydriert und mit CV Mount (Leica) eingedeckelt.

2.11.4.3.2 Vibratomschnitte und DAB-Färbung

Für die detaillierte lichtmikroskopische Analyse wurden PFA-fixierte Gehirne in einem Behältnis mit 63°C warmer 3% Agarose in PBS ausgegossen und mit Hilfe einer Schneideapparatur in 6 koronale Blöcke unterteilt [2 mm Bulbuspitze; 4 mm Bulbussockel; 2,5 mm Vorderhirn; 3,5 mm Mittelhirn-Bereich, einschließlich der Hippokampus-Region; 3,5 mm Kleinhirnregion; 3 mm Resthirn (Hirnstamm und Rückenmark)]. Die einzelnen Blöcke wurden mit Hilfe eines Vibratoms weiter in 50-µm-dicke Schnitte unterteilt. Die weiteren Färbeschritte erfolgten modifiziert nach Petrasch-Parwez *et al.*, 2007. Nach Reduktion freier Aldehydgruppen in 1% Natriumborhydrid in PBS wurden die Schnitte mit Phenylhydrazin (zum Blockieren der endogenen Peroxidase; 10 % Normalserum; 0,3 % Triton X-100; 0,05 % Phenylhydrazin) in PBS vorinkubiert und anschließend mit Primär-Ak [Primär-Ak; Tabelle 7; in 10 % Normalserum (Ausnahme 15G7-Ak: hier 5% Normales Kaninchenserum); 0,3% Triton X-100; 0,1 % Natriumazid] für 48h bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (je 10 min) wurden die Schnitte nach einer 60 min Inkubation in PBS-A-Lösung (2 mg/ml RSA in PBS) mit Sekundär-Ak (Tabelle 8), in 2% RSA, für 18h bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligen Waschen mit PBS (15 min, 20 min) wurden die Sektionen mit ABC-Peroxidase-Komplex (1:1000; Vector) inkubiert und nach zweimaligen Waschen mit PBS (je 20 min) abschließend mit DAB visualisiert. Die Reaktion wurde nach ca. 15 min mit aqua_{bidest} gestoppt.

2.11.4.3 Gefrierschnitte und Doppel-Fluoreszenzfärbung

Für die Erstellung von Gefrierschnitten wurden fixierte Maushirne bis zu ihrem Absinken in 30% D-Saccharose in PBS (ca. 2-3 Tage) inkubiert, gefroren und 20-µm-dicke koronale Schnitte angefertigt. Aufgezogene Schnitte wurden in freundlicher Zusammenarbeit mit PD Dr. M. Fendt (Abt. für Tierphysiologie, Universität Tübingen) oder „free-floating“ mit Prof. Dr. S. von Hörsten (Abt. für Experimentelle Therapie, Universität Erlangen) für Doppelimmunfluoreszenz-Studien gefärbt bzw. abgelichtet (s. 12.3.5). Die Sektionen wurden hierfür nach der Inkubation in Blocklösung (10% Normales Eselsserum (NES); 0,3% Triton X-100) mit 15G7-Ak für 18h inkubiert, dreimal mit PBS (je 5 min) gewaschen und mit anti-Tyrosin-Hydroxylase (TH)-Ak für

weitere 18h inkubiert. Die Sektionen wurden wiederum mit PBS gewaschen, dann mit Cy2-gekoppelten anti-Kaninchen-Ak (1:200 in 10% NES; 0,3 % Triton X-100 in PBS) erneut gewaschen und mit Cy3-gekoppelten anti-Ratte-Ak (1:200 in 10% NES; 0,3 % Triton X-100 in PBS) inkubiert. Optional wurde eine DAPI-Kernfärbung nach Anleitung des Herstellers (Roche) durchgeführt. Nach Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit *Vectashield-DAPI Mounting-Medium* (Vector) eingedeckelt. Gefrierschnitte wurden von Mäusen der Linie **CaM_{syn}** (*Transgen*: 10 Monate männlich, 14 Monate weiblich; *Kontrolle*: 19 Monate männlich) und **PrP_{syn30}** (*Transgen*: 16 und 17 Monate, weiblich, 16 Monate männlich; *Kontrolle*: 16 Monate weiblich) vorgenommen.

2.11.4.4 Pre-embedding Elektronen-Mikroskopie

Die Anfertigung von gefärbten Vibratonschnitten für die Elektronenmikroskopie sowie die Elektronenmikroskopie wurde in freundlicher Zusammenarbeit mit Dr. P. Petrasch-Parwez (Inst. für Neuroanatomie und molekulare Hirnforschung, Universität Bochum) vorgenommen. Die Färbung der Vibratonschnitte erfolgte wie unter 12.3.3 beschrieben, jedoch ohne den Zusatz von Triton X-100. Zunächst wurden die DAB-gefärbten Schnitte vorübergehend wässrig eingedeckelt und fotodokumentiert. Anschließend folgte die Nachfixierung mit 2 % Osmiumtetroxid und nach dreimaligem Waschen in PBS (je 20 min) die Dehydrierung über eine aufsteigende Ethanolreihe und Propylenoxid und das Einbetten in Araldit (Serva). Nach Aushärtung des Harzes wurden Semidünn-Schnitte (0,75 µm) angefertigt, mit 1% Toluidin-Blau (nach ROMEIS; 1989) gefärbt und von lichtmikroskopisch ausgewählte Regionen wurden im weiteren Ultradünn-Schnitte (100 nm) angefertigt. Ultradünnschnitte wurden mittels 5 %iger wässrigen Uranylacetat-Lösung und Bleicitrat kontrastiert mit aqua_{bidest} gespült und getrocknet. Für die ultrastrukturelle Analyse wurden Mäuse der Linie **CaM_{syn}** [alle männlich: *Transgen*: $n = 5$ (9 Monate, 10 Monate, 2x 20 Monate, 21 Monate); *Kontrolle*: $n = 4$ (9 Monate, 14 Monate männlich, 2x 20 Monate); *Behandelt-Transgen*: $n = 4$ (7 Monate on – 2 Monate off; 7 Monate on – 7 Monate off; 2x 20 Monate Gene-off von Geburt an) sowie **PrP_{syn30}** [*Transgen*: $n = 3$ (13 Monate, weiblich; 14 Monate weiblich, 16 Monate männlich; *Kontrolle*: 13 Monate weiblich; 23 Monate männlich); *Behandelt- Transgen*: 14 Monate Gen an – 5 Monate Gene-off] verwendet.

2.12. Licht-und Elektronenmikroskopische Auswertung

Die Fotodokumentation der Paraffin- und Vibratonschnitte für die Lichtmikroskopie erfolgte mittels eines Axioplan 2 imaging-Mikroskops, Axio Vision 4.3 Software und AxioCaMHR-Kamera (Zeiss). Die Fotodokumentation der Gefrierschnitte für die Doppelt-Immunfluoreszenz mittels Eclipse 80i-Mikroskops, mit Software Stereo Investigator (MicroBrightField, VT, USA) und DS-5Mc Kamera und die der Ultradünnschnitte mit Hilfe Philips EM 420 mit DITABIS (Digital Biomedical Imaging System) (siehe auch: 10. Mikroskope).

2.13. Microarray-Analyse

Die Qualitätsanalyse der isolierten RNA (s. 2.11.1.2) wurde mit Hilfe des RNA 6000 Nano Assay Kit (Agilent Technologies, CA, USA) überprüft. Die darauf folgenden Schritte wurde in Zusammenarbeit mit der Microarray-Facility-Tübingen (Dr. Bonin) durchgeführt: Die RNA wurde mittels RT- (Reverse Transkriptase) PCR unter Verwendung von T7-Oligo-Primern in cDNA umgeschrieben, die wiederum als Matrize für die Synthese der cRNA diente. Für die Markierung der cRNA wurden Biotin-markierte Ribonukleotide eingesetzt. Die so entstandene cRNA war komplementär zur ursprünglich isolierten RNA. Die biotinylierte cRNA wurde fragmentiert und nach Angaben des Herstellers hybridisiert (Affymetrix; SC; USA). Der Signalnachweis erfolgte durch Phycoerythrin-gekoppeltes Streptavidin und einem biotin-markierten anti-Streptavidin-Ak und die Detektion mit einem konfokalen Laserscanner (GeneChip[®] Scanner 3000; Affymetrix). Die Analyse wurde mit Hilfe der „GloS 1.4“ Software (Affymetrix) und der „Array Assist 4.0“ Software (Stratagene) vorgenommen. Hybridisiert wurde auf einem GeneChip Mouse Genome 430A 2.0 Array (22.600 Transkripte). Die unterschiedliche Expression wurde mit Hilfe des Signal Log Ratios (SLR) für paarweise Vergleiche ausgedrückt. Gene mit einer SLF von größer 0,6 bzw.

weniger 0,6 ($\pm 1,5$ fach), verbunden mit einem $p \leq 0,05$ wurden als signifikant reguliert betrachtet. Für die Microarray-Analyse wurden die Gewebe von je 3 tg männlichen Mäusen mit 3 entsprechenden Kontroll-Mäusen verglichen. Für die Microarray-Analyse wurden Mäuse der Linie **CaM_syn30** (*Transgen*: $n = 3$; *Kontrolle*: $n = 3$; Alter: 13 Wochen; Analyse auf Genexpression im Bulbus olfactorius), **CaM_syn** (*Transgen*: $n = 3$; *Kontrolle*: $n = 3$; Alter: 13 Wochen; Analyse auf Genexpression im Gesamthirn) sowie **Thy-[A30P] α -syn** (*Transgen*: $n = 3$; Alter: 13 Wochen) verwendet.

2.14 Neurogenese-Analyse

Die Analyse der Neurogenese erfolgte in freundlicher Zusammenarbeit mit Dr. Beate Winner (AG Prof. Dr. Winkler; Universität Regensburg). Für die Analyse wurden Mäuse der Linie **CaM_syn** [*Transgen*: $n = 5$, *Kontrolle*: $n = 5$; *Behandelt-Transgen*: $n = 7$ (Gen an: 16 Wochen – 8 Wochen Gen aus; *Behandelt-Kontrolle*: $n = 4$ (Gen an: 16 Wochen – 8 Wochen Gen aus))] analysiert. Im Alter von 20 Wochen wurden die Mäuse an 5 aufeinander folgenden Tagen mit Bromodeoxyuridin (BrdU; 50 mg/kg; Sigma) intraperitoneal injiziert und 4 Wochen später für die Analyse präpariert. Immunhistochemie und Doppelt-Immunfluoreszenz wurde mit Ak gegen BrdU, Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), Doublecortin (DCX) sowie NeuN durchgeführt und die Quantifizierung positiver Zellen erfolgte nach der Methode von Winner *et al.* (2004). Für die Statistik wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (one-way ANOVA) sowie eine post hoc Bonferroni-Korrektur (PRISM, Graph Pad Software, USA) angewendet und ein $p < 0,05$ als signifikant betrachtet.

2.15 Analyse der mitochondrialen Funktion

Für die mitochondriale Funktionsanalyse wurden die Mäuse mittels Genickbruch getötet und das präparierte Gehirn in Subregionen unterteilt: Für die Linie **PrP_syn 30** [*Transgen*: $n = 9$ (männlich: 4; weiblich: 5), Durchschnittsalter: 115 Wochen; *Kontrolle*: $n = 4$ (männlich: 1; weiblich: 3) Durchschnittsalter: 115 Wochen; *Behandelt-Transgen*: $n = 8$ (männlich: 3; weiblich: 5), Durchschnittsalter: 119 Wochen (Gen an: 59 Wochen – 60 Wochen Gen aus) und *Behandelt-Kontrolle* (ein Männchen) Alter: 119 Wochen (Gen an: 59 Wochen – 60 Wochen Gen aus)] wurde das Gehirn in Bulbus olfactorius und Resthirn unterteilt und für die Linie **CaM_syn** [*Transgen*: $n = 5$ (3 männlich; 2 weiblich); Durchschnittsalter: 70 Wochen; *Gene-off*: *Geburt*: *Behandelt-Transgen*: $n = 5$ (männlich: 2; weiblich: 3), Durchschnittsalter: 70 Wochen; *Behandelt-Kontrolle*: $n = 3$ (männlich: 1; weiblich: 2); Alter: 68 Wochen] wurde das Gehirn in Bulbus olfactorius, Substantia nigra, Striatum und Resthirn unterteilt.

Die Analyse der mitochondrialen Funktion erfolgte in freundlicher Zusammenarbeit mit Dr. Gellerich (KeyNeurotek AG, Magdeburg). Die Isolation der Gehirnmitochondrien und die respiratorischen Messungen wurden wie in Gizatullina *et al.* (2005) beschrieben, durchgeführt. Die Gehirnmitochondrien wurden mittels eines Isolationsmediums (225 mM Mannitol, 75 mM Sucrose, 20 mM MOPS (pH 7,2), 1 mM EGTA, 1% (v/v) RSA) und verschiedenen Zentrifugationsschritten sedimentiert und resuspendiert. Für die Analyse der Bulbusmitochondrien wurden diese aufgrund der geringen Gewebemenge homogenisiert und 1:10 in Isolationsmedium (120 mM Mannitol, 40 mM MOPS, 5 mM Pi, 60 mM KCl, 01 mM EGTA (pH 7,4)) aufgenommen. Die Messung des Sauerstoffverbrauches der isolierten Mitochondrien wurde mit Hilfe eines geschlossenen Respirometers (Oroboros Oxygraph®; Anton Paar; Österreich) als unabhängige Zweifachbestimmung durchgeführt. Hierbei wird durch zwei Sauerstoffsensoren (Platin-Kathode und eine Silber-Anode) die Sauerstoffkonzentration in 2 Messkammern erfasst. Die Sensoren sind von einer sauerstoffdurchlässigen Membran umgeben, durch die der verbrauchte Sauerstoff diffundieren und an der Kathode reduziert werden kann. Dabei ist der gemessene Stromfluss der Sauerstoffkonzentration proportional. Die Daten wurden mit Hilfe der zugehörigen DATGRAPH-Software ausgewertet und grafisch in Bezug auf das Nassgewicht der Probe ($\text{nmolO}_2/\text{min}/\text{mg}$ Probe) dargestellt. Die Messung basiert auf der Tatsache, dass die Atmungsgeschwindigkeit der Mitochondrien durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden kann, wodurch sich 5 separate Zustände definieren lassen (Chance und Williams, 1955a-d):

State 1: O ₂ -Überschuss:	Limitation durch ADP und Substrat
State 2: O ₂ -, ADP-Überschuss:	Limitation durch Substrat
State 3: O ₂ -, ADP- und Substratüberschuss:	Maximalgeschwindigkeit der Atmungskette
State 4: O ₂ -, Substrat-Überschuss:	Limitation durch ADP
State 5: ADP-, Substrat-Überschuss	Limitation durch O ₂

Durch die Kombination verschiedener Substrate und Hemmstoffe kann die Atmungskette an definierten Stellen unterbrochen und so gezeigt werden, bei welchem Enzym der Kette eine Dysfunktion vorliegt (Tabelle 9):

Tabelle 9
Hemmstoffe der mitochondrialen Atmungskette (Sperl, 1997)

<i>Enzym</i>	<i>Inhibitor</i>
Komplex I	Barbiturate, Rotenon
Komplex II	Malonat
Komplex III	Antimyzin A
Komplex IV	CO, HCN, H ₂ S
F₀/F₁-ATPase	Oligomycin
Adenin-Nukleotid-Translokator	Atractylat

Der respiratorische Kontrollquotient (RCI; Svatkova *et al.*, 1996) quantifiziert dabei die Kopplung zwischen Substratoxidation und ATP-Bildung:

$$RCI = \frac{\text{State 3 Atmung}}{\text{State 4 Atmung}}$$

Der RCI ist ein Maß für die Kopplung der oxidativen Phosphorylierung und gibt Auskunft über die Funktionsfähigkeit der mitochondrialen Innenmembran. Ist diese geschädigt, so fließen Protonen zurück in den Matrixraum und es kommt zur Substratoxidation ohne darauf folgende ATP-Synthese. Daher ist ein kleiner Zahlenwert mit einer starken mitochondriale Schädigung verbunden. Für die Analyse der Komplex-I-Aktivität wurde entsprechend ADP, Succinat und Rotenon den isolierten Mitochondrien zugesetzt.

Für die Analyse auf erhöhten oxidativen Stress in den Zellen wurde bestimmt, bei welcher Ca²⁺-Konzentration Mitochondrien, basierend auf dem Öffnen der PTP (Permeability Transition Pore), anschwellen. Dies wurde spektrophotometrisch erreicht, da diese mitochondriale Form den Lichteinfall bei 520 nm vermindert. Die Messung erfolgte wie bereits beschrieben (Gizatullina *et al.*, 2005).

2.16 HPLC-Analysen des Neurotransmittergehaltes

Für die quantitative Analyse der DA- und Serotonin-Konzentration sowie der zugehörigen Metaboliten DOPAC (3,4-dihydroxyphenylacetic acid), HVA (homovanillic acid) und 5'-HIAA (5-hydroxyindolacetic acid), wurden Mäuse dekapitiert, das Gehirn auf einer Eis-gekühlten Platte präpariert und subregional unterteilt (Bulbus olfactorius, Striatum, Substantia nigra, Resthirn). Die Messung des Neurotransmittergehaltes erfolgte in freundlicher Zusammenarbeit mit Dr. P. Teismann (Inst. of Medical Sciences, University of Aberdeen, Schottland). Pro mg Probennassgewicht wurden 20 µl 0,1 M Perchlorsäure zugegeben, das Gewebe sonifiziert und anschließend Gewebereste durch Zentrifugation (23.000 g, 30 min, 4°C) sedimentiert. 20 µl des Überstandes wurden in eine HPLC-Anlage auf eine C18-Reverse-Phase HR-80 Catecholamin Säule (ESA, Bedford, USA) injiziert. Als mobile Phase diente Elutionspuffer (9 Teile 50 mM NaAcetat, 35 mM Zitronensäure, 1 Teil Methanol, 105 mg/l Oktan-Sulfonsäure, 45 mg/l NaEDTA) bei einer Flussrate von 1 ml/min. Chromatogramm-Peaks wurden mittels eines ED50-Elektrochemischen Detektors (Dionex, Germering, D) erfasst. Die statistische Analyse erfolgte

mittels eines Student's t-Test für gepaarte Vergleiche und einer *post hoc* Newman Keuls Korrektur, mit $p < 0.05$ als Signifikanzgrenze. Die HPLC-Analyse wurde mit Mäusen folgender Linien durchgeführt:

CaM_syn: Mittleres Alter: [Transgen: n = 10 (männlich: 3; weiblich: 7) Durchschnittsalter: 60 Wochen; Kontrolle: n = 6 (männlich: 3; weiblich: 3) Durchschnittsalter 61 Wochen]

Hohes Alter: [Transgen: n = 6 (männlich: 1, weiblich: 5) Durchschnittsalter: 102 Wochen; Kontrolle: n = 8 (männlich: 2; weiblich: 6) Durchschnittsalter: 106 Wochen; Behandelt-Transgen: n = 4 (männlich: 2; weiblich: 2) Durchschnittsalter: 96 Wochen (Gen an: 57 Wochen – 39 Wochen Gene-off); Behandelt-Kontrolle: n = 5 (männlich: 3; weiblich: 2) Durchschnittsalter: 97 Wochen (Gen an: 58 Wochen – 39 Wochen Gene-off)]

CaM_syn1 [Transgen: n = 4 (alle männlich); Durchschnittsalter: 60 Wochen; Kontrolle: n = 4 (alle männlich) Durchschnittsalter: 60 Wochen; Behandelt-Transgen: n = 4 (männlich: 1; weiblich: 3) Alter: 52 Wochen; Behandelt-Kontrolle: n = 4 (alle weiblich) Alter: 52 Wochen; Behandlung ab Geburt]

PrP_syn: Mittleres Alter: [Transgen: n = 4 (alle weiblich) Alter: 36 Wochen; Kontrolle: n = 4 (alle weiblich) Alter: 38 Wochen]. **Hohes Alter:** [Transgen: n = 4 (alle männlich) Alter: 97 Wochen; Behandelt-Transgen: n = 4 (alle männlich) Alter: 94 Wochen (Gen an: 80 Wochen – 14 Wochen Gene-off)]

PrP_syn30 [Transgen: n = 4 (männlich: 1; weiblich: 3); Alter: 38 Wochen; Kontrolle: n = 4 (männlich: 1; weiblich: 3); Alter: 35 Wochen; Behandelt-Transgen: n = 4 (männlich: 1; weiblich: 3) Durchschnittsalter: 79 (Gen an: 58 Wochen – 21 Wochen Gen aus); Behandelt-Kontrolle n = 4 (männlich: 1; weiblich: 3) Durchschnittsalter: 77 Wochen (Gen an: 56 Wochen – 21 Wochen Gen aus)]

CaM_syn30 [Transgen: n = 4 (männlich: 2; weiblich: 2); Durchschnittsalter: 108 Wochen; Kontrolle: n = 4 (männlich: 2; weiblich: 2); Durchschnittsalter: 113 Wochen]

2.17 microPET-Analyse

Mit Hilfe dieser nicht invasiven molekularen Bildgebung kann die Integrität des dopaminergen Systems, bspw. durch Messung des Bindungspotenzials des Dopamintransporters via [^{11}C] d-threo-methylphenidate (^{11}C -MP) dargestellt werden. Für die microPET-Analyse, die in enger Kooperation mit Dr. B. Pichler (Radiologie, Universität Tübingen) stattfand, wurden Mäuse mittels Äther betäubt und ein intravenöser 30G-Katheder in die Schwanzvene eingeführt. Während der dynamischen Messung (microPET FOCUS 120 Scanner; Siemens) wurde der Tracer, dessen Volumen (ca. 25-100 μl) abhängig von der spezifischen Aktivität und der individuellen Synthese war, über die Schwanzvene appliziert. Die Synthese der Tracer erfolgte in freundlicher Zusammenarbeit mit Prof. Dr. H.J. Machulla (Radiologie, Universität Tübingen). ^{11}C -MP (^{11}C : Halbwertszeit: ca. 20 min) wurde mittels einer Alkylierungsreaktion aus ^{11}C -Methyliodid synthetisiert und die ^{11}C -Markierung des Methylphenidates wurde mit Hilfe eines PET-Tracer-Generators erreicht (GE Healthcare, Münster, D). Die Zeit der Synthese betrug ca. 60 min mit einer finalen spezifischen Aktivität von 75 - 140 GBq/ μmol . Die durchschnittlich injizierte Aktivität von ^{11}C -MP betrug 22 ± 18 MBq, was einem Trägergehalt von ca. 959 ± 1276 pmol und einem Maximum < 5445 pmol entsprach, letzteres war zur Vermeidung von Sättigungseffekten wichtig. Durch die Gabe des Radiopharmakons mit hoher spezifischer Aktivität und der zusätzlichen Gabe von unmarkierter Substanz lässt sich die DAT-Konzentration (B_{max}) und die Dissoziationskonstante (K_d) im Equilibrium bestimmen. Das Bindungspotenzial (BP) ist äquivalent zu B_{max}/K_d und entspricht dem Quotienten der Geschwindigkeitskonstanten, welche die Bindung und Dissoziation vom Transporter beschreiben. Um auf eine arterielle Imputinformation verzichten zu können, wurde das Kleinhirn als Referenzregion (ähnlicher Blutfluss, keine DAT) verwendet und für die Berechnung des freien Tracergehaltes herangezogen und das spezifische Bindungspotenzial (BP') mit Hilfe des Logan-Plot-Methodik (Logan, 2000) berechnet. Als Rekonstruktionsmethode diente die 3D gefilterte Rückprojektion mit einer Matrix von 128 x 128 Bildpunkten und einem 3fach Zoom. Die zu analysierende Region (ROI: region of interest) des Striatums wurde manuell erfasst (AsiPro Software, Siemens), mit einem (stereotaktischen) Mäuseatlas (Paxinos *et al.*, 2006) abgeglichen und auf alle getesteten Mäuse übertragen. Zur

quantitativen Analyse wurden ROIs des Striatums und des Kleinhirns erfasst, um Zeit-Aktivitätskurven (TACs: time activity curves) zu erstellen.

Die statistische Auswertung des BP erfolgte mit Hilfe des Student's *t*-Test und One-way-ANOVA zur Berechnung der Signifikanz für CaM_syn, Kontrolle und Gene-off-CaM_syn und für die Power-Analyse wurde ein Alpha von 0,05 und eine Power von 0,08 festgelegt. Die Grenze der Signifikanz lag bei $p < 0,05$.

Für die microPET-Analyse wurden Mäuse der Linie **CaM_syn** [¹¹C-MP: Transgen: n= 5 (männlich: 2; weiblich: 3), Durchschnittsalter: 88 Wochen; Kontrolle: n= 7 (männlich:3; weiblich: 4), Durchschnittsalter: 89 Wochen; Behandelt-Transgen: n= 3 (alle männlich), Durchschnittsalter: 77 Wochen; ¹¹C-RP: Transgen: n = 4 (männlich: 3; weiblich: 1); Durchschnittsalter: 77 Wochen; Kontrolle: n = 3 (alle männlich), Durchschnittsalter: 81 Wochen]

3 Ergebnisse

3.1 Expressionsmuster im konditionalen Mausmodell

Zur detaillierten Analyse des pathologischen Einflusses von humanem α -Syn im Mausmodell wurde das Tetrazyklin-regulierte tet-off-System, entwickelt von Gossen und Bujard (1992), verwendet. Für die konditionale Expression waren sowohl Mäuse notwendig, die das humane α -Syn unter Kontrolle eines tTA (Tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator)-regulierten Minimalpromotors, als auch Mäuse, die tTA unter Kontrolle eines neuronenspezifischen Promotors exprimierten. Die Expression ist durch die Gabe von Tetrazyklin-Derivaten, wie Doxyzyklin, reversibel regulierbar (Abb. 4A). Eine erste Charakterisierungsstudie zeigte, dass eine regulierte Expression in Mäusen möglich ist, die humanes Wildtyp (WT) (Responderlinien syn und syn1) bzw. mutiertes [A30P] α -Syn (Responderlinie syn30) unter Kontrolle des CaMKIIalpha- (in dieser Studie als CaM bezeichnet; Mayford *et al.*, 1996) bzw. des Prionen-Protein-Promotors (in dieser Studie als PrP bezeichnet; Tremblay *et al.*, 1998) neuronenspezifisch exprimierten. Ebenso wurde festgestellt, dass der Anteil doppelt-tg (dtg) Mäuse, aus heterozygoten Kreuzungen dieser, nicht unterrepräsentiert war (Nuber, 2002). Für den spezifischen Nachweis des tg Proteins in einzelnen Hirnregionen doppelt-tg Mäuse, wurden im Vorfeld verschiedene kommerzielle Ak ausgetestet (Tabelle 10). Als Negativkontrolle dienten ein Proteinextrakt einer sagittalen Hirnhälfte einer nicht-tg Wildtyp- (WT-) Maus und einer α -Syn-Knockout- (KO-) Maus (Abeliovich *et al.*, 2000) und als Positivkontrolle humanes cortikales Hirngewebe.

Tabelle 10

Für die Etablierung einer geeigneten WBA getestete Ak

Ak	(AS-Spezifität)	Kreuzreaktion mit α -syn-KO (β -oder γ -Syn?)	Kreuzreaktion mit endogenen α -Syn der Maus	Nachweis des humanen α -Syn	Hintergrund-Färbung
SA-3400	(117-131)	+	+	++	+++
Syn 204	(87-110)	-	+	++	++
Syn 211	(121-125)	n.a.	+	++	+++
LB 509	(115-122)	-	- (+)	++	++
15G7- α -Syn	(116-131)	-	-	+++	+

n.a., nicht analysiert; (+), in der Immunhistochemie Kreuzreaktion festgestellt

Da der 15G7- α -Syn-Ak eine besonders starke Bindungsaffinität gegenüber dem Transgen und zugleich wenig unspezifische Hintergrundbanden zeigte, wurde dieser Ak für weitergehende Studien ausgewählt. Durch heterozygote Verkreuzung aller zur Verfügung stehenden Linien (Promotorlinien PrP und CaM, Responderlinie syn, syn1 und syn30) wurden neben einfach-tg Kontrollmäusen, die keine Expression des humanen α -Syn zeigten (Nuber, 2002) auch dtg Mäuse (PrP_syn, PrP_syn1, PrP_syn30 sowie CaM_syn, CaM_syn1 und CaM_syn30) erzeugt. Für die Analyse des differentiellen Expressionsmuster wurden die Gehirne dtg Mäuse in 5 Subregionen

unterteilt (Abb. 4B) und die relative α -Syn-Expression, im Bezug zur α -Syn-Expression in humanen Präfrontalkortex (Positiv-Kontrolle) ermittelt. Unspezifische Signale konnten durch gleichzeitiges Auftragen von Proteinextrakten nicht-tg und von α -Syn^{-/-}-KO-Mäusen ausgeschlossen werden (Abb. 4C). Als Ladekontrolle und zur Quantifizierung der Signalstärke diente β -actin. Die Analyse ergab, dass die Expression des mutierten [A30P] α -Syn in PrP_syn30 und CaM_syn30 Mäusen auf das Riechhirn (Bulbus olfactorius) beschränkt war, wobei in PrP_syn30 Mäusen eine stärkere Expression als in CaM_syn30 Mäusen festgestellt wurde (s. Image-Quant-Auswertung, Abb. 4D). Jedoch zeigte die Analyse einer zweiten Maus jeder Linie, dass diese verstärkte Expression nicht signifikant war (o. Abb.; Student's *t-Test*: $p = 0,31$).

Dagegen zeigten Mäuse, die das WT α -Syn exprimierten, mit Ausnahme von PrP_syn1 Mäusen, transgenes α -Syn in weiteren Hirnbereichen, die unter Verwendung des CaM-Promotors zusätzlich verstärkt wurde (Abb. 4D). In PrP_syn-Mäusen konnte eine Expression im Kleinhirn gezeigt werden, die in Mäusen mit konditionaler Expression ausgehend vom CaM-Promotor nicht beobachtet wurde (Abb. 4C, D). Für den Nachweis der Regulierbarkeit der transgenen Expression wurden dtg Mäuse mit Doxyzyklin (Dox) über das Trinkwasser behandelt. Durch Mitteln und Vergleich der prozentualen Expression in Mäusen ohne (angeschaltete Genexpression: „Gen an“) und mit Dox-Behandlung (abgeschaltete Genexpression: „Gen aus“) (Abb. 4D) ergab sich eine Minderung der Expression von über 90%. Dabei war die Regulation im Riechhirn am stärksten (95%) und in den anderen Hirnregion mit geringfügig geringerer Effizienz ebenso gut kontrollierbar (Basalganglien, Kortex und Kleinhirn: ca. 70%; Hirnstamm: ca. 50%, wobei hier jedoch die unspezifische Hintergrundfärbungen der Membran einfließt, die gerade in den Randbereichen der Membran verstärkt auftrat; s. bspw. Abb. 4C: PrP_syn1 und CaM_syn30).

Insbesondere CaM_syn Mäuse zeigten eine starke Expressions des Transgens in den für das IPS-relevanten Bereichen des Vorder- und Mittelhirns.

Um feststellen zu können, in welcher Relation das Transgen im Hinblick auf das endogene α -Syn der Maus überexprimiert wurde, wurden die Proteinextrakte des Riechhirns aller Mauslinien aufgetragen und die Membran mit einem Ak detektiert, der speziell gegen das α -Syn der Maus gerichtet war (7554 α -Syn; Kahle *et al.*, 2000; o. Abb.). Das Riechhirn wurde gewählt, da dtg Mäuse aller analysierten Linien in diesem Bereich eine Expression des Transgens aufzeigten (Abb. 4C, 4D). Die Auswertung erfolgte über die ImageQuantTM-Berechnung der Signalintensitäten nach Normierung mittels β -Actin (Abb. 5).

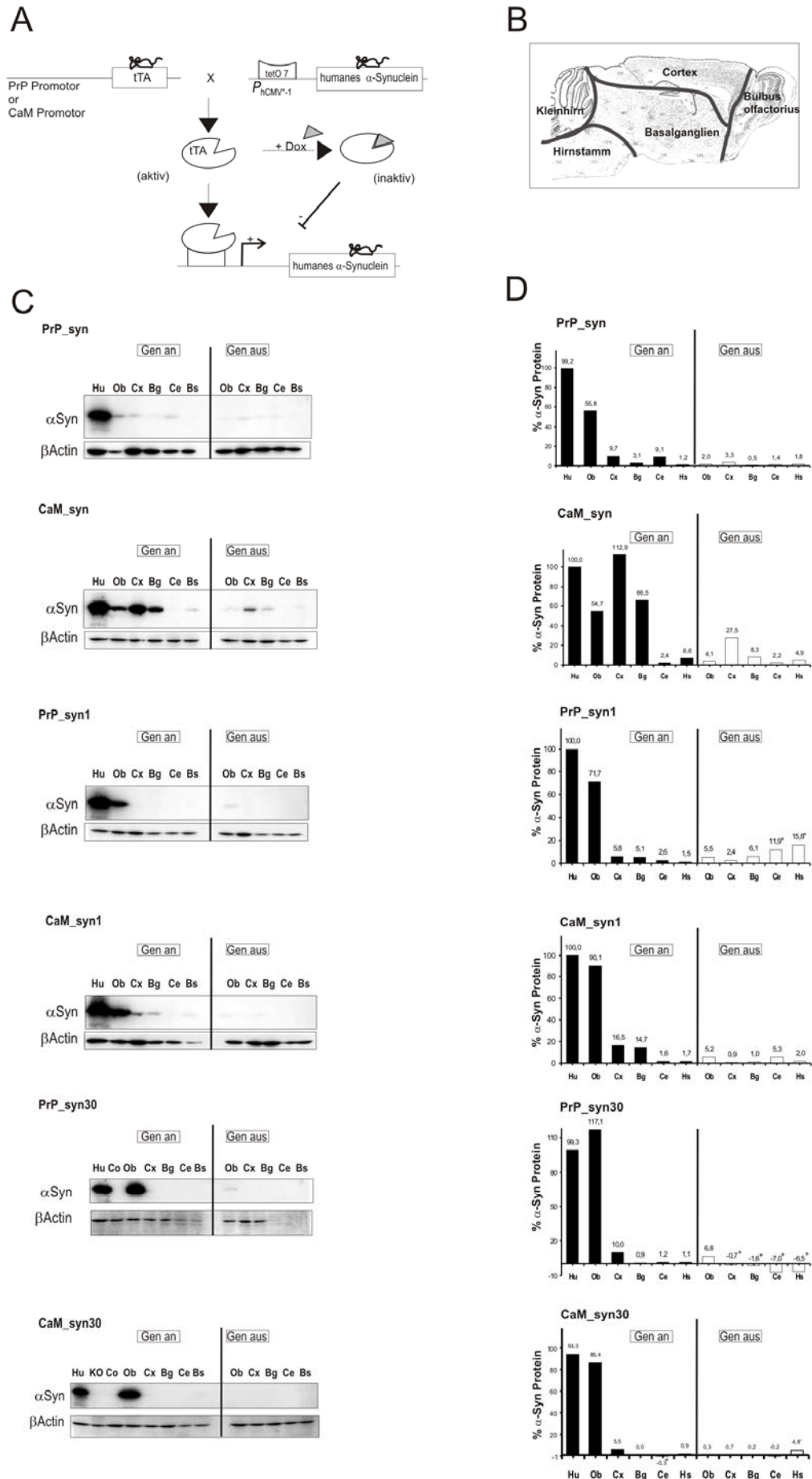
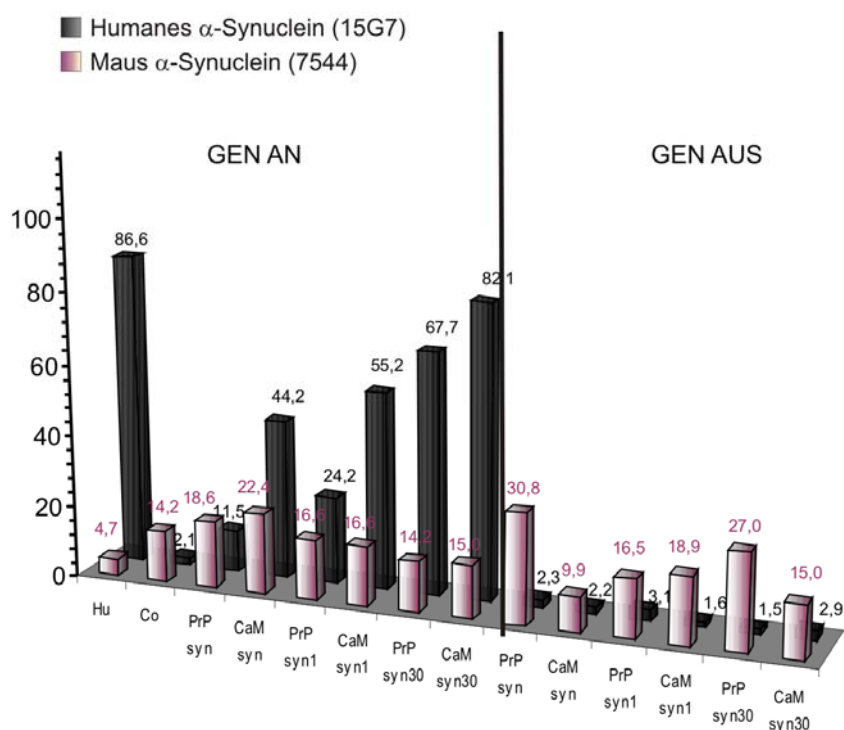


Abb. 4 Maus-Design und Expressionsmuster in konditionalen Mäusen

(A) Die Expression des tTA wurde entweder durch den PrP- oder den CaM- Promotor erreicht. In seiner aktiven Form bindet tTA an die tetO₇-Sequenz des Minimalpromotors stromaufwärts des humanen α -Syn-Gens und initiiert die Expression. Durch die Anwesenheit von Doxzyklin (Dox) kann die Expression des transgenen α -Syn inhibiert werden, da Dox an tTA bindet und durch reversible Konformationsänderung dessen eine Inaktivierung erzeugt. (B) Subregionale Unterteilung der Gehirne für die differentielle WBA (Abb. modifiziert nach Paxinos *et al.*, 2001). (C) WBA (20 μ g pro Spur) des Expressionsmuster humanen α -Syn von unterteilten Maushirnen. Nachweis des Transgens (α -Syn) mittels 15G7- α -syn Ak und β -Actin als Ladekontrolle. (D) Die Signalstärke der α -Syn-Banden in der WBA wurde mittels ImageQuantTM Software quantifiziert und gegen die β -Actin-Färbung der selben Spur normiert, um Variationen beim Auftragen zu korrigieren. Angegeben ist die α -Syn Expressionsstärke in Prozent in Relation zur Expressionsintensität der humanen Kontrolle. +: unspezifische Hintergrund-Färbung der Membran; Abkürzungen: Ob, (olfactory bulb) Riechhirn; Cx, (cortex) Kortex; Bg, Basalganglien; Ce, Cerebellum (Kleinhirn); Bs (brain stem) = Hs, Hirnstamm; Hu, humanes Gewebe; KO, α -Syn^{-/-}-KO-Maus; Ko, (Kontrolle) einfach-tg Kontroll-Maus

Im Riechhirn dtg Mäuse betrug die Expression des transgenen α -Syn im Bezug zum endogenen α -Syn 0,6 für PrP_syn, 1,5 für PrP_syn1, 2,0 für CaM_syn, 3,3 für CaM_syn1, 4,8 für PrP_syn30 und 5,5 für CaM_syn30 (Abb. 5).

**Abb. 5 Relative Expression transgenen α -Syn in dtg Maushirn in Bezug zur Expression des endogenen α -Syn.**

Das Balkendiagramm zeigt die relative Expression des transgenen α -Syn, ermittelt durch 15G7- α -Syn-Färbung, im Bezug zur endogenen Expression, detektiert durch den 7544- α -Syn-Ak derselben Spur, in der WBA. Die Werte entsprechen prozentualen Angaben im Bezug zur humanen Kontrolle und nach Normierung durch β -Actin-Färbung als Ladekontrolle. Abkürzungen: Hu, humane Kontrolle; Co, einfach-tg Kontrolle.

Daher zeigten die Mäuse mit induzierter Überexpression des mutierten [A30] die stärkste Expression des Transgens im Riechhirn, jedoch beschränkt auf das Riechhirn (Abb. 4C). Die geringfügige Expression in der humanen Kontrolle ergab sich durch unspezifische Hintergrundfärbung des Randbereichs der Membran (o. Abb.)

Immunhistochemisch ließ sich die in der WBA beobachtete Expression durch regionale Anfärbung bestätigen. Da dtg Mäuse der Linie CaM_syn und PrP_syn eine übergreifende

Expression in für das IPS relevanten Hirnbereichen (darunter Bulbus olfactorius, Kortex und Basalganglien) zeigten und Mäuse der Linie PrP_syn30 eine relativ starke Expression im Bulbus olfactorius, der im Frühstadium des IPS betroffen ist (Tabelle 2), wurden insbesondere diese Mäuse für immunhistochemische und weitergehende Detail-Studien herangezogen.

Dabei zeigten Mäuse der Linie CaM_syn eine starke Färbung des transgenen α -Syn im Vorder- und Mittelhirnbereich (Abb. 6A), die mittels Antibiotika-Gabe in adulten Mäusen nur schwach reguliert werden konnte (Abb. 6B). Die Expression des humanen α -Syn wurde jedoch nahezu vollständig in Mäusen reprimiert, die unter Antibiotikabehandlung geboren und aufgewachsen waren (Abb. 6C). Im Hippokampus konnte eine starke α -Syn-Immunreaktivität im Bereich der CA3-Region (Abb. 6D und 6E), und eine geringfügig geringere Färbung der Pyramidenzellen in CA1 und des Stratum lacunosum-moleculare sowie der Molekularschicht des Gyrus dentatus festgestellt werden (Abb. 6E, 6F). Im Bulbus olfactorius konnte eine prominente α -Syn-Färbung der Körnerzellschicht und der äußeren plexiformen Schicht, sowie vereinzelt auch in der glomerulären Schicht beobachtet werden (Abb. 6G). Dabei ist die Expression in der glomerulären Schicht von besonderem Interesse, da hier ebenso dopaminerge Neurone lokalisiert sind. Hinsichtlich des nigrostriatalen Systems wurde im striatalen Bereich eine markante Färbung der Fasern (Abb. 6H) aber auch vereinzelt zelluläre Expression detektiert (Abb. 6I); ebenso konnte auch in der Substantia nigra eine starke Färbung des Neuropils (Übersicht siehe Abb. 6J), insbesondere der pars reticulata (Abb. 6K), mit z.T. LN-ähnlicher axonaler Formation jedoch auch vereinzelt positive Zellen in der Region der pars compacta gezeigt werden (Abb. 6L).

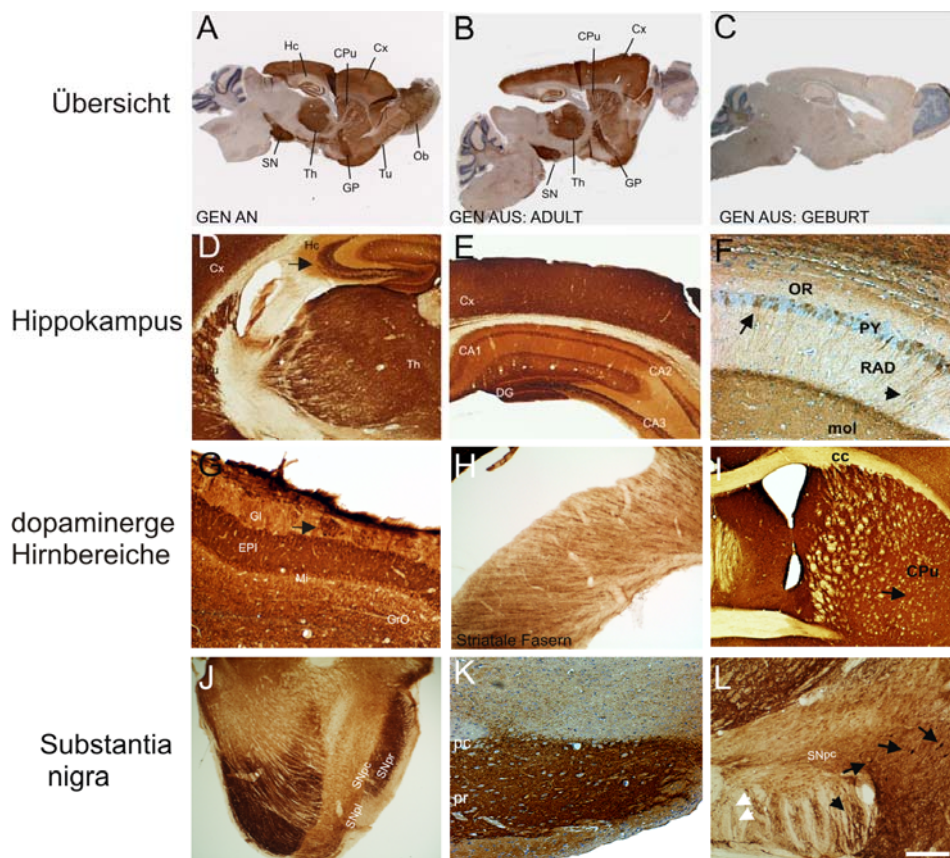


Abb. 6 Expression des transgenen α -Syn in adulten konditionalen CaM_syn Mäusen

CaM_syn Mäuse zeigten eine starke α -Syn Färbung des Vorder- und Mittelhirnbereiches (A), die mittels Dox-Gabe in adulten Mäusen nur moderat (B) jedoch durch Behandlung von Geburt an nahezu vollständig herabreguliert werden konnte (C). Im Hippokampus (Hc) der unbehandelten Maus

konnte eine vorwiegend starke Expression der Moosfasern der CA3-Region (D) sowie in einer Subpopulation der Pyramidenzellen (Py) der CA1-Region (Pfeil in F) sowie in Dendriten des Stratum radiatum (RAD; Pfeilkopf) und im Neuropil des Stratum lacunosum-moleculare (mol) (Übersicht siehe E) gezeigt werden. Im Bulbus olfactorius (Ob) war das Neuropil der externen plexiformen Schicht (EPI) sowie der Glomerularschicht (Gl; Pfeil) gefärbt und in der Granulärschicht (GrO) zeigten sich zusätzlich vereinzelte Zellen immunpositiv (G). Neben striatalen Fasern (H) konnte humanes α -Syn im Bereich des Striatum (CPu) zellulär detektiert werden (I). In der Substantia nigra (SN; Übersicht: J) konnte eine extensive α -Syn Färbung sowohl im Bereich der pars compacta (SNpc) als auch der pars reticulata (SNpr) festgestellt werden (K), mit vereinzelt positiver Zellfärbung (schwarze Pfeile, L) und prominenter Faserfärbung (schwarzer Pfeilkopf, L), sowie korkenzieher-förmige Axone, die LN ähnelten (weißer Pfeilkopf).

Abkürzungen: CPu, Caudate Putamen; Cx, Cortex; EPI, externe plexiforme Schicht; Gl, Glomerular-Schicht des Bulbus olfactorius; GP, Globus Pallidum; GrO, Granulärschicht des Bulbus olfactorius; Hc, Hippokampus; Mi, Mitralschicht; Ob, Bulbus olfactorius; OR, Stratum oriens; PYR, Pyramidenzellschicht der CA1-Region; RAD, Stratum radiatum; SN, Substantia nigra; SNpc, SN pars compacta; SNpl, pars lateralis; SNpr, SN pars reticularis; Th, Thalamus; Tu, olfaktorische Tuberkel; Messbalken in (L) entspricht: 200 μ m in (A-C); 50 μ m in (D,E,I,J), 20 μ m in (F,G,H,K,L); sagittale Paraffinschnitte: (A-C,F,K); coronale Vibratomschnitte: (D,E,G-I, L).

Mäuse der Linie PrP_syn zeigten eine im Vergleich zur CaM_syn Linie schwächere Expression, mit zusätzlicher Färbung des Kleinhirns (Abb. 7A). Durch Antibiotika-Gabe von adulten Mäusen wurde die α -Syn-Expression im Bereich des Thalamus und des Kleinhirns nur mäßig herabreguliert (Abb. 7B), jedoch durch Behandlung von Geburt an vollständig abgeschaltet (Abb. 7C). Im Hippokampus konnte eine starke Färbung des Stratum lacunosum-moleculare, vereinzelt eine Anfärbung der Pyramidenzellen der CA1-Region, sowie eine prominente punktuelle Anfärbung polymorpher Schicht des Gyrus dentatus der festgestellt werden (Abb. 7D). Wie auch in CaM_syn Mäusen zeigten PrP_syn Mäuse eine Lokalisation des humanen α -Syn in (Moos-) Fasern der CA3-Region (Abb. 7D, 7E). Im Kleinhirn wurden eine spezifische Färbung des Neuropils der Molekularschicht und eine zusätzliche zelluläre Anfärbung der Körnerzellschicht detektiert, wohingegen die Purkinjezellschicht klar immunnegativ war (Abb. 7G). Der Bulbus olfactorius zeigte eine leichte Anfärbung der Körnerzell- und Glomerularschicht (Abb. 7H) mit axonaler und zellulärer Lokalisierung (Abb. 7I) in der Körnerzellschicht. Im nigrostriatalen Bereich zeigten sowohl das Striatum (Abb. 7J) als auch die Substantia nigra (Abb. 7K) eine vorwiegende Färbung des Neuropils, die im Bereich der pars compacta besonders hervortrat (Abb. 7L).

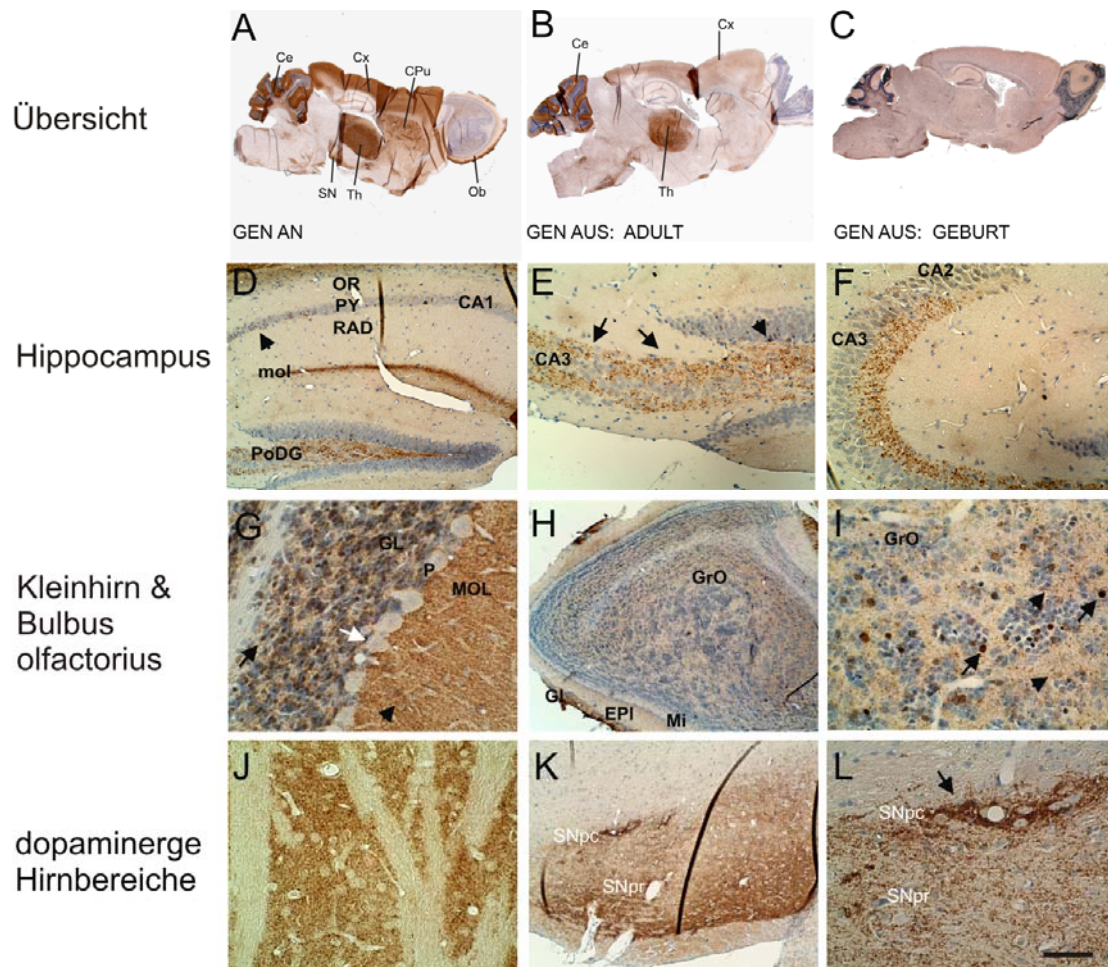


Abb. 7 Expression transgenen α -Syn in konditionalen PrP_{syn} Mäusen

15G7- α -Syn-Färbung von Paraffinschnitten zeigte eine Lokalisierung des transgenen α -Syn im Vorder- und Mittelhirn, sowie im Kleinhirn der dtg PrP_{syn} Maus (A). Die Expression konnte durch Doxyzyklin-Gabe in adulten Mäusen nur reduziert (B), jedoch bei Behandlung von Geburt an vollständig abgeschaltet werden (C). Im Hippocampus konnte eine Färbung im Neuropil des Stratum lacunosum-moleculare (mol) und polymorphen Schicht des Gyrus dentatus (PoDG) und vereinzelt auch zelluläre Färbung in der Pyramidenzellschicht der CA1-Region (Pfeilkopf, D) beobachtet werden. Punktuelle Anfärbung der CA3-Region (Pfeile E; F) legt immunpositive Moosfasern nahe, daneben waren auch vereinzelt Zellen der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus α -Syn-positiv (Pfeilkopf, E). Im Kleinhirn wurde neben der Anfärbung des Neuropils der Molekularschicht (MOL; Pfeilkopf, G) auch eine Anfärbung der Perikrya der Körnerzellschicht (schwarzer Pfeil, G) beobachtet, mit selektiver Aussparung der Purkinjezellen (weißer Pfeil, G). Im Bulbus olfactorius war die Körnerzellschicht (GrO) und die glomeruläre Schicht (Gl) gefärbt (H), wobei insbesondere in der GrO neben vereinzelt immunpositiven Zellen (Pfeile, I) auch eine Färbung des Neuropils (Pfeilköpfe, I) auftrat. Im Striatum dominierte Anfärbung des Neuropils, klar abgegrenzt von immunnegativen Zellen (J), was ebenso in der Substantia nigra beobachtet wurde (K), in welcher sich sowohl in der pars reticulata als auch verstärkt in der pars compacta Immunprodukt zeigte (Pfeil, L).

Abkürzungen: CPu, Caudate Putamen; Cx, Cortex; Ce, Cerebellum (Kleinhirn); EPI, externe plexiforme Schicht; Gl, Glomerular-Schicht des Bulbus olfactorius und GL: des Cerebellums; GP, Globus Pallidus; GrO, Granulärschicht des Bulbus olfactorius; Hc, Hippokampus; Ob, Bulbus olfactorius; mol, Stratum lacunosum-moleculare; MOL, Molekularschicht des Kleinhirns; OR, Stratum oriens; PoDG, polymorphe Schicht des Gyrus dentatus; PYR, Pyramidenzellschicht der CA1-Region; RAD, Stratum radiatum; SN, Substantia nigra; SNpc, SN pars compacta; SNpr, SN pars reticularis; Th, Thalamus; Messbalken in (L) entspricht: 200 μ m in (A-C); 50 μ m in (H), 20 μ m in (D,K); 10 μ m in (E,F) und 5 μ m in (G,I,J,L)

Mäuse der Linie PrP_{syn30} und CaM_{syn30} zeigten erwartungsgemäß eine auf das Riechhirn limitierte Expression des transgenen α -Syn (Abb. 8A - C). In PrP_{syn30} waren insbesondere Mitralzellen immunpositiv, sowie auch Bereiche der externen Plexiformschicht und der glomerulären Schicht (Abb. 8B). Dagegen wurde in CaM_{syn30} Mäusen eine Begrenzung der α -Syn-Färbung auf die Glomerulärschicht festgestellt, die aufgrund der weniger starken Hintergrundfärbung im Vergleich zum PrP_{syn30}-Färbung auf etwa die gleiche Stärke geschätzt

wird (Abb. 8C). In adulten Mäusen führte die Dox-Behandlung von 4 Wochen zu keiner sichtbaren Reduktion der Immunreaktivität (Abb. 8D), jedoch eine Behandlung von mehr als 20 Wochen sowohl in PrP_syn30 (Abb. 8E) als auch CaM_syn30 Mäusen (Abb. 8F).

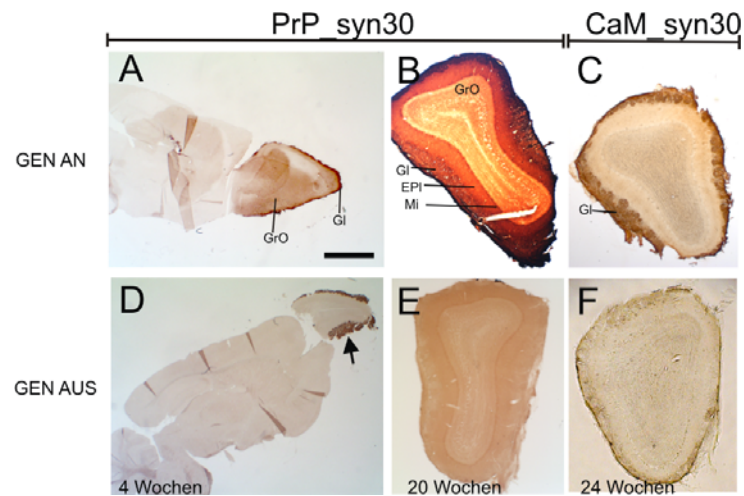


Abb. 8 Expression des transgenen α -Syn in konditionalen PrP_syn30 und CaM_syn30 Mäusen

15G7- α -Syn-Färbung von Paraffin- (A, D) und Vibratomschnitten (B, C, E, F) zeigte eine Lokalisierung des transgenen α -Syn in PrP_syn30 Mäusen limitiert auf den Bulbus olfactorius (A). Im Detail konnte eine Färbung der Zellen der Mitralzellschicht (Mi) und der Granulärschicht (GrO), des Neuropils der externen plexiformen Schicht (EPI) sowie der Glomerulärschicht (Gl) gezeigt werden (B). In CaM_syn30 Mäusen konnte nur eine Färbung der Gl nachgewiesen werden konnte. Für die Expressionsreduktion in adulten PrP_syn30 Mäusen war eine 4wöchige Behandlung mit Doxyzyklin ungenügend (Pfeil, D), jedoch zeigte eine Behandlung von mehr als 20 Wochen eine vollständige Expressionsreduktion sowohl in PrP_syn 30 (E) als auch CaM_syn30 Mäusen (F). Abkürzungen: Gl, glomeruläre Schicht; GrO, Granulärschicht; EPI, externe plexiforme Schicht; Mi, Mitralzellschicht. Messbalken in (A) entspricht 200 μ m in (A, D) und 50 μ m in (B, C, E, F)

Da die häufig beobachtete Anosmie in präklinischen Patienten mit IPS und das sich später manifestierende motorische Defizit auf einer Neuropathologie dopaminerger Zellen beruht, wurde weitergehend analysiert, ob transgenes α -Syn in dopaminergen Zellen koexprimiert wird.

Für die Analyse der Koexpression wurde eine Doppelmarkierung mit einem Ak gegen humanes α -Syn und einem Ak gegen Tyrosin-Hydroxylase, dem Geschwindigkeits-bestimmenden Enzym der DA-Synthese in dopaminergen Zellen, durchgeführt. Dabei wurde die Färbung mit Mäusen der Linie CaM_syn und PrP_syn30 durchgeführt, da bei diesen transgenes α -Syn besonders stark in Bereichen mit dopaminergen Zellen nachgewiesen werden konnte (CaM_syn: Substantia nigra pars compacta; Abb. 6A, G, K; PrP_syn30: glomerulären Schicht des Bulbus olfactorius, Abb. 8B).

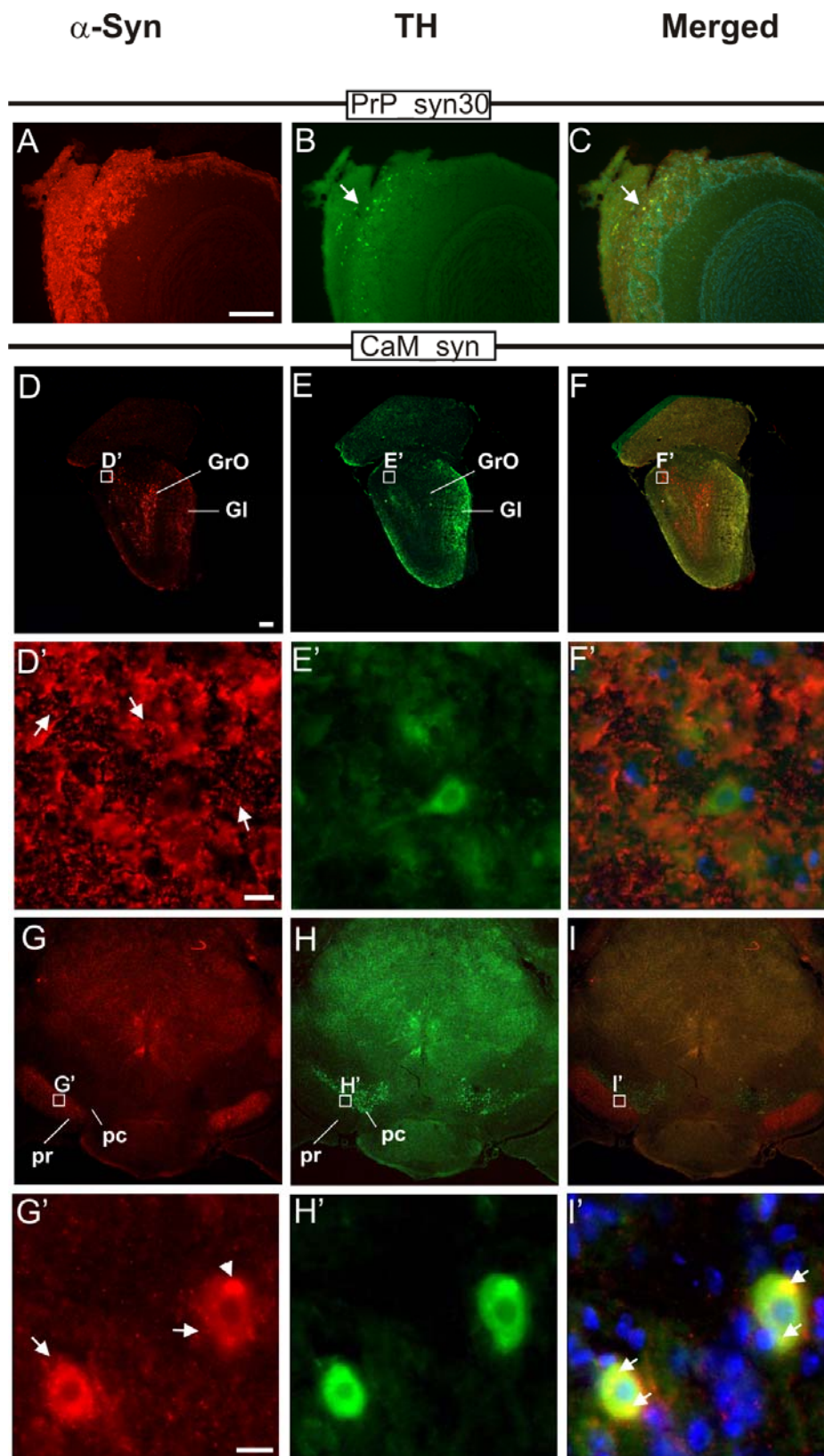


Abb. 9 Doppelimmunfluoreszenz zum Nachweis transgenen α -Syn in dopaminergen Regionen im Gehirn konditionaler PrP_syn30 und CaM_syn Mäuse

Gezeigt sind Vibratomschnitte des Gehirns einer 16 Monaten alten PrP_syn30 Maus (A-C) und einer 20 Monate alten CaM_syn dtg Maus (D-I'), doppelt fluoreszenzmarkiert mit α -Syn (rot) und TH (grün) und deren Fusionsabbildung (Merged) in der gleichen fokalen Ebene, zwecks Detektion des Transgens in dopaminergen Zellen. (D') – (F') und (G') – (I') zeigen eine höhere Vergrößerung der Kästchen in (D) – (F) bzw. (G) – (I). In PrP_syn30 Mäusen zeigte die prominente Lokalisierung des Transgens (A) im Bereich der dopaminergen Zellen der Glomerulärschicht (Gl) (B) eine deutliche Kolokalisierung im Zellsoma (C). (D) In CaM_syn Mäusen konnte humanes α -Syn im Bulbus olfactorius sowohl in der Gl als auch selten in der Granulärschicht (GrO) nachweisen werden, dagegen lokalisierten dopaminerge

Zellen erwartungsgemäß nur in der Gl (E, E'). Punktförmige α -Syn-Akkumulate der Gl deuteten auf Färbung des Neuropils hin (Pfeile in D') und zeigten bei höherer Vergrößerung keine Kolokalisierung im Zellsoma dopaminerger Zellen des Bulbus olfactorius (F'). In der Substantia nigra dagegen konnte transgenes α -Syn sowohl in der pars compacta (pc) als auch in der pars reticularis (pr) nachgewiesen werden (G); erst bei höherer Vergrößerung konnte α -Syn eindeutig in Zellsoma (Pfeile in G') dopaminerger Zellen (H') vorliegend und kolokalisiert (I') nachgewiesen werden. Hier bildete α -Syn einschlossförmige Akkumulate verschiedener Größe (Pfeilkopf; G'), wie es auch für TH festgestellt wurde (H'). Abkürzungen: Gl, glomeruläre Schicht, GrO: granuläre Schicht; pc, Substantia nigra pars compacta; pr, Substantia nigra pars reticulata; Messbalken entspricht 20 μ m in (A) – (C), 1 μ m in (D,E,F) und (G,H,I), 10 μ m in (D', E', F'); 100 μ m in (G', H', I').

In PrP_{syn30}-Mäusen zeigte die prominente α -Syn-Färbung der olfaktorischen Glomerularschicht (Abb. 9A), ein Bereich der ebenfalls TH-positive, dopaminerge Neurone aufweist (Abb. 9 B) eine klare Kolokalisierung in dopaminergen Neuronen (Abb. 9C).

Eine starke aber insbesondere punktuelle Anfärbung des α -Syn der Glomerularschicht wurde in CaM_{syn} Mäusen detektiert (Abb. 9D, D'). Jedoch legte die punktuelle Färbung eine Lokalisierung des Transgens im Neuropil und weniger im Zellsoma nahe, weswegen auch keine Kolokalisierung mit somatisch lokalisierter TH (Abb. 9E, E') festgestellt werden konnte (Abb. 9F, F'). Nichtsdestotrotz legt die punktuelle Anfärbung der Glomerularschicht nahe, dass transgenes α -Syn durchaus in dopaminergen Zellen, jedoch im Neuropil dieser, exprimiert wird. In CaM_{syn} Mäusen wurde α -Syn-Immunreaktivität ebenso in der Substantia nigra, hier insbesondere in der pars reticulata und etwas schwächer in der pars compacta, detektiert (Abb. 9G). Dabei wurde α -Syn neben der physiologischen Lokalisierung im Neuropil (Totterdell *et al.*, 2004) auch mislokalisiert im Zellsoma vorgefunden (Abb. 9G'), wo es mit TH (Abb. 9H') ein immunpositives Akkumulat bildete, dass LK-ähnliche Strukturen zeigen (Abb. 9 I'). Auf ultrastruktureller Ebene konnte in CaM_{syn} Mäusen im Bereich der olfaktorischen Glomerularschicht erwartungsgemäß transgenes α -Syn in unmyelinisierten Axonen (Abb. 10A) und synaptischen Nervenendigungen (Abb. 10B) nachgewiesen werden. In der Substantia nigra wurde das Transgen sowohl in myelinisierten und unmyelinisierten Axonen detektiert (Abb. 10C); im Zellsoma nigraler Neurone konnte α -Syn oftmals assoziiert mit Lysosomen und Mitochondrien beobachtet werden, jedoch ohne fibrilläre Struktur, was in Abgrenzung zu einer LK-Pathologie steht. α -Syn-positive Akkumulate entsprachen eher dem Bild von Mikroaggregaten (Abb. 9D).

Somit ergab sich für CaM_{syn} Mäuse eine Expression des Transgens in den für das IPS-relevanten Bereichen des Vorder- und Mittelhirns, mit insbesondere axonaler Lokalisation im Bereich der dopaminergen Zellen der olfaktorischen Glomerularschicht und mit sowohl axonaler als auch somatischer Lokalisation im Bereich der Substantia nigra. Dagegen zeigten die Linien mit induzierter Expression des mutierten [A30P] α -Syn eine auf das Riechhirn beschränkte Expression, jedoch im Bereich dopaminerger Neurone. In PrP_{syn}, PrP_{syn1} und CaM_{syn1} wurde eine schwächere Expression beobachtet, die in PrP_{syn1} und CaM_{syn1} Mäusen zudem auf Bereiche des Vorderhirns beschränkt war. Entsprechend wurden für weitere Studien insbesondere die Linie PrP_{syn30} für den Nachweis des pathogenen Einflusses von mutiertem α -Syn auf dopaminerge Zellen im Riechhirn und CaM_{syn} Mäuse zum Nachweis der Zytotoxizität des überexprimierten Wildtyp- α -Syn auf das nigrostriatale und extranigrale System ausgewählt.

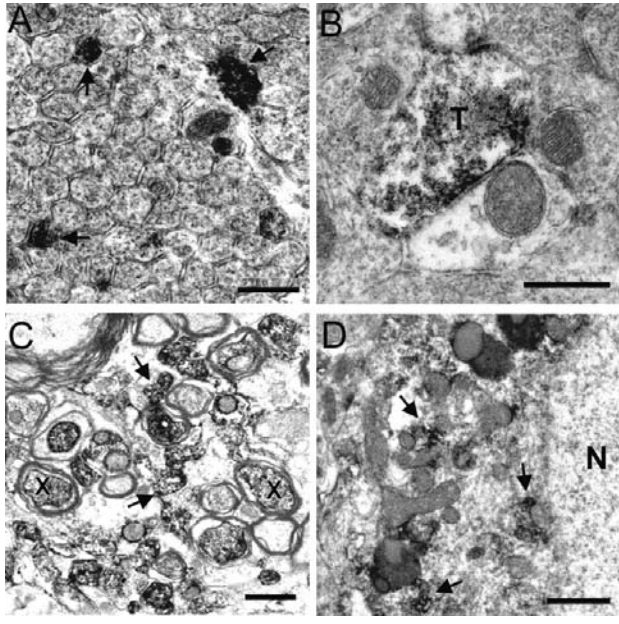


Abb. 10 EM-Analyse der α -Syn Lokalisierung in CaM_{syn} Maushirn.

In einer 20-Monate-alten CaM_{syn} Maus wurde α -Syn ultrastrukturell in Bereich des Bulbus olfactorius (A, B) und der Substantia Nigra (C, D) nachgewiesen. (A) EM-Analyse der olfaktorischen Glomerulärschicht zeigte α -Syn-positives Akkumulat in unmyelinisierten Axonen (A) und synaptischen Endigungen (T in B). Nigrale Neurone zeigten humanes α -Syn in myelinisierten (X in C) und unmyelinisierten (Pfeile in C) Axonen sowie assoziiert mit Lysosomen und Mitochondrien (Pfeile in D) im Zellsoma.

Abkürzungen: Gl, olfaktorische Glomerulärschicht; T, synaptische Endigung; N, Nukleus

Messbalken: 10 μ m in (A,C,D), 1 μ m in (B)

3.2 Neuropathologie

3.2.1 EM-Analyse: Hippokampale und nigrale Neuropathologie in CaM_{syn} Mäusen

Da CaM_{syn} Mäuse eine starke Expression im Bereich der Substantia nigra (als Voraussetzung für die Modellierung eines motorischen Defizits) und im Hippokampus (als Voraussetzung für die Modellierung einer kognitiven Beeinträchtigung) zeigten, wurde die Zellstruktur dieser im Detail mittels Elektronenmikroskopie (EM) analysiert. Im Bereich der Substantia nigra pars compacta und pars reticulata (Abb. 11B) konnte transgenes α -Syn bestätigend durch die subregionale Differenzierung mittels TH-Färbung benachbarter Schnitte (Abb. 11A) lokalisiert werden. Darüber hinaus zeigte die EM-Analyse degenerierte Neurone im Bereich der Substantia nigra, mit dunklem (elektronendichtem) Erscheinungsbild des Nukleus und Zytoplasmas, die zudem leichte Schädigungen der Kernmembran und eine lysosomale Anreicherung aufwiesen (Abb. 11C). Lipidähnliche Einschlüsse konnten ferner zwischen den neuronalen Fortsätzen, häufig assoziiert mit α -Syn-immunpositiven Axonen, im Bereich der pars reticulata detektiert werden (Abb. 11D). In degenerierten und dystrophen myelinisierten (Abb. 11E) als auch unmyelinisierten Axonen (Abb. 11F) konnte neben elektronendichten Organellen auch insbesondere Mitochondrien mit degenerierter Struktur gezeigt werden (Abb. 11G). Das Expressionsmuster des humanen α -Syn in diesen degenerierten Zellen bzw. Zellfortsätzen lässt auf eine enge Assoziation mit degenerierten Strukturen schließen (Abb. 11F).

Die subregionale Lokalisation des humanen α -Syn im Bereich der hippokampalen Region erfolgte auf lichtmikroskopischer Ebene durch den Vergleich mit benachbarten, Calbindin-gefärbten Schnitten, da Calbindin die einzelnen hippokampalen Felder selektiv anfärbte (Abb. 11G). Humanes α -Syn konnte mit einer hohen Signalstärke in Neuronen und im Neuropil des CA3-Feldes (Abb. 11H) und schwächer ebenso in Pyramidenzellen des CA1-Feldes, der Stratum

lacunosum-moleculare und der inneren Molekularschicht des Gyrus dentatus nachgewiesen werden. EM-Aufnahmen des Gyrus dentatus zeigten ein heterogenes Bild von Zellen mit unterschiedlichen Degenerationsstadien zwischen nicht-betroffenen Neuronen (Abb. 11I). Immunpositives Akkumulat konnte insbesondere in den Terminalen der Moosfasern detektiert werden, oftmals selbst degeneriert oder in Assoziation mit degenerierten Zellen (Abb. 11J, K). Verdichtete Organellen mit unterschiedlichem Degenerationsstadium konnten wie auch schon in Axonen der Substantia nigra beobachtet (Abb. 11E, F) ebenso in der CA3-Region und im Hilus des Gyrus dentatus detektiert werden (Abb. 11L). In degenerierten Zellen und umgebenden Neuronen konnten keine LK-ähnlichen Aggregate mit fibrillären α -Syn-Anteil festgestellt werden.

Degenerierte Strukturen im Bereich der Substantia nigra pars compacta und des Hippokampus wurden bestätigend in 2 weiteren 20 Monate alten CaM_syn Mäusen und ebenso in einer 9 Monate alten Maus nachgewiesen (o. Abb.). Bei letzterer wurde die Degeneration ebenso durch den Ausfall der Ak-Färbung mit Calbindin, Parvalbumin und Calretinin in Vibratomschnitten und durch starke Anreicherung von Toluidinblau in Semidünnschnitten bestätigt (o. Abb.). Degenerierte Strukturen traten in dieser Maus abweichend von den oben gezeigten Befund insbesondere in der hippokampalen CA1-Region auf (o. Abb.). Eine mit GFAP durchgeführte Färbung zeigte keine prominente Anreicherung von Astrozyten in den betroffenen Regionen dieser Maus (o. Abb.).

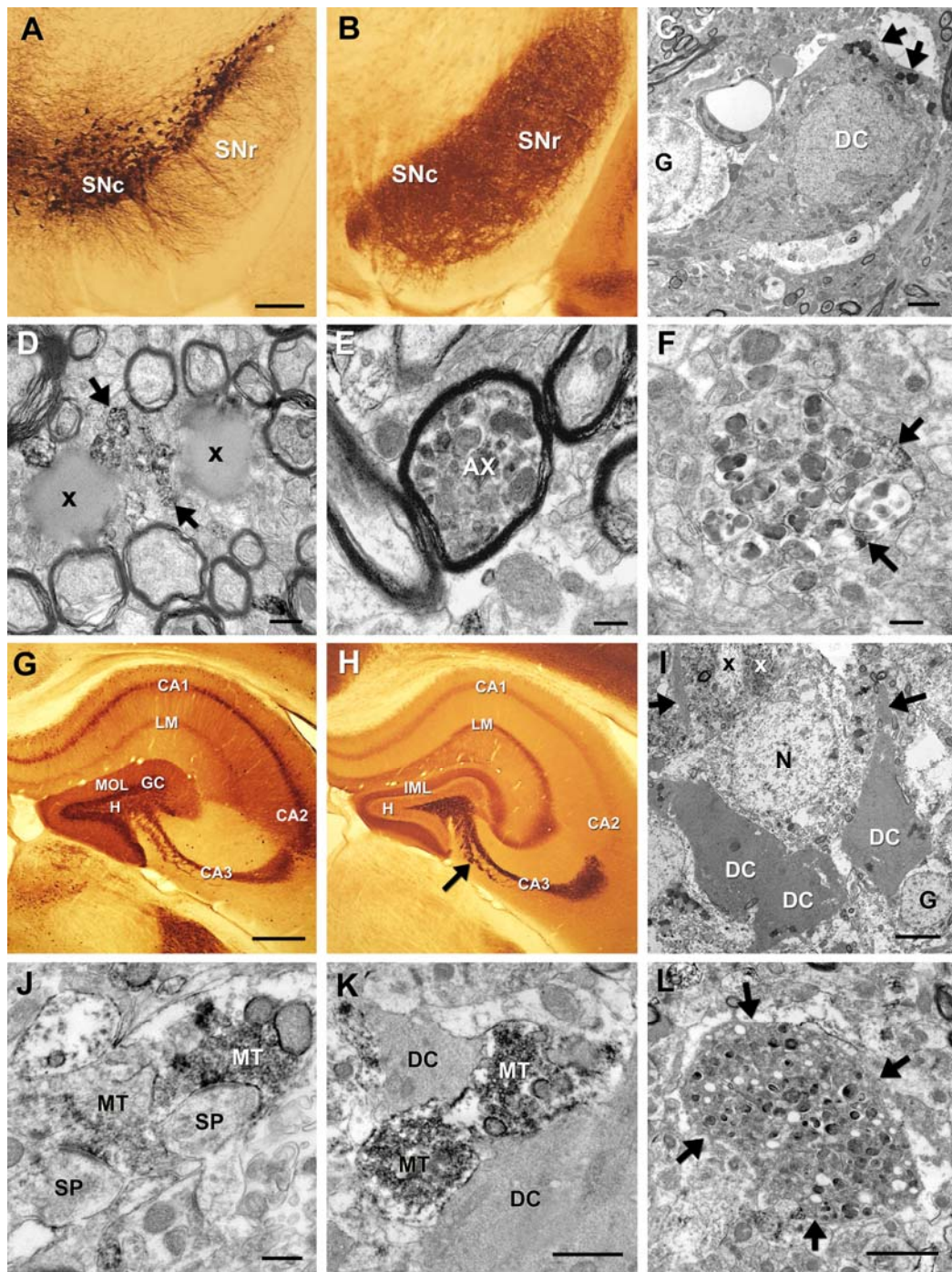


Abb. 11 Immuno-EM der Neurodegeneration und assoziiertem α -Syn in 20-Monate-alten CaM_{syn}-Mäusen

(A) Die TH-Färbung zeigte dopaminerge Neurone der Substantia nigra pars compacta (SNc) und Zellfortsätze, die sich weitergehend in die pars reticulata (SNr) erstrecken. (B) Der benachbarte Schnitt zeigte eine 15G7 α -Syn-Färbung beider Regionen (SNc und SNr). (C) Ein nigrales Neuron (DC), assoziiert mit einer Gliazelle (G) mit Anzeichen von „dark-cell“-Degeneration. Der Nukleus erscheint leicht kollabiert und das Zytoplasma elektronendicht mit einer prominenten Anhäufung von Lysosomen (Pfeile). (D) Grosse Fetttropfchen (X) konnten zwischen Nervenfasern der SNr detektiert werden, von welchen einige eng mit α -Syn-positiven unmyelinisierten Axonen assoziiert waren (Pfeile). (E) In myelinisierten Axonen (AX) wie auch in unmyelinisierten Axonen (F) konnten elektronendichte Mitochondrien assoziiert mit α -Syn (Pfeile in F) beobachtet werden. (G) Durch Calbindin-Färbung konnte eine subregionale Anfärbung der hippocampalen Schichten gezeigt werden. (H) Ein benachbarter 15G7- α -Syn gefärbter Schnitt mit starker Färbung des CA3-Feldes, leichter Färbung der CA1-Region und des LM und des IML des Gyrus dentatus. (I) In der CA3-Region konnten degenerierte Neuronen (DC) zwischen normalen Neuronen (N) detektiert werden (Pfeil: zur Lokalisation Vergleiche Pfeil in H); Elektronendichte Moosfaserbündel (x), oftmals für 15G7- α -Syn-positiv, konnten zwischen proximalen Dendriten detektiert werden. (J) α -Syn-positive Moosfaser-Nervenendigungen (MT) bildeten asymmetrische Kontakte zu immunnegativen Dendriten (SP), konnten jedoch ebenfalls (K) in Assoziation mit degenerierten Zellen (DC) vorgefunden werden. (L) Im Gyurs dentatus konnten dystrophe Axone mit elektronendichten Organellen

nachgewiesen werden. Messbalken: 100 μm (A, B); 1 μm (C); 200 nm (D, E, F); 100 μm (G, H); 4 μm (I), 500 nm (J, K); 2 μm in (L).

3.2.2 Analysen auf Aggregatvorkommen mittels WBA und Dot-Blot

In der EM wurde in CaM_syn Mäusen eine Degeneration nigraler und hippokampaler Neurone beobachtet, jedoch keine LK-ähnlichen Aggregate, wie diese aber typischerweise in den überlebenden Zellen im post-mortem Hirngewebe von IPS-Patienten nachweisbar sind (Forno *et al.*, 1990). Zur Bestätigung des fehlenden Aggregatvorkommens in der EM wurde daher ein Dot-Blot evaluiert, der auf biochemischer Ebene den Nachweis von Aggregaten im Proteinlysate dtg Mäuse erbringen sollte. Dieser beruht auf dem Prinzip, dass Proteinaggregate im Proteinextrakt aufgrund ihrer Größe nicht die Membran (mit einer Porengröße von 0,45 μm ; Birkmann, 2005) passieren können, wenn das Extrakt durch Anlegen von Vakuum durch die Membran gezogen wird. Zur Vermeidung der Auflösung von α -Syn-positiven Aggregaten durch SDS (als starkes ionisches Detergenz) wurde dieses in der Methodik des Dot-Blots durch das mildere Triton X-100- (anionische) Detergenz ersetzt und die initiale Homogenisierung der Gewebe zum Erhalt des Proteinextraktes erfolgte ohne jegliche Detergenz-Zusätze. Mittels WBA (Abb. 12A) wurde die Expression des Transgens in den Positiv-Kontrollen (Kortex-Gewebe eines DLB-Patient, Rückenmark (RM)-Gewebe der Thy_A30P Maus; Neumann *et al.*, 2002) mit der Expression der CaM_syn Maus verglichen und durch gleichzeitiges Blotten und Detektion des Sammelgels konnte ein erster Nachweis von Aggregaten im RM-Homogenat der Thy_A30P Maus festgestellt werden (Abb. 12A), jedoch nicht im Kortex-Gewebe der CaM_syn Maus und ebenso nicht im Kortex-Gewebehomogenat des DLB-Patienten. Letzteres kann aber durch ein vergleichbar geringes Aggregatvorkommen in der humanen Probe im Vergleich zur Rückenmark-Gewebe der Thy_A30P Maus begründet sein (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. P. Kahle). Wie erwartet zeigte nur das RM-Proteinextrakt der Thy_A30P mögliche starke Aggregatbanden auf Höhe des Sammelgels, das Proteinextrakt des Kortex hingegen nur ein leichtes Signal, was jedoch auch mit dem geringen Auftragsvolumen einhergehen kann (Abb. 12A; β -Actin-Bande als Ladekontrolle). Nach Angaben von Neumann *et al.*, (2002) soll der Kortex der Thy_A30P Mäuse aber vergleichsweise wenige Aggregate aufzeigen. Ein Dot-Blot des RM-Homogenats der Thy_A30P Maus bestätigte das Aggregat-Vorkommen (Abb. 12C). Im Vergleich zur Expressionsstärke der Thy_A30P Probe zeigte die Probe der CaM_syn Maus eine ca. 100fach geringere Expressionsstärke in der WBA. Im Dot-Blot konnte diese geringere Expressionsstärke nicht durch das 100fache Erhöhen der Auftragskonzentration ausgeglichen werden, da es sonst zur Überladung der Membran und zur unspezifischen Hintergrundfärbung kam (o. Abb.). Es konnte jedoch um Faktor 10 mehr aufgetragen werden. Die Mittelhirnregion (einschließlich Substantia nigra) zeigte im Dot-Blot keine Aggregat-Signale (Abb. 12B). Es wird davon ausgegangen, dass die Bildung von Aggregaten nicht proportional mit der Expressionsstärke korreliert, wodurch das

Ergebnis des Dot-Blots neben der EM-Analyse als weiterer Hinweis eines fehlenden Aggregatvorkommens gewertet wird. Dies legt nahe, dass die in CaM_syn Mäusen beobachtete nigrale Degeneration (Abb. 11C-F) nicht von der Ausbildung α -Syn-positiver Aggregate abhängig ist.

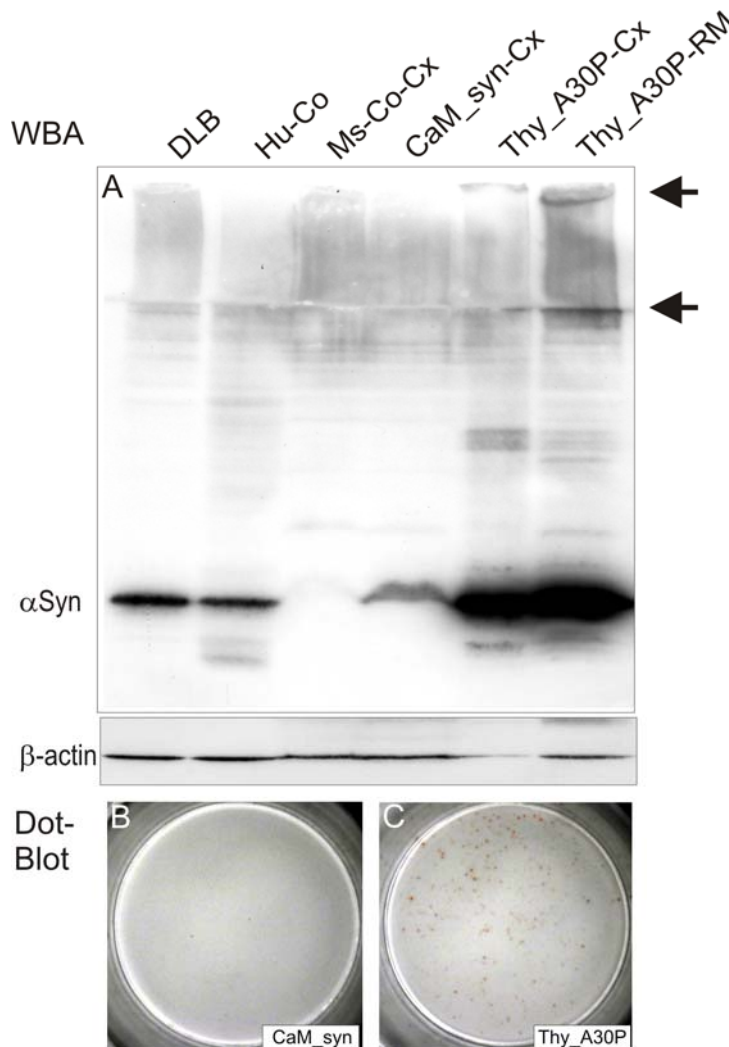


Abb. 12 WBA und Dot-Blot zum Nachweis von α -Syn-Aggregaten

Für den Aggregat-Nachweis wurden je 30 μ g Proteinextrakt aus Hirngewebe eines DLB-Patienten (Kortex; Positivkontrolle), eines gesunden Menschen (Präfrontalkortex; Negativkontrolle), einer 26 Monate alten Kontrollmaus (Kortex; Negativkontrolle) und gleichaltriger CaM_syn Maus, und je 3 μ g Hirngewebe einer Thy_A30P Maus (Kortex, daher Negativkontrolle) und Rückenmarksgewebe (Positivkontrolle). Die Pfeile zeigen sowohl die Grenzen des Sammelgels der WBA als auch die möglichen Aggregatssignale in der Thy_A30P-RM-Probe an. Das Expressionssignal der CaM_syn-Cx-Probe lag deutlich unter dem Signal der Thy_A30P-Cx und -RM-Proben. (B) Fehlende α -Syn-positiv Dots im Dot-Blot des Mittelhirn-Proteinextrakts der CaM_syn Maus, jedoch (C) positiver Nachweis im Dot-Blot der Rückenmark-Proteinextrakts der Thy_A30P Maus (Aggregat-Dots Färbereagenz-spezifisch rot dargestellt). Abkürzungen: DLB, Demenz mit LK; Co, Kontrolle; Cx, Kortex; RM, Rückenmark

3.2.3 Integrität des dopaminergen Systems in konditionalen Mäusen

3.2.3.1 HPLC-Analysen des Neurotransmittergehaltes

Kennzeichnend für das Parkinson-Syndrom, insbesondere der Symptome der Akinese und Bradykinese, ist der striatale Mangel an DA und Metaboliten (DOPAC und HVA) als Hinweis für den Untergang dopaminergener nigraler Neurone (Bernheimer *et al.*, 1972, 1973). Gleiches gilt für Serotonin im Bezug auf serotonerge Neurone (Jellinger, 1991). Entsprechend sollte ein aufgezeigter Mangel an DA und Metaboliten bzw. Serotonin und Metaboliten einen Hinweis für eine Beeinträchtigung der Neurotransmission und / oder für den Zelltod in dtg Mäusen sein. Deshalb wurde der Einfluss der α -Syn Expression auf den DA- und Serotonin-Metabolismus in

dopaminergen nigrostriatalen und olfaktorischen Hirnarealen in Mäusen der Linie PrP_{syn}, CaM_{syn} und CaM_{syn1}, sowie PrP_{syn30} und CaM_{syn30} analysiert (Tabellen 11-15).

Tabelle 11

Konzentration von Dopamin, Serotonin und jeweiligen Metaboliten im Riechhirn, Striatum und der Mittelhirnregion in PrP_{syn} konditionalen Mäusen; Angaben in [ng/mg Nassgewicht]

LINIE	DOPAMIN	DOPAC	HVA	SEROTONIN	5'HIAA
Bulbus olfactorius					
PrP_{syn} Alter: 36 Wo n = 4	0,4761538 ±0,02	0,21390725 ±0,04	0,3818912 ±0,06	0,448797 ±0,03	0,2353672 ±0,01
Kontrolle Alter: 38 Wo n = 4	0,442367933 ±0,06	0,23155775 ±0,08	0,3884504 ±0,08	0,43635405 ±0,02	0,263856 ±0,02
PrP_{syn} alt⁺ Alter: 97 Wo n = 4	0,44693785 ±0,03	0,15129 ±0,01	0,1617936 ±0,01	0,44103345 ±0,03	0,2574508 ±0,05
Kontrolle alt⁺ Alter: 106 Wo n = 8	0,55642675 ±0,05	0,20268658 ±0,02	0,38794935 ±0,09	0,43082385 ±0,08	0,1776726 ±0,02
Gen aus PrP_{syn} alt⁺⁺ Alter: 94 (80+14) Wo n = 4	0,4213148 ±0,01	0,13590885 ±0,01	0,1742743 ▼±0,03**	0,45315735 ±0,05	0,2134748 ▼±0,02**
Gen aus Kontrolle alt⁺⁺ Alter: 97 (57+39) Wo n = 5	0,57758704 ±0,07	0,12230956 ±0,02	0,5269224 ±0,06	0,52809156 ±0,02	0,33597664 ±0,02
Striatum					
PrP_{syn} Alter: 36 Wo n = 4	15,8186878 ±1,70	0,9317783 ±0,12	1,1080493 ±0,11	0,43210005 ±0,07	0,3542936 ±0,02
Kontrolle Alter: 38 Wo n = 4	14,1027944 ±0,37	1,7455504 ±0,41	1,2522606 ±0,08	0,42571905 ±0,05	0,3934896 ±0,03
PrP_{syn} alt⁺ Alter: 97 Wo n = 4	8,936488 ±0,98	0,948672 ±0,10	0,775899 ±0,07	0,52856 ±0,03	0,346168 ±0,06
Kontrolle alt⁺ Alter: 106 Wo n = 8	14,3093915 ±1,06	1,38253845 ±0,21	0,624946 ±0,06	0,42722314 ±0,03	0,29362857 ±0,05
Gen aus PrP_{syn} alt⁺⁺ Alter: 94 (80+14) Wo n = 4	16,1739783 ±1,16	0,97052535 ±0,11	0,7304398 ±0,03	0,38828385 ▼±0,07**	0,2048708 ▼±0,04**
Gen aus Kontrolle alt⁺⁺ Alter: 97 (57+39) Wo n = 5	15,9279686 ±1,07	1,68980844 ±0,23	0,502872 ±0,04	0,73455945 ±0,02	0,3971224 ±0,02
Mittelhirn (inkl. Substantia nigra)					
PrP_{syn} Alter: 36 Wo n = 4	0,1845616 ±0,02	0,08715985 ▼±0,01*	0,1744565 ±0,02	1,1256084 ±0,09	0,894816 ▼±0,05*
Kontrolle Alter: 38 Wo n = 4	0,19070735 ±0,02	0,1090969 ±0,00	0,1381987 ±0,01	1,1830374 ±0,17	1,2205252 ±0,10
PrP_{syn} alt⁺ Alter: 97 Wo n = 4	0,2715476 ±0,02	0,10396985 ±0,01	1,6382972 ±0,25	2,0685075 ▲±0,09*	0,2610926 ±0,03
Kontrolle alt⁺ Alter: 106 Wo n = 8	0,2569869 ±0,03	0,10779413 ±0,01	0,413594 ±0,05	1,3976517 ±0,17	1,4047464 ±0,20
Gen aus PrP_{syn} alt⁺⁺	0,2376987 ±0,02	0,11439205 ±0,01	1,7395376 ±0,11	2,0251167 ±0,08	0,2475187 ±0,02

Alter: 94 (80+14) Wo n = 4					
Gen aus Kontrolle alt⁺⁺ Alter: 97 (58+39) Wo n = 5	0,31178808 ±0,04	0,14261604 ±0,01	0,62195792 ±0,03	1,2966192 ±0,12	1,21496128 ±0,07

Grau unterlegte Felder: Korrektur-Messung ohne Proben der „PrP_syn alt“-Gruppe, daher wurde hier die Signifikanz nicht berechnet.
▼Felder mit roter Schrift: signifikante Reduktion des Neurotransmittergehaltes; ▲Felder mit grüner Schrift: signifikante Zunahme des Neurotransmittergehaltes *p< 0,05; **p< 0,05; +, ++: durch gleiche Linienzugehörigkeit (α -syn-einfach-tg oder Wildtyp) wurden die Daten der Gruppen „Kontrolle“ und „Gen aus Kontrolle“ der Linie CaM_syn (Tabelle 12) ebenso für die statistische Analyse der Gruppen „PrP_syn“ und „Gen aus PrP_syn“ verwendet werden.; Daten werden gemittelt \pm Standardfehler gezeigt

Mäuse der Linie PrP_syn zeigten bereits im Alter von 36 Wochen eine signifikante Minderung der Metaboliten DOPAC und 5'-HIAA in der Mittelhirnregion, was jedoch in Hirnproben von 97 Wochen alten PrP_syn Mäusen (PrP_syn alt) nicht mehr bestätigt werden konnte und daher unspezifisch sein könnte. In diesen 94-Wochen-alten Mäusen zeigte sich eine signifikante Hochregulation des Serotoningehaltes. Die vorausgehende Behandlung von PrP_syn Mäusen mit Antibiotika (Gen aus PrP_syn alt) führte zur signifikanten Minderungen verschiedener Metaboliten im Bereich des Bulbus und des Striatums, die jedoch nicht in unbehandelten PrP_syn Mäusen gezeigt werden konnten und daher als unspezifisch zu bewerten sind. Interessanterweise konnte sowohl in unbehandelten als auch in behandelten PrP_syn Mäusen ein erhöhter Serotonin-Level im Striatum beobachtet werden, was auf einen spezifischen und nicht reversiblen Effekt des transgenen α -Syn schließen lässt.

Tabelle 12

Konzentration von Dopamin, Serotonin und jeweiligen Metaboliten im Riechhirn, Striatum und der Mittelhirnregion in CaM_syn konditionalen Mäusen; Angaben in [ng/mg Nassgewicht]

LINIE Alter (Gen an + off)	DOPAMIN	DOPAC	HVA	SEROTONIN	5'HIAA
<i>Bulbus olfactorius</i>					
CaM_syn Alter: 60 Wo n = 10	0,3405691 ±0,02	0,07877166 ▼±0,01*	0,4584152 ±0,08	0,26336514 ±0,02	0,13739632 ±0,01
Kontrolle Alter: 61 Wo n = 6	0,39269767 ±0,03	0,11049773 ±0,01	0,4161448 ±0,10	0,2838836 ±0,04	0,13862 ±0,02
CaM_syn alt Alter: 102 Wo n = 8	0,37124112 ▼±0,04*	0,16453628 ±0,02	0,32380584 ±0,08	0,24834852 ±0,03	0,14309408 ±0,03
Kontrolle alt Alter: 106 Wo n = 4	0,55642675 ±0,05	0,20268658 ±0,02	0,38794935 ±0,09	0,43082385 ±0,08	0,1776726 ±0,02
Gen aus CaM_syn Alter: 96 (57+39) Wo n = 10	0,595665 ±0,06	0,1480961 ±0,01	0,494673 ±0,02	0,38679495 ▼±0,03*	0,2506632 ±0,03
Gen aus Kontrolle Alter: 97 (58+39) Wo n = 5	0,57758704 ±0,07	0,12230956 ±0,02	0,5269224 ±0,06	0,52809156 ±0,02	0,33597664 ±0,02
<i>Striatum</i>					
CaM_syn Alter: 60 Wo n = 10	19,1340835 ±0,69	1,79221496 ±0,13	1,32455756 ±0,07	0,7327515 ±0,02	0,42629952 ±0,02
Kontrolle Alter: 61 Wo n = 6	19,4894024 ±1,39	2,1792484 ±0,15	1,34396793 ±0,08	0,7573538 ±0,06	0,44555973 ±0,03

CaM_syn alt Alter: 102 Wo n = 8	13,3974324 ±0,89	1,096012 ±0,12	0,50372227 ±0,04	0,3503878 ±0,04	0,23256293 ±0,02
Kontrolle alt Alter: 106 Wo n = 4	14,3093915 ±1,06	1,38253845 ±0,21	0,624946 ±0,06	0,42722314 ±0,03	0,29362857 ±0,05
Gen aus CaM_syn Alter: 96 (57+39) Wo n = 10	16,1837453 ±1,56	1,64040385 ±0,28	0,4257103 ±0,02	0,64075875 ±0,05	0,2733204 ±0,05
Gen aus Kontrolle Alter: 97 (58+39) Wo n = 5	15,9279686 ±1,07	1,68980844 ±0,23	0,502872 ±0,04	0,73455945 ±0,02	0,3971224 ±0,02
Mittelhirn (inkl. Substantia nigra)					
CaM_syn Alter: 60 Wo n = 10	0,14742236 ±0,01	0,06855118 ±0,01	n.g.	1,20881664 ±0,03	1,05994907 ±0,12
Kontrolle Alter: 61 Wo n = 6	0,16672317 ±0,02	0,0687529 ±0,00	n.g.	1,3602874 ±0,11	1,05530928 ±0,05
CaM_syn alt Alter: 102 Wo n = 8	0,2524485 ±0,03	0,1186786 ±0,01	0,49965313 ±0,08	1,4492669 ±0,14	1,5188928 ±0,17
Kontrolle alt Alter: 106 Wo n = 4	0,2569869 ±0,03	0,10779413 ±0,01	0,413594 ±0,05	1,3976517 ±0,17	1,4047464 ±0,20
Gen aus CaM_syn Alter: 96 (57+39) Wo n = 10	0,211792 ±0,02	0,10548275 ±0,01	0,5053317 ±0,04	0,8203839 ▼±0,06*	0,7604024 ▼±0,08**
Gen aus Kontrolle Alter: 97 (58+39) Wo n = 5	0,31178808 ±0,04	0,14261604 ±0,01	0,62195792 ±0,03	1,2966192 ±0,12	1,21496128 ±0,07

▼ Felder mit roter Schrift: signifikante Reduktion des Neurotransmittergehaltes; blaue Schrift: nach Dox-Behandlung auf gleichem Niveau wie Dox-behandelten Kontrollen; *p < 0,05; **p < 0,05; n.g. nicht getestet aufgrund mess-technischer Probleme; Daten werden gemittelt ± Standardfehler gezeigt

In 60 Wochen alten CaM_syn Mäusen konnte eine signifikante Minderung von DOPAC im Riechhirn nachgewiesen werden, die sich jedoch in älteren Mäusen nicht bestätigte. Dahingegen zeigten ca. 100 Wochen alte CaM_syn Mäuse eine signifikante Herabregulation des DA Gehaltes (0,371 ng/mg) im Vergleich zu Kontrolltieren. Die Antibiotika-Behandlung von ca. 40 Wochen in gleichaltrigen Mäusen ergab ein DA-Level vergleichbar mit unbehandelten und behandelten Kontrollen (0,596 ng/mg vs. 0,556 ng/mg und 0,576 ng/mg Nassgewicht; Tabelle 12) so dass das in CaM_syn Mäusen beobachtete DA-Defizit spezifischer Effekt des Transgens sein sollte. Ebenso wurde der Serotonin-Metabolismus beeinträchtigt, was jedoch nur in Dox-behandelten CaM_syn Mäusen und Kontrollen im Bereich des Bulbus und des Mittelhirns beobachtet. Dieser Effekt trat jedoch in unbehandelten Mäusen nicht auf und wird daher als unspezifisch betrachtet.

Tabelle 13

Konzentration von Dopamin, Serotonin und jeweiligen Metaboliten im Riechhirn, Striatum und der Mittelhirnregion in CaM_syn1 konditionalen Mäusen; Angaben in [ng/mg Nassgewicht]

LINIE Alter (Gen an + off)	DOPAMIN	DOPAC	HVA	SEROTONIN	5'HIAA
Bulbus olfactorius					
CaM_syn1 Alter: 60 Wo n = 4	0,47380056 ±0,05	0,13709489 ±0,02	0,43586289 ±0,04	0,2088005 ±0,08	0,15933333 ±0,05
Kontrolle Alter: 60 Wo n = 4	0,55674192 ±0,03	0,17631822 ±0,01	0,3329705 ±0,04	0,2088005 ±0,02	0,13384 ±0,01

Gen aus CaM_syn1 Alter: 52 (0+52) Wo n = 4	0,52743142 ±0,05	0,144566 ±0,01	0,37229533 ±0,04	0,2314885 ±0,04	0,14308133 ±0,02
Gen aus Kontrolle Alter: 96 (0+52) Wo n = 4	0,55626917 ±0,02	0,1588545 ±0,03	0,36090783 ±0,03	0,25718975 ±0,04	0,13511467 ±0,02
Striatum					
CaM_syn1 Alter: 60 Wo n = 4	16,3617724 ±0,89	1,10142856 ±0,10	1,88921156 ▲±0,08*	0,85339967 ±0,06	0,63754578 ▲ ±0,03*
Kontrolle Alter: 60 Wo n = 4	15,8714782 ±0,54	1,22642958 ±0,05	1,52653233 ±0,05	0,6923385 ±0,14	0,39674 ±0,06
Gen aus CaM_syn1 Alter: 52 (0+52) Wo n = 4	15,3424709 ±0,74	1,16605367 ±0,04	1,95288033 ±0,28	0,7745825 ±0,08	0,60148333 ▲±0,06**
Gen aus Kontrolle Alter: 96 (0+52) Wo n = 4	15,6776507 ±1,55	1,1103005 ±0,14	1,37728017 ±0,10	0,62374275 ±0,05	0,32615533 ±0,03
Mittelhirn (inkl. Substantia nigra)					
CaM_syn1 Alter: 60 Wo n = 4	0,31661778 ±0,01	0,14582667 ±0,01	0,50157732 ±0,00	1,53115785 ±0,12	1,19706639 ±0,07
Kontrolle Alter: 60 Wo n = 4	0,23268755 ±0,04	0,2139913 ±0,05	0,46928279 ±0,02	1,4176455 ±0,06	1,1525536 ±0,06
Gen aus CaM_syn1 Alter: 52 (0+52) Wo n = 4	0,33605538 ±0,03	0,18824704 ±0,04	0,52245683 ±0,05	1,37367599 ±0,04	1,26147082 ±0,07
Gen aus Kontrolle Alter: 96 (0+52) Wo n = 4	0,315797 ±0,02	0,2015519 ±0,01	0,42561346 ±0,01	1,34649735 ±0,13	1,062116 ±0,08

▲ Felder mit grüner Schrift: signifikante Zunahme des Neurotransmittergehaltes; *p < 0,05; **p < 0,05; Daten werden gemittelt ± Standardfehler gezeigt.

CaM_syn1 Mäuse zeigten eine signifikante Hochregulierung des Serotonin-Metabolits 5-HIAA und des DA-Metabolits HVA. Durch Antibiotika-Behandlung wurde die Signifikanz im Hinblick auf den HVA-Level nicht mehr erreicht, was jedoch auf der hohen Messvarianz beruhen könnte. Die Behandlung zeigte keinen Effekt auf das Ergebnis der 5-HIAA Regulation. Die Konzentration von > 0,6 ng/mg Nassgewicht für 5'-HIAA und > 1,8 ng/mg Nassgewicht für HVA spricht für einen spezifischen transgenen Effekt, der im Hinblick auf andere Linien in dieser Höhe nicht beobachtet wurde.

Tabelle 14

Konzentration von Dopamin, Serotonin und jeweiligen Metaboliten im Riechhirn, Striatum und der Mittelhirnregion in PrP_syn30 konditionalen Mäusen; Angaben in [ng/mg Nassgewicht]

	DOPAMIN	DOPAC	HVA	SEROTONIN	5'HIAA
Bulbus olfactorius					
PrP_syn30 Alter: 38 Wo n = 4	0,2758969 ▼±0,02*	0,07942725 ▼±0,01*	0,1778272 ▼±0,01*	0,37828695 ±0,03	0,2425372 ±0,02
Kontrolle Alter: 35 Wo n = 4	0,346053 ±0,02	0,1161571 ±0,00	0,2461522 ±0,02	0,39657915 ±0,02	0,2483688 ±0,01
Gen aus PrP_syn30 Alter: 79 (58+21) Wo n = 4	0,31967355 ±0,02	0,11489635 ±0,01	0,1856618 ±0,04	0,13602165 ±0,02	0,1067852 ±0,008

Gen aus Kontrolle Alter: 77 (46+21) Wo n = 4	0,2974543 ±0,03	0,08043585 ±0,01	0,2661031 ±0,09	0,20132055 ±0,04	0,0964604 ±0,01
Striatum					
PrP_syn30 Alter: 38 Wo n = 4	14,1941297 ±1,35	2,6497603 ±0,27	1,2481611 ±0,15	0,4677273 ▲±0,05*	0,3856504 ±0,04
Kontrolle Alter: 35 Wo n = 4	11,5301834 ±0,98	2,69539945 ±0,27	1,0117566 ±0,06	0,2597067 ±0,02**	0,2888076 ±0,01
Gen aus PrP_syn30 Alter: 79 (58+21) Wo n = 4	19,5457542 ±0,81	1,7894245 ±0,04	1,5119867 ±0,17	0,8537778 ±0,07	0,4734112 ±0,02
Gen aus Kontrolle Alter: 77 (46+21) Wo n = 4	18,3843966 ±1,17	1,6697373 ±0,26	1,1890372 ±0,10	0,87387795 ±0,11	0,446452 ±0,05
Mittelhirn (inkl. Substantia nigra)					
PrP_syn30 Alter: 38 Wo n = 4	0,1728374 ▲±0,02*	0,11170245 ±0,01	0,1243515 ±0,03	0,8616477 ▲±0,07*	1,0111612 ±0,12
Kontrolle Alter: 35 Wo n = 4	0,10939435 ±0,00	0,0983385 ±0,00	0,1004833 ±0,01	0,6761733 ±0,02	0,8908008 ±0,07
Gen aus PrP_syn30 Alter: 79 (58+21) Wo n = 4	0,23968425 ±0,037	0,1094331 ±0,014	n.g.	1,4863476 ±0,09	1,1829544 ±0,05
Gen aus Kontrolle Alter: 77 (46+21) Wo n = 4	0,22947285 ±0,04	0,09085805 ±0,01	n.g.	1,45497435 ±0,11	1,0356348 ±0,09

▼ Felder mit roter Schrift: signifikante Reduktion des Neurotransmittergehaltes; ▲ Felder mit grüner Schrift: signifikante Zunahme des Neurotransmittergehaltes; blaue Schrift: nach Dox-Behandlung auf gleichem Niveau wie Dox-behandelten Kontrollen; *p < 0,05; **p < 0,05; n.g. nicht getestet aufgrund mess-technischer Probleme; Daten werden gemittelt ± Standardfehler gezeigt.

Die Expression des mutierten [A30P] α -Syn Transgens unter Kontrolle des PrP-Promotors führte im Riechhirn von ca. 38 Wochen alten Mäusen zu einer signifikanten Herabregulation sowohl des DA als auch dessen Metaboliten und ist daher ein, auch im Hinblick auf die starke Expression im Riechhirn (Abb.8B), überzeugendes Ergebnis einer α -Syn induzierten Beeinträchtigung der dopaminergen Neurotransmission. Durch Antibiotika-Behandlung von älteren Mäusen konnte die Signifikanz durch Angleichen der Werte auf das Niveau der Kontrolltiere, aufgehoben werden. Das Ergebnis spricht daher ebenso für einen auf das Transgen spezifischen Effekt. Dagegen konnten im Bereich des Mittelhirns in unbehandelten PrP_syn30 Mäusen eine signifikante Erhöhung von DA und Serotonin, letzteres ebenso im Striatum beobachtet werden, was auf einen kompensatorischen Effekt schließen lässt.

Tabelle 15

Konzentration von Dopamin, Serotonin und jeweiligen Metaboliten im Riechhirn, Striatum und der Mittelhirnregion in CaM_syn30 Mäusen; Angaben in [ng/mg Nassgewicht]

	DOPAMIN	DOPAC	HVA	SEROTONIN	5'HIAA
<i>Bulbus olfactorius</i>					
CaM_syn30 Alter: 108 Wo n = 4	0,72778287 0,24	0,09391187 ▼0,01**	0,169446 0,02	0,5269288 ▲0,03*	0,2072608 0,05
Kontrolle Alter: 113 Wo n = 4	0,38283295 0,07	0,1591907 0,01	0,1742743 0,02	0,2639607 0,06	0,1537248 0,02
<i>Striatum</i>					
CaM_syn30 Alter: 108 Wo n = 4	11,991682 ±2,43	0,8023413 ±0,06	0,7064805 ±0,11	0,480702 ±0,03	0,2325948 ▼±0,04*
Kontrolle Alter: 113 Wo n = 4	8,22030307 ±2,30	1,581821 ±0,60	0,8935088 ±0,19	0,4809147 ±0,04	0,4528572 ±0,05
<i>Mittelhirn (inkl. Substantia nigra)</i>					
CaM_syn30 Alter: 108 Wo n = 4	0,3199572 ±0,07	0,1050625 ±0,02	0,2310296 ±0,02	1,71446835 ±0,31	1,5626776 ±0,40
Kontrolle Alter: 113 Wo n = 4	0,23079655 ±0,05	0,1154847 ±0,01	0,3207631 ±0,05	1,675868 ±0,32	1,4667792 ±0,38

▼Felder mit roter Schrift: signifikante Reduktion des Neurotransmittergehaltes; ▲Felder mit grüner Schrift: signifikante Zunahme des Neurotransmittergehaltes *p < 0,05; **p < 0,05; Daten werden gemittelt ± Standardfehler gezeigt.

In CaM_syn30 Mäusen führte die Expression des Transgens zu einer signifikanten Minderung des DOPAC-Levels im Riechhirn, begleitet von einem erhöhten striatalen 5-HIAA-Level. Im Mittelhirn-Bereich konnten keine Regulationen festgestellt werden.

Die hohen Varianzen zwischen den Gruppen (Tabelle 11-15) und einzelnen Messungen (bspw. schwanken die Werte von DA im Riechhirn zwischen 0,2 ng/mg Nassgewicht für PrP_syn30 Mäuse bis 0,7 ng/mg Nassgewicht für CaM_syn30 Mäuse) lassen keine vergleichende statistische Auswertung über alle Linien zu, was neben messtechnischen Problemen ebenso auf Ungenauigkeiten bei der Präparation beruhen kann.

3.2.3.2 microPET-Analyse konditionaler CaM_syn Mäuse

In Patienten mit IPS (Antonini *et al.*, 2001) und modellhaft in MPTP-behandelten Tieren (Brownell *et al.*, 2003; Honer *et al.*, 2006) konnte eine Korrelation zwischen nigraler dopaminerger Neurodegeneration und der Reduktion des Bindungspotenzials des Dopamin-Transporters (DAT) im Striatum gezeigt werden. Da CaM_syn Mäuse in der EM-Analyse u.a. nigrale degenerierte Zellen zeigten (Abb. 11C, E, F), wurde das DAT-Bindungspotenzial *in vivo* mittels microPET analysiert. Mit Hilfe des [¹¹C]-d-threo-Methylphenidat-Radiopharmazeutikums (¹¹C-MP), welches spezifisch an DAT bindet, konnte das Striatum als ROI (region of interest)

selektiv vom Resthirn abgebildet werden (Abb. 13A, B). Qualitativ konnte eine verminderte ^{11}C -MP-Aufnahme in CaM_syn Mäusen im Vergleich zu Kontrollen beobachtet werden (vergleiche Abb. 13A mit B; Summe aller Frames einer einstündigen microPET-Aufnahme). Die einzelnen 3D-ROIs lieferten die quantitativen Werte für Zeit-Aktivitätskurven (TACs, time activity curves). Die TACs (exemplarisch in Abb. 13C für die CaM_syn Maus) der spezifischen Bindung des DAT-Liganden im Striatum bzw. des freien Radiopharmazeutikums im Kleinhirn (Cerebellum) spiegelte am Anfang die Perfusion (K_1) und nach Erreichen eines Pseudo-Equilibriums das modifizierte Bindungspotenzial (BP') wieder. Nach Normierung der einzelnen Bilder im Hinblick auf die eingesetzte Radioaktivität ergab sich die deutlich geringere Anreicherung des Tracers im Striatum der CaM_syn transgenen Maus (Abb. 13A) im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 13B).

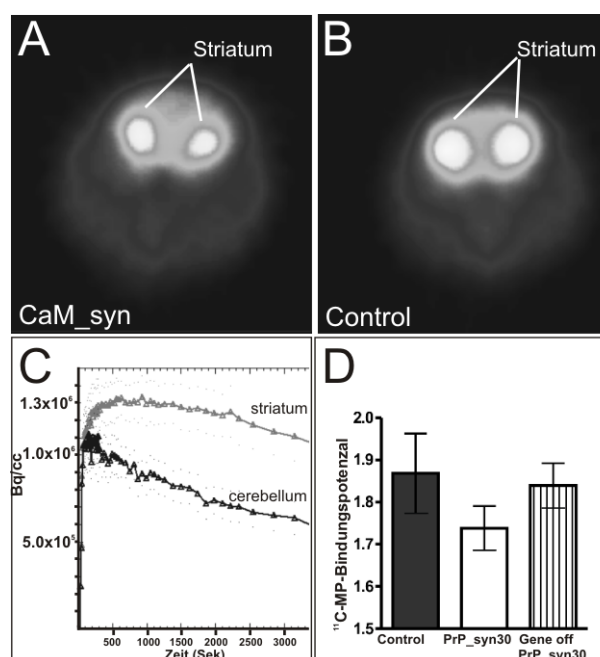


Abb. 13 Quantifizierung des striatalen DAT Bindungs-Potenzials in konditionalen CaM_syn Mäusen

Repräsentative transaxiale MicroPET-Aufnahmen (der 3D-Datenakquisition über 60 min) des Striatums wurden mittels Injektion des [^{11}C]-d-threo-Methylphenidate-Radiopharmazeutikums (^{11}C -MP) erzeugt. (A) Minderung des ^{11}C -MP-Signals im Striatum der CaM_syn Maus im Vergleich zur (B) Kontrolle. (C) Repräsentative Zeit-Aktivitätskurve einer CaM_syn Maus. Die obere Kurve entspricht dem ROI (region of interest) des Striatums und die untere Kurve der Referenzregion des Kleinhirns (cerebellum), die für die quantitative Berechnung des Bindungspotenzials (BP') herangezogen wurden. (D) Die quantitative Analyse des BP' im Striatum der CaM_syn Mäuse ($n = 5$), Kontrollen ($n = 7$) und Doxyzyklin behandelten (tet off CaM_syn; $n = 3$) Mäuse zeigte eine Minderung des Bindungspotenzials in CaM_syn Mäusen, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Abkürzungen: ^{11}C -MP, ^{11}C -d-threo-Methylphenidate; Kontrolle, Kontrollmaus; Daten werden gemittelt und mit Standardfehler gezeigt.

Die Auswertung der striatalen und cerebellären TACs der CaM_syn Mäuse ($n = 5$; Alter: 88 ± 5 Wochen) ergab eine Reduktion des DAT-Bindungspotenzials von 20% im Vergleich zu Kontrolltieren ($n = 7$; Alter: 89 ± 4 Wochen). Die Behandlung mit Doxyzyklin zur Expressionsreduktion des transgenen α -Syn führte zu einem nur um 9% verminderten Bindungspotenzials in 89 Wochen alten Mäusen. Jedoch erreichten die Ergebnisse aufgrund der hohen Varianz keine statistische Signifikanz ($p = 0,437$; ANOVA; Abb. 13D).

3.2.4 Mitochondriale Funktionsanalyse

Mitochondriale Komplex I Inhibitoren wie MPTP führen, ähnlich wie beim vererbten Morbus Parkinson, zur Degeneration dopaminerger Neurone (Davis *et al.*, 1979). Da in Mäusen der Linie PrP_syn30 und CaM_syn Neurotransmitter-Defizite und bei CaM_syn Mäuse ebenso Neurodegenerationen vorgefunden werden konnten, wurde der Einfluss der Expression des

Transgens auf die Funktionsfähigkeit der Mitochondrien analysiert. Zur Funktionsanalyse wurde vor der Mitochondrien-Isolation das Gehirn von CaM_syn Mäusen in Striatum, Nigra und Resthirn und von PrP_syn30 Mäusen in Bulbus olfactorius und Resthirn unterteilt. Im Resthirn konnten die Mitochondrien nach Standardbedingungen (s. 12.6) isoliert werden. Die Bulbus-Mitochondrien der PrP_syn30 Mäuse sowie die der Nigra und des Striatums in CaM_syn Mäusen konnten jedoch aufgrund des geringen Ausgangsmaterialvolumens nur als Homogenat untersucht werden. Nach Ca^{2+} -Titration zeigte sich, dass die Maximalgeschwindigkeit der Atmungskette (State 3; s. 12.6) in PrP_syn30 Resthirn-Mitochondrien für die Glutamat/Malat und die Succinat/Rotenon Atmung signifikant reduziert war, und ebenso RCI_{succ} einen signifikant geringeren Wert aufzeigte. Dies legte nahe, dass eine mitochondriale Schädigung vorliegt. Die $\text{State3}_{\text{Glutamat/Malat}}$ stieg durch steigende Konzentrationen an Ca^{2+} anfänglich an, nahm jedoch bei höheren Ca^{2+} ab. Die kalkulierten State3-Verläufe zeigten klare Differenzen zwischen PrP_syn30, Dox-behandelten PrP_syn30 (Gen aus PrP_syn30) und Kontrollmäusen (Abb. 14): In PrP_syn30-Mitochondrien war die Maximalgeschwindigkeit der Atmungskette bereits bei einer niedrigeren Ca^{2+} -Konzentration (50 μM) im Vergleich zu Dox-behandelten PrP_syn30 und Kontrollmäusen (75 μM) erreicht (p = 0,019). Ebenso war die Atmungsrate nach Zugabe von 50 μM und 75 μM Ca^{2+} signifikant reduziert (vergleiche PrP_syn30 mit Gen aus PrP_syn30 und Kontrolle; p = 0,012). Bei (physiologischen) Konzentrationen unter 50 μM Ca^{2+} konnten jedoch keine Unterschiede zwischen PrP_syn30 und Gen aus PrP_syn30 Mäusen in der Succinat-abhängigen Veratmung von Glutamat festgestellt werden, was darauf hinweist, dass primär kein Komplex-I-Defizit der Mitochondrien vorlag. Die signifikanten Unterschiede bei höheren Ca^{2+} -Konzentrationen weisen jedoch auf eine verminderte Funktionalität der Mitochondrien unter Ca^{2+} -Stress hin.

Die Analyse der PrP_syn30 Bulbus-Homogenate zeigte keine Signifikanzen, wobei davon ausgegangen wird, dass der Ca^{2+} -Gehalt des umliegenden Gewebes spezifische Defizite der Mitochondrienfunktion (unter erhöhten Ca^{2+} -Spiegel) maskierte, weshalb hier eine geeignete Isolations-Methode evaluiert werden muss.

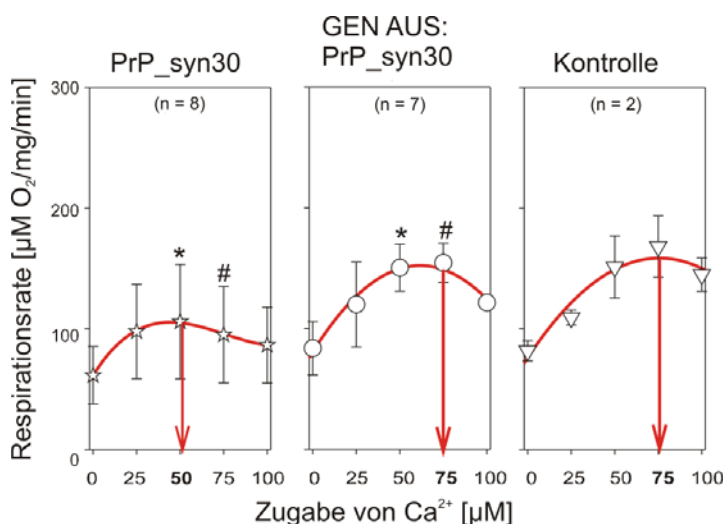


Abb.14 Verminderte Komplex I-abhängige Atmungsrate in Resthirn-Mitochondrien konditionaler PrP_syn30 Mäuse

Ca^{2+} -Titration der Maximalgeschwindigkeit der Atmungskette (State 3) mit Glutamat/Malat als zu veratmendes Substrat zeigten bei Konzentrationen $\geq 50 \mu\text{M}$ Ca^{2+} signifikant reduzierte Atmungsraten in PrP_syn30 Mäusen und eine verminderte Ca^{2+} -Schwelle für das Erreichen der Ca^{2+} -abhängigen Respirationsinhibition. Daten werden gemittelt und mit Standardfehler gezeigt.

Die Atmungsgeschwindigkeit in CaM_{syn} Mäusen war in der Tendenz geringer als die der Kontrollmäuse mit erwartungsgemäß verbesserter Atmungsgeschwindigkeit in den Mäusen mit Dox-Behandlung von Geburt an. Die geringe Anzahl der bisher analysierten Mäuse (CaM_{syn}: n = 2, Gen aus CaM_{syn}: n = 3; Kontrolle: n = 2) könnte der Grund für die lediglich nachgewiesene Tendenz sein.

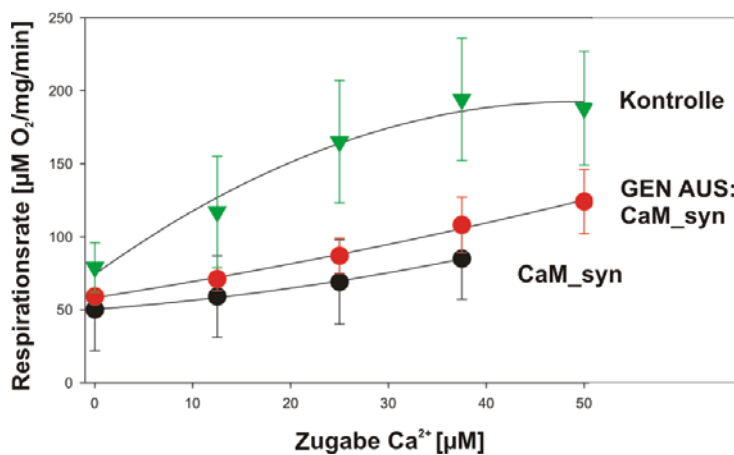


Abb. 15 Tendenzielle Reduktion der Komplex-I-abhängigen Atmungsrate in Resthirn-Mitochondrien konditionaler CaM_{syn} Mäuse
CaM_{syn} Mäuse (n = 2) zeigten bei der Ca²⁺-Titration der Komplex-I-abhängigen Atmungsrate (State 3) eine tendenzielle Reduktion der Sauerstoffproduktion im Vergleich zu den Mitochondrien aus dem Resthirn von Kontrollmäusen (n = 2). Ebenfalls konnte eine Verbesserung der Atmungsrate Dox-behandelter CaM_{syn} Mäusen (Gen aus CaM_{syn}: n = 3) gezeigt werden. Daten wurden gemittelt und mit Standardfehler gezeigt.

3.2.5 Analysen auf Transgen-induzierte kompensatorische Mechanismen

3.2.5.1 Microarray-Analyse

Um feststellen zu können, ob in 3-Monate-alten CaM_{syn} und CaM_{syn}30 Mäusen eine früh-kompensatorische Antwort der Transkriptomenebene auf die Expression des Humanpathogens vorlag, wurden Microarray-Analysen durchgeführt. In der Microarray-Studie wurde der Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430A 2.0 verwendet, der insgesamt über 22.000 unterschiedliche Transkripte repräsentiert. Die Auswertung der gemessenen Intensitätswerte erfolgte mit Hilfe der Array Assist 4.0 Software (Stratagene). Für die Bewertung als reguliertes Gen mussten als Kriterium der Regulationsfaktor $\geq 1,5$ sein (sog. „N-fold“ Wert) und die Schwankung der Transkriptregulation in drei unabhängigen Scans einer Student's t-Test Analyse mit $p \leq 0,05$ genügen.

Die differentiell regulierten Gene im Gesamthirn der CaM_{syn} Mäuse im Bezug zu gleichaltrigen und gleichgeschlechtlichen Kontrollen sind in Tabelle 16 und die aus dem RNA-Extrakt selektiv des Riechhirns von CaM_{syn}30 Mäusen in Tabelle 17 dargestellt. Zur Erfassung der Datenmenge im Hinblick auf einen Signalweg-Zusammenhang wurde die Ingenuity-Software (www.ingenuity.com) herangezogen, welche es durch eine programmierte Internetrecherche ermöglicht die Liste der potenziell regulierten Gene einem putativen Signalweg zuzuordnen.

Tabelle 16

Stark regulierte Gene in CaM_{syn} Gesamthirn in Bezug zu Kontrollen

Gen (Synonyme in der Maus)	Regulation	Netzwerk	Funktion	Expression reguliert durch	Evtl. Bezug zum IPS
H2-D1 (H2-D; H2 db; H2-L; MHC B7.2; MHC-i-kd)	64,208 ▲	DNA-Replikation, Rekombination, Reparatur, Dermatologische Erkrankung, Zelltod	AG-präsentation aus ER-Lumen; Zytolyse	28 beschriebene Gene	Ubiquitin-Proteasom-Pfad (Luckey <i>et al.</i> , 1998) (Diaz-Hernandez <i>et al.</i> , 2003)* ER-Stress (Ye <i>et al.</i> , 2004) Neuroinflammation (Foster <i>et al.</i> , 2002)
Supt16H (Cdc68, Fact140, Spt16)	19,252 ▲	Keine Zuordnung über Ingenuity	Transkriptions-Elongation	unbekannt	?
ST6Gal2 (C230064G14Rik, mKIAA1877, Siat2, ST6Gal II)	3,714 ▲	Keine Zuordnung über Ingenuity	Sialyl-Transferase	unbekannt	?
HSPA1B (70kDa, hsp68, Hsp70, Hsp70.1, Hsp70-1, HSP70A1)	3,293 ▲	DNA-Replikation, Rekombination, Reparatur, Dermatologische Erkrankung, Zelltod	Protein-Faltung;	65 beschriebene Gene	Ubiquitin-Proteasom-Pfad (Park <i>et al.</i> , 2007) ER-Stress (Oyadomari <i>et al.</i> , 2006)
SLC8A1 (D930008O12Rik, MGC90693, Ncx1)	2,828 ▲	Genexpression, Zelluläres Wachstum und Proliferation, konnektive Gewebe-Entwicklung und -Funktion	Ca ²⁺ /Na ⁺ -Austauscher	Mechanische Überladung, CYP27B1, ATP2A2, Calcineurin, 1-Alpha, 25-Dihydroxy vitamin D3, DIO2, S100A1, Ca ²⁺ -reiche Diät	Oxidativer Stress (Huschenbett <i>et al.</i> , 1998) Ca ²⁺ -Stress (Craner <i>et al.</i> , 2004)* ER-Stress (Nagano <i>et al.</i> , 2005)
HSPA1A (70kDa, heat shock protein 1A, Hsp70.3, Hsp70-3, Hsp72)	2,263 ▲	Genexpression, Zelluläres Wachstum und Proliferation, konnektive Gewebe-Entwicklung und -Funktion	Protein-Faltung	39 beschriebene Gene	Ubiquitin-Proteasom-Pfad (Pritts <i>et al.</i> , 2002) ER-Stress (Kadara <i>et al.</i> , 2007)
CD320 (425O18-1, 8D6, D17Erd716e, NG29, VLDL)	2,173 ▲	Keine Zuordnung über Ingenuity	B-Lymphozytäres Zellwachstum	unbekannt	?
BMP2 (AI467020, Bmp2a)	1,940 ▲	Genexpression, Zellzyklus, zelluläre Anordnung und Organisation	Knorpel- und Knochenentwicklung	24 beschriebene Gene	?
FOS (C-fos, D12Rfj1)	1,897 ▲	Genexpression, Zellzyklus, zelluläre Anordnung und Organisation	Zusammen mit JUN: Bildung des Transkriptions-Faktor Komplexes AP-1	546 beschriebene Gene	Apoptose (Ebadi <i>et al.</i> , 2005)*
CLDN5 (AI854493, Claudin-5, MBEC1, MGC102088, Tmvcf)	1,877 ▲	DNA-Replikation, Rekombination, Reparatur, Dermatologische Erkrankung, Zelltod	Bildung von Tight-Junction (Zell-Zell-Verbindungen)	CLDN6, HOXA10, Altern, Diät, Progesterone	Blut-Hirnschranke (Ohtsuki <i>et al.</i> , 2007)
RGPRIP1 (0610005A07Rik, 4930401L23Rik,	2,786 ▼	Keine Zuordnung über Ingenuity	Entwicklung von Photorezeptor-	unbekannt	?

		Zellen			
4930505G06Rik, A930002K18Rik, AA415034)					
DSCR1L1 (MCIP2, ZAKI-4)	2,646 ▼	Keine Zuordnung über Ingenuity	Komplexformation mit Calcineurin A; Entwicklung von Muskelzellen	L-triiodothyronine	?
RASD1 (Dexas1, Ras-related protein)	2,331 ▼	DNA-Replikation, Rekombination, Reparatur, Dermatologische Erkrankung, Zelltod	GTPase-Aktivität, Verbindung zur Zellmorphologie und Signaltransduktion	Dexamethasone, TNF, Troglitazone	NO-Signal-Wege in Zusammenhang mit Eisen-Import (Cheah <i>et al.</i> , 2006)
FKBP5 (51kDa, D17Ertd592e, Dit1, FKBP51)	2,239 ▼	DNA-Replikation, Rekombination, Reparatur, Dermatologische Erkrankung, Zelltod	Protein-Faltung	1,2-Dithiol-3-thion, MECP2, Salicylsäure, CLOCK, LIPE, NFE2L2	Apoptose (Giraudier <i>et al.</i> , 2002)
S3-12	2,182 ▼	Keine Zuordnung über Ingenuity	Keine Angabe über Ingenuity	Keine Angabe über Ingenuity	?
LUZP5 (5830426I05Rik, Luzp5, mCAP-G2, Mtb)	2,117 ▼	Keine Zuordnung über Ingenuity	Zell-Zyklus	unbekannt	Apoptose (Smith <i>et al.</i> , 2004)
APOD	2,087 ▼	DNA-Replikation, Rekombination, Reparatur, Dermatologische Erkrankung, Zelltod	Lipid-Transporter	GW3965, GW501516, HNF4A, MTPN, NR1H3, Prnp, TO-901317	SN-Gliazellen-Neuroprotektion (Ordonez <i>et al.</i> , 2006)*
ANG (AI385586, Ang, Ang1, Rnase5, Rnase5a)	2,046 ▼	Genexpression, Zelluläres Wachstum und Proliferation, konnektive Gewebe-Entwicklung und -Funktion	Angiogenese	1,2-Dithiol-3-thione, ARNT2, ERBB2, NFE2L2, NR112, PTGS2, SIM1, Batimastat	?
MYOC (AI957332, GLC1A, MGC159032, TIGR)	1,905 ▼	Keine Zuordnung über Ingenuity	Glaukom-assoziiert	unbekannt	?
CRIM1 (AU015004)	1,715 ▼	Karzinome, Zellzyklus, Zell-Zell-Interaktion und Signalübertragung	Regulation des Zellwachstums, insb Motoneurone	unbekannt	Ausbildung kortikospinaler Motoneurone (Kolle <i>et al.</i> , 2003)

▲ im Bezug zur Kontroll-RNA hochregulierte Transkripte; ▼ im Bezug zur Kontroll-RNA herabregulierte Transkripte; * im Zusammenhang mit Neurodegeneration bzw. einer neurodegenerativen Erkrankung publiziert

Für CaM_syn Mäuse konnten insgesamt 92 regulierte Transkripte festgestellt werden. Die stärkste Hochregulierung für ein Transkript mit bekanntem Proteinprodukt fand sich für H2-D1 (histocompatibility 2, D region locus 1), welches als Funktion die Antigen-Präsentierung auf der Zelloberfläche innehat, und auch im HD-Mausmodell reguliert vorliegt (Diaz-Hernandez *et al.*, 2003). Stark herabreguliert war Rasd1, welches im GTP-vermittelten Signaltransduktionsweg eine Rolle spielt (Cheah *et al.*, 2006). Bemerkenswert war ebenso die Hochregulierung einer Reihe von Hitzeschockproteinen, darunter Hspa (heat shock protein) 8, Hspa1a und Hspa1b, was ein Hinweis auf regulative Mechanismen im Zusammenhang einer Beeinträchtigung des UPS und oxidativen Stress, sein könnte (Pritts *et al.*, 2002).

Tabelle 17

Stark regulierte Gene im CaM_{syn30} Riechhirn (Bulbus olfactorius) in Bezug zu Kontrollmäusen

Gen (Synonyme in der Maus)	Regulation	Netzwerk	Funktion	Expression (in der Maus) reguliert durch	Evt. Bezug zum IPS
CAPI (Adenylyl cyclase- associated protein)	280,328 ▲	Keine Zuordnung über Ingenuity	Aktivierung der Adenylat-Zyklase: cAMP-Produktion	MAFB, CLEC11A, PSEN1, PSEN2, RAC2, TGFB1	Endo- Lysosome n-System; Vesikel- Transport (Sultana <i>et al.</i> , 2005)
CLASP2 (150004F14Rik, 8030404L10Rik, C77448, CLASP2beta, mKIAA0627)	10,204 ▲	Keine Zuordnung über Ingenuity	Mikrotubuli- Stabilität	unbekannt	Mikrotubuli- assoziiierter Transport (Drabek <i>et al.</i> , 2006)
BHMT (MGC117976, MGC46866)	4,806 ▲	Keine Zuordnung über Ingenuity	Methyltransferase- Aktivität	1,2-Dithiol-3-thion, HIST1H1A, HIST1H1T, NFE2L2, NR1I2	?
ACSL4 (9430020A05Rik , ACS4, AU018108, Facl4, Lacs4)	4,185 ▲	Zelluläre Entwicklung, Zell- Zell- Signalübertragung und Interaktion, Entwicklung und Funktion des Immun- lymphatischen Systems	Abbau langkettiger Fettsäuren, Lipidsynthese	PPARA, Pirinixic- Säure, CLOCK, ERBB2, MYC, PPARD, RORA, SCAP, SREBF1, TFAM, Hypertrophie	Lipid- Stoffwechsel (Stinnett <i>et al.</i> , 2007)
PTP4A2 (MGC102154, MGC103400, Prl-2)	4,074 ▲	Zellverband und Organisation, Entwicklung und Funktion des Nervensystems, Zelltod	Protein Tyrosin / Serin / Threonin Phosphatase, Interagiert mit RABGGTB	NFKBIA	Apoptose (Werner <i>et al.</i> , 2003)
CYP1B1 (CP1B, P4501b1)	3,983 ▲	Zelluläre Entwicklung, Zell- Zell- Signalübertragung und Interaktion, Entwicklung und Funktion des Immun- lymphatischen Systems	Monoxygenase; Metall-, Häm-, Sauerstoff- Bindung als Bestandteil der Elektronentranspor- tkette	AHR, Benzo(a)pyren, FGF10, INSR, Wachstum, IGF2, IKKKB, Ins, NFKBIA, Altern, Dimethylbenzanthraz en, tetrachloro- Dibenzodioxine	ER-Stress (Franzen und Brittebo; 2005) Apoptose (Sparfel <i>et al.</i> , 2006) Östrogen- Metabolismus (Huber <i>et al.</i> , 2002)
CEBPD (Ccaat/enhancer binding protein delta, Cebp delta, Crp3)	3,498 ▲	Zelluläres Wachstum und Proliferation, Entwicklung, Funktion des hämatologischen Systems, Immunantwort	Transkriptions- faktor	STAT3, CAMK4, Calcium, cAMP, Lipoate	Entzündungs- prozesse (Sato <i>et al.</i> , 2007)
SULT1A1 (AI266890, aryl sulfotransferase, Mst, PST, St1a4, Stp, Stp1)	2,787 ▲	Keine Zuordnung über Ingenuity	Sulfotransferase	NR1I3, 1,4-bis[2-(3,5- Dichloropyridyloxy)] Benzen, Fasten	Östrogen- Metabolismus (Spink <i>et al.</i> , 2000) Gastrointestin ale Beteiligung; (Teubner <i>et al.</i> , 2007) Bio- transformatio n von 6-

ABCD2 (ABC39, ALDL1, ALDR, ALDRP)	2,549 ▲	Keine Zuordnung über Ingenuity	ATPase; Peroxisomaler Transport von Fettsäuren	L-Triiodothyronin, Fenofibrat, 10E,12Z-Octadecadienoic acid, 4-Phenylbutyric acid, ABCD1, PPARA, THRB, TNF, Troglitazon	Hydroxy-Melatonin (Aust <i>et al.</i> , 2005) Oxidativer Stress (Lu <i>et al.</i> , 2007)
APOD	2,531 ▲	Keine Zuordnung über Ingenuity	Lipid-Transporter	GW3965, GW501516, HNF4A, MTPN, NR1H3, Prnp, TO-901317	SN-Gliazellen-Neuroprotektion (Ordonez <i>et al.</i> , 2006)*
ACTN1 (3110023F10Rik, Actn1a, Alpha-Actinin1)	10,470 ▼	Keine Zuordnung über Ingenuity	Bindung von: Actinfilamenten, Ca ²⁺ , Integrin, Vinculin, Proteinen; Mitogenese	Myb Familie, MAFB, TGFB1	?
CUTL1 (AA407197, CDP, Cdp/cux, Cux, Cux-1, KIAA4047, MGC102214, mKIAA4047, Phox2)	4,690 ▼	Keine Zuordnung über Ingenuity	Transkriptionsfaktor oder involviert in Zellteilung und Zellwachstum	GH1, Small T Antigen, Wasserstoffperoxid	?
RGL1 (KIAA0959, mKIAA0959, Rgl)	3,303 ▼	Keine Zuordnung über Ingenuity	unbekannt	TNFSF11	?
CEP2 (AW490617, B230210E21Rik, Cep2, C-nap1, Inmp)	3,162 ▼	Zelluläre Entwicklung, Zell-Zell-Signalübertragung und Interaktion, Entwicklung und Funktion des Immun- bzw. lymphatischen Systems	Bindet NIMA-related kinase 2 während der Mitose	unbekannt	?
SRC (ASV, AW259666, C-SRC, NSRC, p60 SRC, p60v-Src, PP60, Pp60/c-Src, PP60C-SRC, PP60 SRC, SRC1, TVHUSC, V-SRC)	3,102 ▼	Karzinom, Zellmorphologie, Bindegewebserkrankung	Tyrosin / Protein-Kinase Involviert in der Embryonalentwicklung und Zellwachstum	GAST, TNFSF11, MYOD1, TNFRSF1B, Hyaluronsäure, CD44, CHUK, FRK, PTH, RAC1, TNFRSF1A, YY1, Cycloheximide, Polymethyl methacrylate	Apoptose (zahlreiche Artikel; u.a. Gillet <i>et al.</i> , 1995)
MGC5008 (1110006I15Rik, AA958958, C77652)	3,060 ▼	Keine Zuordnung über Ingenuity	Unbekannt; ist im ER lokalisiert	KRAS, MYCN	?
DMPK (DM, Dm15)	2,967 ▼	Zelluläre Entwicklung, Zell-Zell-Signalübertragung und Interaktion, Entwicklung und Funktion des Immun- bzw. lymphatischen Systems	Bindung von: Nukleotiden, ATP, Mg ²⁺ ; Serin / Threonin-Kinase; Transferase; Bindung indentscher Proteine; Involviert durch pathogene CTG-Repeat-Verlängerung in Myotone	SIX5, CXCL12, LIPE, TNFSF11, YY1, Wehen	?

VIPR2 (Pvr3, VPAC2, VPAC2R)	Vip2,	2,943 ▼	Keine Zuordnung über Ingenuity	Dystrophie G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Aktivität; Vasoaktiv-Intestinal-Polypeptid-Rezeptor-Aktivität	IL4, Cd3	Apoptose (Pankhaniya <i>et al.</i> , 1998)
MARK2 (AU024026, Emk, KIAA4207, mKIAA4207, Par-1)		2,862 ▼	Zelluläre Entwicklung, Zell-Zell-Signalübertragung und Interaktion, Entwicklung und Funktion des Immun- bzw. lymphatischen Systems	Serin / Threonin-Proteinkinase; involviert in Zellpolarität, Mikrotubuli-Stabilität und Entwicklung von Karzinomen	Apoptose, FAS, RBL2, Camptothecin, Fenofibrate, Phagocytose, Pirinixic-Säure	Mikrotubuli-assoziiierter Transport (Thies und Mandelkow; 2007)*
ZFP57 (G19)		2,721 ▼	Zellverband und Organisation, zellulärer Ausgleich, Zellmorphologie	Transkriptions-Repression; involviert in Entwicklung des peripheren NS	FGF2, HMGA1, LIF	?

In CaM_syn30 Mäusen wurden 311 Transkripte unterschiedlich reguliert. Die stärkste Hochregulierung der Transkription wurde im Cap1-Gen gefunden, das in die Produktion zyklischen AMP involviert ist und die Hochregulation von Cap1 und CLASP2 sprechen für eine Regulation des intrazellulären Transportes (Sultana *et al.*, 2005; Drabek *et al.*, 2006). Insgesamt waren insbesondere Apoptose-involvierte Transkripte reguliert, u.a. die Protein-Tyrosine-Phosphatase-Typ IVA (Klasse 2) oder Cytochrome P450 (Familie 1, Subfamilie B, Polypeptide 1) oder das „Rous sarcoma oncogene“ (src). Wie auch in CaM_syn Mäusen war Apolipoprotein D (APOD) reguliert, jedoch in CaM_syn30-Mäusen hochreguliert. Von diesem Protein ist bekannt, dass es in glären Zellen der *Substantia nigra* exprimiert wird und so eine protektive Rolle ausüben könnte (Ordonez *et al.*, 2006).

Ein Beispiel für ein durch die Ingenuity-Software erstelltes Netzwerk, für „DNA-Replikation, Rekombination, Reparatur, Dermatologische Erkrankung, Zelltod“ ist in Abb. 16 dargestellt. Das Netzwerk verbindet weitläufig den stark hochregulierten Transmembran-Rezeptor H2-D1 mit dem herabregulierten Transkripten des Lipid-Transporters APOD, und den beiden Enzymen RASD1 und FKBP5. In diesem Netzwerk finden sich ebenso die in Tabelle 16 erwähnten hochregulierten Hsp70 und Claudin-5 und weitere schwächer regulierte Transkripte, die aufgrund der schwachen Regulation nicht in die Liste aufgenommen wurden.

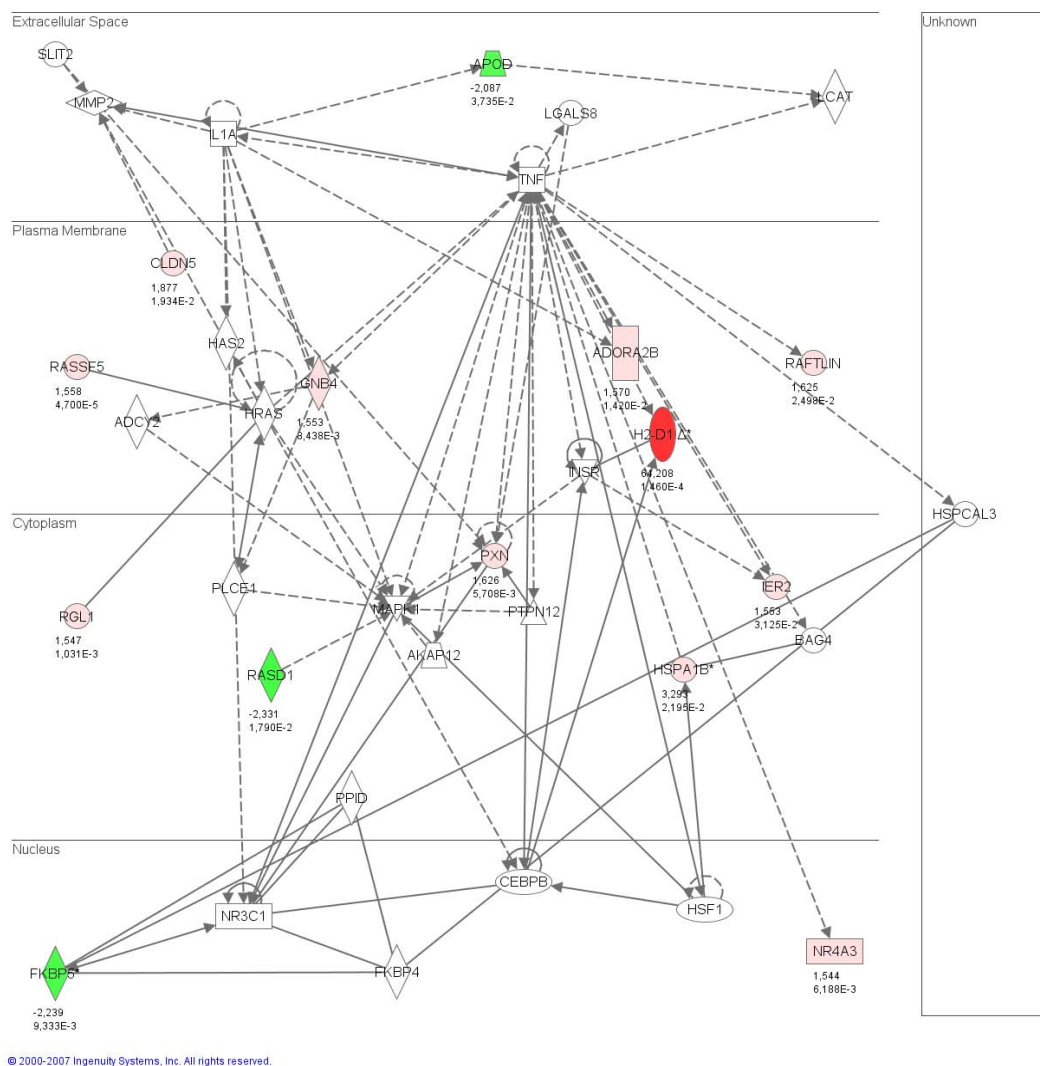


Abb. 16 Signalweg-Analyse von 11 differenziell regulierten Genen aus Gesamthirn-RNA-Extrakt von Mäusen der Linie CaM_syn im Zusammenhang mit der Regulation der Zellteilung und Transkription.

Die Softwareanalyse bezieht sich auf die Interaktion und funktionelle Regulation zwischen Genen nach Stand der aktuell publizierten Forschung. Die Pfeile zeigen eine ein- bzw. zweiseitige Interaktion an. Symbole: ○ biologische, chemische Substanz, Toxine, Transkriptionsregulator; □ Ionenkanäle; ▽ Kinasen; △ Phosphatasen; ⊙ Komplexe, Gruppen; ◇ Enzyme; □ Cytokine; □ G-Protein-gekoppelter Rezeptor; □ Wachstumsfaktoren, □ Liganden-abhängiger nukleärer Rezeptor; ◇ Peptidasen; ○ Transmembranrezeptoren; △ Transporter; ○ sonstige; rot und rosa unterlegt; hochregulierte Transkripte; grün unterlegt: herabregulierte Transkripte

3.2.5.2 Neurogenese

Neuronale Stammzellen des Gyrus dentatus bilden in Säugetieren in Abhängigkeit funktioneller Stimuli lebenslang neue Körnerzellen (Übersichtsartikel, Gould *et al.*, 2000; Elder *et al.*, 2006). Die detektierte Immunreaktivität und die beobachtete fokale Degeneration einzelner Zellen dieser Struktur (Abb. 11H, L) gab Anlass zur Frage, ob die Neurogenese-Rate in CaM_syn Mäusen kompensatorisch reguliert wird. Hierfür erfolgte bei sowohl unbehandelten, als auch Dox-behandelten CaM_syn Mäusen und zugehörigen Kontrolltieren im Alter von 20 Wochen eine

BrdU-Behandlung. BrdU baut sich kompetitiv zu Thymidin in die DNA mitotisch aktiver Zellen ein. Nach Perfusion wurden Hirnschnitte angefertigt und die mitotische Aktivität, sowie die Migrationsfähigkeit, das Differenzierungspotenzial und der Fortbestand neu gebildeter Zellen durch spezifische Antikörperfärbung ausgewertet (Tabelle 18).

Tabelle 18

Analyse der Neurogenese. Experimentelles Design. (A) Injektions- und Behandlungsschema konditionaler CaM_{syn} Mäuse und zugehöriger Kontrollen. (B) Zellzahl und Verbleib neuentwickelter Zellen im Gyrus dentatus der hippocampalen Formation

A Gruppe:	Kontrolle (n = 5) CaM _{syn} (n = 5) <i>Gen aus</i> CaM _{syn} (n = 5) <i>Gen aus</i> Kontrolle (n = 4)		
	Behandlung:		
Tag des Experimentes	0	32	64
Alter der Mäuse (Wochen)	16	20	24
Dox-Behandlungsalter der Mäuse (Wochen)	⁺ 16	20	24

B

	Kontrolle	CaM _{syn}	<i>Gen aus</i> CaM _{syn}	<i>Gen aus</i> Kontrolle
Proliferation (PCNA+)	293 ± 41	254 ± 19	294 ± 16	306 ± 27
Neuroblasten (DCX+) total	2059 ± 286	▼874 ± 224*	1962 ± 193 ⁺	1767 ± 74
Fortbestand (BrdU+)	588 ± 19	▼329 ± 17*	464 ± 44 ⁺	▼392 ± 8*
% NeuN-positive Zellen	82	77	85	83
BrdU/ NeuN totale Zellzahl	496 ± 8	▼252 ± 15*	389 ± 11 ⁺	▼325 ± 12 ⁺

Daten werden ± Standardfehler gezeigt. *p < 0,05 in Bezug zu Kontrollen; +p < 0,05 in Bezug zu CaM_{syn} Mäusen; Abkürzungen: BrdU, Bromodeoxyuridin; DCX, Doublecortin; Dox, Doxyzyklin; PCNA, Proliferating cell nuclear antigene;

Hinsichtlich PCNA (proliferating cell nuclear antigen), einem Marker für die Proliferation von Zellen (Takasaki *et al.*, 1981), konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. Dies legt nahe, dass in allen Gruppen die gleiche Anzahl an neuen Zellen gebildet wurde. Jedoch war die Zahl BrdU-positiver Zellen in CaM_{syn} Mäusen signifikant reduziert, was mit einem verminderten Fortbestand der Zellen einhergeht. Da das Verhältnis von NeuN-positiven neuronalen Strukturen innerhalb BrdU-positiver Zellen unverändert war (als Bsp. für die der Quantifizierung zugrunde liegende Doppel-Markierung: Abb. 17G - I), ergab sich in CaM_{syn} Mäusen eine um 49% signifikante Reduktion für die Gesamtzahl neu generierter Neurone (BrdU-positive Zellen multipliziert mit BrdU/NeuN; als repräsentatives Beispiel vergleiche Abb. 17D - F). Obgleich die Dox-Behandlung von Kontrollmäusen einen generellen negativen Einfluss auf die Neurogenese ausübte (*Gen aus* Kontrolle; Tabelle 18B), führte die Dox-Behandlung von transgenen Mäusen (*Gen aus* CaM_{syn}; Tabelle 18B) nicht zu einer weiteren

signifikanten Reduktion neugenerierter Zellen und neu gebildeter Neurone. Im Gegenteil, im Vergleich zu Kontrollen zeigten behandelte CaM_syn Mäuse keine signifikante Reduktion und im Vergleich zu unbehandelten Mäusen sogar eine signifikant erhöhte Überlebensrate neu generierter Neurone. Dies legt nahe, dass humanes α -Syn die hippocampale Neurogenese-Rate direkt negativ beeinflusst. Um diesen negativen Einfluss innerhalb der Entwicklungsphasen adulter proliferierender Vorläuferzellen spezifizieren zu können, wurden eine DCX (Doublecortin)-Färbung zur Zählung der Neuroblasten durchgeführt (Tabelle 18B; Abb. 17A-C). Das Ergebnis der Auszählung zeigte, dass übereinstimmend mit einer reduzierten Neurogenese-Rate in CaM_syn Mäusen ebenso die Zahl der Neuroblasten signifikant reduziert war (Tabelle 18B). Dies legt zusammenfassend nahe, dass die Überexpression des transgenen α -Syn den Fortbestand neuronal geprägter Vorläufer und neu gebildeter Neurone bereits im Integrationsstadium in den Gyrus dentatus negativ affizierte und das Ausschalten der Genexpression diesen negativen Einfluss aufhob.

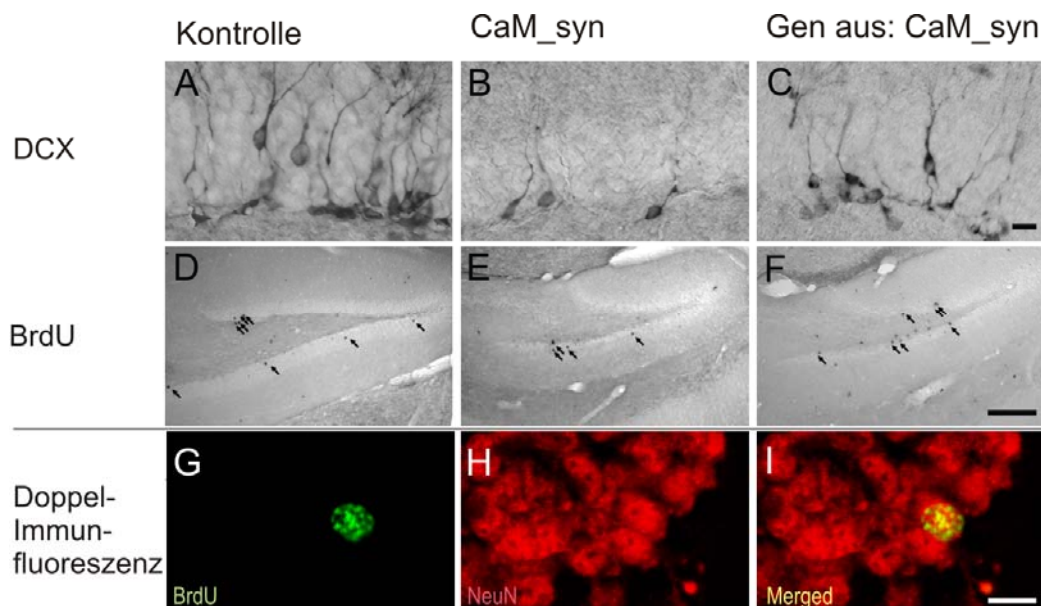


Abb. 17 Reversible hippocampale Reduktion adulter Neurogenese in konditionalen CaM_Syn Mäusen

Für die Analyse wurden die Gehirne von 24-Wochen-alten CaM_syn Mäusen, Dox-behandelten CaM_syn Mäusen (Gen aus: CaM_syn) und gleichaltrigen Kontrollen mittels Ak-Färbung auf Neurogenese-abhängige Marker hin untersucht. (A-C): Neu generierte DCX-positive Neuroblasten wurden quantifiziert und zeigten bei CaM_syn Mäusen eine signifikante Reduktion (B) im Vergleich zu Kontrollen (A) und Mäusen mit abgeschalteter Expression (C). (D-E): Fortbestand neu gebildeter Zellen. Eine Reduktion BrdU-markierter Zellen konnte in Sektionen von CaM_syn Mäusen (E, Pfeile) im Vergleich zu Kontrollen (D; Pfeile) und Mäusen mit abgeschalteter Expression (F; Pfeile) gezeigt werden. (G-I) Durch Kolokalisations-Immunhistochemie von BrdU (G) und NeuN (H) wurde die Differenz im Prozentsatz der neuronale Differenzierung von BrdU-positiven Zellen zwischen Kontrollen, CaM_syn- und Dox-behandelten CaM_syn Mäusen errechnet. Zur Quantifizierung wurden die einzelnen Färbungen in der identischen Ebene fusioniert (Merged; I). Abkürzungen: BrdU, bromodeoxyuridine; DCX, doublecortin

3.2.6 Verhaltensstudien

3.2.6.1 Modifizierter SHIRPA zur Analyse des Basisverhaltens

Zur Analyse primärer Verhaltensunterschiede und gesundheitlicher Defizite, die einen z.T. auch unspezifischen Einfluss auf die weitergehende Analyse bspw. motorischer oder kognitiver

Leistung ausüben könnten, wurde ein SHIRPA-Test durchgeführt (Tabelle 19). Dieser setzt sich aus der Beobachtung des äußeren Erscheinungsbildes im „Viewing Jar“, der Aktivität und des Gangbildes in der „Arena“, Clasping und allgemeine Muskelschwäche in der „Analyse über der Arena“, sowie Reflexen und allgemeinen Aggressionsverhalten zusammen.

Tabelle 19
SHIRPA Analyse konditionaler Mäuse

Konstrukt	Alter (Wochen)	Gewicht (g)	Gruppe	Viewing Jar (0) [#]	In der Arena (6) [#]	Über der Arena (0) [#]	Reflexe / Aggression (0) [#]
PrP_syn30	59,71	44,22*	10 m	1,00	5,80	0,00	0,11
	±7,55	▲±1,79	4 w	±0,16	±0,09	±0,00	±0,07
Kontrolle	60,5	37,75	8 m	1,45	5,65	0,00	0,15
	±8,32	±1,80	12 w	±0,15	±0,11	±0,00	±0,08
Gen aus PrP_syn30	53,38	35,22	5 m	0,62	5,69	0,00	0,08
	±4,53	±2,16	8 w	±0,24	±0,26	±0,00	±0,08
Gen aus Kontrolle	54,86	35,44	4 m	0,67	5,78	0,00	0,11
	±4,71	±3,16	5 w	±0,24	±0,15	±0,00	±0,11
CaM_syn30	57,30	34,12	2 m	0,00	6,00	0,00	0,25
	±2,47	±1,38	10 w	±0,00	±0,12	±0,00	±0,13
Kontrolle	56,73	36,95	3 m	0,00	5,50	0,00	0,00
	±2,22	±2,38	5 w	±0,00	±0,27	±0,00	±0,00
CaM_syn [†]	62,59	35,18	8 m	0,44	6,69	0,06	0,06
	±0,71	±1,39	8 w	±0,18	±0,15	±0,06	±0,06
Kontrolle [†]	63,60	36,52	7 m	0,55	6,82	0,00	0,00
	±0,85	±3,46	4 w	±0,16	±0,12	±0,00	±0,00
CaM_syn [†]	63,42	36,65	8 m	0,38	6,31	0,00	0,19
	±0,72	±1,37	8 w	±0,13	±0,39	±0,00	±0,10
Kontrolle [†]	64,60	37,16	7 m	0,27	6,91	0,00	0,00
	±0,85	±3,52	4 w	±0,14	±0,34	±0,00	±0,00
CaM_syn [†]	65,46	36,96	8 m	0,18	6,94	0,00	0,12
	±0,68	±1,34	9 w ⁺	±0,10	±0,25	±0,00	±0,08
Kontrolle [†]	66,60	37,13	7 m	0,00	6,91	0,00	0,00
	±0,85	±3,55	4 w	±0,00	±0,48	±0,00	±0,00
CaM_syn [†]	75,61	32,72	8 m	0,71	6,35	0,00	0,18
	±0,68	±1,30	9 w ⁺	±0,11	±0,35	±0,00	±0,10
Kontrolle [†]	77,06	36,57	6 m ⁻	0,60	6,20	0,00	0,10
	±0,87	±2,89	4 w	±0,16	±0,44	±0,00	±0,10

#, deutet auf gesundes Äußeres bzw. Normalverhalten hin; †, Analyse zu 4 verschiedenen, aufeinanderfolgenden Zeitpunkten; +, eine weiteres Weibchen wurde der Analyse zugefügt; -, ein Tier verstorben; ▲ grüne Schrift, signifikante Steigerung; blaue Schrift, nach Dox-Behandlung auf gleichem Level wie Kontrollen; Angaben als gemittelte Summen ± Standardfehler; *p < 0,05

Die Gewichts-Analyse zeigte bei ca. 60 Wochen alten PrP_syn30 eine signifikante Steigerung im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrollen, die nach Abschalten der Genexpression von Geburt an nicht beobachtet wurde. In allen anderen analysierten Gruppen wurden keine Unterschiede im Gewicht festgestellt. Im „Viewing Jar“ der SHIRPA-Analyse konnten in keiner der analysierten Gruppen eine Signifikanz beobachtet werden. Jedoch zeigten sowohl PrP_syn30 als auch die jeweiligen Kontrollmäuse ein im Vergleich zu CaM_syn30 und CaM_syn Mäusen schlechtes äußeres Erscheinungsbild, wobei insbesondere das Vorhandensein eines leichten Tremors und abgestoßene Schnurrhaare negativ in das Punktesystem einfließen. Die Kontrolltiere der PrP_syn30 Mäuse zeigten zudem die Tendenz des schlechteren Erscheinungsbildes im Vergleich

zu PrP_{syn30} transgenen Mäusen (Student's *t-Test*: $p = 0.051$). Von allen analysierten dtg Mauslinien zeigten CaM_{syn30} Mäuse das beste äußere Erscheinungsbild. In einer Studie über mehrere Wochen zeigten CaM_{syn} Mäuse im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen keine proportionale Verschlechterung des Erscheinungsbildes mit relativ großen Schwankungen zwischen den einzelnen Messungen. Die Analyse der Aktivität und des Gangbildes in der Arena zeigte zwischen allen Gruppen keine signifikante Dysfunktion, die jedoch aufgrund der geringen Beobachtungszeit (30 sek) und der geringen Arenagröße (55 x 33 x 18 cm) auch nicht zu erwarten waren. PrP_{syn30} Mäuse zeigten eine Tendenz zur höheren Bewegungsaktivität in Vergleich mit Kontrollen ($p = 0,3$). Auch die Analyse über der Arena zeigte auf, dass alle transgenen Mäuse im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren keine motorischen Anomalien (wie bspw. Claspings) zeigten und die Kraft aufbrachten, für kurze Zeit ihr eigenes Gewicht (entgegen der Schwerkraft) zu halten. Auch konnte kein Unterschied im Reflex- und Aggressionsverhalten zwischen den einzelnen Linien und ebenso über die Zeit in CaM_{syn} Mäusen in Relation zu jeweiligen Kontrollen festgestellt werden. Diese Analyse zeigte, dass Mäuse der Linie PrP_{syn30}, CaM_{syn30} und PrP_{syn} auf den „ersten Blick“ keine Anzeichen von Sekundärerkrankungen (wie bspw. Tumore oder Entzündungen) und muskuläre Schwäche zeigten. Die Gewichtssteigerung in PrP_{syn30} Mäusen jedoch könnte ein Transgen-Effekt sein, da er in Mäusen mit abgeschalteter Expression nicht auftrat und das Gewicht zudem im Vergleich zu anderen 50-60 Wochen alten Mäusen deutlich gesteigert war.

3.2.6.2 TMT-Fuchsexkrement-induziertes Angstverhalten in konditionalen PrP_{syn30} und CaM_{syn30} Mäusen

Die Expression von mutierten [A30P] α -Syn in der Glomerulärschicht des Bulbus olfactorius legte eine Kollokalisierung in dopaminergen Neuronen von PrP_{syn30} und CaM_{syn30} Mäusen nahe, wie es für PrP_{syn30} Mäuse bereits gezeigt werden konnte (Abb. 9C). Die Analyse des Neurotransmittergehaltes im Riechhirn zeigte zudem eine signifikante Reduktion von DA, DOPAC und HVA für PrP_{syn30} und von DOPAC in CaM_{syn30} Mäusen. Der Nachweis, dass diese neurochemischen Veränderungen nachgehende Verhaltensänderungen bedingen, und nicht durch Sekundär-Effekte kompensiert werden, wurde mittels eines Geruchstests erreicht. Dieser basiert auf einem olfaktorischen Prädatorenreiz. Mit Trimethylthiazoline (TMT; aus Fuchsexkrementen) wird in Mäusen und Ratten eine angeborene Furchtreaktion ausgelöst, die von der Motivation der Tiere unabhängig ist und bereits bei der ersten Messung nachweisbar sein sollte (Wallace und Rosen, 2000). Darüber hinaus basiert die von TMT ausgelöste Furchtreaktion auf der Aktivierung dopaminergischer Neurone (Morrow *et al.*, 2000a, 2000b) und eine verringerte Reaktion kann so als weiterer Anhaltspunkt einer dopaminergen Dysfunktion gesehen werden.

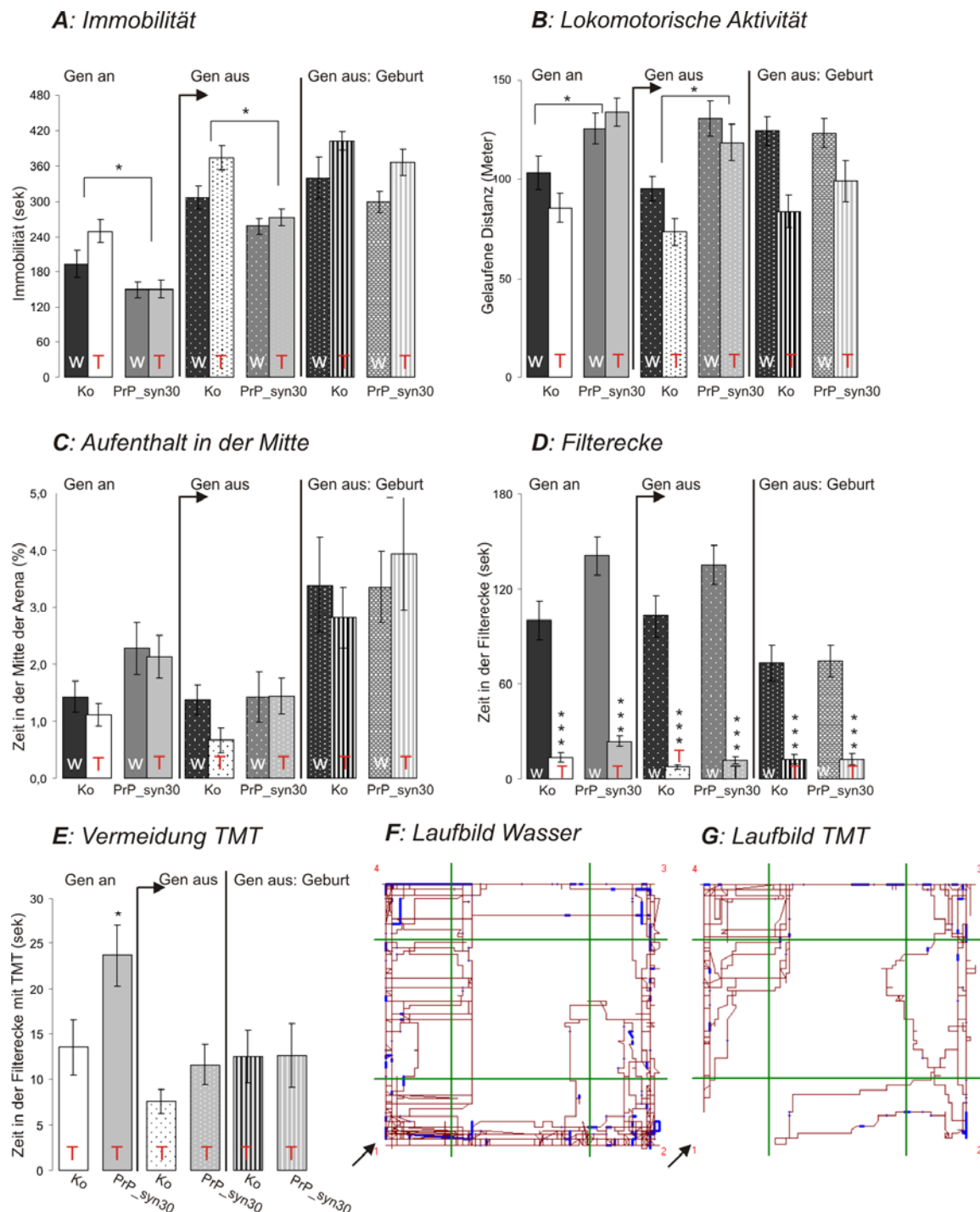


Abb. 18 TMT-induziertes Angstverhalten in konditionalen PrP_syn30 Mäusen.

(A) Auf den olfaktorischen Stimulus TMT hin zeigten Kontrollmäuse (Ko) eine Immobilitätsphase, die in PrP_syn30 Mäusen nicht festgestellt werden konnte (Gen an). Die 21-wöchige Dox-Behandlung dieser Mäuse (Gen aus) zeigte keine Reversibilität in PrP_syn30 Mäusen, jedoch wahrscheinlich aufgrund des zunehmenden Alters eine allgemeine Erhöhung der Immobilität. Erfolgte die Dox-Behandlung von Geburt an, konnte im Vergleich zu Kontrollen keine Signifikanz in der Immobilität festgestellt werden. (B) In der beobachteten Zeit wurde in PrP_syn30 Mäusen unabhängig von TMT eine in Vergleich zu Kontrollmäusen signifikante Erhöhung der lokomotorischen Aktivität beobachtet (Gen an), die jedoch durch Abschalten der α -Syn-Expression in symptomatischen Mäusen nicht an Signifikanz verlor (Gen aus). Erfolgte die Behandlung von Geburt an, so zeigten PrP_syn30 Mäuse ein zu Kontrollmäusen vergleichbares Aktivitätsmuster (Gen aus: Geburt). (C) Der Aufenthalt in der Mitte der Arena erreichte zwischen Kontrollen und PrP_syn30 Mäusen vor und nach der Dox-Behandlung keine Signifikanz. Von Geburt an behandelte PrP_syn30 Mäuse zeigten einen von TMT unabhängigen und vergleichsweise höheren Aufenthalt in der Mitte, der jedoch im Vergleich zu Kontrollen keine Signifikanz erreichte. (D) Wurde der Filter mit TMT versetzt, dann zeigten sowohl PrP_syn30 als auch Kontroll-Mäuse mit (Gen aus, Gen aus: Geburt) und ohne Behandlung (Gen an) eine im Vergleich zum Wasser-versetzten Filter hochsignifikante Vermeidung der Filterecke (Student's *t*-Test) und keine Signifikanz im Verhalten im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (multifaktorielle ANOVA). (E) Vergleicht man die

Aufenthaltsdauer in der TMT-Filterecke, dann zeigten unbehandelte PrP_{syn30} Mäuse eine im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen und behandelten PrP_{syn30} Mäusen und Kontrollen (Gen aus; Gen aus: Geburt) signifikant gesteigerten Aufenthalt. (F) Repräsentatives Laufbild (ActiMot-Software) einer mit Dox-behandelten PrP_{syn30}-Maus mit einem Wasser-Filterpapier in Ecke1 (Kontrolle; Pfeil). (G) Wurde der Filter mit TMT versetzt und in Ecke1 gelegt (Pfeil) dann zeigte sich neben der Vermeidung dieser Ecke auch ein geringeres Explorationsverhalten (Vergleiche Linien-Anzahl zwischen G und F). Abkürzungen: „Gen an“, keine Dox-Behandlung; „Gen aus“, 21-wöchige Dox-Behandlung der zuvor unbehandelten „Gen an“ Mäuse; „Gen aus: Geburt“, Mäuse mit Antibiotika-Behandlung von Geburt an (siehe auch 11.5.3) ; Ko, Kontroll-Mäuse; T, Trimethylthiozalin, TMT; W, Leitungswasser; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; A-C: multifaktorielle ANOVA; D,E: Student's *t*-Test; Daten werden als gemittelte Werte mit Standardfehler gezeigt.

Wurden ca. 1 Jahr alte PrP_{syn30} Mäuse TMT als olfaktorischen Reiz ausgesetzt, so konnte keine im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrollen gesteigerte Immobilitätsphase nachgewiesen werden (Abb. 18A; Gen an) und PrP_{syn30} Mäuse zeigten zudem eine höhere lokomotorische Aktivität (Abb. 18B; Gen an) und ein erhöhtes Explorationsverhalten gegenüber der Arena-Mitte (Abb. 18C; Gen an). Trotzdem mieden PrP_{syn30} Mäuse die Ecke mit dem TMT-versetzten Filterpapier (Abb. 18D; Gen an). Nach Abschalten der Expression des transgenen α -Syn in PrP_{syn30} Mäusen konnte keine Veränderung im Verhalten gegenüber gleichbehandelten Kontrolltieren gezeigt werden (Abb. 18A und 18B; jeweils Gen aus), jedoch zeigten die Dox-behandelten PrP_{syn30} Mäuse einen geringeren und im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen nicht unterschiedlichen Aufenthaltszeitraum in der Arenamitte, was als ein geringeres basales Angstverhalten bewertet werden kann (Abb. 18C; Gen an). Von Geburt an behandelte Mäuse beider Gruppen (Abb. 18C; Gene aus: Geburt) zeigten ein höheres Explorationsverhalten der Arena-Mitte, jedoch TMT unabhängig und mit hoher Messvarianz (Abb. 18C; Gen aus: Geburt). Die Dox-Behandlung von PrP_{syn30}-Mäusen und jeweiligen Kontrollen bestätigte das hochsignifikante Vermeiden der TMT-Filterecke (Abb. 18D; Gene aus, Gen aus: Geburt). Obgleich die TMT-Ecke (als repräsentatives Bsp. siehe 18G) im Vergleich zur Wasser-Kontrolle (als repräsentatives Bsp. siehe 18F) von Mäusen beider Gruppen gemieden wurde, zeigten PrP_{syn30} Mäuse im Vergleich zu behandelten PrP_{syn30} Mäusen und den jeweiligen Kontrollmäusen eine signifikant erhöhte Aufenthaltsdauer im Bereich der TMT-Filterecke (Abb. 18E). Die Gewichtsmessung ergab keine Signifikanz in allen Gruppen (o. Abb.).

Hingegen konnte für CaM_{syn30} Mäuse kein im Vergleich zu Kontrolltieren unterschiedliches Verhaltensmuster im TMT-induzierten Angstverhalten beobachtet werden (Abb. 19). CaM_{syn30} Mäuse zeigten ein den Kontrollen ähnliches, und in Anwesenheit von TMT verstärktes Immobilitätsverhalten (Abb. 19A; $p = 0,08$; einfaktorielle ANOVA). Ebenso konnten keine Unterschiede in der zurückgelegten Distanz (Abb. 19B; $p = 0,37$; einfaktorielle ANOVA) und im Aufenthalt in der Arena-Mitte festgestellt werden (Abb. 19C; $p = 0,44$; einfaktorielle ANOVA). Wie auch PrP_{syn30} Mäuse so zeigten CaM_{syn30} Mäuse eine hochsignifikant kürzere Aufenthaltsdauer in der Ecke mit TMT im Vergleich zum Wasser (Student's *t*-Test; $p < 0,001$); jedoch konnte im Vergleich zur Aufenthaltsdauer der Kontrollen kein signifikant längerer Aufenthalt in Anwesenheit von TMT festgestellt werden ($p = 0,19$; Student's *t*-Test).

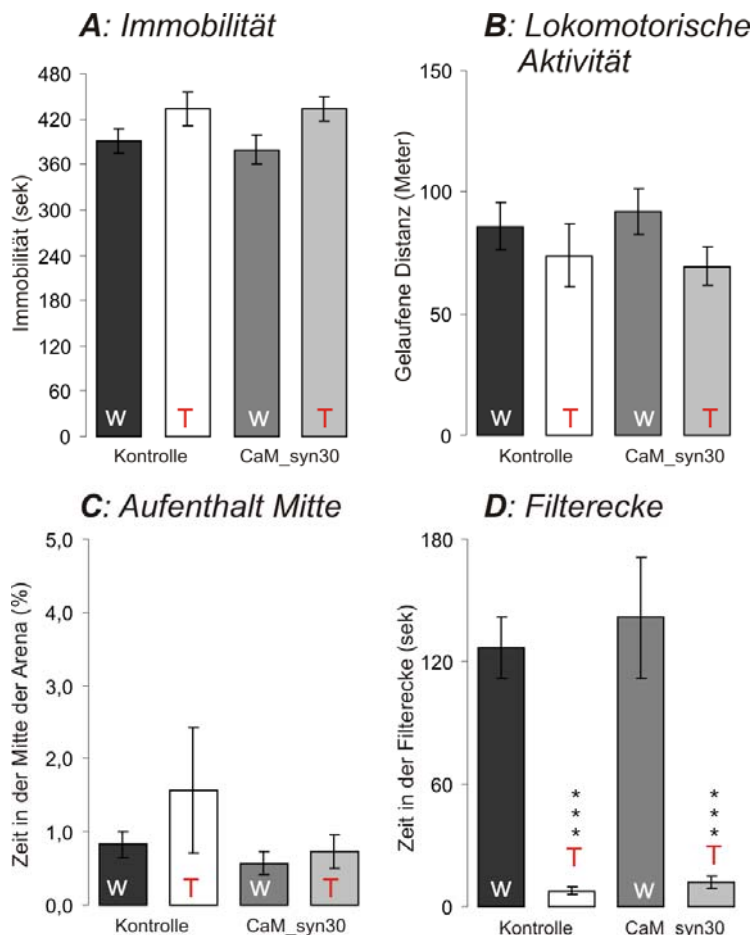


Abb. 19 TMT-induziertes Angstverhalten in CaM_syn30 transgenen Mäusen.

57-Wochen-alte CaM_syn30 Mäuse zeigten auf den olfaktorischen Stimulus TMT (T) hin, kein signifikant unterschiedliches Verhalten im Vergleich zu Kontrollmäusen. (A) Sowohl Kontrollmäuse als auch CaM_syn30 Mäuse zeigten eine Zunahme der Immobilität in Anwesenheit von TMT. (B) CaM_syn30 und Kontrollen legten eine vergleichbare Distanz in An- und Abwesenheit von TMT zurück. (C) Es zeigten sich keine Unterschiede im Explorationsverhalten der Arena-Mitte. (D) Wurde die Filterecke mit TMT versetzt, dann zeigten sowohl Kontrollen als auch CaM_syn30 Mäuse eine signifikant geringere Aufenthaltsdauer in dieser Ecke im Vergleich zu Wasser (W), jedoch im Vergleich zu Kontrollen kein unterschiedliches Verhalten.

Werte werden als gemittelt und mit Standardfehler dargestellt; *** $p < 0,01$

3.2.6.3 Analyse der Motorik in konditionalen PrP_syn und CaM_syn Mäusen

Das IPS ist als eine neurodegenerative Erkrankung mit einer einhergehenden motorischen Symptomatik typisiert. Daher wurde mit PrP_syn und CaM_syn Mäusen, die eine Expression des Transgens in mehreren IPS-relevanten Bereichen und insbesondere in den Basalganglien aufzeigen (Abb.6 und Abb.7), eine Studie der Motorik mittels „Accelerod (Accelerated Rotarod)“ durchgeführt (Abb. 20, 21). Bei Mäusen der Linie PrP_syn zeigten nur männlichen Mäuse, nicht jedoch weiblichen Mäuse eine Progression mit einhergehender Signifikanz (Weibchen: $p = 0,44$; Männchen $p = 0,02$; 2-Way-ANOVA; o. Abb.). Daher wurden weibliche Mäuse nach der 6. Messung (im Alter von ca. 48 Wochen) von der Analyse ausgeschlossen. Da diese männlichen PrP_syn Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen signifikant schwerer wurden (36 Wochen: $p = 0,03$; Zweistichproben t -Test; Abb. 20A) und weiterhin eine starke Tendenz der Zunahme zeigte, konnten die Daten nicht interpretiert werden, da davon auszugehen ist, dass schwergewichtige Mäuse unabhängig vom Transgen weniger gut auf einem sich drehenden Rad balancieren können. Wurden Kontrollmäuse von Geburt an mit Doxyzyklin behandelt, so zeigten diese von Beginn an eine schlechtere Performance im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen ($p < 0,001$; Student's t -Test) was auf einen unspezifisch negativen Einfluss der Dox-Gabe auf die motorische Leistung der Mäuse schließen lässt. Hingegen zeigte sich, dass bei einer Behandlung

von Geburt an PrP_{syn} Mäuse anfänglich keine signifikant schlechtere motorische Leistung als unbehandelte PrP_{syn} Mäuse aufwiesen ($p = 0,495$; Student's t -Test) jedoch mit stark negativer Tendenz in der weiteren Analyse (Abb. 20B), obgleich in diesen Mäusen keine Restexpression des Transgens festzustellen war (Abb. 7). Mäuse beider Gruppen nahmen über den Testzeitraum von 30 Wochen signifikant an Gewicht zu (Dox-behandelte Kontrolle: $p = 0,026$; Dox-behandelte PrP_{syn}: $p = 0,0008$; einfaktorische ANOVA), was mit einer sich verschlechternden Leistung auf dem Accelerod einhergehen könnte.

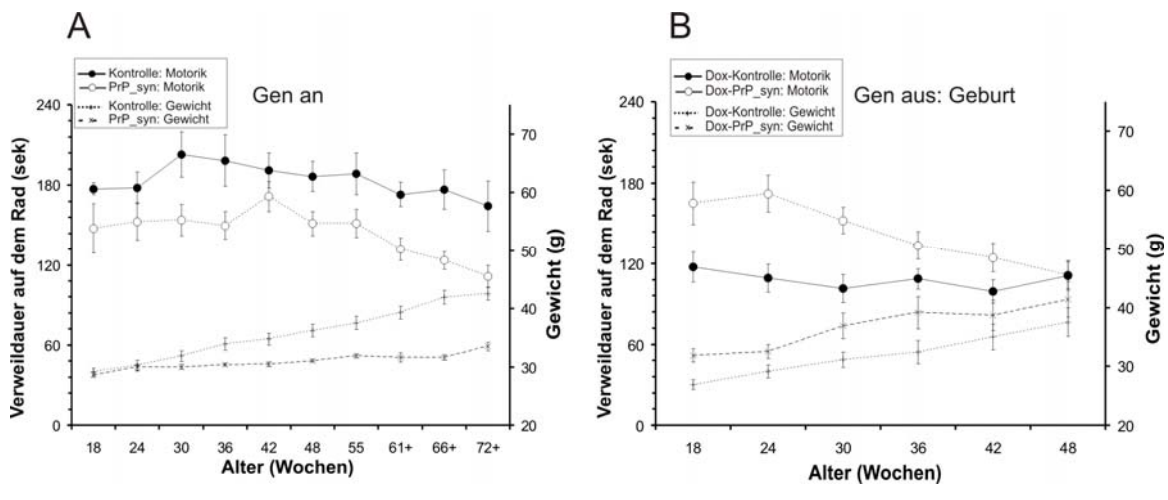


Abb. 20 Motorische Leistung in konditionalen PrP_{syn} Mäusen.

In männlichen PrP_{syn} Mäusen (unbehandelt: $n = 15$; Dox-behandelt: $n = 9$) und gleichaltrigen männliche Kontrollen (unbehandelt: $n = 7$; Dox-behandelt: $n = 9$) wurde zur Analyse der motorischen Koordination ihre Fähigkeit gemessen, auf einem sich beschleunigenden Rad („Accelerod“) zu balancieren. Die Messung erfolgte in mehreren Testsitzungen, wobei sich jede aus 2 Durchgängen pro Tag über einen Zeitraum von 5 Tagen in Abständen von ca. 6 Wochen zusammensetzte. (A) PrP_{syn} Mäuse (offene Kreissymbole) zeigten eine signifikant schlechtere Progression im Vergleich zu Kontrollmäusen (schwarze Kreissymbole) ($p < 0,05$; ANOVA) jedoch bei gleichzeitig signifikanter Zunahme des Gewichtes ($p < 0,05$ ab 36 Wochen im Vergleich zu Kontrollen; Student's t -Test). (B) Die Behandlung von Geburt an zeigte einen negativen Effekt auf die motorische Leistung (vergleiche motorische Leistung der Dox-Kontrolle in B mit Kontrolle in A), und ebenso in PrP_{syn} Mäusen im Alter von > 24 Wochen, mit einhergehender starker Gewichtssteigerung (PrP_{syn}: $26,89 \pm 0,85$ g im Alter von 18 Wochen zu $37,49 \pm 2,42$ g im Alter von 48 Wochen; Kontrolle: $31,85 \pm 1,17$ g im Alter von 18 Wochen zu $41,38 \pm 3,05$ g im Alter von 48 Wochen). Abkürzungen: Gen an: Unbehandelte Mäuse der Linie PrP_{syn} und Kontrollen; Gen aus: Geburt: Unter Antibiotika-Gabe geborene und weiterbehandelte Mäuse; +: von 7 unbehandelten Kontrollen wurden 2 Mäuse ab diesem Zeitpunkt mit Dox behandelt, da diese gleichzeitig als Kontrolltiere der Linie CaM_{syn} dienen. Werte wurden gemittelt und mit Standardfehler gezeigt.

Hingegen zeigten wiederholte Messungen von CaM_{syn} Mäusen eine progressive Verschlechterung der motorischen Leistung ohne Signifikanz in der Gewichtsdiﬀerenz zwischen CaM_{syn} Mäusen und entsprechenden Kontrollen (Abb. 21). Auch hier wurde festgestellt, dass weibliche Mäuse beider Gruppen eine bessere Motorik als die männlichen Tiere aufwiesen, jedoch war ihre Verteilung in beiden Gruppen gleich (ermittelt durch einen Kontingenztest; o. Abb.) und demzufolge ihr Beitrag in beiden Gruppen gleich. CaM_{syn} Mäuse zeigten bereits bei der ersten Testung im Alter von 18 Wochen eine signifikant schlechtere motorische Leistung als Kontrollmäuse (Abb. 21A). Eine progressive Minderung der Leistung wurde jedoch erst ab einem Alter von 30 Wochen festgestellt, was vermuten lässt, dass CaM_{syn} Mäuse den Einfluss transgenem α -Syn auf motorische Hirnkerngebiete anfänglich tragen können. Die Messungen von CaM_{syn} Mäuse, die älter als 30 Wochen waren, zeigten, dass diese zu jedem nachfolgenden Test

im Mittel eine negative Steigung von -13,4 sek aufwiesen (Abb. 21A; Gen an; Steigung -13,4). Dagegen zeigten Kontrollmäuse eine Minderung von nur 3,3 sek (Abb. 21A; Gen an; Steigung -3,3) in den nachfolgenden Testungen, die wahrscheinlich mit dem steigendem Alter der Mäuse einhergeht und im Vergleich zu CaM_syn Mäusen signifikant besser war ($p < 0,05$). Zur Analyse, ob die Progression in diesen symptomatischen CaM_syn Mäusen tatsächlich durch humanes α -Syn induziert und ob eine Reversibilität noch möglich war, wurden die Mäuse ab dem Alter von 58 Wochen mit Dox zur Abschaltung des Transgens behandelt und über einen weiteren Zeitraum von 19 Wochen getestet (Abb. 21A; Gen aus). Kontrollmäuse wurden gleichermaßen behandelt, um Antibiotika-unspezifische Effekte auf die Motorik ausschließen zu können. Die Messungen zeigten, dass sich die motorische Leistung von CaM_syn Mäusen im Vergleich zu der von Kontrollmäusen zwar nicht anglich, jedoch in der Tendenz verbesserte. Die kalkulierte negative Steigung betrug im Mittel nur noch -4,2 sek in den nachfolgenden Testungen, was nicht signifikant schlechter war als die beobachtete Tendenz von (weiterhin) -3,3 sek in Kontrollen ($p = 0,85$) und signifikant besser im Vergleich zur kalkulierten Tendenz in unbehandelten CaM_syn Mäusen ($p < 0,05$).

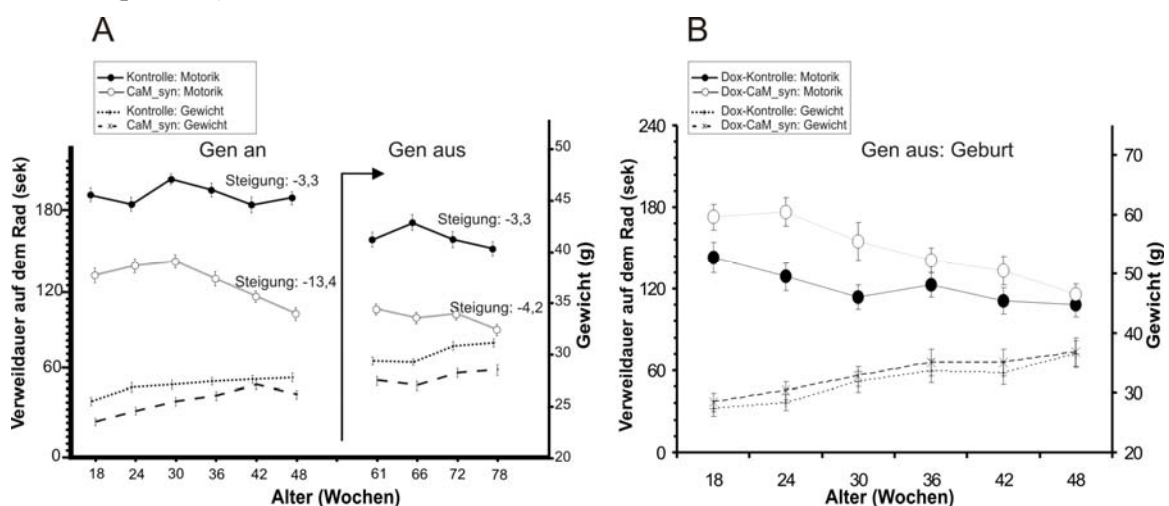


Abb. 21 Motorische Leistung in konditionalen CaM_syn Mäusen.

Für die Analyse der motorischen Leistung wurden CaM_syn Mäuse ($n = 8$) und zugehörige Kontrollen ($n = 8$) sowie von Geburt an Dox-behandelte (Gen aus: Geburt) CaM_syn Mäuse ($n = 12$) und Dox-behandelte Kontrollen ($n = 20$) in mehreren Messungen getestet, die jeweils aus 2 Durchgängen pro Tag über einen Zeitraum von 5 Tagen, alle 6 Wochen bestanden. (A) Die Analyse auf dem „Accelerod“ zeigte eine beeinträchtigte motorische Leistung in CaM_syn Mäusen (offene Kreissymbole) im Vergleich zu Kontrollen (schwarze Kreissymbole). Eine Progression in der motorischen Beeinträchtigung konnte mit Hilfe einer linearen Regressionsanalyse ab dem Alter von 30 Wochen festgestellt werden. Diese zeigte einen Leistungsabfall von -13,4 sek (Mittelwert) in den darauf folgenden 4 Messungen, welcher signifikant schlechter war, als die beobachtete Steigung von -3,3 sek in Kontrollmäusen. Die Antibiotika-Behandlung der CaM_syn Mäuse und Kontrollen ab einem Alter von ca. 58 Wochen (Pfeil) zeigte in der linearen Regressionsanalyse einen Stopp der Progression durch eine signifikante Verbesserung der kalkulierten Steigung von -13,4 sek zu -4,2 sek. Die Steigung zeigte zu der von Kontrollen beobachtete Steigung (-3,3 sek: vor und nach Dox-Behandlung) keine Signifikanz. (B) Die Antibiotika-Behandlung von CaM_syn Mäusen und Kontrollmäusen ab Geburt zeigte in beiden Gruppen stetige Verschlechterung über die Zeit, die aber nur in behandelten CaM_syn Mäusen die Signifikanzgrenze erreichte ($p < 0,01$) ohne Unterschiede im Gewicht zwischen beiden Gruppen. Abkürzungen: Gen an: Unbehandelte Mäuse der Linie PrP_syn und Kontrollen; Gen aus: Geburt: Unter Antibiotika-Gabe geborene und weiterbehandelte Mäuse. Werte wurden gemittelt und mit Standardfehler gezeigt.

Wurden CaM_syn Mäuse von Geburt an mit Dox behandelt, so konnte man im Accelerod nach einer anfänglich guten motorischen Leistung (im Alter bis 24 Wochen), im fortlaufenden Test eine stetige Verkürzung der Verweildauer auf dem Rad beobachten, die dann mit der ebenso

beobachteten schlechteren Leistung Dox-behandelter Kontrollen auf etwa gleichem Leistungsniveau endete (Abb. 21B). Es konnte im Vergleich zu CaM_syn Mäusen eine signifikante Gewichtssteigerung in Dox-behandelten CaM_syn Mäusen festgestellt werden ($p < 0,05$; Student's *t*-Tests). In behandelten und unbehandelten Kontrollen wurde kein Unterschied im Gewicht zu den jeweiligen Messungen festgestellt.

3.2.6.4 Analyse der kognitiven Fähigkeiten

2.6.4.1 Analysen der motorischen Kognition in konditionalen PrP_syn und CaM_syn Mäusen

Nach den heutigen Erkenntnissen basiert das motorische Lernen („motor skill learning“) auf der Interaktion zweier orthologer Verbindungen, den fortlaufenden intrakortikalen Verbindungen und den kreisgeschalteten Verbindungen zwischen Kortex und Basalganglien und Kortex und Kleinhirn. Das Erlernen der motorischen Fähigkeiten bezieht sich auf den motorischen Kortex und assoziierten Regionen des Kleinhirns und der Basalganglien und ist dabei von hippokampalen Lernvorgängen unabhängig (Hikosoka *et al.*, 2002). Da die Messungen im Accelerod ebenso als Paradigma des Lernverhaltens komplexer Bewegungsabläufe herangezogen werden können (Buitrago *et al.*, 2004), wurden die Daten aus den beiden Durchgängen der ersten Messung dahingehend beurteilt, ob Mäuse zwischen diesen einen Lerneffekt zeigten oder nicht. Spätere Messungen wurden aufgrund des extensiven Trainings vor dem Test (5 Tage mit je 2 Durchgängen) und der ebenso langen Dauer des Testes selbst (5 Tage mit je 2 Durchgängen) nicht in die Bewertung des „Motor skill learning“ einbezogen, da die Wiederholung der Bewegungsabläufe zum Plateau-Effekt führt (Buitrago *et al.*, 2004).

Die Analyse der Einzelmessungen zeigte in Kontrollmäusen eine über die Wochen hinweg gleichmäßig gute Leistung, die nach Dox-Behandlung eine höhere Varianz aufwies (Abb. 22A). Dagegen zeigten CaM_syn Mäuse eine progressive Verschlechterung der Leistung (wie auch bereits durch die Berechnung der Steigung in Abb. 21 gezeigt), die sich nach Dox-Behandlung der beobachteten Leistung der Kontrollmäuse annäherte (Abb. 21). PrP_syn Mäuse zeigten eine über die Zeit hinweg ähnliche Leistung wie Kontrollen (Abb. 22B). Für die Erfassung des Erlernens komplexer motorischer Fähigkeiten wurden jeweils die Leistung der transgenen CaM_syn und PrP_syn Mäuse in Messungen 1 und 2 des ersten Testtages mit der von Kontrolltieren verglichen (Übersicht der Gesamtleistung: CaM_syn Mäuse: Abb. 22A; PrP_syn Mäuse Abb. 22B; nur Testtag 1: CaM_syn: Abb. 22C', 22D'; PrP_syn: 22E'). In PrP_syn Mäusen wurden wiederum nur männliche Mäuse analysiert.

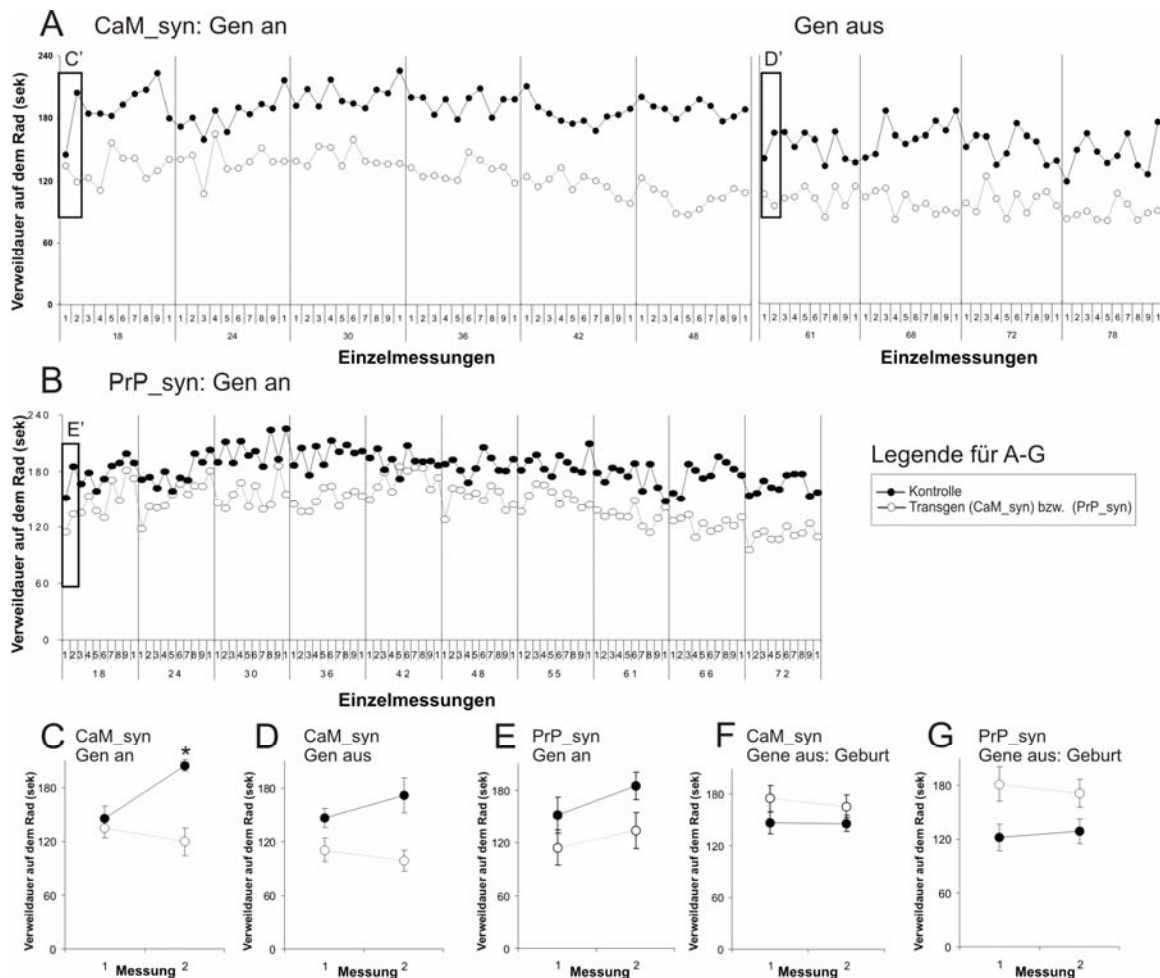


Abb. 22 Motorisches Lernen in konditionalen CaM_syn und PrP_syn Mäusen auf dem Accelerod

Zur Erfassung des Erlernens komplexer motorischer Fähigkeiten (motor skill learning) wurden die Einzelmessungen des 1. Testes des Accelerod von 18-Wochen-alten transgenen CaM_syn (Gen an; C) und Dox-behandelten CaM_syn (Gen aus) Mäusen (D), von PrP_syn Mäusen (E) und von Geburt an Dox-behandelten CaM_syn Mäusen (Gen aus: Geburt; F) sowie PrP_syn Mäusen (Gen aus: Geburt; G) (jeweils offene Kreissymbole) mit den jeweiligen Kontrollen (schwarze Kreissymbole) verglichen. Zur Übersicht wurden alle erfassten Einzelmessungen von CaM_syn Mäusen (A) und PrP_syn Mäusen (B) im Bezug zu den Einzelmessungen der Kontrollen dargestellt. Dabei entsprechen die Kästchen in A (C', D') und B (E') den unter C, D, E dargestellten Messungen 1 und 2. (C) Im Vergleich zur ersten Messung zeigten Kontrollmäuse bei der zweiten Messung desselben Tages eine signifikant längere Verweildauer auf dem Accelerod, wohingegen in CaM_syn Mäusen keine Verbesserung festgestellt werden konnte. Beide Gruppen starteten den Test auf ähnlichem Leistungsniveau. (D) Nach Abschalten der Expression des humanen α -Syn in 58-Wochen-alten Mäusen konnte in Kontrollen eine Tendenz zur längeren Verweildauer auf dem Accelerod festgestellt werden, die in Dox-behandelten CaM_syn Mäusen nicht beobachtet wurde. (E) Die Analyse der von männlichen PrP_syn und zugehörigen Kontrollen zeigte in beiden Fällen eine im Vergleich zu Messung 1 Tendenz der verlängerten Laufzeit auf dem Accelerod in Messung 2. (F) Wurden CaM_syn Mäuse und (G) PrP_syn Mäuse und zugehörige Kontrollen von Geburt an mit Dox behandelt, so zeigten diese keine signifikante Verbesserung in der Verweildauer auf dem Rad zwischen Messung 1 und Messung 2.

Gezeigt werden gemittelte Werte. Aus Übersichtlichkeitsgründen ohne Standardfehler-Balken in den Übersichten (A und B); * $p < 0,05$.

Es konnte gezeigt werden, dass CaM_syn Mäuse keine Verbesserung der motorischen Leistung zwischen Messung 1 und Messung 2 zeigten, wohingegen die Verbesserung der zugehörigen Kontrollen hoch signifikant war (Abb. 22C; Student's t -Test; $p = 0,0016$). Auch nach Abschalten des humanen α -Syn in symptomatischen CaM_syn Mäusen konnte keine Besserung zwischen Messung 1 und Messung 2 festgestellt werden (Abb. 22D). Hier erreichten jedoch gleichbehandelte Kontrollen ebenfalls keine Signifikanz, was durch den oben erwähnten Plateau-Effekt begründet sein kann. Sowohl PrP_syn Mäuse und zugehörige Kontrollen zeigten am ersten

Testtag eine Tendenz der Verbesserung (Abb. 22E), was darauf schließen lässt, dass sich Mäuse beider Gruppen ohne Beeinträchtigung eine motorische Strategie aneignen konnten.

Wurden CaM_{syn} oder PrP_{syn} Mäuse und zugehörige Kontrollmäuse von Geburt an mit Dox behandelt, so zeigten diese keine Unterschiede zwischen der Leistung in der ersten Messung im Vergleich zur der Leistung in der zweiten Messung (Abb. 22F, Abb. 22G). Dies legt zusammenhängend mit der beobachteten schlechten Leistung über die Zeit (Abb. 20B für PrP_{syn}: Gen aus: Geburt; Abb. 21B für CaM_{syn}: Gen aus : Geburt) nahe, dass die Dox-Behandlung von Geburt an einen vom Transgen unabhängigen negativen Einfluss auf motorischen Ansprüche ausübt, die im Accelerod aufgebracht werden müssen.

3.2.6.4.2 Analyse der räumlichen Kognition in CaM_{syn} Mäusen mittels radialen Acht-Arm Labyrinths

Um feststellen zu können, ob in CaM_{syn} Mäusen, die im Accelerod ein progressives motorisches Defizit (siehe Abb. 21A) und linienspezifisch eine starke Expression des Transgens im Hippokampus zeigten (Abb. 6D-E), eine Beeinträchtigung der hippokampalen Lernvorgänge vorliegt, wurden diese im radialen Acht-Arm-Labyrinth getestet. Im Vorfeld wurde zur Testung der visuellen Intelligenz ein sog. „Visual Cliff“ Test durchgeführt, um sicher zu gehen, dass in Mäusen beider Gruppen die optische Voraussetzung für die Hippokampus-spezifische Orientierung im Raum gegeben war. Zum Aufbau dieses Versuches siehe Abb. 23A.

Visual Cliff

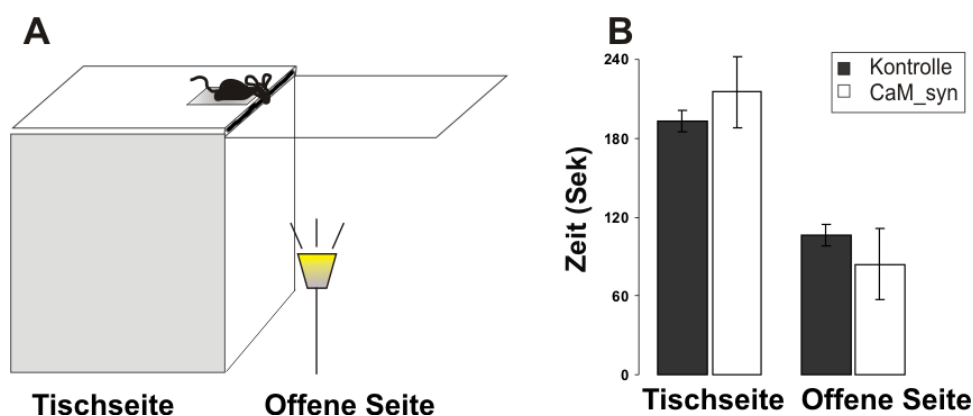


Abb. 23 Verhalten von CaM_{syn} Mäusen an einer visuellen Kante (Visual Cliff)

58-Wochen alte männliche CaM_{syn} Mäuse (n = 5) und entsprechende Kontrollmäuse (n = 8) wurden auf ihre visuelle Intelligenz hin im „Visual Cliff“ getestet. (A) Aufbau: 2 Glasplatten wurden so gelegt, dass sich an der Tischkante eine Erhebung ergab. Diese Kante wurde zusätzlich von der offenen Seite aus mit einer Lampe bestrahlt, um den Eindruck des „Visual Cliff“ zu verstärken. Die Mäuse wurden an einer zentralen Startarena nahe der Kante gesetzt und über einen Zeitraum von 5 min gemessen, wo sich die Maus bevorzugt aufhielt. (B) Beide Gruppen zeigten ein signifikantes Vermeidungsverhalten gegenüber der offenen Seite hin (einschließlich des Überschreitens der visuellen Kante (Student's *t*-Test; $p < 0,01$). Es wurde kein Unterschied im Verhalten zwischen Kontrollen und CaM_{syn} Mäusen festgestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass CaM_syn Mäuse, wie auch Kontrollmäuse, die offene Seite im Vergleich zur Tischseite signifikant meiden (Abb. 23B; Student's *t*-Test: CaM_syn und Kontrollen: $p < 0,01$) und sich beide Gruppen untereinander in diesem Verhalten nicht unterscheiden.

Für die Analyse der hippocampalen Lernvorgänge wurden die Mäuse in ein 8-Arm-Labyrinth (Aufbau: Abb. 24A) gesetzt, wobei die Mäuse in einem Arm starteten, der pro Durchgang gewechselt wurde und ein Belohnungspellet in einem für die Maus spezifischen Arm angeboten wurde. Zur räumlichen Orientierung wurden die Wände des Versuchsaumes mit unterschiedlichen Markern bestückt (Poster und ähnliches). Sowohl CaM_syn Mäuse als auch Kontrollmäuse zeigten über die Testzeit von 7 Tagen in der Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse (One-way ANOVA) keine signifikante Verbesserung im Bezug zur Zeit bis zum Auffinden des Futterpellets (Abb. 24B) und der Zahl der bis dahin betretenen Fehlarme (Abb. 24C). Jedoch zeigten Student's *t*-Tests der einzelnen Tagesmessungen an Tag 1 und 3 für CaM_syn Mäuse eine signifikant erhöhte Anzahl an Fehlarmen bis zum Auffinden der Futterpellets, was ein Hinweis für eine Verzögerung des Lernvorganges sein könnte.

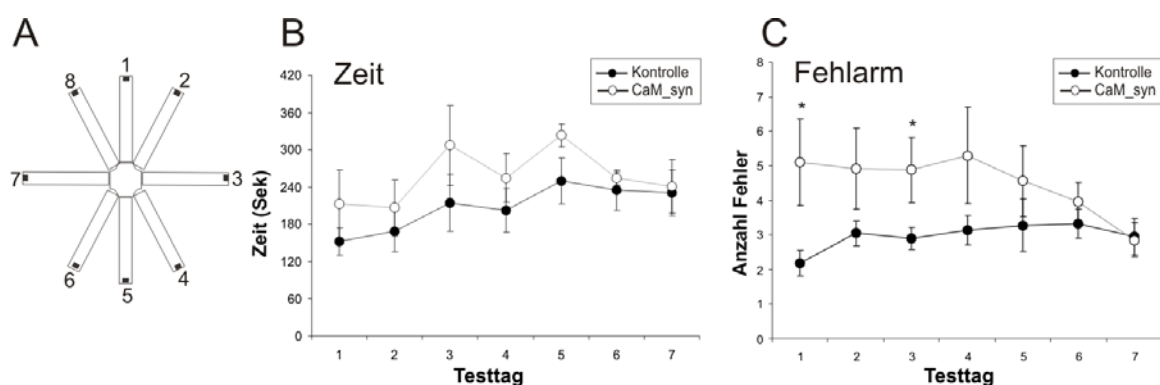


Abb. 24 Hippocampus-assoziiertes Lernverhalten im radialen 8-Arm-Labyrinth von CaM_syn Mäusen

CaM_syn Mäuse (männlich; $n = 5$) und Kontrollen ($n = 8$) wurden in einem radialen 8-Arm-Labyrinth (Radial maze) zur Analyse der hippocampalen Lernvorgänge getestet. Jeder Maus wurde ein spezifischer Belohnungsarm zugeteilt, wobei der Startarm zufällig gewechselt wurde, so dass sich die Maus anhand der umgebenden Marker zur Auffindung der Belohnung orientieren musste. (A) 8-Arm-Radial-Maze-Aufbauschema mit dunkel markierter Stelle der Belohnungsfelder. Für jede Maus wurde immer nur ein bestimmter Arm befüttert. Pro Testtag fanden für jede Maus mindestens 4 Durchgänge statt und der Test dauerte bis zum Auffinden der Futterpellets an. (B) Die Auswertung der benötigten Dauer zum Auffinden der Futterpellets zeigte keinen Unterschied in beiden Gruppen (One-way ANOVA), jedoch zeigten CaM_syn Mäuse über die Zeit hinweg eine Tendenz zur verlängerten Suche. (C) Die Auswertung der Fehlarme zeigte keinen Unterschied zwischen Kontrollen und CaM_syn Mäuse über die Zeit (One-way ANOVA); jedoch zeigte die Auswertung einzelner Tage signifikant häufiger besuchte Fehlarme in CaM_syn Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen (*: $p < 0,05$; Student's *t*-Test).

Die 58 Wochen alten Mäuse wurden für den Radial-Maze Test aufgrund ihres Alters und des motorischen Defizits der CaM_syn Mäuse im Accelerated Rotarod nicht wie standardisiert Futterdepriviert. Für die Motivation war lediglich während des Testes die Belohnung einzige Futterquelle. Über Nacht jedoch wurde Futter *ad libitum* gereicht, was eine Signifikanz in der ANOVA-Auswertung evtl. verhindert haben könnte.

3.2.6.4.3 Analyse der räumlichen Kognition in CaM_{syn} Mäusen mittels Morris Wasserlabyrinth (Morris-Water-Maze)

Zur Erfassung der räumlichen Lern- und Gedächtnisleistung wurde neben dem radialen 8-Arm-Labyrinth mit 52 Wochen alten weiblichen Mäusen der CaM_{syn} Linie ebenfalls eine Morris-Water-Maze (MWM) Analyse durchgeführt. Auch hier dienten visuelle Landmarken der unmittelbaren Umgebung als Fixpunkt für die Orientierung und Mäuse mussten durch diese lernen, eine nicht-sichtbare Plattform gezielt anzuschwimmen (nach Logue *et al.*, 1997). Das Paradigma zum MWM ist in Abb. 25A dargestellt. Während der fünftägigen Akquisitionsphase (Lernen) konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden und eine zweifaktorielle Varianzanalyse zeigte auf, dass sich in beiden Gruppen die Zeit bis zum Erreichen der Plattform signifikant reduzierte ($p < 0,001$; two-way ANOVA; Abb. 25B). Im darauf folgenden Test ohne Plattform konnte kein Unterschied in der Zeit festgestellt werden, die die Mäuse beider Gruppen im Plattformquadranten verbrachten (Student's *t*-Test: $p = 0,84$; o. Abb.). Wurde dieser Test jedoch nach 7 Tagen zur Erfassung des räumlichen Langzeitgedächtnisses (Retention) wiederholt, so zeigte sich, dass CaM_{syn} Mäuse signifikant länger brauchten, um die verdeckte Plattform zu erreichen ($p < 0,05$; Abb. 25C).

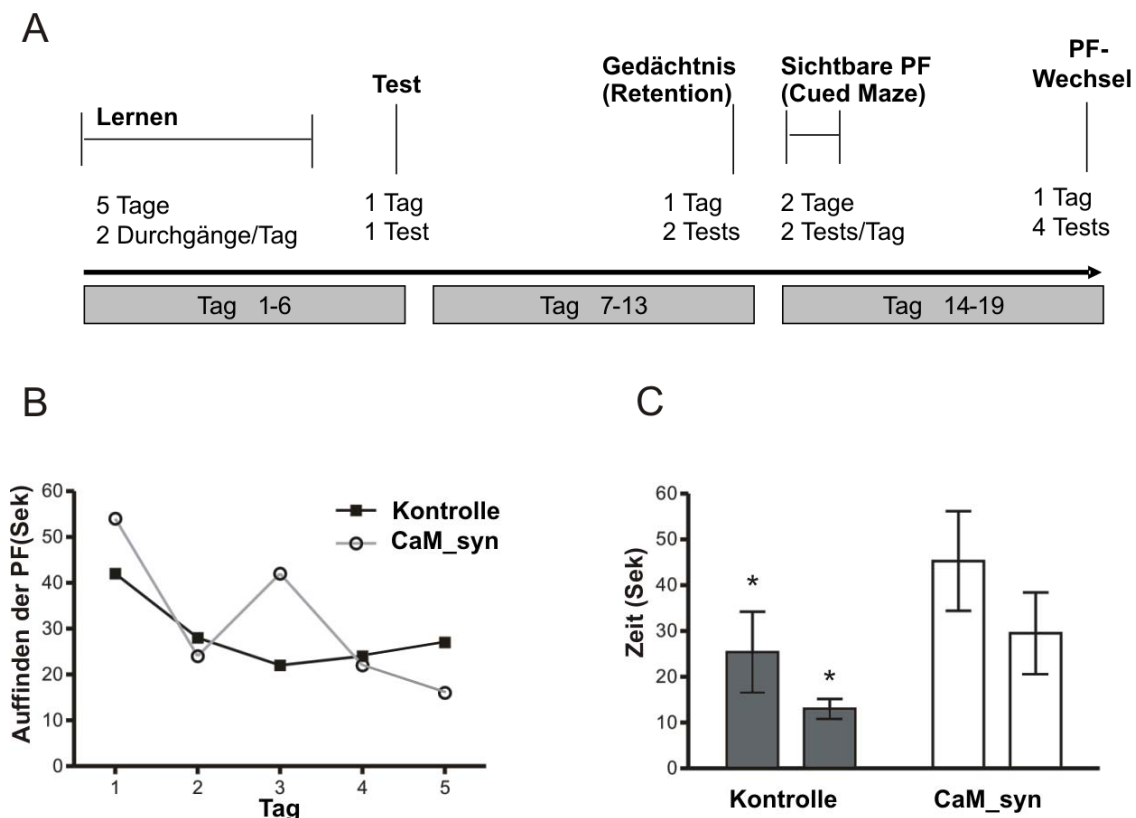


Abb. 25 Hippokampus-assoziiertes Defizit des Langzeitgedächtnisses in CaM_{syn} Mäusen im Morris Wasserlabyrinth (Morris Water Maze)

(A) Verhaltensparadigma: 52-Wochen-alte CaM_{syn} Mäuse (weiblich; $n = 5$) und Kontrollen (weiblich; $n = 5$) wurden zuerst mit Hilfe von visuellen Markern für 5 Tage daraufhin trainiert, eine abgesenkte Plattform (PF) zu finden, um dem Wasser zu entkommen (Lernen). Danach wurde das räumliche Lernvermögen getestet, indem die Plattform aus dem Wasserbecken entfernt wurde und die Zeit gemessen wurde, die die Mäuse im Plattformquadranten mit der Suche nach der Plattform verbringen (Test). Nach einer 7-tägigen Pause wurde das Langzeitgedächtnis der Mäuse analysiert, indem

die Zeit gemessen wurde, die die Mäuse in zwei Durchgängen bis zum Auffinden der Plattform benötigen (Gedächtnis; Retention). Zum Ausschluss visueller Defizite wurden Mäuse in 2 Tagen mit je 2 Durchgängen ebenso daraufhin getestet, eine sichtbare Plattform anzuschwimmen (Sichtbare PF; Cued Maze). Zur Analyse des Arbeitsgedächtnisses wurde im letzten Test die Plattform in den diagonal gegenüberliegenden Quadranten platziert und es folgte ein Test mit 4 Durchgängen, in welchem die Zeit gemessen wurde, die die Mäuse bis zum Finden der neu platzierten Plattform brauchten. (B) Die 5-tägige Akquisition (Lernen) zeigten Mäuse beider Gruppen keine signifikanten Unterschiede im Lernverhalten zueinander und in beiden Gruppen wurde die Plattform signifikant schneller erreicht ($p < 0,01$). (C) Nach 7-tägiger Retention zeigten CaM_syn Mäuse im Vergleich zu Kontrollmäusen eine signifikant längere Schwimmzeit bis zum Erreichen der abgesenkten Plattform. Abkürzungen: PF, Plattform; Werte gemittelt (B, C) und mit Standardfehler (C); * $p < 0,05$

Zum Ausschluss visueller Defizite wurde der Test mit einer sichtbaren Plattform wiederholt und es konnten keine Unterschiede zwischen CaM_syn Mäusen und Kontrollen festgestellt werden (o. Abb.). Am 19. Tag der Versuchsreihe wurde die Plattform in den diagonal gegenüberliegenden Quadranten (von Südwest nach Nordost) überführt und in 4 Testungen das Arbeitsgedächtnis der Mäuse analysiert. CaM_syn Mäuse zeigten eine verlängerte Schwimmzeit bei diesem „Plattform-Switch“, die jedoch die Signifikanzgrenze nicht erreichte ($p = 0,06$; o. Abb.). Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass CaM_syn Mäuse neben der Tendenz des verzögerten Lernvorganges ebenso einem beeinträchtigten Langzeitgedächtnis aufweisen, was die in der EM beobachtete hippocampale Pathologie auf Verhaltenesebene bestätigt.

3.3 Zusammenfassende Darstellung der zeitlichen Abfolge der Analyse konditionaler CaM_syn, PrP_syn, CaM_syn30 und PrP_syn30 Mäuse

Die zeitliche Abfolge der Pathologieanalyse von dtg Mäuse mit Expression des humanen WT α -Syn (CaM_syn und PrP_syn; Abb. 26A, B) richtete sich vor allem nach Verhaltensauffälligkeiten im Accelerod (siehe auch Abb. 20 und 21), die in beiden Linien insbesondere erstmals zwischen 7 - 14 Monaten auftraten. Für den Nachweis einer Progression und/oder einer Reversibilität nach Dox-Gabe wurden einige Analysen, wie bspw. die HPLC zum Nachweis des Neurotransmittergehaltes oder EM-Analysen zum Nachweis des Zelltodes, mit älteren Tieren wiederholt. Dies schließt Analysen der Kognition (Morris Water Maze, Radial Maze und Motor Skill Learning) aus, da diese in der Regel nur einmal durchgeführt werden können, da sich ein „Gewöhnungseffekt“ bzw. ein „Lerneffekt“ einstellt.

In PrP_syn30 Mäusen traten Änderungen im Verhalten und der Biochemie zwischen 9 - 14 Monaten auf. Die späte Analyse der mitochondrialen Funktion war unabhängig von dieser Beobachtung und ergab sich eher auf dem Vorhandensein einer ausreichend großen Tiergruppe zum Zeitpunkt der Kooperation (Abb. 26D). Die Analyse der CaM_syn30 Linie richtete sich z. T. im Hinblick auf die Ergebnisse der Prp_syn30 Mäuse (Abb. 26C).

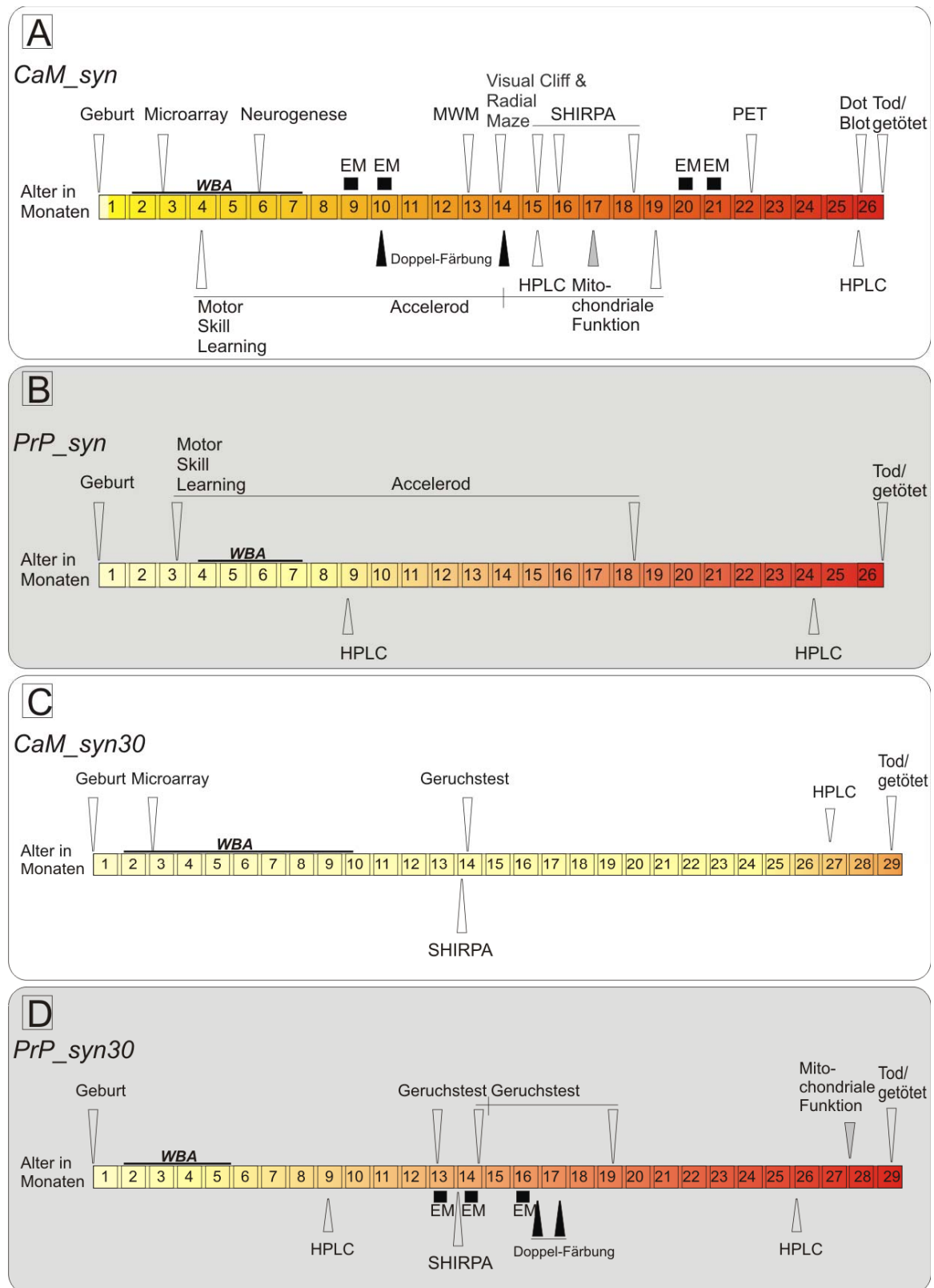


Abb. 26 Zusammenfassende Darstellung der zeitliche Abfolge der Analyse konditionaler Mäuse

Dargestellt sind Analysen der (A) *CaM_syn* dtg Mäuse, (B) *PrP_syn* dtg Mäuse, (C) *CaM_syn30* dtg und (D) *PrP_syn30* dtg Mäuse. Nähere Erläuterungen und Ergebnisse siehe Text und vorausgehender Ergebnisteil. Die Farbänderungen sollen den, auf den Ergebnissen beruhenden, Beginn und die Progression der Pathologie darstellen. Abkürzungen: EM, Elektronenmikroskopie; HPLC, High-Pressure Liquid Chromatography; PET, Positronen-Emissions-Tomographie; MWM, Morris Water Maze; WBA, Western Blot Analyse; †, kennzeichnet eine Wiederholung des Verhaltenstestes nach Dox-Gabe.

4 Diskussion

4.1 Konditionale Expression des humanen α -Syn in IPS-relevanten Regionen

Für die Generation eines konditionalen Mausmodells für das IPS wurden Mäuse verwendet, die das humane Wildtyp- α -Syn („Responder“-Linie syn und syn1) bzw. das mutierte [A30P] α -Syn (Linie syn30) indirekt über den Tetrazyklin-kontrollierten Transaktivators (tTA) unter Kontrolle des PrP-Promotors (PrP; Tremblay *et al.*, 1998) oder des CaMKII α -Promotors (CaM; Mayford *et al.*, 1996) exprimieren. Die Verkreuzung aller der Promotor-Linien mit den Responderlinien führte zu doppelt-tg Mäusen (PrP_syn, CaM_syn, PrP_syn1, CaM_syn1, PrP_syn30, CaM_syn30), die das Transgen unterschiedlich im Gehirn exprimierten. Im Vergleich zu PrP_syn Mäusen zeigten CaM_syn Mäuse eine stärkere Expression des Transgens in den Bereichen des Vorder- und Mittelhirns, bspw. im Striatum, Hippokampus, Thalamus und der Substantia nigra. Jedoch wurde nur in PrP_syn Mäusen eine zusätzliche Expression im Kleinhirn, und hier speziell im Bereich der Körnerzell- und Molekularschicht mit Aussparung der Purkinjzellschicht, festgestellt. Diese PrP-spezifische zerebelläre Expression wurde bereits in Mäusen mit konditionaler Expression eines Markerproteins (β -Galaktosidase) beschrieben (Boy *et al.*, 2006). Im Vergleich zu PrP_syn und CaM_syn Mäusen zeigten Mäuse der Linien PrP_syn1 und CaM_syn1 schwächere transgene Signale, die in CaM_syn1 Mäusen auf den Bulbus, Kortex und die Basalganglien und in PrP_syn1 Mäusen auf das Riechhirn beschränkt waren. Die Expression des mutierten [A30P] α -Syn war sowohl in PrP_syn30 als auch in CaM_syn30 Mäusen auf das Riechhirn limitiert. Die IHC legte in PrP_syn30 Mäusen eine stärkere Expression des [A30P] α -Syn im Bereich der Mitral- und externen plexiformen Schicht im Vergleich zu CaM_syn30 Mäusen, die ihrerseits prominente Signale in der Glomerulärschicht aufzeigten, nahe. Ähnliche Expressionsvariationen wurden bereits sowohl für die permanente Expression (Maskri *et al.*, 2004) als auch die konditionale Expression (Mayford *et al.*, 1996) im transgenen Mausmodell beschrieben. Die Autoren begründeten die Expressionsunterschiede durch die Anzahl und die speziellen Integrationsstellen der transgenen Konstrukte in das Mausgenom. Das unterschiedliche Expressionsmuster in unseren konditionalen Mäusen zeigte auf, dass gerade der Einbau des α -Syn- (Responder-) Konstruktes eine große Rolle spielte, da im Falle der syn30-Expression eine vom Promotorkonstrukt unabhängige Expressionslimitierung auf den Bulbus olfactorius vorlag. Ein Linien-übergreifender Vergleich der Expression des Transgens konnte daher nur für das Riechhirn vorgenommen werden. In dieser Region wurde das stärkste Expressionssignal in CaM_syn30 Mäusen, gefolgt von PrP_syn30 Mäusen und CaM_syn1 Mäusen nachgewiesen. CaM_syn Mäuse und PrP_syn Mäuse zeigten eine schwächere transgene Expression im Riechhirn, Diese war immunhistochemisch in PrP_syn Mäusen auf die glomeruläre Schicht beschränkt, in CaM_syn Mäusen wurde sie dagegen ebenfalls in der externen plexiformen Schicht und am

stärksten in der granulären Schicht detektiert. In anderen publizierten Mausmodellen wurde die relative Expression im Vergleich zu einer humanen Kontrolle, dem endogenen α -Syn der Maus oder den verschiedenen generierten Linien untereinander, entweder auf RNA-Ebene und / oder auf Proteinebene bestimmt; wobei bspw. Masliah *et al.* (2000) und Lee *et al.* (2002) zeigten, dass die Höhe der RNA-Konzentration im Hirngewebe dann positiv mit der Höhe der Proteinkonzentration des Transgens korreliert. Im Vergleich zur endogenen α -Syn-Expression zeigten bspw. die Mäuse von Tofaris *et al.* (2006) im Riechhirn lediglich einen Bruchteil an Expressionsstärke, wobei in diesem Modell die Expression des Transgens Promotor-spezifisch auf Tyrosine-Hydroxylase (TH)-Neurone beschränkt war. Im Vergleich zu einer humanen Kontrolle (100 %), zeigten die Mäuse von Masliah *et al.* (2000) linienspezifisch eine relative Expression von ca. 20 – 80 %, weshalb die von unseren konditionalen Mäusen beobachtete Expressionsstärke zumindest im Riechhirn mit der Expression in diesen PDFG- β -[wt] α -Syn transgenen Mäusen vergleichbar sein sollte. Im Vergleich zu endogenen α -Syn zeigten die Mäuse von Lee *et al.* (2002) eine 4-15fache stärkere Expression, wodurch die Expression dann in unseren konditionalen Mäusen zumindest für PrP_syn30 und CaM_syn30 Mäusen vergleichbar sein könnte, jedoch die anderen konditionalen Linien eine schwächere Expression aufzeigen sollten. In der Studie von Lee wurde jedoch das Gesamthirnproteinextrakt untersucht und in den konditionalen Mäusen lediglich das Proteinextrakt des Bulbus olfactorius, so dass eine tatsächliche Aussage über die relative Expression in den Mäusen nur durch direkten Vergleich in der Western Blot Analyse (WBA) vorgenommen werden könnte. Ein direkter Vergleich wurde mit den Mäusen von Kahle *et al.* (2000) in der WBA für die Evaluierung eines Dot-Blots vorgenommen (Abb. 12A). Im Kortextbereich zeigte die heterozygote CaM_syn Maus eine im Vergleich zur homozygoten „[A30P] α -Syn“ Maus 100x geringere Expression; ginge man davon aus, dass die Homozygotie die Expressionsstärke verdoppelt, so läge im Kortext in [A30P] α -Syn tg Mäusen etwa 50fach mehr transgenes α -Syn als in CaM_syn Mäusen vor.

Ogleich die WBA eine gute Regulierbarkeit der Expression des Transgens durch Doxyzyklin (Dox) nahe legte, zeigte die immunsensitivere Färbung von Gehirnschnitten adulter Mäuse eine Restexpression insbesondere in den Hirnregionen, die in unbehandelten Mäusen eine starke Expression zeigten. Im Falle der PrP_syn30 Mäuse konnte gezeigt werden, dass die verlängerte Gabe von Antibiotika die Expression vollständig herabregulierte. In allen Linien wurde die Expression vollständig unterdrückt, wenn Mäuse von Geburt an mit Antibiotika behandelt wurden. Entsprechend kann die detektierte Restexpression Ergebnis einer ungenügenden Antibiotika-Dosis oder Behandlungsdauer sein, oder es handelt sich um stabile immunopositive Ablagerungen, wie sie bspw. in konditionalen Mäusen für den MA beschrieben wurden (Jankowsky *et al.*, 2005). Erstere Annahme ist ebenso unwahrscheinlich, da eine vollständige Expressionsregulation in Mäusen mit gleicher Promotor-tTA-Linie für diese Dosis (2 mg/ml) und Dauer (30 Tage) gezeigt

wurde (Mayford *et al.*, 1996; Tremblay *et al.*, 1998). Ob stabile immunopositive Ablagerungen in unserem Modell bspw. durch einen beeinträchtigten Proteinabbau, wie es für mutiertes α -Syn *in-vitro* gezeigt werden konnte (Stefanis *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2001) verursacht werden, benötigt einer weitergehenden Analyse.

Da die Läsionen des IPS im Bulbus olfactorius auftreten und weitergehend progressiv über den Nukleus dorsalis nukleus vagi der Medulla oblongata über das Mittelhirn in den Kortex „aufsteigen“ (Übersichtsartikel; Braak *et al.*, 2004) und somit mehrere Hirnregionen beim IPS betroffen sind, wurden für detaillierte Studien PrP_syn1 und CaM_syn1 Mäuse ausgeschlossen, die eine sehr begrenzte Expression im Vergleich zu CaM_syn Mäusen und PrP_syn Mäusen zeigten. Zusätzlich wiesen diese Mäuse eine schwächere Expression des humanen Wildtyp- α -Syn in Bezug zu CaM_syn Mäusen auf. Es ist davon auszugehen, dass eine starke Expression des transgenen α -Syn im Tiermodell zu einer schnelleren Ausprägung der durch das Transgen induzierten Pathologie führt, wie es bspw. durch eine vorgezogene Pathologie in homozygoten „Thy1-[A30P] α -Syn“ Mäusen im Vergleich zu heterozygoten Mäusen (Neumann *et al.*, 2002) und durch eine Gendosis-abhängige Verstärkung der Pathologie in „Hu α -Syn(A53T)“ Mäusen gezeigt werden konnte (Lee *et al.*, 2002). Eine von der Gendosis abhängige Verstärkung der Pathologie ausgehend von Wildtyp- α -Syn legt der Mensch selbst nahe, da die Duplikation bzw. Triplikation des Wildtyp-Genlokus zum vererbten MP führen (Singleton *et al.*, 2003; Chartier-Harlin *et al.*, 2004). Ebenso konnte in Mäusen mit Expression des humanen Wildtyp- α -Syn ein direkter Zusammenhang zwischen Expressionsstärke und der Anzahl α -Syn-positiver Aggregate im Kortex festgestellt werden (Masliah *et al.*, 2000). Jedoch zeigen Mäuse mit einer vergleichsweise geringeren Expression des PDGF- β -[A53T] α -Syn im Vergleich zur Expression des PDGF- β -[wt] α -Syn trotzdem eine stärkere Pathologie (Hashimoto *et al.*, 2003; Winner *et al.*, 2007), so dass intern zwischen der Expression der nicht-mutierten und mutierten Varianten des α -Syn unterschieden werden muss.

PrP_syn30 und CaM_syn30 Mäuse wurden ebenso weiter analysiert, da diese durch Begrenzung der transgenen Expression auf den Bulbus olfactorius den MP im Frühstadium modellieren könnten (Stadium I ohne Involvierung des Nukleus vagus) und zudem Aussage treffen, ob eine im Riechhirn induzierte Pathologie andere Hirnregionen sekundär in Mitleidenschaft zieht, wie es in der Ratte modellhaft durch nasale MPTP-Injektion gezeigt werden konnte (Prediger *et al.*, 2006), jedoch bspw. von Braak *et al.*, (2004) negiert wird: „[...] From stages 3-4 onward, the lesions extend into more remote olfactory sites without advancing into non-olfactory grays or cortical areas [...]. Thus, the disease process chiefly begins in the dorsal motor nucleus of the vagal nerve and, from then on, proceeds upward until it arrives at the cerebral cortex [...]”.

Kolokalisationsfärbungen mit Ak gegen TH und α -Syn zeigten in PrP_syn30 Mäusen die Expression des humanen α -Syn in dopaminergen Neuronen der olfaktorischen glomerulären Schicht

und in CaM_syn Mäusen in dopaminergen Neuronen der Substantia nigra als Voraussetzung für eine Modellierung α -Syn induzierter Pathologie in dopaminergen Zellen.

4.2 Neuropathologie, begleitender Phänotyp und Reversibilität in CaM_syn Mäusen

4.2.1 Neuropathologie des nigrostriatalen Systems

Die immunohistochemische Kolokalisations-Analyse der nigralen Neurone ergab neben der physiologischen Lokalisierung im Neuropil eine Fehllokalisierung im Zellsoma, wie sie auch in anderen publizierten α -Syn-tg Mausmodellen beobachtet wurde (Masliah *et al.*, 2000; Matsuoka *et al.*, 2001; Richfield *et al.*, 2002; Rockenstein *et al.*, 2002; Gispert *et al.*, 2003; Maskri *et al.*, 2004; Tofaris *et al.*, 2006). Ein nigraler Zelluntergang wurde jedoch in diesen Modellen nicht beschrieben, mit Ausnahme von PDGF- β -Mäusen mit nicht-fibrillären Wildtyp- α -Syn-Aggregaten in nigralen dopaminergen Zellen und einer wahrscheinlich kausalen Abnahme dopaminerger Nervenendigungen im Striatum. Ähnlich konnten Tofaris und Mitarbeiter (2006) α -Syn-positive Einschlüsse in der Nigra und eine striatale Pathologie, hier als axonale Schwellung gezeigt, nachweisen. Entsprechend steht in Diskussion, ob das Vorhandensein α -Syn-positiver Aggregate im Mausmodell Voraussetzung bzw. notwendiger Bestandteil einer Neuropathologie ist. Obgleich in konditionalen CaM_syn Mäusen eine Mislokalisierung im Zellsoma festgestellt wurde, zeigten EM-Analysen und ein evaluierter Dot-Blot des Proteinextrakts der Substantia nigra kein Aggregatvorkommen. Ultrastrukturell lag das α -Syn-positive Akkumulat granulär und dispers verteilt vor und die in Abb. 9I gezeigten großflächigen Akkumulate konnten nicht bestätigt werden. Jedoch konnten im Übergangsbereich Substantia nigra *pars compacta* zur Substantia nigra *pars reticulata* zahlreiche degenerierte Dark-Cells nachgewiesen werden. Dieses Degenerationsmuster wurde bisher nicht für den MP aber für andere neurodegenerativen Erkrankungen, wie bspw. dem MH (Turmaine *et al.*, 2000) oder für SCA7 (Custer *et al.*, 2006) beschrieben. Ungeachtet dessen reflektierte die detektierte Zelldegeneration, einschließlich axonaler Pathologie, der von Galvin und Mitarbeiter (1999) publizierten Pathologie von Patienten mit IPS bzw. DLB. Obgleich Braak und Mitarbeiter (2004) eine selektive Verwundbarkeit nicht-myelinisierter oder nur schwach-myelinisierter Axone der MP-Neuropathologie postulierte, war eine axonale Pathologie in CaM_syn Mäusen sowohl in myelinisierten als auch unmyelinisierten Axonen festzustellen. Die betroffenen Axone zeigten unter andere elektronendichte Mitochondrien, oftmals assoziiert mit transgenem α -Syn. Eine im Zusammenhang mit pathologisch veränderten Mitochondrien beschriebene Pathologie der Zellfortsätze wurde auch von Martin und Mitarbeiter (2006) für „A53T“-Mäuse beobachtet. Die dysomorphen

(geschwollenen, geschrumpften oder vakuolisierten) Mitochondrien zeigten sich in diesen Mäusen aber insbesondere in neuronalen Dendriten des Hirnstamms und des Rückenmarks.

Mitochondriale Schäden werden in Patienten mit IPS häufig beobachtet, und die Aktivität des Komplex I in der Substantia nigra ist in Parkinson-Patienten signifikant reduziert (Übersichtsartikel: Parker und Swerdlow, 1998; Shults, 2004). Die Analyse der mitochondrialen Funktion mittels Ca^{2+} -Titration zeigte eine tendenzielle Reduktion der Komplex-I-abhängigen Atmungsrate im Resthirn von CaM_syn Mäusen, die in Dox-behandelten CaM_syn Mäusen ohne Transgen-Expression, wiederum lediglich in der Tendenz, etwas höher lag. Diese Ergebnisse sollten durch die Analyse weiterer Mäuse zur Begrenzung der Varianz und zur Validierung führen. Zu Beachten wäre, dass eventuell nur Neurone spezieller Hirnbereiche, wie bspw. die der *Substantia nigra* eine Dysfunktion aufweisen und durch die Vermischung mit intakten Mitochondrien im Gesamthirnhomogenat maskiert werden, weswegen ein Protokoll für eine Hirnregion-spezifische Analyse etabliert werden sollte.

Neben kondensierten Mitochondrien wurden ebenfalls ein hoher Anteil an Lipid-Tropfen und eine starke lysosomale Anreicherung beobachtet. Es ist bekannt, dass α -Syn an Lipide und Membranen binden kann. Ein Grund für diese Anreicherung könnte daher sein, dass überexprimiertes α -Syn vermehrt Bindungen mit Organellen und Lipiden eingeht und es als pathologische Konsequenz zu einem beeinträchtigten Lipid- und Organellen-Transport mit einhergehender Überladung des proteasomalen und lysosomalen Abbauweges kommt. Hinweise für diese Hypothese zeigen „ α -S-tg-MPTP“ Mäuse, die humanes Wildtyp- α -Syn unter Kontrolle des Thy-1 Promotors exprimieren und deren Neuropathologie durch eine geringe-MPTP-Dosis induziert wurde (Song *et al.*, 2004).

Das dopaminerge System kann durch PET und verschiedener Radiopharmaka quantitativ erfasst werden. Häufig verwendete Marker sind u.a. ^{18}F -L-Fluorodopa, dessen Anreicherung mit der Aktivität der striatalen Decarboxylase (aromatic amino acid decarboxylase; AADC) korreliert, ^{11}C -Racloprid zur Darstellung der D2-Rezeptordichte auf postsynaptischer Seite oder ^{11}C - β -CIT, ^{11}C -CFT, ^{11}C -MP bzw. ^{18}F -FECNT zum Nachweis des DAT-Bindungspotenzial präsynaptischer striataler Nervenendigungen. In MPTP-behandelten Mäusen war insbesondere der Nachweis des DAT-Bindungspotenzials geeignet für die Aufdeckung einer striatalen Schädigung (Honer *et al.*, 2006). Obgleich im MPTP-, 6-OHDA- und in einem Lentiviral-induzierten α -Syn-Tiermodell eine Reduktion der DAT-Aktivität, ausgehend von einer nigralen Schädigung nachgewiesen werden konnte (Brownell *et al.*, 2003; Honer *et al.*, 2006; Lauwers *et al.*, 2006), zeigten CaM_syn Mäuse trotz vorliegender nigraler Degeneration nur eine tendenzielle Reduktion der ^{11}C -MP-DAT-Aktivität. Eine den Daten zugrunde liegende Power-Analyse zeigte zudem, dass zumindest 51 Tiere in die Messung eingeschlossen werden müssten, um eine Signifikanz zwischen CaM_syn Mäusen, Dox-behandelten CaM_syn Mäusen und Kontrollen erreichen zu können. Die beobachtete Signifikanz in den oben Neurotoxin-Tiermodellen beruhte jedoch auf einer akuten

Induktion des Zelltodes; selbst α -Syn-überexprimierende Ratten wurden im Vorfeld mit Amphetamin zur Überprüfung eines Amphetamin-induzierten Rotationsverhaltens behandelt. Dadurch wurde die dopaminerge Neurodegeneration artifiziiell und subakut induziert, so dass vermutlich das Ausmaß der dopaminergen Neurodegeneration im Vergleich zu einer reinen Transgen-induzierten Degeneration stark erhöht war.

Gleichermaßen zeigte die Messung des striatalen DA-Gehaltes nur in der Tendenz eine Reduktion in CaM_syn Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen. Auch hier, im Vergleich zu anderen publizierten Mäusen, zeigten nur artifiziiell veränderte α -Syn-tg Mäuse, mit entweder Expression von doppelt mutierten [A30P + A53T] α -Syn (13-23 Monate alte hm² α Syn-39 Mäuse; Richfield *et al.*, 2002) oder C-terminal verkürzten α -Syn (≥ 3 Monate alte α -Syn120 Mäuse; Tofaris *et al.*, 2006) eine Signifikanz im Striatum. Ähnlich konnte man in artifiziiell Neurotoxin-induzierten Mausmodellen signifikante Unterschiede striataler Neurotransmitter nachweisen (Übersichtsartikel: Bové *et al.*, 2005), wobei in letzteren Mäusen der Zelltod wiederum subakut und daher nicht in einer zeitlichen Abfolge auftritt.

Es wird vermutet, dass der Verlust dopaminergere Synapsen im IPS z.T. durch kompensatorische Mechanismen ausgeglichen wird (Abb. 27). Zu diesen zählen eine gesteigerte DA-Synthese und Freisetzung intakter nigrostriataler Nervenendigungen, wie man es in Parkinson-Patienten zeigen konnte (Sossi *et al.*, 2002), kompensatorisches „Sprouting“ wie man es am Beispiel 6-OHDA behandelte Ratten und MPTP-behandelten Affen nachweisen konnte (Finkelstein *et al.*, 2000; Song und Haber; 2000), sowie kompensatorische Mechanismen extranigrale Systeme, wie bspw. die kompensatorische Plastizität nigropallidaler Projektionen (Whone *et al.*, 2003).

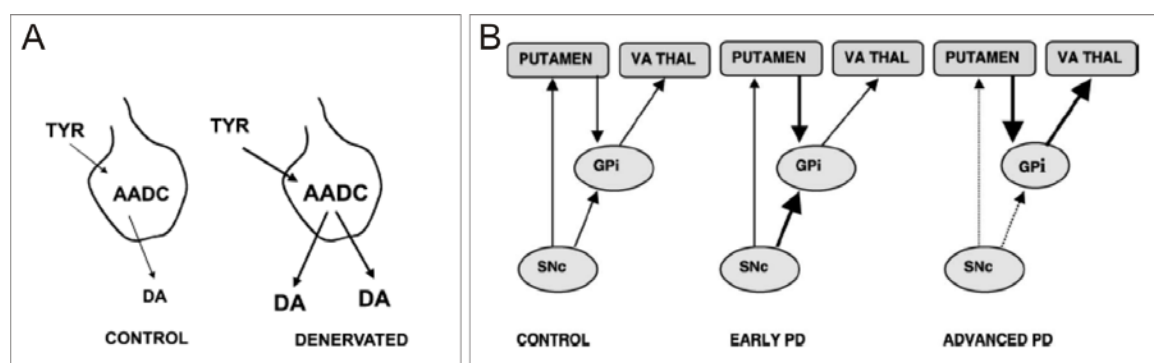


Abb. 27 Kompensatorische Mechanismen dopaminergere Neurone bzw. nigropallidaler Projektionen des IPS (aus Moore; 2003)

(A) Mit dem Verlust nigrostriataler Nervenfasereindigungen (DENERVATED) kommt es zur vermehrten Aktivität der striatalen Decarboxylase (AADC) in verbleibenden Nervenendigungen mit gesteigerter Dopamin- (DA) Produktion und Freisetzung. (B) In gesunden Menschen (CONTROL) wird durch den „Input“ des Globus pallidus ein normaler „Output“ des motorischen Thalamus (VA THAL) erreicht, der durch die kortikostriatale motorische Schleife und das nigrostriatale System extern reguliert wird. Mit Verlust des DA-Input des Putamens im frühen IPS-Stadium (EARLY PD), kommt es zu kompensatorischen Veränderungen nigropallidaler Projektionen zur Aufrechterhaltung eines relativ normalen Outputs des motorischen Thalamus. Durch die Degeneration nigropallidaler Projektionen im fortgeschrittenen IPS (ADVANCED PD) und kontinuierlichem Verlust nigrostriataler Projektionen, kommt es zum Verlust der kompensatorischen Antwort und zur Symptomatik.

Entsprechend kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Degeneration vereinzelter Neurone der Substantia nigra kompensatorische Mechanismen auslösten, die eine Signifikanz bei der Messung des striatalen DA-Gehaltes bzw. der DAT-Aktivität verhinderten.

4.2.2 Hippokampale Neuropathologie

Ultrastrukturell konnte das Muster der Dark-Cell-Degeneration, einschließlich axonaler Pathologie, ebenso in der hippokampalen CA3-Region und im Gyrus dentatus festgestellt werden. Auf eine Beteiligung der hippokampalen CA2/CA3-Region als extranigrale Pathologie wiesen die Untersuchungen von Mattila *et al.* (1999) und Bertrand *et al.* (2003, 2004) an dementen Parkinson-Patienten hin. Physiologisch liegt α -Syn in der CA2/CA3-Region im neuronalen Perikaryon des humanen Gehirns (Mori *et al.*, 2002) und im Neuropil des Maushirns (Totterdell *et al.*, 2004) vor. In CaM_syn Mäusen könnte daher die induzierte Überexpression des humanen α -Syn im Neuropil der CA3-Region die Pathologie unterstützt haben. In diesem Zusammenhang interessant ist Abb 11K, die zeigt, wie α -Syn-positive Moosfaserendigungen die degenerierten Zellen der hippokampalen CA3-Region kontaktieren. Die starke Anreicherung in präsynaptischen Nervenendigungen könnte, wie bereits von Galvin *et al.* 1999 postuliert, die Kognition durch beeinträchtigte synaptische Transmission inhibieren. Hierfür würden in CaM_syn Mäusen die angrenzenden degenerierten Neurone sprechen. Ein entsprechendes pathologisches Bild wurde jedoch für Parkinson-Patienten noch nicht beschrieben.

Als Konsequenz einer Hirnschädigung wurde beim Menschen (Macas *et al.*, 2006) und beim Nager (Arvidsson *et al.*, 2002; Nakatomi *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003) ein kompensatorischer Anstieg in der Neurogeneserate beschrieben. Kontrovers bleibt die Neurogeneserate in Parkinson-Modellen: Obgleich die MPTP-induzierte Degeneration dopaminerger Neurone die Neurogeneserate zumindest in der Substantia nigra (Shan *et al.*, 2006) und im Riechhirn (Hayakawa *et al.*, 2007) steigerte, zeigten Freundlieb *et al.* (2006) eine signifikante Abnahme der Zellproliferation der Subventrikulären Zone (SVZ) aufgrund MPTP-induzierter DA-Reduktion. Ähnlich wurde in 6-OHDA-behandelten Ratten eine Reduktion der Proliferationsrate in der SVZ und in der Granulärschicht des Riechhirns, jedoch in der Glomerulärschicht eine signifikante Steigerung beobachtet (Winner *et al.*, 2006). Dagegen zeigten α -Syn-überexprimierende Mausmodelle eine signifikante Reduktion in der Glomerulär- und Granulärschicht sowie der SVZ (Winner *et al.*, 2004), die zudem durch die Expression des [A53T] α -Syn verstärkt wurde (Winner *et al.*, 2007).

Die Analyse der 6-Monate-alten CaM_syn Mäuse zeigte eine diesbezüglich erwartete und mit PDGF- β -[wt] α -Syn vergleichbare signifikante Reduktion neu differenzierter Neurone in der SVZ, mit gleichzeitig vorliegender Reduktion DCX-positiver Neuroblasten. Durch das Abschalten der Expression des humanen α -Syn konnte gleichzeitig gezeigt werden, dass dieser Effekt primär auf

die Expression des transgenen α -Syn zurückzuführen ist, da in diesen Mäusen eine signifikant höhere Anzahl an Neuroblasten und BrdU-positiven Zellen im Vergleich zu unbehandelten CaM_syn Mäusen vorlag.

4.2.3 Neuropathologie im Riechhirn (Bulbus olfactorius)

Die punktuelle Anfärbung der olfaktorischen Glomerulärschicht von CaM_syn Mäusen mit Ak gegen humanes α -Syn legt ein Vorkommen insbesondere im Neuropil nahe. Auch zeigten weiterführende Färbungen keine Kolo-kalisation zwischen der somatisch lokalisierten TH und des im Neuropil lokalisierten α -Syn. Ungeachtet dessen konnte eine signifikante Reduktion von DOPAC in CaM_syn Mäusen im Alter von ca. 60 Wochen festgestellt werden und im Alter von ca. 100 Wochen eine Reduktion von DA. Es ist anzunehmen, dass die Reduktion von DOPAC auf eine metabolische Dysfunktion in jüngeren CaM_syn Mäusen und die Reduktion von DA mit der in der EM beobachteten axonalen Pathologie von ca. 80 Wochen alten CaM_syn Mäusen zurückzuführen ist (s. Abb. 11). Jedoch müssten bei einer der DA-Reduktion zu Grunde liegenden Neurodegeneration ebenfalls die Metaboliten DOPAC und HVA reduziert vorliegen. Der Ursprung des gemessenen DOPAC kann dabei entweder vesikulär oder glial oder intraneuronal sein. Ein verminderter DOPAC-Spiegel kann, ginge man davon aus, dass er intrazellulären Ursprungs ist, ein Hinweis auf einen verminderten intrazellulären DA-Spiegel sein, der aber bei der Messung unspezifisch durch den erhöhten extrazellulären DA-Spiegel (als kompensatorischer Effekt verbleibender nigrostriataler Fasern) kompensiert wird.

Jedoch ist diese Interpretation spekulativ und müsste durch spezifische Messung des intra-, und extrazellulären DA überprüft werden. Anzumerken ist, dass ebenso sowohl in 60-Wochen-alten CaM_syn Mäusen der DA-Spiegel und in 100-Wochen-alten CaM_syn Mäusen der DOPAC-Spiegel tendenziell reduziert war. Die Varianz in den HPLC-Messungen war insgesamt hoch und schwankte zwischen den Mauslinien und einzelnen Messungen so stark, dass eine linienübergreifende Messung nicht möglich war. Signifikanzen der HPLC-Messungen in α -Syn transgenen Mäusen wurden von Neumann *et al.*, (2002) mit einer Gruppe von $n > 20$ (Kontrolle: $n = 21$; Homozygot-Transgen: $n = 23$) und von Tofaris *et al.*, (2006) mit $n = 4$ publiziert. Jedoch war die Expression letzterer Mäuse eher artifiziell, da das transgene α -Syn carboxyterminal verkürzt und zudem in Mäusen ohne endogenes α -Syn (C57BL/6J; Specht und Schoepfer; 2001) exprimiert wurde. Da die Daten aus Gruppen von $n \leq 10$ erzielt wurden, könnten Tendenzen evtl. durch eine gesteigerte Anzahl an Probenmaterial ausreichen. Eine Poweranalyse zeigte auf, dass ca. 30 Mäuse (28,7 für DOPAC in der CaM_syn-alt Gruppe und 32,6 Mäuse für DA in der CaM_syn Gruppe) und entsprechend ca. 15 Tiere pro Gruppe zum Erreichen einer Signifikanz notwendig wären.

4.2.4 Begleitender Phänotyp

4.2.4.1 Beeinträchtigungen im motorischen Lernen und der räumlichen Kognition

Durch wiederholtes Training auf einem Accelerated Rotarod eignen sich Ratten eine neue motorische Fähigkeit an (Buitrago *et al.*, 2004). Die Analyse der Daten des ersten Accelerated-Rotarod-Testtages unserer Mäuse zeigte, dass Kontrollen bei der Wiederholung des Testes innerhalb derselben Sitzung bereits beim 2. Durchgang eine Verbesserung der Leistung zeigten. Ein ähnlich starker Unterschied wurde in den folgenden Sitzungen zwischen den beiden Durchgängen nicht mehr festgestellt und könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Tiere sich eine motorische Strategie für die Anpassung an die fortlaufende Geschwindigkeitssteigerung angeeignet hatten. Im Gegensatz hierzu wurde in CaM_syn Mäusen keine Verbesserung beobachtet, sondern eher eine tendenzielle Verschlechterung im 2. Durchgang. Dass ein direkter Zusammenhang des Erlernens motorischer Fähigkeiten und einer nigrostriatalen Pathologie besteht, konnten Ogura und Mitarbeiter (2005) in Ratten zeigen, die nur moderat mit 6-OHDA striatal injiziert wurden und so ein frühes Stadium des IPS modellieren sollten. Obgleich die Autoren nur ein Rotarod ohne Geschwindigkeitssteigerung verwendeten, konnte gezeigt werden, dass die Ratten kein motorisches Lernen über einen Zeitraum von 5 Tagen (4 Durchgänge pro Tag) im Vergleich zur SHAM-Kontrolle aufzeigten. In unseren Kontrollmäusen wurde in der ersten Woche (bis auf den 2. Durchgang am 5. Testtag) eine kontinuierliche Zunahme der Leistung beobachtet, wohingegen in CaM_syn Mäuse eine Verbesserung erst ab dem 4. Tag, jedoch nicht innerhalb der ersten beiden Durchgänge beobachtet wurde. Da den jeweiligen Testungen jedoch ein 5-tägiges Training mit je 2 Durchgängen vorausging und erwartungsgemäß sich innerhalb von 5-8 Tagen bereits ein Leistungs-Plateau zeigt (Buitrago *et al.*, 2004) wurde (nach Absprache mit Dr. A. Luft; Hertie-Institut, Universität Tübingen; korrespondierender Autor in Buitrago *et al.*, 2004) für jede Gruppe jeweils nur die Verbesserung zwischen dem 1. und 2. Durchgang des 1. Testtages als Grundlage der Berechnung des motorischen Lernens herangezogen. Betrachtet man die Leistung der weiteren Tage ungeachtet dessen, so würden CaM_syn Mäuse zumindest eine Verzögerung in der Aneignung einer motorischen Strategie zeigen. Die Antibiotika-Gabe von symptomatischen CaM_syn Mäusen und entsprechend ebenso in Kontrollen führte, jedoch nur in der Tendenz in beiden Gruppen, zu keiner Abänderung (gesteigerte Leistung in Kontrollen, Verschlechterung in CaM_syn Mäusen zwischen dem 1. und 2. Durchgang des 1. Testtages). Eine Signifikanz wurde in diesen Mäusen aber auch nicht durch die vorhergehenden Testungen erwartet.

Wurden CaM_syn Mäuse und Kontrollen von Geburt an mit Dox behandelt, so zeigten Kontrollmäuse in der Tendenz eine leichte Zunahme in der Verweildauer auf dem Rad, wohingegen CaM_syn Mäuse wiederum keine Verbesserung zeigten. Das Fehlen von

Signifikanzen in beiden Gruppen könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich die Mäuse bereits eine motorische Strategie (Plateau-Phase) angeeignet hatten. Die Verweildauer auf dem Accelerated Rotarod wurde jedoch in den dem Test vorausgehenden Trainingssitzungen mit jeweils konstanten Geschwindigkeiten nicht erfasst.

Die Auswertung der Radiallabyrinth-Daten der einzelnen Testtage zeigte eine Verzögerung des räumlichen Lernens in CaM_syn Mäusen, was auf ein hippocampales Defizit schließen lässt (O'Keefe und Nadel; 1978). Jedoch ergab die Auswertung über die Zeit, dass in beiden Gruppen kein tatsächlicher Lerneffekt vorlag, was mit der moderaten Futterreduktion (nur während des Testes) im Zusammenhang stehen kann. Ungeachtet dessen besuchten CaM_syn Mäuse an 2 von 7 Testtagen signifikant mehr Fehlarme als Kontrollen, obgleich in diesen Mäusen bei gleicher visueller Intelligenz bereits ein motorisches Defizit vorlag (siehe unten). Eine Verzögerung im Lernmuster α -Syn-tg Mäuse (Thy1-h[A30P] α SYN) konnten ebenfalls von Freichel und Mitarbeitern (2006) jedoch im Bezug auf das Hippokampus/Amygdala-assoziierte „aktive Vermeidungsverhalten“ beobachtet werden. Es liegt daher nahe, dass kognitive Beeinträchtigungen in α -Syn-tg Tiermodellen des IPS von subtiler Art sind, wie es auch für IPS-Patienten selbst beschrieben wurde (Leplow *et al.*, 2002). Es ist nicht auszuschließen, dass in CaM_syn Mäusen ein erhöhtes Explorationsverhalten als Strategie zur Auffindung des Futterpellets angewendet wurde, da die Mäuse keine signifikante Abnahme in der benötigten Zeit bis zum Auffinden des Futterpellets zeigten. Es wurde jedoch ebenfalls keine Zeitersparnis in Kontrollmäusen beobachtet, so dass grundlegend ein Lernerfolg in Kontrollmäusen fehlte, um ein kognitives Defizit in CaM_syn feststellen zu können.

Dagegen zeigten Mäuse im MWM ein signifikantes Lernverhalten hinsichtlich des Auffindens einer verborgenen Plattform. Ein Unterschied zwischen CaM_syn Mäusen und Kontrollen zeigte sich jedoch nicht im Lernverhalten, sondern nur in der Analyse auf Langzeitgedächtnis. Ähnliches Verhalten wurde von Steffenach *et al.* (2002) in Ratten beobachtet, deren longitudinal-orientieren CA3-Fasern der CA3-CA3 und CA3-CA1-Konnektion zerstört wurden. Die Autoren verwiesen darauf, dass ein fehlender Effekt auf das Kurzzeitgedächtnis durch die lediglich moderate Zerstörung der CA3-Region (< 3 %) zurückzuführen sein könnte. Gleichfalls wäre es für CaM_syn Mäuse denkbar, dass die moderate Neurodegeneration von CA3-Neuronen nur einen Effekt in der Retention erzielt. Im „strategy switching test“, welcher aufzeigt, wie schnell die Tiere neue Suchstrategien entwickeln können, zeigten CaM_syn Mäuse eine Beeinträchtigung, die jedoch die Signifikanzgrenze nicht ganz erreichte. Dies legt nahe, dass CaM_syn Mäuse neben der Beeinträchtigung des Langzeitgedächtnisses ebenfalls eine leichte Beeinträchtigung in der Adaptation einer neuen Suchstrategie aufzeigen, was eventuell auch mit der Beeinträchtigung der adulten Neurogenese im Einklang stehen könnte.

4.2.4.2 Beeinträchtigungen in der Motorik

Ein deutlicher Unterschied zu Kontrollen wurde in der Analyse der motorischen Leistung festgestellt. Parallel zur nigralen Neurodegeneration wurde in CaM_{syn} Mäusen ab einem Alter von ca. 30 Wochen eine progressive motorische Schwäche beobachtet. Das nicht-progressive motorische Defizit in CaM_{syn} Mäusen, die jünger als 30 Wochen waren, könnte auf dem Lerndefizit motorischer Fähigkeiten begründet sein (s. 4.2.4.1). Die kalkulierte Progression von ca. -13 sek konnte in symptomatischen Mäusen durch Dox-Gabe gestoppt werden, jedoch war die motorische Leistung immer noch signifikant schlechter als die der entsprechend behandelten Kontrollen. Dies weist ebenso daraufhin, dass die Neurodegeneration und axonale Pathologie nicht durch einen kompensatorischen Effekt ausgeglichen wurde. Im Vergleich zu anderen α -Syn-tg Tiermodellen zeigte keine Publikation eine vergleichsweise überzeugende Progression des motorischen Defizits, weswegen hier im Näheren auf die Ergebnisse anderer Modelle eingegangen werden soll: In der Analyse von Van der Putten *et al.* (2000) wurden die Mäuse bereits nach 60 sek vom Rad entfernt, wodurch es in Kontrollmäusen zu keiner (altersabhängigen) Progression kam. Die transgenen Mäuse zeigten zwar eine Progression (im Bereich unter 60 sek), diese wurde jedoch nicht durch die Degeneration nigraler Zellen ausgelöst, da es ausgehend vom Thy1-Promotor keine Expression des Transgens in diesen Zellen gab. Die Rotarod-Ergebnisse von Gispert *et al.* (PrPmtB; 2003) zeigten hohe Varianzen und die Tiere wurden unterschiedlich oft gemessen (Kontrollen: 4 Datenpunkte; Transgen: 6 Datenpunkte), mit einer finalen Besserung der motorischen Leistung in Kontrollen, die wahrscheinlich die Progression in transgenen Mäusen begünstigte. Ähnlich zeigten Kontrollen in Freichel *et al.* (2006) nach 73 Wochen eine (mit Ausnahme des Wertes in der 73. Woche) verbesserte Leistung auf dem Rotarod und zeitgleich transgene (Thy1)-h[A30P] α SYN-Mäuse einen „Progressionsschub“ ($p < 0,05$ zu $p < 0,01$) mit Hyperaktivität der transgenen Mäuse im Alter von weniger als 66 Wochen; eine Degeneration des nigrostriatalen Systems wurde nicht gezeigt. Die Rotarod-Daten der PDGF- β [wt] α -Syn transgenen Mäuse wurden nur im Alter von 12 Monaten für 5 Durchgänge gezeigt (Masliah *et al.*, 2000). In den Durchgängen zeigten transgene Mäuse eine schlechtere Performance, jedoch sowohl Kontrollen als auch transgene Mäuse eine tendenzielle Verbesserung während der Durchgänge. Eine Analyse der altersabhängigen Progression wurde nicht vorgenommen. In Gomez-Isla und Mitarbeitern (2003) beschriebenen α -Syn-Mausmodellen zeigte nur die höchst-exprimierende Linie (PrP_A30P: TG5093) ein motorisches Defizit, jedoch nur im bidirektionalen (und nicht im accelerated) Rotarod; durch fehlende Abbildungen kann eine einhergehende Verbesserung in der Leistung der Kontrollmäuse nicht ausgeschlossen werden. Obgleich die Mäuse im Alter zwischen 8-16 Monaten nach Aufzeigen eines motorischen Phänotyps so schwer erkrankten, dass sie sich nicht mehr Ernähren konnten, wurde keine Schädigung des nigrostriatalen Systems festgestellt. Giasson und Mitarbeiter (2002) beschrieben nur die nicht-signifikanten Rotarod-Daten von

Mäusen jünger als 8 Monate, wobei die Mäuse länger als 300 sek auf dem Rotarod verweilten. Eine nähere Beschreibung der Werte an sich und über die Zeit wurde nicht gemacht. Die von Lee und Mitarbeitern (2002) publizierten PrP_Hu α Syn(A53T)Mäuse zeigten trotz einer maximalen Lebenszeit von ca. 12 Monaten keine Progression bis zur 53. Woche und lediglich im letzten Wert eine (wahrscheinliche) Signifikanz, die aber nicht als solches beschrieben wurde. In keinem der publizierten Modelle wurde gleichzeitig auf Gewichtsunterschiede eingegangen, obgleich anzunehmen ist, dass das Gewicht mit der motorischen Leistung auf dem Rotarod korreliert (Hockly *et al.*, 2002; Holmes *et al.*, 2002; Filliat *et al.*, 2006). CaM_syn Mäuse zeigten während der Messung ohne Dox-Behandlung und mit Dox-Behandlung, eine leichte Zunahme, ohne signifikanten Unterschied zu entsprechenden Kontrollmäusen. Dagegen zeigte von Geburt an mit Dox-behandelten Mäusen (sowohl CaM_syn als auch Kontrollen) eine stärkere Gewichtszunahme. Die Analyse einzelner Mäuse ergab, dass eine stark negative Korrelation zwischen der Geschwindigkeit der Gewichtszunahme und der Abnahme der motorischen Leistung auf dem Accelerod besteht (Abb. 28), was jedoch knapp die Signifikanzgrenze verfehlte (CaM_syn: $p = 0,054$, $n = 12$; Kontrollen: $p = 0,065$, $n = 20$). Von Geburt an Dox-behandelte CaM_syn Mäuse waren im Alter von 16 Wochen bereits signifikant schwerer als unbehandelte CaM_syn Mäuse. Es konnte aber keine Korrelation zwischen Anfangsgewicht und Gewichtszunahme festgestellt werden.

Durch Abschalten der α -Syn Expression in symptomatischen Mäusen konnte durch den resultierenden Progressions-Stopp gezeigt werden, dass primär das transgene α -Syn die motorische Verschlechterung angetrieben hat und dass die Progression des Phänotyps auf der kontinuierlichen Expression des Transgens beruht. Der kalkulierte mittlere Abfall von -4,2 sek in Gene-off-CaM_syn Mäusen war dem der Kontrollen (-3,3 sek) ähnlich (Progressions-Stopp), jedoch glich sich die motorische Leistung nicht der der Kontrollen an. Ein Grund hierfür könnte die beobachtete Neurodegeneration ohne kompensatorischen Ausgleich (wie bspw. Neurogenese; s.o.) sein, die eine Reversibilität verhinderte.

Im Vergleich hierzu zeigten andere konditionale Mausmodelle im Bezug zum Phänotyp in symptomatischen Mäusen eine komplette Reversibilität oder ähnlich nur eine Reduktion des Phänotyps: Nach einer 16 wöchiger Dox-Gabe zeigten HD94-Mäuse (MH-Mausmodell) trotz vorhergegangener Aggregatbildung, striataler Atrophie und Reduktion postsynaptischer D1-Rezeptoren, eine Reversibilität der Claspings-Symptomatik und Pathologie (Yamamoto *et al.*, 2000). Dahingegen zeigten tTA/APP-Mäuse (MA-Mausmodell) nur eine Reduktion, keine Reversibilität, APP-positiver Aggregate aber eine Reversibilität des Phänotyps (Hyperaktivität) in 4-5 Monate alten Mäusen. In SCA1[82Q] Mäusen wurde zeitabhängig eine volle Reversibilität in ca. 8 Wochen alten Mäusen festgestellt, eine nicht-signifikante Verbesserung in 24 Wochen alten Mäusen und nahezu keine Verbesserung mehr in 44-Wochen-alten Mäusen (Zu *et al.*, 2004). Im

Einklang kam es zu einer zeitlich-bedingten Verbesserung der Purkinje-Zell-Restauration, wohingegen der Abbau (Clearance) von Aggregaten in allen getesteten Altersklassen nach Dox-Behandlung gleich schnell verlief.

4.3 Neuropathologie, begleitender Phänotyp und Reversibilität in PrP_{syn30} Mäusen

4.3.1 Neuropathologie und Einfluss auf extraolfaktorische Hirnbereiche

Wie auch für die Nigra in CaM_{syn}-Mäusen beobachtet, wurde humanes α -Syn in PrP_{syn30} Mäusen ebenso mislokalisiert im Soma dopaminerger Neurone des Riechhirns detektiert. Die Überexpression in dopaminergen Zellen könnte Auslöser für die Dysfunktion der DA-Synthese und Metabolismus sein, den die HPLC-Messung der Neurotransmitter DA, DOPAC und HVA aufzeigte. Neurochemisch ist diese Veränderung der von IPS-Patienten ähnlich, in welchen eine Reduktion von DA und Metaboliten, zumindest für die Regionen der Substantia nigra und das Putamen beschrieben, festgestellt wurde (Birkmayer und Riederer; 1975; Riederer und Youdim, 1986). In PrP_{syn30} Mäusen konnte jedoch in diesen Hirnregionen keine Expression des Transgens festgestellt werden. Ungeachtet dessen zeigte sich eine Hochregulierung des Serotoningehaltes im Striatum und eine Hochregulierung von DA und Serotonin im Mittelhirnbereich von PrP_{syn30} Mäusen. Eine differentielle Regulation von Neurotransmittern kann verschiedenen Einflussfaktoren unterliegen, darunter bspw. Metallen (Lafuente *et al.*, 2005), Drogen (Rivest und Marsden, 1992; Kish *et al.*, 2001) und α -Syn selbst, wie es modellhaft durch die Überexpression bzw. Knockout (KO) in Mäusen gezeigt werden konnte (Abeliovich *et al.*, 2000; Chandra *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004; Yavich *et al.*, 2004; Unger *et al.*, 2006). Da darüber hinaus bekannt ist, dass Serotonin die DA-Freisetzung positiv beeinflussen kann (Gudelsky und Nash, 1996), kann es sich im Falle des beobachteten erhöhten striatalen und nigralen Neurotransmitter-Gehaltes um einen kompensatorischen Effekt handeln, der jedoch als solches in Patienten mit IPS noch nicht beschrieben wurde. Eine temporäre striatale Hochregulation von DA und Metaboliten wurde in den ersten beiden Wochen in einem (Paraquat-) Neurotoxin-Rattenmodell für das präklinische IPS beobachtet (Ossowska *et al.*, 2005) was die These eines kompensatorischen Effektes im frühen Erkrankungsstadium unterstützt würde. Jedoch gibt es keine Hinweise auf einen kompensatorischen Effekt über die betroffenen Hirnregionen hinaus. Durch Abschalten der [A30P] α -Syn-Expression mittels Dox-Gabe wurde gezeigt, dass humanes [A30P] α -Syn primär die Neurotransmitter-Konzentration im Riechhirn beeinflusste, da PrP_{syn30}-Mäuse nun einen den Kontrolltieren vergleichbaren Wert zeigten, und dies sowohl für DA als auch dessen Metaboliten. Nach Antibiotika-Behandlung wurden ebenso keine differentielle Regulationen mehr in den extraolfaktorischen Bereichen des Striatums und des

Mittelhirns beobachtet. Im Bezug zur HVA-Konzentration im Mittelhirn nach Dox-Behandlung kann keine Aussage getroffen werden, da technische Probleme die Analyse nicht zuließen.

Es liegt daher nahe, dass die von α -Syn induzierte Neuropathologie des Riechhirns Auswirkungen auf sekundäre Hirnbereiche hat, obgleich es keine Beschreibung einer direkten Verbindung zwischen dem Riechhirn und dem nigrostriatalen System gibt. Neue Studien mit Ratten zeigten jedoch, dass die intranasale Gabe von geringen Mengen an MPTP den Gehalt von DA und Metaboliten im Striatum reduziert. Auch zeigten diese Ratten zusätzlich kognitive und motorische Beeinträchtigungen, die eine Beteiligung des Hippokampus und der Basalganglien nahe legten (Prediger *et al.*, 2006). In einer Folgestudie konnten zudem Veränderungen insbesondere im Bereich des Bulbus olfactorius und des Striatums betreffend des oxidativen Stresses beobachtet werden (Franco *et al.*, 2007). Dies lässt vermuten, dass eine dem Riechhirn zugrunde liegende Neuropathologie sich durchaus auf weitere Hirnbereiche ausdehnen kann, die Wege hierfür müssen jedoch noch aufgezeigt werden.

In Patienten mit IPS konnte in Gehirnmitochondrien eine erhöhte oxidative Schädigung des Komplex-I der mitochondrialen Elektronentransportkette festgestellt werden (Keeney *et al.*, 2006). Da mitochondriale Komplex-I-Schädigung auch in weiteren Geweben und Zelltypen, wie bspw. Muskel (Shoffner *et al.*, 1991), Lymphozyten (Yoshino *et al.*, 1992; Shinde, 2006) und Fibroblasten (Mytilineou *et al.*, 1994) in Patienten mit IPS nachgewiesen werden konnte, legt eine Schlüsselrolle der mitochondrialen Dysfunktion in der Pathogenese des Morbus Parkinson nahe. Für die Messung in PrP_{syn30} Mäusen wurde das Gehirn in Bulbus und Resthirn unterteilt. Die Gewebemengen einzelner Bulbi (ca. $20,4 \pm 0,5$ mg) reichten jedoch für die Funktionsanalyse nicht aus, so dass eine Homogenisierung durchgeführt werden musste. Der Homogenisierungsprozess führte dazu, dass der Homogenisierungspuffer etwa 30fach geringere Ca^{2+} -Bindungskapazität aufwies als für die Standard-Mitochondrien-Isolation. Hinzu kommt, dass beim Homogenisierungsprozess ebenso das ER als weiterer Ca^{2+} -Speicher aufgeschlossen wurde und so zum internen Ca^{2+} -Gehalte Mitochondrien beitrug. Deswegen ist es möglich, dass bei der angewendeten Ca^{2+} -Titration keine Signifikanzen aufgezeigt wurden.

Dahingegen zeigten (die nicht-homogenisierten) Resthirnmitochondrien von PrP_{syn30} Mäusen sowohl eine Verminderung in der Respirationsrate als auch eine frühere Inhibierung der Respiration durch Ca^{2+} -Titration im Vergleich zu Dox-behandelten PrP_{syn30} Mäusen und Kontrollmäusen. Im Gegensatz zu anderen Publikationen, in welchen ein Komplex-I-Aktivitäts-Verlust nachgewiesen werden konnte (Schapira *et al.*, 1990; Swerdlow *et al.*, 1996), zeigten PrP_{syn30} eine intakte Komplex-I-Aktivität. Jedoch konnte in PrP_{syn30} Mäuse eine gesteigerte Vulnerabilität gegenüber Ca^{2+} -Stress beobachtet werden, wie es bspw. für Muskelmitochondrien von R6/2 als Modell des MH nachgewiesen werden konnte (Gizatullina *et al.*, 2006). In Einklang hierzu stehen auch die Ergebnisse von Hirnmitochondrien eines Rotenon-Neurotoxin-Modells für das IPS (Panov *et al.*, 2005). Die Autoren zeigten, dass diese Hirnmitochondrien eine verminderte

Fähigkeit der Stabilisierung des Membranpotenzials aufwiesen und sich bereits bei einer relativ geringen Ca^{2+} -Konzentration die mitochondrialen Permeabilitäts-Transition (mit nachfolgender Apoptose bzw. Nekrose) vollzog. Deshalb könnten in PrP_syn30 Mäusen gesteigerte Ca^{2+} -Konzentrationen, bspw. ausgelöst durch ER-Stress (wie beschrieben für kortikale Neurone der Prionen-Erkrankung und des MA: Ferreira *et al.*, 2006) zur Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion und nachfolgend zum Zelltod führen.

Die Langzeit-Dox-Behandlung (60 Wochen) führte in PrP_syn30 Mäusen zu einer Restauration der mitochondrialen Dysfunktion im Hinblick auf eine gesteigerte Atmungsrate und einer mitochondrialen Permeabilitäts-Transition bei höherem Ca^{2+} -Spiegel, die den Werten der Kontrollen ähnlich war. Daher kann man Rückschluss ziehen, dass humanes [A30P] α -Syn Einfluss auf die mitochondriale Dysfunktion (in extraolfaktorischen Bereichen) ausübt. Diese Annahme wird durch die Beobachtung, dass α -Syn-KO-Mäuse gegenüber der MPTP-Neurotoxizität resistent sind (Dauer *et al.*, 2002; Klivenyi *et al.*, 2006), unterstützt. Das „Poolen“ des Bulbusmaterials mehrerer PrP_syn30 Mäuse und die Messungen weiterer CaM_syn Mäuse sollte Aufschluss geben, ob die mitochondriale Dysfunktion ebenso das Riechhirn betrifft und diese von der Mutation des Transgens abhängig ist.

4.3.2 Phänotyp in konditionalen PrP_syn30 Mäusen

PrP_syn30-Mäuse zeigten eine Limitation der Expression des humanen α -Syn auf das Riechhirn. Um einen phänotypischen Unterschied zu Kontrollmäusen nachweisen zu können, wurden die Mäuse auf den Geruchssinn basierende TMT-induzierte Angstverhalten hin untersucht. Zu diesem Angstverhalten tragen neben einer funktionellen Transmission im Riechhirn sekundäre Hirnbereiche, wie die Amygdala, der Nucleus accumbens und die Region des BNST („bed nucleus of stria terminalis“), entsprechend somit die Schaltstelle zwischen Lokomotion und Emotion, bei (Abb. 28, nach Fendt *et al.*, 2005).

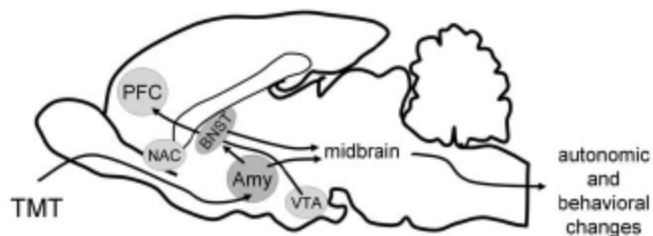


Abb. 28 Hypothetischer neuronaler Pfad des TMT-induzierten Angstverhaltens (aus Fendt *et al.*, 2005)

Abkürzungen: Amy, Amygdala; BNST, Bed nucleus der Stria terminalis; NAC, Nucleus accumbens; PFC, Präfrontalkortex; VTA, ventrales tegmentales Areal

Die Verhaltensanalyse von PrP_syn30 Mäusen zeigte auf, dass diese keine erhöhte Immobilität (Abb. 16A) aber eine erhöhte lokomotorische Aktivität (Abb. 16B), und in beiden Fällen unabhängig von TMT aufwiesen. Dies legt ein gestörtes Angstverhalten nahe. Eine Erhöhung des lokomotorischen Explorationsverhaltens ist typisch für Mäusen mit Bulbektomie (Züger *et al.*, 2004) und wurde von verschiedenen Autoren als Antwort auf ein fehlendes oder verzögertes

Habituationsverhalten auf eine neue Umgebung, im Zusammenhang mit einer gesteigerten Stress- oder Angst- bezogenen Grundstimmung der Mäuse, interpretiert (Leonard und Tuite, 1981; McNish und Davis, 1997; Zueger *et al.*, 2005). Die erhöhte lokomotorische Aktivität führte ebenso zu einem tendenziell gesteigerten Aufenthalt in der Arenamitte. Obgleich die Mäuse keine Erhöhung der Immobilität in Anwesenheit von TMT zeigten, konnte eine signifikante Vermeidung der TMT-Ecke beobachtet werden. Die bisherige Analyse der TMT-induzierten Reaktion ist auf das sog. „Freezing“ beschränkt, und der Hirnregion (mediale Amygdala), die für diese Reaktion maßgeblich verantwortlich ist (Muller und Fendt, 2006; Wallace und Rosen., 2001). Es gibt bisher noch keine Publikationen, ob Nager bspw. nach Bulbektomie die TMT-Lokalisation tatsächlich meiden, und der TMT-Geruch beispielsweise nicht auch die Augen der Mäuse reizt. Deshalb schließt eine signifikante Vermeidung der Filterecke eine Störung der olfaktorischen Transmission in PrP_{syn30} Mäusen nicht aus. Das Abschalten der Expression in symptomatischen Mäusen führte nicht zu einer Reversibilität des inhibierten TMT-induzierten Angstverhaltens, was eine irreversible Schädigung eines oder mehrerer beteiligter Kerngebiete nahe legt. Diese These muss jedoch noch immunhistologisch bestätigt werden. Dagegen zeigte die HPLC-Analyse von Tieren, die im selben Alter (ca. 58 Wochen) für die gleiche Zeitspanne (21 Wochen) mit Dox behandelt wurden, eine Reversibilität der DA-Synthese und des DA-Metabolismus. Ein wahrscheinlicher Grund für die fehlende Reversibilität des TMT-induzierten Angstverhaltens ist, dass dieses Verhalten auf einem komplexen Zusammenspiel mehrerer Hirnregionen beruht und die Messung des dopaminergen Systems alleine keinen Aufschluss über andere (und sehr wahrscheinlich irreversibel geschädigte) Hirnregionen gibt, die an der Reaktion beteiligt sind. Entsprechend könnten kompensatorische Effekte, wie bspw. eine gesteigerte Neurogenese-Rate, wie sie durch Abschalten des Transgens in CaM_{syn}-Mäuse beobachtet wurde, die dopaminergen Neurone des Bulbus olfactorius ersetzen, nicht aber bspw. die Neurone der medialen Amygdala. Der hierfür erforderliche immunhistologische Nachweis muss jedoch noch erfolgen.

Um ausschließen zu können, dass die fehlende Angstreaktion α -Syn-unspezifisch ist, wurde der Test mit Mäusen wiederholt, bei welchen das humane α -Syn von Geburt an abgeschaltet wurde. Diese Mäuse zeigten im Alter von 58 Wochen keinerlei Unterschiede im Verhalten zu gleichbehandelten Kontrollmäusen und die erwartete Immobilisierung in Anwesenheit von TMT. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen und PrP_{syn30} Mäusen zeigten die behandelten Mäuse eine höhere Grundimmobilität und geringere lokomotorische Aktivität. Ähnlich zeigten die Accelerod-Ergebnisse von Langzeit-behandelten CaM_{syn} Mäusen und Kontrollen einen negativen Effekt des Antibiotikas auf die Aktivität der Tiere. Dies legt nahe, dass die Langzeit-Dox-Gabe negativ mit der Grund-Aktivität der Tiere korreliert und dieses entsprechend bei Testungen berücksichtigt werden sollte.

In der SHIRPA-Analyse wurde in PrP_{syn30} Mäusen eine Gewichtserhöhung festgestellt werden, die aber für eine 2. Gruppe von Mäuse des gleichen Alters nicht mehr bestätigt werden konnte. In

Tiermodellen mit Bulbektomie dagegen konnte zwar eine erhöhte Futterraufnahme jedoch bei gleichzeitiger Gewichtsreduktion festgestellt werden (Primeaux *et al.*, 2007). Daher liegt es nahe, dass die von [A30P] α -Syn-induzierte Pathologie im Riechhirn von PrP_syn30 Mäusen nicht den gleichen Schweregrad wie der einer Bulbektomie aufweist.

4.4 Analyse der PrP_syn, CaM_syn30, PrP_syn1 und CaM_syn1 dtg Mäuse

In PrP_syn Mäusen könnte im Vergleich zu CaM_syn Mäusen eine in Relation zu angrenzenden Hirnbereichen stärkere Expression des Transgens in dopaminergen Zellen des Bulbus und der Substantia nigra vorliegen (s. Abb. 6A, 6L), die jedoch erst durch Kolokalisationsfärbungen gezeigt werden muss. Da bisher keine α -Syn-positiven Läsionen im Kleinhirn von Parkinson-Patienten beschrieben wurden, ist die beobachtete zusätzliche α -Syn-Expression im Kleinhirn transgener Mäuse evtl. für die Modellierung eines IPS hinderlich. Jedoch wurde in kürzlichen Studien eine Beteiligung des Kleinhirns in der Kompensierung der hypoaktiven Striatums gezeigt (Yu *et al.*, 2007). Obgleich im Kleinhirn eine starke Expression des Transgens vorlag, konnte in Relation zu CaM_syn Mäusen keine vergleichbare Hinderung in der Aneignung neuer motorischer Strategien („motor skill learning“) festgestellt werden, was eine intakte Kortiko-cerebelläre Neuronenschleife vermuten lässt. In wiederholten Messungen zeigten nur männliche PrP_syn Mäuse eine Minderung in der motorischen Leistung. Dies könnte im Zusammenhang mit der für den C57BL/6-Hintergrund beschriebenen gesteigerten Ängstlichkeit männlicher Mäuse im Vergleich zu weiblichen Mäusen stehen (Voikar *et al.*, 2001), die als zusätzlicher Stressor wirken könnte. Die konstante Gewichtszunahme der PrP_syn-Mäuse erschwerte die Interpretation, da davon auszugehen ist, dass ein hohes Gewicht negativ mit der motorischen Leistung auf dem Accelerod korreliert. Durch Abschalten des Transgens von Geburt an wurde die Leistung sowohl in der Kontroll- als auch in der PrP_syn-Gruppe nicht verbessert, was die Annahme bestätigt, dass die Langzeit-Dox-Gabe einen vom Transgen unabhängigen negativen Effekt auf die Accelerod-Leistung ausübt. Im Weiteren wird diese Annahme auch durch die HPLC-Analyse des Neurotransmittergehaltes unterstützt, die nur in Dox-behandelten alten PrP_syn Mäusen signifikante Minderungen in der Synthese und Metabolismus des Serotonins aufzeigte. Unabhängig hiervon wurde in alten PrP_syn-Mäusen eine signifikante Hochregulation des Serotonin-Gehaltes im Bereich des Mittelhirns beobachtet. Regulationen des serotonergen Systems konnten ebenfalls von Neumann *et al.* (2002) in (Thy1)-h[A30P] α S transgenen Mäusen beobachtet werden und im frontalen Kortex lagen die Werte über den Serotonin-Werten der Kontrollmäuse. Dies könnte ein Hinweis auf eine kompensatorische Rolle des serotonergen Systems in Bezug auf die von humanen α -Syn induzierte Pathologie im Maushirn sein. Ebenso wurde in CaM_syn30 Mäusen ein erhöhter Serotonin-Gehalt, jedoch im Riechhirn, beobachtet. Gleichzeitig lag im Riechhirn eine signifikante Reduktion von DOPAC vor, was ein

Defizit des DA-Metabolismus nahe legt. Da aber keine Regulation im HVA-Spiegel vorlag, sollten die HPLC-Ergebnisse mit weiteren Mäusen validiert werden. Die signifikante Reduktion des Serotonin-Metabolits 5'-HIAA im Striatum von CaM_syn30 Mäusen, lässt ebenfalls vermuten, dass die von α -Syn induzierten Veränderungen im Riechhirn Sekundär-Effekte auf andere Hirnregionen ausübte. Jedoch wurde weder im TMT-induzierten Riechtest noch in der SHIRPA-Analyse ein Unterschied im Phänotyp im Vergleich zu Kontrolltieren festgestellt. Hier sollte in Folgeanalysen durch die Verwendung weiterer Mäuse gezeigt werden, inwiefern sich die Expression des mutierten α -Syn zwischen PrP_syn30 und CaM_syn30 Mäusen unterscheidet.

Obleich in CaM_syn1 Mäusen ebenso eine starke Expression des Wildtyp- α -Syn im Riechhirn festgestellt wurde, zeigte die Linie in dieser Region keine Regulation im Neurotransmittergehalt. Im Striatum konnte eine signifikante Hochregulation des DA-Metabolits HVA (nicht jedoch von DOPAC) und des Serotonin-Metabolits 5-HIAA, wobei letzterer selbst nach Antibiotika-Behandlung von Geburt an nicht das Niveau der Kontrollen erreichte. Daher kann man hier von einem von α -Syn-unabhängigen Effekt ausgehen. CaM_syn1 Mäuse könnten sich im Hinblick auf ihre Expressionsstärke und ihr Expressionsmuster eventuell als WT- α -Synuclein-Kontrollen zu CaM_syn30 eignen und aufzeigen, inwiefern die Mutation des Transgens die Pathologie im Riechhirn beeinflusst.

Gleiches gilt für PrP_syn1 Mäuse im Bezug zu PrP_syn30 Mäusen. Da PrP_syn30 Mäuse im Vergleich zu CaM_syn30 Mäusen einen klaren Phänotyp und neben Neurotransmitterregulation auch mitochondriale Defizite zeigten, wäre ein Vergleich mit PrP_syn1 Mäusen dem von CaM_syn30 zu CaM_syn1 - Mäusen vorzuziehen.

4.5 Microarray-Analyse

Die Daten aus der Microarray-Analyse gaben einen ersten Hinweis auf die durch die Expression des humanen α -Syn induzierten Veränderungen der Transkription adulter Mäuse. In CaM_syn Mäusen könnte die Hochregulation der Transkripte von Hitzeschock-Genen wie *Hsp 70* und *Hsp 72* ein Hinweis auf eine kompensatorische Antwort sein, wie sie bspw. für *Hsp70* in einem anderen Tiermodell mit Adenoviren-assoziiierter Überexpression des humanen α -Syn-Gens beobachtet wurde (St Martin *et al.*, 2007). Ebenso legten die Transkriptregulationen eine Assoziation mit ER-Stress nahe, insbesondere die Hochregulation des $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ -Austauschers *Ncx1* könnte ein Hinweis auf eine gestörte Ca^{2+} -Homöostase sein, die dann oxidativen Stress und anschließenden Zelltod zur Folge haben könnte. Von Diaz-Horta *et al.* (2002) konnte gezeigt werden, dass die Überexpression *Ncx1.7*, einem Isoform von *Ncx1*, zur Verminderung der Zellproliferation, zur Ca^{2+} -Entleerung des endoplasmatischen Retikulums und Aktivierung der Caspase-12 mit anschließender Apoptose-Induktion führt. Die gleichzeitige Herabregulierung von *APOD*, das im Zusammenhang mit glärer Neuroprotektion in nigralen Zellen von Parkinson-

Patienten beschrieben wurde (Ordonez *et al.*, 2006), könnte ebenso eine Voraussetzung für die Pathologie-Entwicklung in CaM_syn Mäusen sein. In CaM_syn30 Mäusen wurde hingegen APOD hochreguliert. Dies würde im Hinblick darauf passen, dass eine auf den Bulbus limitierte Expression eher zu Symptomen führt die dem frühen-IPS entsprechen, wie es bspw. die biochemischen Daten der PrP_syn30 Mäuse nahe legen.

Von Interesse könnte ebenso die Expressionsregulation von SULT1A1 sein. SULT1A1 ist sowohl in den Östrogen-Metabolismus als auch der Biotransformation von 6-OH-Melatonin verwickelt, die im Hinblick auf das IPS als neuroprotektiv gelten (Spink *et al.*, 2000; Srinivasan *et al.*, 2005). Ebenso wird es im Gastrointestinaltrakt exprimiert, der ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese des IPS spielen könnte (Miwa *et al.*, 2006).

Die Transkriptionsregulation von CAP1, CLASP2 und MARK2 legen im Weiteren eine differentielle Regulation des intrazellulären Transports nahe (s. Tabelle 13). Die Hochregulation des CEBPD (CCAAT/enhancer binding protein, subunit δ)-Transkriptes gewinnt an Bedeutung durch die von Bonin und Mitarbeitern (2004) durchgeführte Microarray-Analyse von gad-Mäusen, die ein KO-Modell für PARK5 darstellen. In diesen Mäusen wurde sowohl die δ -Untereinheit als auch die α - und β -UE hochreguliert vorgefunden und es konnte eine zentrale Rolle des CEBP im Hinblick auf das UPS ausgearbeitet werden. Ebenso wurde im 6-OHDA-Modell eine Hochregulierung des CEBP- β UE nachgewiesen (Holtz *et al.*, 2005). Inwiefern das UPS in CaM_syn30-Mäusen betroffen ist, ist unklar.

Finden sich in der Validierung die beschriebenen Regulationen ebenfalls auf Protein-Ebene, so könnte durch Abschalten des Transgens überprüft werden, ob diese primär durch α -Syn induziert wurden und ob die Regulationen reversibel sind.

4.6 Ausblick

Die WBA und die IHC-Analyse zeigten, dass die Dox-Behandlung von adulten CaM_syn Mäusen nicht zur erwarteten Minderung des Transgens auf Proteinebene führte, wobei eine zu geringe Dosis bzw. eine zu kurze Behandlungsdauer unwahrscheinlich ist. Folglich könnte sich transgenes α -Syn zu Akkumulaten mit verlängerter Halbwertszeit formiert haben. In einer weiterführenden Studie könnte daher überprüft werden, ob die 4wöchige Gabe von Dox zu 3 verschiedenen Zeitpunkten (bspw. ab dem 1., 3., und 6. Lebensmonat) positiv mit der Signalstärke der WBA korreliert und so diese Vermutung untermauern. Gleichzeitig könnte mit dieser Studie gezeigt werden, wann für eine Reversibilitätsstudie spätestens eine Dox-Behandlung erfolgen sollte. Würde man die WBA basierend auf der Methode der sequentiellen Extraktion durchführen, könnte man gleichzeitig überprüfen, ob transgenes α -Syn mit zunehmendem Alter der Mäuse einem Shift in die schwerlösliche Fraktion unterliegt, wie dies bspw. für die α -Syn-tg Mäuse von Kahle *et al.* (2001) und Tofaris *et al.* (2006) beschrieben wurde.

Die in der EM aufgezeigte Pathologie der Axone legt eine Auszählung TH-positiver Nervenendigungen im Striatum nahe, wie dies bspw. anhand einer Synaptophysin-TH-Doppelt-Fluoreszenzfärbung in den α -Syn-tg Mäusen von Masliah *et al.* (2000) vorgenommen wurde. Ebenso könnten parallel dopaminerge Zellen in den Regionen des Bulbus olfactorius und der Substantia nigra gezählt werden; im Riechhirn um zu zeigen, dass die DA-Reduktion auf Zelltod beruht, und in der Substantia nigra, dass die beobachtete Dark-cell-Degeneration in alten CaM_syn Mäusen signifikant zu Kontrollmäusen ist. Bei signifikanten Ergebnissen sollte anschließend gezeigt werden, ob die rechtzeitige Gabe von Dox (s.o.) den Zelltod verhindert. Da die in der EM beobachtete Dark-cell-Degeneration nicht auf apoptotischen Mechanismen basiert, könnte in CaM_syn Mäusen auf TUNEL-Färbungen verzichtet werden. Gleichzeitig sollte anhand humaner PD-Gewebeproben überprüft werden, ob die Dark-cell-Degeneration, obgleich noch nicht als solches für das humane IPS beschrieben (aber bspw. von Galvin *et al.* (1999) gezeigt), ein allgemeines Charakteristikum der PD-Erkrankung darstellt.

Die ersten Daten der Mikroarray-Analyse lassen durch die Regulationen der Transkription von Hitzeschockproteinen und $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ -Austauschers Ncx1 eine Beteiligung des UPS und des ER-Stress in der Pathogenese der α -Syn-induzierten Pathologien vermuten. Die Messung der Proteasomen-Aktivität in verschiedenen Hirnregionen parallel mit der Analyse, ob und in welcher Konzentration Mono- und Polyubiquitin in der löslichen oder unlöslichen Fraktion vorzufinden sind, wie bspw. von Chen *et al.* (2006) publiziert, sollte hierüber Aufschluss geben. Gleichzeitig könnte mittels EM und Respirationsmessungen überprüft werden, ob eine mitochondriale Schädigung bzw. eine erhöhte mitochondriale Sensitivität gegenüber Ca^{2+} vorliegt.

Da die Langzeit-Dox-Behandlung die lokomotorische Aktivität der Kontrollmäuse zu beeinträchtigen scheint, wären Folgeanalysen zur Senkung der Dosis bzw. der tatsächlich notwendigen Behandlungsdauer nützlich. Gegebenenfalls sollte analysiert werden, ob gerade bei Langzeitbehandlung auf ein anderes Tetrazyklin-Derivat zurückgegriffen werden könnte, bzw. über die Verabreichung mittels Doxyzyklin-versetzten-Futterpellets eine gleichmäßigere Aufnahme erfolgt.

Da sich mit Hilfe der PET-Analyse pathologische Veränderungen *in-vivo* nachweisen lassen, könnte eine weiterführende Studie unter Verwendung verschiedener Radiopharmaka aufzeigen, welches die höchste Sensitivität gegenüber striatalen Veränderungen aufzeigt. Durch die Arbeiten von Honer *et al.* (2006) ist bekannt, dass in Mäusen der Nachweis der Aktivität des DAT mittels [^{18}F]FECNT gegenüber [^{18}F]FDOPA und [^{18}F]FMT für den Nachweis der Integrität dopaminerger präsynaptischer Terminale vorzuziehen ist. Daher würde es nahe liegen, die PET-Studie mit verschiedenen Radiopharmaka durchzuführen, die die Aktivität des DAT messen, wie bspw. [^{18}F]FECNT, [^{11}C]d-threo-Methylphenidate und [^{11}C]CFT und entsprechend der Poweranalyse, mit wenigstens 15 Tiere pro Gruppe, unabhängig vom Geschlecht und einem Mindestalter von 12 Monaten. Da Honer *et al.* (2006) signifikante Unterschiede zwischen MPTP-behandelten Mäusen

und Kontrolltieren innerhalb der ersten 30 min des 60minütigen Scans zeigte, wäre eine Überlegung als radioaktives Isotop Fluor, mit einer Halbwertszeit von 110 min, dem von Kohlenstoff, mit einer Halbwertszeit von 20 min, vorzuziehen.

In PrP_{syn30} Mäusen legte die phänotypische Analyse nahe, dass die hohe Expression von transgenen α -Syn im Riechhirn die Neurotransmission beeinträchtigt, wodurch sekundär-pathogene Effekte in anderen Hirnregionen entstanden. Die erhöhte lokomotorische Aktivität könnte auf ein hyperaktives Explorationsverhalten hinweisen, wie es typischerweise in Depressions-Mausmodellen mit Bulbektomie beschrieben wurde (Kelly *et al.*, 1997; Züger *et al.*, 2004; Palucha *et al.*, 2005). Mittels weiterer phänotypischer Analysen, bspw. im Hinblick auf konditionierte Furcht (nach Freichel *et al.*, 2006) könnte die Beteiligung der Amygdala validiert und mittels „Porsolt swim test“ (Porsolt *et al.*, 1977) der Nachweis des Vorliegens einer Depression in PrP_{syn30} Mäusen erfolgen.

Die Auszählung dopaminerger Neurone der Glomulärschicht des Bulbus olfactorius sollte aufzeigen, ob die in der HPLC beobachtete Reduktion der DA-Synthese und des DA-Metabolismus einer Neurodegeneration zu Grunde liegt. Ebenso sollte mittels EM, Dot-Blot und sequentieller Proteinextraktion überprüft werden, ob α -Syn-positive Aggregate vorzufinden sind. Die Analyse sollte neben dem Riechhirn auch das Rückenmark einschließen, da eine Pathologie dieser Region nach der neuropathologischen Stadien-Einteilung nach Braak (Braak *et al.*, 2003) das Stadium I des IPS komplettieren würde.

Ein Augenmerk in der Validierung der Mikroarray-Analyse wären insbesondere die Gene CEBPD, welches eine zentrale Rolle in der Pathogenese des IPS spielen könnte (Bonin *et al.*, 2004; Holtz *et al.*, 2005) und CYP1B1, welches intrazellulär sowohl in der mikrosomatischen Fraktion des ER als auch mitochondrial lokalisiert ist. Da das ER und die Mitochondrien die wichtigsten intrazellulären Ca^{2+} -Speicher der Zelle sind, könnte die Regulation des Gens ein wichtiger Anhaltspunkt für die beobachtete erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität der Resthirnmitochondrien sein. Die Funktionsanalyse speziell der Bulbusmitochondrien sollte noch, nach Etablierung einer geeigneten Isolationsmethode, erfolgen.

5a Zusammenfassung

Durch den Anstieg der Lebenserwartung und damit der Inzidenz des idiopathischen Parkinson-Syndroms (IPS) in den modernen Industrieländern rückt die Suche nach den Faktoren, die maßgeblich zur Entstehung der Pathogenese beitragen, an zentrale Stelle der Forschung neurodegenerativer Erkrankungen. Es ist evident, dass ca. 5% der Fälle mit IPS eine genetische Ursache haben. Dadurch bietet sich die Möglichkeit anhand transgener Modelle *in-vitro* und *in-vivo* die biomolekularen Prozesse zu analysieren, die der Zelldegeneration, nicht nur bei vererbten sondern auch bei sporadischen Fällen des IPS zu Grunde liegen. Da *in-vitro* Modelle die Komplexität neuronaler Netzwerke nicht modellieren können, gewinnen *in-vivo* Modelle zunehmend an Bedeutung.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Analyse des zytotoxischen Einflusses von α -Synuclein (α -Syn), das sowohl in seiner mutierten Form (A30P, A53T, E46K: PARK1) als auch durch alleinige Überexpression (Duplikation, Triplikation: PARK4) familiären Parkinson verursacht. Zur detaillierten Aufklärung wurde das konditionale Tetrazyklin (Tet)-abhängige Expressionssystem verwendet, welches die Möglichkeit bietet, die Expression des Transgens durch Doxyzyklingabe an- und abzuschalten. Die konditionale Expression des humanen, entweder Wildtyp (syn, syn1) oder mutierten [A30P] α -Syn (syn30), wurde ausgehend von 2 verschiedenen neuronenspezifischen Promotoren, dem Prionen-Protein (PrP)-Promotor bzw. der CaMKII α (CaM)-Promotor induziert. Dabei zeigten nur die Mäuse der Linie CaM_syn und PrP_syn eine durchgehende Expression in den für das IPS relevanten Bereichen des nigrostriatalen Systems, Kortex und des Riechhirns. Durch Anzahl oder spezielle Integration der syn30 und syn1 Konstrukte zeigten dtg Tiere der Linie PrP_syn30, PrP_syn1 und CaM_syn30 eine limitierte Expression auf den Bereich des Riechhirns und im Falle der CaM_syn1 Mäuse eine zusätzliche schwache Expression im Vorder- und Mittelhirnbereich. In PrP_syn30 und in CaM_syn Mäusen konnte eine Kolo-kalisation in dopaminergen Neuronen als Voraussetzung für eine durch α -Syn induzierte Pathologie des dopaminergen Systems nachgewiesen werden.

PrP_syn30 Mäuse zeigten in der weiteren Analyse eine Riechhirn-spezifische Reduktion der Dopamin (DA)-Synthese und des DA-Metabolismus im Zusammenhang mit eventuell-kompensatorischer Neurotransmitterregulationen, insbesondere des serotonergen Systems in sekundären Hirnbereichen. Es konnte mit Hilfe eines TMT-Geruchstestes gezeigt werden, dass PrP_syn30 Mäuse neben einer beeinträchtigten Angst-Induktion eine für Depressionen-typische gesteigerte Lokomotorik im Explorationsverhalten aufwiesen. Das mehrwöchige Abschalten der Expression des humanen [A30P] α -Syn führte in adulten und symptomatischen Mäusen zu einer Expressionsreduktion auf ein basales Niveau und zu einer Reversibilität der Neurotransmitterregulation, jedoch bei unverändertem Phänotyp. Letzterer wurde in gleichaltrigen Mäusen, die unter Dox-Gabe geboren und aufgewachsen waren, nicht mehr beobachtet. Die

momentane Ansicht, dass α -Syn-induzierte Pathologien des Riechhirns keine Auswirkung auf sekundäre Hirnbreie haben, muss daher revidiert werden. Gleichzeitig legen die Ergebnisse nahe, dass eine durch α -Syn induzierte Beeinträchtigung der olfaktorischen Neurotransmission Auslöser einer Depression sein könnte und zeigt darüber hinaus, welches pathogene Potenzial das Riechhirn auch im Hinblick auf den Transport von Umwelttoxinen ins ZNS trägt.

CaM_{syn} Mäuse zeigten eine initiale Beeinträchtigung des Erlernens neuer motorischer Strategien und somit eine Störung in der neuronalen Verschaltung zwischen Kortex, Basalganglien und Kleinhirn. Im weiteren Verlauf manifestierte sich eine progressive Abnahme der motorischen Leistung, welche in symptomatischen Mäusen durch Abschalten des Transgens gestoppt werden konnte. Parallel zeigten EM-Studien im Bereich der Substantia nigra und in der hippocampalen CA3-Region degenerierte Strukturen, Dark-cells und axonale Pathologien. Obgleich in adulten CaM_{syn}-Mäusen humanes α -Syn Dox-resistente Akkumulate bildete, wurde in Dark-cells und benachbarten Zellen keine Lewy-Körperchen (LK)-ähnliche Strukturen nachgewiesen, so dass der Zelluntergang unabhängig von der Ausbildung dieser erfolgte. Ein etablierter Dot-Blot bestätigte das Fehlen α -Syn-positiver Aggregate im Mittelhirn und Kortex von CaM_{syn} Mäusen. Bisher wurde noch kein Dot-Blot zum Nachweis α -Syn-positiver Aggregate im Tiermodell publiziert und die hier gezeigte Methodik sollte insbesondere für den schnellen Nachweis von α -syn-positiven Aggregaten in IPS-Tiermodellen nützlich sein. Das Fehlen von Aggregaten steht im Einklang mit der vorherrschenden Meinung dass nigrale Zellen der Maus im Hinblick auf die Formation fibrillärer LK-ähnlicher Einschlüsse resistent sein könnten, zeigte jedoch im Gegensatz, dass diese Zellen durchaus für den Zelluntergang prädisponiert waren. Die hippocampale Beteiligung machte deutlich, dass extranigrale Strukturen ebenso einer α -Syn-induzierten Pathologie unterliegen. Die Degeneration von CA3-Neuronen war phänotypisch mit einem beeinträchtigten Langzeitgedächtnis und einer moderaten Beeinträchtigung in der Adaptation neuer Suchstrategien assoziiert. Die Degeneration wurde nicht durch eine kompensatorische Erhöhung der Neurogenese-Rate begleitet, sondern diese war gegenteilig in adulten CaM_{syn} Mäusen reversibel reduziert. Dadurch konnte im Hinblick auf andere α -Syn-tg Mausmodelle bestätigt werden, dass humanes α -Syn die Neurogenese-Rate reduziert und darüber hinaus, dass diese Beeinträchtigung eine kontinuierliche Expression des Transgens voraussetzt. Die Degeneration nigraler Zellen zeigte eine moderate aber nicht-signifikante, Reduktion der Aktivität des DA-Transporters nigro-striataler Nervendigungen und des striatalen DA-Gehaltes. Dies lässt vermuten, dass die nigrale Degeneration entweder sehr gering ausfällt oder aber kompensatorische Mechanismen nach sich zieht. Dies zeigt ebenso auf, dass der Einfluss des Transgens nicht allein durch die Evaluierung eines selektierten (nigro-striatalen) Systems erfolgen sollte, sondern ebenso wichtig eine Beurteilung des neuropathologischen Phänotyps ist, der dann den Einfluss des Transgens auf das gesamte neuronale Netzwerk darlegt. CaM_{syn} Mäuse zeigen entsprechend eine zum humanen IPS ähnliche nigrale und extranigrale Pathologie mit progressivem Leistungsabbau, der durch

Abschalten des Transgens gestoppt werden konnte. Daher könnten Therapiestrategien mit α -Syn-Reduktion sowohl in asymptomatischen als auch symptomatischen Patienten vorteilhaft sein.

Die Mikroarray-Analyse legen zusammen mit den ersten Daten der mitochondrialen Funktionsanalyse nahe, dass eine erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität bzw. eine Störung der Ca^{2+} -Homöostase in die durch humanes α -Syn induzierte Zytotoxizität involviert ist.

5b Summary

In industrialized countries the incidence of Parkinson's disease (PD) increases along with increased life expectancy. Thus driving research of the underlying pathophysiological mechanisms of sporadic and inherited PD. Inheritance is thought to account for about 5% of the PD patients. The causative mutations of the identified PD genes offered the opportunity to analyze neuropathological alterations, that might be involved in inherited or sporadic PD, *in-vitro* and *in-vivo* in transgenic models. As *in-vitro* models fail to reflect the whole brain network, *in-vivo* models become more and more important. In my thesis, the cytotoxic influence of human α -synuclein (α -syn) is analyzed. Three point mutations (A30P, A53T, E46K: called PARK1) and duplication and triplication of the normal wildtype gene (called PARK4) α -Syn are known to cause familial PD. In order to get detailed evidence, a conditional tetracycline (tet)-dependent expression system was used, allowing to turn on and off transgene expression by administration of doxycycline. Expression of the human wildtype α -syn (responder lines designated syn and syn1) or mutated α -syn (responder line designated syn30), respectively, was initiated by crossbreeding the responder lines with either a prion-protein promoter line (designated PrP) or a CaMKII α line (designated CaM). However, only CaM_syn and PrP_syn mice showed expression in most of the PD-related brain regions, including the nigro-striatal system, the cortex and the olfactory bulb. Due to copy number or integration site of the responder construct, PrP_syn30, PrP_syn1 and CaM_syn30 mice showed transgenic signals limited to the olfactory bulb or in case of CaM_syn1 mice an additional weak signal in fore- and midbrain areas. In CaM_syn and PrP_syn30 mice human α -Syn was colocalized in dopaminergic neurons as a precondition to analyze the impact of the transgene on the dopaminergic system.

In further experiments PrP_syn30 mice showed reduction of dopamine (DA)-synthesis and DA-metabolism in the olfactory bulb, accompanied by a likely compensatory alteration of neurotransmitter content, especially of serotonin, in secondary brain regions. Since α -syn was expressed in the olfactory bulb a TMT-smell-test was conducted. In this test PrP_syn30 mice revealed an impaired anxiety reaction and an increased exploratory behavior; the latter might be a depressive core symptom. Turning off expression for several weeks ceased transgene signals to basal levels and led to a reversibility of the neurotransmitter regulation but did not change the phenotype. However, a phenotype was not apparent when PrP_syn30 mice were born and raised under treatment of dox. Therefore, the opinion that α -syn induced pathology of the olfactory bulb do not advance in secondary brain regions has to be revised. Additionally these data suggest, that α -syn induced cytotoxicity of the olfactory bulb might cause depression. Further, it emphasizes the pathogenic potential of the olfactory tract, also regarding the transport of toxic agents from the external environment to the nervous system.

In the accelerated rotarod test CaM_{syn} mice initially showed difficulties to learn this locomotor task, suggesting a disruption of the necessitative neuronal circuit, including cortex, cerebellum and basal ganglia. Later on, CaM_{syn} mice showed a progressive motor decline which could be halted in these symptomatic mice by turning off transgene expression. Additionally, in old CaM_{syn} mice cell death was observed in the hippocampus and the substantia nigra, resembling dark-cell degeneration pattern and axonal pathology. Although in adult CaM_{syn} mice α -syn formed dox-resistant deposits, neither dark-cells nor adjacent cells displayed lewy-body-like fibrillary aggregates, favoring the opinion that these structures did not contribute to cytotoxicity. Accordingly, a new developed dot-blot failed to detect α -syn-positive aggregates in the cortex and the midbrain region of aged CaM_{syn} mice. So far a dot-blot for the detection of α -syn-positive aggregates in α -syn-tg animal models has not been published, and the herein shown method should be useful for especially the fast detection of α -syn-positive aggregates in animal models of PD. The lack of midbrain-aggregates is in agreement to the majority opinion that the population of nigral neurons may be protected from the formation of inclusion bodies induced by transgene expression in mice but in disagreement that dopaminergic neurons did not have the same vulnerability as in humans. Also, cell-death observed in the hippocampus indicate, that α -syn induced cytotoxicity is not limited to the nigro-striatal system. Degeneration of hippocampal CA3 neurons was phenotypically associated by impaired long-term memory and a moderate disturbance in the adaption of new search strategies. Degeneration was not accompanied by a compensatory effect as increased neurogenesis, but contrary neurogenesis was negatively affected in adult CaM_{syn} mice; and impaired neurogenesis was reversed by turning off transgene expression. Thus CaM_{syn} mice confirmed significant reduction of newly differentiated neurons, which has also been shown in other α -syn-tg mice. This further suggest that the effect is based on the continuous expression of the human α -syn transgene. Although the activity of the DA transporter was suggested to be reduced as a result from degenerated nigral neurons, striatal nerve terminals only showed a moderate, and therefore non-significant, reduction of the binding potential of the DAT and further only a tendency towards reduced striatal DA. These data indicated that there was either only a very mild degeneration of nigral neurons or a compensatory mechanism occurred. Thus, the data suggest that evaluation of a selective (nigro-striatal) system might be more precarious than assessment of behavioral neuropathological impairment, reflecting transgene influence on the whole brain network. Therefore, CaM_{syn} mice showed similarities with human PD, including late-onset of nigral and extra-nigral pathology and progressive motor decline, which could be stopped in symptomatic mice. Thus, the data suggest, that therapy-strategies targeting α -syn reduction might be of benefit in asymptomatic or symptomatic PD patients. Finally, data of microarray analysis and analysis of the mitochondrial function indicated, that there might be a shift in Ca^{2+} -sensitivity or a disruption of the Ca^{2+} -homeostasis contributing to the α -syn induced cytotoxicity in our conditional α -syn transgenic mice.

6 Literatur

- Abeliovich A., Schmitz Y., Farinas I., Choi-Lundberg D., Ho W.H., Castillo P.E., Shinsky N., Verdugo J.M., Armanini M., Ryan A., Hynes M., Phillips H., Sulzer D., Rosenthal A. (2000). Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25, 239-252.
- Adams R.N., Murrill E., McCreery R., Blank L., Karolczak M. (1972). 6-Hydroxydopamine, a new oxidation mechanism. *Eur. J. Pharmacol.* 17, 287-292
- Alam M., Schmidt W.J. (2002). Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. *Behav. Brain Res.* 136, 317-324.
- Andrew R., Watson D.G., Best S.A., Midgley J.M., Wenlong H., Petty R.K. (1993). The determination of hydroxydopamines and other trace amines in the urine of parkinsonian patients and normal controls. *Neurochem. Res.* 18, 1175-1177.
- Anglade P., Vyas S., Hirsch E.C., Agid Y. (1997). Apoptosis in dopaminergic neurons of the human substantia nigra during normal aging. *Histol Histopathol.* 12, 603-610.
- Antonini A., Moresco R.M., Gobbo C., De Notaris R., Panzacchi A., Barone P., Calzetti S., Negrotti A., Pezzoli G., Fazio F. (2001). The status of dopamine nerve terminals in Parkinson's disease and essential tremor: a PET study with the tracer [11-C]FE-CIT. *Neurol. Sci.* 22, 47-48.
- Arvidsson A., Collin T., Kirik D., Kokaia Z., Lindvall O. (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat. Med.* 8, 963-970.
- Aust S., Jaeger W., Klimpfinger M., Mayer K., Baravalle G., Ekmekcioglu C., Thalhammer T. (2005). Biotransformation of melatonin in human breast cancer cell lines: role of sulfotransferase 1A1. *J. Pineal. Res.* 39, 276-282.
- Bandopadhyay R., Kingsbury A.E., Cookson M.R., Reid A.R., Evans I.M., Hope A.D., Pittman A.M., Lashley T., Canet-Aviles R., Miller D.W., McLendon C., Strand C., Leonard A.J., Abou-Sleiman P.M., Healy D.G., Ariga H., Wood N.W., de Silva R., Revesz T., Hardy J.A., Lees A.J. (2004). The expression of DJ-1 (PARK7) in normal human CNS and idiopathic Parkinson's disease. *Brain* 127, 420-430.
- Barrachina M., Castano E., Dalfo E., Maes T., Buesa C., Ferrer I. (2006). Reduced ubiquitin C-terminal hydrolase-1 expression levels in dementia with Lewy bodies. *Neurobiol. Dis.* 22, 265-273.
- Benabid A.L., Chabardes S., Seigneuret E. (2005) Deep-brain stimulation in Parkinson's disease: long-term efficacy and safety - What happened this year? *Curr. Opin. Neurol.* 18, 623-630.
- Berg D., Niwar M., Maass S., Zimprich A., Moller J.C., Wuellner U., Schmitz-Hubsch T., Klein C., Tan E.K., Schols L., Marsh L., Dawson T.M., Janetzky B., Muller T., Woitalla D., Kostic V., Pramstaller P.P., Oertel W.H., Bauer P., Krueger R., Gasser T., Riess O. (2005). Alpha-synuclein and Parkinson's disease: implications from the screening of more than 1,900 patients. *Mov Disord.* 20, 191-1194.
- Bernheimer H., Birkmayer W., Hornykiewicz O., Jellinger K., Seitelberger F. (1973). Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J. Neurol Sci.* 20, 415-455.

- Bertrand E., Lechowicz W., Lewandowska E., Szpak G.M., Dymecki J., Kosno-Kruszewska E., Wierzba-Bobrowicz T. (2003). Degenerative axonal changes in the hippocampus and amygdala in Parkinson's disease. *Folia Neuropathol.* *41*, 197-207
- Bertrand E., Lechowicz W., Szpak G.M., Lewandowska E., Dymecki J., Wierzba-Bobrowicz T. (2004). Limbic neuropathology in idiopathic Parkinson's disease with concomitant dementia. *Folia Neuropathol.* *42*, 141-150.
- Betarbet R., Sherer T.B., MacKenzie G., Garcia-Osuna M., Panov A.V., Greenamyre J.T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* *3*, 1301-1306.
- Bezard E., Gross C.E. (1998). Compensatory mechanisms in experimental and human parkinsonism: towards a dynamic approach. *Prog. Neurobiol.* *55*, 93-116.
- Beyer K. (2006). Alpha-synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *112*, 237-251.
- Birkmayer W., Riederer P. (1975). Biochemical post-mortem findings in depressed patients. *J. Neural. Transm.* *37*, 95-109.
- Birkmann E. (2005). Nachweis einzelner pathologischer Proteinaggregate mit der Fluoreszenz-korrelationsspektroskopie als diagnostische Methode für BSE und Scrapie. Dissertation, Universität Bochum
- Bodner R.A., Outeiro T.F., Altmann S., Maxwell M.M., Cho S.H., Hyman B.T., McLean P.J., Young A.B., Housman D.E., Kazantsev A.G. (2006). Pharmacological promotion of inclusion formation: a therapeutic approach for Huntington's and Parkinson's diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *103*, 4246-425.
- Bonifati V., Breedveld G.J., Squitieri F., Vanacore N., Brustenghi P., Harhangi B.S., Montagna P., Cannella M., Fabbrini G., Rizzu P., van Duijn C.M., Oostra B.A., Meco G., Heutink P. (2002). Localization of autosomal recessive early-onset parkinsonism to chromosome 1p36 (PARK7) in an independent dataset. *Ann. Neurol.* *51*, 253-256.
- Bonifati V., Rizzu P., van Baren M.J., Schaap O., Breedveld G.J., Krieger E., Dekker M.C., Squitieri F., Ibanez P., Joosse M., van Dongen J.W., Vanacore N., van Swieten J.C., Brice A., Meco G., van Duijn C.M., Oostra B.A., Heutink P. (2003). Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* *299*, 256-259
- Bonin M., Poths S., Osaka H., Wang Y.L., Wada K., Riess O. (2004). Microarray expression analysis of gad mice implicates involvement of Parkinson's disease associated UCH-L1 in multiple metabolic pathways. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *126*, 88-97.
- Bossy-Wetzel E., Schwarzenbacher R., Lipton S.A. (2004). Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med.* *10*, Suppl. S. 2-9.
- Bove J., Prou D., Perier C., Przedborski S. (2005). Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx.* *2*, 484-494.
- Boy J., Leergaard T.B., Schmidt T., Odeh F., Bichelmeier U., Nuber S., Holzmann C., Wree A., Prusiner S.B., Bujard H., Riess O., Bjaalie J.G. (2006). Expression mapping of tetracycline-responsive prion protein promoter: digital atlas for generating cell-specific disease models. *Neuroimage* *33*, 449-462.

- Braak H., Rub U., Gai W.P., Del Tredici K. (2003). Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm.* *110*, 517-536
- Braak H., Ghebremedhin E., Rub U., Bratzke H., Del Tredici K. (2004). Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res.* *318*, 121-134.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* *12*, 248-254.
- Bretau S., Allen C., Ingham P.W., Bandmann O. (2007). p53-dependent neuronal cell death in a DJ-1-deficient zebrafish model of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* *100*, 1626-1635.
- Brownell A.L., Canales K., Chen Y.I., Jenkins B.G., Owen C., Livni E., Yu M., Cicchetti F., Sanchez-Pernaute R., Isacson O. (2003). Mapping of brain function after MPTP-induced neurotoxicity in a primate Parkinson's disease model. *Neuroimage* *20*, 1064-1075.
- Bruck A., Kurki T., Kaasinen V., Vahlberg T., Rinne J.O. (2004). Hippocampal and prefrontal atrophy in patients with early non-demented Parkinson's disease is related to cognitive impairment. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *75*, 1467-1469.
- Buitrago M.M., Schulz J.B., Dichgans J., Luft A.R. (2004). Short and long-term motor skill learning in an accelerated rotarod training paradigm. *Neurobiol. Learn. Mem.* *81*, 211-216.
- Burns R.S., Chiueh C.C., Markey S.P., Ebert M.H., Jacobowitz D.M., Kopin I.J. (1983). A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *80*, 4546-4550.
- Cabin D.E., Gispert-Sanchez S., Murphy D., Auburger G., Myers R.R., Nussbaum R.L. (2005). Exacerbated synucleinopathy in mice expressing A53T SNCA on a Snca null background. *Neurobiol. Aging* *26*, 25-35.
- Carman L.S., Gage F.H., Shults C.W. (1991). Partial lesion of the substantia nigra: relation between extent of lesion and rotational behavior. *Brain Res.* *553*, 275-283.
- Chartier-Harlin M.C., Kachergus J., Roumier C., Mouroux V., Douay X., Lincoln S., Levecque C., Larvor L., Andrieux J., Hulihan M., Waucquier N., Defebvre L., Amouyel P., Farrer M., Destee A. (2004). Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet.* *364*, 1167-1169.
- Chance B., Williams G. (1955a). Method for localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature* *176*, 250-254.
- Chance B., Williams G. (1955b). Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *J. Biol. Chem.* *217*, 383-393.
- Chance B., Williams G. (1955c). Simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. *Nature* *175*, 1120-1121
- Chance B., Williams G. (1955d). Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation: III. The steady state. *J. Biol. Chem.* *217*, 409-427.
- Chandra S., Fornai F., Kwon H.B., Yazdani U., Atasoy D., Liu X., Hammer R.E., Battaglia G., German D.C., Castillo P.E., Sudhof T.C. (2004). Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 14966-14971.

- Chandra S., Gallardo G., Fernandez-Chacon R., Schluter O.M., Sudhof T.C. (2005). Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell* 123, 383-396.
- Cheah J.H., Kim S.F., Hester L.D., Clancy K.W., Patterson S.E. 3rd, Papadopoulos V., Snyder SH. (2006). NMDA receptor-nitric oxide transmission mediates neuronal iron homeostasis via the GTPase Dexas1. *Neuron* 51, 431-440.
- Chen L., Thiruchelvam M.J., Madura K., Richfield E.K. (2006). Proteasome dysfunction in aged human alpha-synuclein transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* 23, 120-126
- Choi J., Sullards M.C., Olzmann J.A., Rees H.D., Weintraub S.T., Bostwick D.E., Gearing M., Levey A.I., Chin L.S., Li L. (2006). Oxidative damage of DJ-1 is linked to sporadic Parkinson and Alzheimer diseases. *J. Biol. Chem.* 281, 10816-10824.
- Choi D.W., Koh J.Y., Peters S. (1988). Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J. Neurosci.* 8, 185-196.
- Chu Y., Kordower J.H. (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, 134-149
- Chung K.K., Zhang Y., Lim K.L., Tanaka Y., Huang H., Gao J., Ross C.A., Dawson V.L., Dawson T.M. (2001). Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat Med.* 7, 1144-1150.
- Clark I.E., Dodson M.W., Jiang C., Cao J.H., Huh J.R., Seol J.H., Yoo S.J., Hay B.A., Guo M. (2006). *Drosophila* pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 441, 1162-1166.
- Conway K.A., Harper J.D., Lansbury P.T. (1998). Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat. Med.* 4, 1318-1320.
- Conway K.A., Lee S.J., Rochet J.C., Ding T.T., Williamson R.E., Lansbury P.T. Jr. (2000). Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 571-576.
- Cooper A.A., Gitler A.D., Cashikar A., Haynes C.M., Hill K.J., Bhullar B., Liu K., Xu K., Strathern K.E., Liu F., Cao S., Caldwell K.A., Caldwell G.A., Marsischky G., Kolodner R.D., Labaer J., Rochet J.C., Bonini N.M., Lindquist S. (2006). Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science* 313, 324-328.
- Craner M.J., Newcombe J., Black J.A., Hartle C., Cuzner M.L., Waxman S.G. (2004). Molecular changes in neurons in multiple sclerosis: altered axonal expression of Nav1.2 and Nav1.6 sodium channels and Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 8168-8173
- Cuervo A.M., Stefanis L., Fredenburg R., Lansbury P.T., Sulzer D. (2004). Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* 305, 1292-1295.
- Cuervo A.M., Bergamini E., Brunk U.T., Droge W., French M., Terman A. (2005). Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells. *Autophagy* 1, 131-140
- Custer S.K., Garden G.A., Gill N., Rueb U., Libby R.T., Schultz C., Guyenet S.J., Deller T., Westrum L.E., Sopher B.L., La Spada A.R. (2006). Bergmann glia expression of polyglutamine-

- expanded ataxin-7 produces neurodegeneration by impairing glutamate transport. *Nat. Neurosci.* *9*, 1302-1311.
- Davis G.C., Williams A.C., Markey S.P., Ebert M.H., Caine E.D., Reichert C.M., Kopin I.J. (1979). Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res.* *1*, 249-254.
- Dauer W., Kholodilov N., Vila M., Trillat A.C., Goodchild R., Larsen K.E., Staal R., Tieu K., Schmitz Y., Yuan C.A., Rocha M., Jackson-Lewis V., Hersch S., Sulzer D., Przedborski S., Burke R., Hen R. (2002). Resistance of alpha-synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 14524-14529.
- Dekker M.C., Bonifati V., van Duijn C.M. (2003). Parkinson's disease: piecing together a genetic jigsaw. *Brain* *126*, 1722-1733.
- Deumens R., Blokland A., Prickaerts J. (2002). Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp. Neurol.* *175*, 303-317
- Diaz-Hernandez M., Hernandez F., Martin-Aparicio E., Gomez-Ramos P., Moran M.A., Castano J.G., Ferrer I., Avila J., Lucas J.J. (2003). Neuronal induction of the immunoproteasome in Huntington's disease. *J. Neurosci.* *23*, 11653-11661.
- Diaz-Horta O., Kamagate A., Herchuelz A., Van Eylen F. (2002). Na/Ca exchanger overexpression induces endoplasmic reticulum-related apoptosis and caspase-12 activation in insulin-releasing BRIN-BD11 cells. *Diabetes* *51*, 1815-1824.
- Di Fonzo A., Rohe C.F., Ferreira J., Chien H.F., Vacca L., Stocchi F., Guedes L., Fabrizio E., Manfredi M., Vanacore N., Goldwurm S., Breedveld G., Sampaio C., Meco G., Barbosa E., Oostra B.A., Bonifati V.; Italian Parkinson Genetics Network. (2005). A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. *Lancet* *365*, 412-415.
- Ding Y.S., Sugano Y., Fowler J.S., Salata C. (1994a). Synthesis of the racemate and individual enantiomers of [¹¹C]methylphenidate for studying presynaptic dopaminergic neuron with positron emission tomography. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* *34*, 989-997.
- Ding Y.S., Fowler J.S., Volkow N.D., Gatley S.J., Logan J., Dewey S.L., Alexoff D., Fazzini E., Wolf A.P. (1994b). Pharmacokinetics and in vivo specificity of [¹¹C]dl-threo-methylphenidate for the presynaptic dopaminergic neuron. *Synapse* *18*, 152-160.
- Dluzen, D.E., and McDermott J.L. (2000). Gender differences in neurotoxicity of the nigrostriatal dopaminergic system: implications for Parkinson's disease. *J. Gend. Specif. Med.* *3*, 36-42.
- Dobson C.M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature* *426*, 884-890.
- Dorsey E.R., Constantinescu R., Thompson J.P., Biglan K.M., Holloway R.G., Kieburtz K., Marshall F.J., Ravina B.M., Schifitto G., Siderowf A., Tanner C.M. (2007). Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* *68*, 384-386.
- Doty R.L., Deems D.A., Stellar S. (1988). Olfactory dysfunction in parkinsonism: a general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration. *Neurology* *38*, 1237-1244.
- Duda J.E., Lee V.M., Trojanowski J.Q. (2000). Neuropathology of synuclein aggregates. *J. Neurosci. Res.* *61*, 121-127.

- Drabek K., van Ham M., Stepanova T., Draegestein K., van Horsen R., Sayas C.L., Akhmanova A., Ten Hagen T., Smits R., Fodde R., Grosveld F., Galjart N. (2006). Role of CLASP2 in microtubule stabilization and the regulation of persistent motility. *Curr. Biol.* *16*, 2259-2264.
- Dunham N.W., Miya T.S. (1957). A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J. Am. Pharm. Assoc.* *46*, 208-209
- Ebadi M., Brown-Borg H., El Refaey H., Singh B.B., Garrett S., Shavali S., Sharma S.K. (2005). Metallothionein-mediated neuroprotection in genetically engineered mouse models of Parkinson's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *134*, 67-75.
- Elder G.A., De Gasperi R., Gama Sosa M.A. (2006). Research update: neurogenesis in adult brain and neuropsychiatric disorders. *Mt. Sinai J. Med.* *73*, 931-940.
- Fahn S. (2003). Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *991*, 1-14.
- Fasano M., Bergamasco B., Lopiano L. (2006). Modifications of the iron-neuromelanin system in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* *96*, 909-916.
- Farrer M., Chan P., Chen R., Tan L., Lincoln S., Hernandez D., Forno L., Gwinn-Hardy K., Petrucelli L., Hussey J., Singleton A., Tanner C., Hardy J., Langston J.W. (2001). Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations. *Ann Neurol.* *50*, 293-300.
- Farrer M., Stone J., Mata I.F., Lincoln S., Kachergus J., Hulihan M., Strain K.J., Maraganore DM. (2005). LRRK2 mutations in Parkinson disease. *Neurology.* *65*, 738-740.
- Farrer M., Ross O.A., Stone J.T. (2006). LRRK2-Related Parkinson disease. *Gene Reviews*
- Feany M.B., Bender W.W. (2000). A Drosophila model of Parkinson's disease. *Nature* *404*, 394-398.
- Fearnley J.M., Lees A.J. (1991). Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* *114*, 2283-2301.
- Fendt M., Endres T., Lowry C.A., Apfelbach R., McGregor I.S. (2005). TMT-induced autonomic and behavioral changes and the neural basis of its processing. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *29*, 1145-1156.
- Ferrante R.J., Schulz J.B., Kowall N.W., Beal M.F. (1997). Systemic administration of rotenone produces selective damage in the striatum and globus pallidus, but not in the substantia nigra. *Brain Res.* *753*, 157-162.
- Ferreiro E., Resende R., Costa R., Oliveira C.R., Pereira C.M. (2006). An endoplasmic-reticulum-specific apoptotic pathway is involved in prion and amyloid-beta peptides neurotoxicity. *Neurobiol. Dis.* *23*, 669-678
- Filliat P., Coubard S., Pierard C., Liscia P., Beracochea D., Four E., Baubichon D., Masqueliez C., Lallement G., Collombet J.M. (2006). Long-term behavioral consequences of soman poisoning in mice. *Neurotoxicology* *18*
- Finkelstein D.I., Stanic D., Parish C.L., Tomas D., Dickson K., Horne M.K. (2000). Axonal sprouting following lesions of the rat substantia nigra. *Neuroscience* *97*, 99-112.

- Fleming S.M., Salcedo J., Fernagut P.O., Rockenstein E., Masliah E., Levine M.S., Chesselet M.F. (2004). Early and progressive sensorimotor anomalies in mice overexpressing wild-type human alpha-synuclein. *J. Neurosci.* *24*, 9434-9440.
- Foley P., Riederer P. (2000). Influence of neurotoxins and oxidative stress on the onset and progression of Parkinson's disease. *J. Neurol.* *247 Suppl 2:II* 82-94.
- Forno L.S., Langston J.W., DeLanney L.E., Irwin I., Ricaurte G.A. (1986). Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys. *Ann. Neurol.* *20*, 449-455.
- Forno L.S. (1990). Pathology of Parkinson's disease: The importance of the substantia nigra and Lewy bodies. In *Parkinson's disease*. Stern GM, ed. (Baltimore, John Hopkins Press): 185-192
- Foster J.A., Quan N., Stern E.L., Kristensson K., Herkenham M. (2002). Induced neuronal expression of class I major histocompatibility complex mRNA in acute and chronic inflammation models. *J. Neuroimmunol.* *131*, 83-91.
- Franco J., Prediger R.D., Pandolfo P., Takahashi R.N., Farina M., Dafre A.L. (2007). Antioxidant responses and lipid peroxidation following intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats: increased susceptibility of olfactory bulb. *Life Sci.* *80*, 1906-1914.
- Franzen A., Brittebo E.B. (2005). Toxicant-induced ER-stress and caspase activation in the olfactory mucosa. *Arch. Toxicol.* *79*, 561-570.
- Freichel C., Neumann M., Ballard T., Muller V., Woolley M., Ozmen L., Borroni E., Kretschmar H.A., Haass C., Spooen W., Kahle P.J. (2006). Age-dependent cognitive decline and amygdala pathology in alpha-synuclein transgenic mice. *Neurobiol Aging.* 2006; in press
- Freundlieb N., Francois C., Tande D., Oertel W.H., Hirsch E.C., Hoglinger G.U. (2006). Dopaminergic substantia nigra neurons project topographically organized to the subventricular zone and stimulate precursor cell proliferation in aged primates. *J. Neurosci.* *26*, 2321-2325.
- Galvin J.E., Uryu K., Lee V.M., Trojanowski J.Q. (1999). Axon pathology in Parkinson's disease and Lewy body dementia hippocampus contains alpha-, beta-, and gamma-synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *96*; 13450-13455.
- George J.M., Jin H., Woods W.S., Clayton D.F. (1995). Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron* *15*, 361-372.
- Gerlach M., Reichmann H., Riederer P. (2003). *Die Parkinson-Krankheit. Grundlagen, Klinik, Therapie.* Springer Verlag, Wien, 2. Auflage, 1-298
- Giasson B.I., Duda J.E., Quinn S.M., Zhang B., Trojanowski J.Q., Lee V.M. (2002). Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. *Neuron* *34*, 521-533.
- Giasson B.I., Covy J.P., Bonini N.M., Hurtig H.I., Farrer M.J., Trojanowski J.Q., Van Deerlin V.M. (2006). Biochemical and pathological characterization of Lrrk2. *Ann. Neurol.* *59*, 315-322.
- Gilks W.P., Abou-Sleiman P.M., Gandhi S., Jain S., Singleton A., Lees A.J., Shaw K., Bhatia K.P., Bonifati V., Quinn N.P., Lynch J., Healy D.G., Holton J.L., Revesz T., Wood N.W. (2005). A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet* *365*, 415-416.
- Gillet G., Guerin M., Trembleau A., Brun G. (1995). A Bcl-2-related gene is activated in avian cells transformed by the Rous sarcoma virus. *EMBO J.* *14*, 1372-1381.

- Giraudier S., Chagraoui H., Komura E., Barnache S., Blanchet B., LeCouedic J.P., Smith D.F., Larbret F., Taksin A.L., Moreau-Gachelin F., Casadevall N., Tulliez M., Hulin A., Debili N., Vainchenker W. (2002). Overexpression of FKBP51 in idiopathic myelofibrosis regulates the growth factor independence of megakaryocyte progenitors. *Blood* *100*, 2932-2940.
- Gispert S., Del Turco D., Garrett L., Chen A., Bernard D.J., Hamm-Clement J., Korf H.W., Deller T., Braak H., Auburger G., Nussbaum R.L. (2003). Transgenic mice expressing mutant A53T human alpha-synuclein show neuronal dysfunction in the absence of aggregate formation. *Mol. Cell. Neurosci.* *24*, 419-429.
- Gizatullina Z.Z., Chen Y., Zierz S., Gellerich F.N. (2005). Effects of extramitochondrial ADP on permeability transition of mouse liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* *1706*, 98-104.
- Gizatullina Z.Z., Lindenberg K.S., Harjes P., Chen Y., Kosinski C.M., Landwehrmeyer B.G., Ludolph A.C., Striggow F., Zierz S., Gellerich F.N. (2006). Low stability of Huntington muscle mitochondria against Ca²⁺ in R6/2 mice. *Ann. Neurol.* *59*, 407-411.
- Glinka Y., Tipton K.F., Youdim M.B. (1996). Nature of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-Hydroxydopamine. *J. Neurochem.* *66*, 2004-2010.
- Gloeckner C.J., Kinkl N., Schumacher A., Braun R.J., O'Neill E., Meitinger T., Kolch W., Prokisch H., Ueffing M. (2006). The Parkinson disease causing LRRK2 mutation I2020T is associated with increased kinase activity. *Hum. Mol. Genet.* *15*, 223-232
- Golbe L.I., Di Iorio G., Sanges G., Lazzarini A.M., La Sala S., Bonavita V., Duvoisin R.C. (1996). Clinical genetic analysis of Parkinson's disease in the Contursi kindred. *Ann Neurol.* *40*, 767-775.
- Goldberg M.S., Fleming S.M., Palacino J.J., Cepeda C., Lam H.A., Bhatnagar A., Meloni E.G., Wu N., Ackerson L.C., Klapstein G.J., Gajendiran M., Roth B.L., Chesselet M.F., Maidment N.T., Levine M.S., Shen J. (2003). Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *J Biol Chem.* *278*, 43628-43635.
- Gomez-Isla T., Irizarry M.C., Mariash A., Cheung B., Soto O., Schrupp S., Sondel J., Kotilinek L., Day J., Schwarzschild M.A., Cha J.H., Newell K., Miller D.W., Ueda K., Young A.B., Hyman B.T., Ashe K.H. (2003). Motor dysfunction and gliosis with preserved dopaminergic markers in human alpha-synuclein A30P transgenic mice. *Neurobiol. Aging* *24*, 245-258.
- Gosavi N., Lee H.J., Lee J.S., 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*, 48984-48992.
- Gossen M., Bujard H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *89*, 5547-5551.
- Gossen M., Bujard H. (1995). Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type: commentary. *Biotechniques* *19*, 213-216; discussion 216-217
- Gossen M., Bujard H. (2002). Studying gene function in eukaryotes by conditional gene inactivation. *Annu. Rev. Genet.* *36*, 153-173
- Gould E., Tanapat P., Rydel T., Hastings N. (2000). Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood. *Biol. Psychiatry* *48*, 715-720.
- Greenamyre J.T., MacKenzie G., Peng T.I., Stephans S.E. (1999). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochem. Soc. Symp.* *66*, 85-97.

- Greenamyre J.T., Sherer T.B., Betarbet R., Panov A.V. (2001). Complex I and Parkinson's disease. *IUBMB Life* 52, 135-141.
- Gudelsky G.A., Nash J.F. (1996). Carrier-mediated release of serotonin by 3,4-methylenedioxymethamphetamine: implications for serotonin-dopamine interactions. *J. Neurochem.* 66, 243-249.
- Hadjigeorgiou GM, Xiromerisiou G, Gourbali V, Aggelakis K, Scarmeas N, Papadimitriou A, Singleton A. (2006). Association of alpha-synuclein Rep1 polymorphism and Parkinson's disease: influence of Rep1 on age at onset. *Mov Disord.* 21, 534-539.
- Hague S., Rogaeva E., Hernandez D., Gulick C., Singleton A., Hanson M., Johnson J., Weiser R., Gallardo M., Ravina B., Gwinn-Hardy K., Crawley A., St George-Hyslop P.H., Lang A.E., Heutink P., Bonifati V., Hardy J., Singleton A. (2003). Early-onset Parkinson's disease caused by a compound heterozygous DJ-1 mutation. *Ann. Neurol.* 54; 271-274.
- Hashimoto M., Rockenstein E., Masliah E. (2003). Transgenic models of alpha-synuclein pathology: past, present, and future. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 99, 171-188.
- Hatano Y., Li Y., Sato K., Asakawa S., Yamamura Y., Tomiyama H., Yoshino H., Asahina M., Kobayashi S., Hassin-Baer S., Lu C.S., Ng A.R., Rosales R.L., Shimizu N., Toda T., Mizuno Y., Hattori N. (2004). Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism. *Ann. Neurol.* 56, 424-427
- Hayakawa H., Hayashita-Kinoh H., Nihira T., Seki T., Mizuno Y., Mochizuki H. (2007). The isolation of neural stem cells from the olfactory bulb of Parkinson's disease model. *Neurosci. Res.* 57, 393-398.
- Hayashi S., Wakabayashi K., Ishikawa A., Nagai H., Saito M., Maruyama M., Takahashi T., Ozawa T., Tsuji S., Takahashi H. (2000). An autopsy case of autosomal-recessive juvenile parkinsonism with a homozygous exon 4 deletion in the parkin gene. *Mov. Disord.* 15, 884-888.
- Haywood A.F., Staveley B.E. (2006). Mutant alpha-synuclein-induced degeneration is reduced by parkin in a fly model of Parkinson's disease. *Genome* 49, 505-510.
- Heikkila R.E., Manzino L., Cabbat F.S., Duvoisin R.C. (1984). Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. *Nature* 311, 467-469.
- Heikkila R.E., Manzino L., Cabbat F.S., Duvoisin R.C. (1985). Studies on the oxidation of the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase B. *J. Neurochem.* 45, 1049-1054.
- Herraiz T. and Galisteo J. (2003). Tetrahydro-beta-carboline alkaloids occur in fruits and fruit juices. Activity as antioxidants and radical scavengers. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7156-7161.
- Hikosaka O., Nakamura K., Sakai K., Nakahara H. (2002). Central mechanisms of motor skill learning. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 217-222.
- Hill D.L., Almlı C.R. (1981). Olfactory bullectomy in infant rats: survival, growth and ingestive behaviors. *Physiol. Behav.* 27, 811-817.
- Hisata J.S. (2002). Lake and stream rehabilitation: rotenone use and health risks. Final supplemental environmental impact statement. Washington Department of Fish and Wildlife, Olympia.

- Hockly E., Cordery P.M., Woodman B., Mahal A., van Dellen A., Blakemore C., Lewis C.M., Hannan A.J., Bates G.P. (2002). Environmental enrichment slows disease progression in R6/2 Huntington's disease mice. *Ann. Neurol.* *51*, 235-242.
- Hoehn M.M., Yahr M.D. (1967). Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* *17*, 427-442.
- Holmes A., Yang R.J., Murphy D.L., Crawley J.N. (2002). Evaluation of antidepressant-related behavioral responses in mice lacking the serotonin transporter. *Neuropsychopharmacology* *27*, 914-923.
- Holtz W.A., Turetzky J.M., O'Malley K.L. (2006). Microarray expression profiling identifies early signaling transcripts associated with 6-OHDA-induced dopaminergic cell death. *Antioxid. Redox Signal.* *7*, 639-648.
- Holzmann C., Kruger R., Saecker A.M., Schmitt I., Schols L., Berger K., Riess O. (2003). Polymorphisms of the alpha-synuclein promoter: expression analyses and association studies in Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* *110*, 67-76.
- Honer M., Hengerer B., Blagoev M., Hintermann S., Waldmeier P., Schubiger P.A., Ametamey S.M. (2006). Comparison of [¹⁸F]FDOPA, [¹⁸F]FMT and [¹⁸F]FECNT for imaging dopaminergic neurotransmission in mice. *Nucl. Med. Biol.* *33*, 607-614.
- Huber J.C., Schneeberger C., Tempfer C.B. (2002). Genetic modeling of estrogen metabolism as a risk factor of hormone-dependent disorders. *Maturitas.* *41, Suppl 1*: S55-64.
- Hughes A.J., Daniel S.E., Kilford L., Lees A.J. (1992). Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *55*, 181-184.
- Hughes A.J., Ben-Shlomo Y., Daniel S.E., Lees A.J. (2001). What features improve the accuracy of clinical diagnosis in Parkinson's disease: a clinicopathologic study. 1992. *Neurology* *57*, S34-38
- Huisman E., Uylings H.B., Hoogland P.V. (2004). A 100% increase of dopaminergic cells in the olfactory bulb may explain hyposmia in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* *19*, 687-692.
- Hurtig H.I., Trojanowski J.Q., Galvin J., Ewbank D., Schmidt M.L., Lee V.M., Clark C.M., Glosser G., Stern M.B., Gollomp S.M., Arnold S.E. (2000). Alpha-synuclein cortical Lewy bodies correlate with dementia in Parkinson's disease. *Neurology.* *54*, 1916-1921.
- Huschenbett J., Zaidi A., Michaelis M.L. (1998). Sensitivity of the synaptic membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger and the expressed NCX1 isoform to reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta* *1374*, 34-46.
- Huynh D.P., Scoles D.R., Nguyen D., Pulst S.M. (2003). The autosomal recessive juvenile Parkinson disease gene product, parkin, interacts with and ubiquitinates synaptotagmin XI. *Hum. Mol. Genet.* *12*, 2587-2597.
- Ichihara N., Wu J., Chui D.H., Yamazaki K., Wakabayashi T., Kikuchi T. (1995). Axonal degeneration promotes abnormal accumulation of amyloid beta-protein in ascending gracile tract of gracile axonal dystrophy (GAD) mouse. *Brain Res.* *695*, 173-178.
- Imai Y., Soda M., Inoue H., Hattori N., Mizuno Y., Takahashi R. (2001). An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* *105*, 891-902.

- Inaji M., Okauchi T., Ando K., Maeda J., Nagai Y., Yoshizaki T., Okano H., Nariai T., Ohno K., Obayashi S., Higuchi M., Suhara T. (2005). Correlation between quantitative imaging and behavior in unilaterally 6-OHDA-lesioned rats. *Brain Res.* *1064*, 136-145.
- Inden M., Kondo J., Kitamura Y., Takata K., Nishimura K., Taniguchi T., Sawada H., Shimohama S. (2005). Proteasome inhibitors protect against degeneration of nigral dopaminergic neurons in hemiparkinsonian rats. *J. Pharmacol. Sci.* *97*, 203-211.
- Inden M., Taira T., Kitamura Y., Yanagida T., Tsuchiya D., Takata K., Yanagisawa D., Nishimura K., Taniguchi T., Kiso Y., Yoshimoto K., Agatsuma T., Koide-Yoshida S., Iguchi-Arigo S.M., Shimohama S., Arigo H. (2006). PARK7 DJ-1 protects against degeneration of nigral dopaminergic neurons in Parkinson's disease rat model. *Neurobiol. Dis.* *24*, 144-158.
- Irwin S. (1968). Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia* *13*, 222-257.
- Itier J.M., Ibanez P., Mena M.A., Abbas N., Cohen-Salmon C., Bohme G.A., Laville M., Pratt J., Corti O., Pradier L., Ret G., Joubert C., Periquet M., Araujo F., Negroni J., Casarejos M.J., Canals S., Solano R., Serrano A., Gallego E., Sanchez M., Deneffe P., Benavides J., Tremp G., Rooney T.A., Brice A., Garcia de Yebenes J. (2003). Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* *12*, 2277-2291.
- Jankowsky J.L., Slunt H.H., Gonzales V., Savonenko A.V., Wen J.C., Jenkins N.A., Copeland N.G., Younkin L.H., Lester H.A., Younkin S.G., Borchelt D.R. (2005). Persistent amyloidosis following suppression of Abeta production in a transgenic model of Alzheimer disease. *PLoS. Med.* *2*, e355.
- Janus C. (2004). Search strategies used by APP transgenic mice during navigation in the Morris water maze. *Learn. Mem.* *11*, 337-46.
- Jellinger K.A. (1991). Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol. Chem. Neuropathol.* *14*, 153-197
- Jenner P. (1998). Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* *13 Suppl 1*, 24-34.
- Jenner P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* *53 Suppl 3*:S26-36; discussion S36-38.
- Jiang H., Jiang Q., Feng J. (2004). Parkin increases dopamine uptake by enhancing the cell surface expression of dopamine transporter. *J. Biol. Chem.* *24*, 279(52):54380-64386.
- Kachergus J., Mata I.F., Hulihan M., Taylor J.P., Lincoln S., Aasly J., Gibson J.M., Ross O.A., Lynch T., Wiley J., Payami H., Nutt J., Maraganore D.M., Czyzewski K., Styczynska M., Wszolek Z.K., Farrer M.J., Toft M. (2005). Identification of a novel LRRK2 mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: evidence of a common founder across European populations. *Am. J. Hum. Genet.* *76*, 672-680.
- Kadara H., Lacroix L., Lotan D., Lotan R. (2007). Induction of Endoplasmic Reticulum Stress by the Pro-Apoptotic Retinoid N-(4-Hydroxyphenyl)Retinamide Via a Reactive Oxygen Species-Dependent Mechanism in Human Head and Neck Cancer Cells. *Cancer Biol. Ther.* (in press)
- Kahle P.J., Neumann M., Ozmen L., Muller V., Jacobsen H., Schindzielorz A., Okochi M., Leimer U., van Der Putten H., Probst A., Kremmer E., Kretschmar H.A., Haass C. (2000). Subcellular

- localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha-synuclein in human and transgenic mouse brain. *J. Neurosci.* *20*, 6365-6373.
- Kahle P.J., Neumann M., Ozmen L., Muller V., Odoy S., Okamoto N., Jacobsen H., Iwatsubo T., Trojanowski J.Q., Takahashi H., Wakabayashi K., Bogdanovic N., Riederer P., Kretschmar H.A., Haass C. (2001). Selective insolubility of alpha-synuclein in human Lewy body diseases is recapitulated in a transgenic mouse model. *Am. J. Pathol.* *159*, 2215-2225.
- Kahle P.J., Haass C. (2004). How does parkin ligate ubiquitin to Parkinson's disease? *EMBO Rep.* *5*, 681-685.
- Kamel F., Tanner C., Umbach D., Hoppin J., Alavanja M., Blair A., Comyns K., Goldman S., Korell M., Langston J., Ross G., Sandler D. (2007). Pesticide exposure and self-reported Parkinson's disease in the agricultural health study. *Am. J. Epidemiol.* *165*, 364-374.
- Kawasaki T., Kashiwabara A., Sakai T., Igarashi K., Ogata N., Watanabe H., Ichiyanagi K., Yamanouchi T. (2005). Long-term sucrose-drinking causes increased body weight and glucose intolerance in normal male rats. *Br. J. Nutr.* *93*, 613-618.
- Keeney P.M., Xie J., Capaldi R.A., Bennett J.P. Jr. (2006). Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *J. Neurosci.* *26*, 5256-5264.
- Kelly J.P., Wrynn A.S., Leonard B.E. (1997). The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: an update. *Pharmacol. Ther.* *74*, 299-316.
- Kitada T., Asakawa S., Hattori N., Matsumine H., Yamamura Y., Minoshima S., Yokochi M., Mizuno Y., Shimizu N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* *392*, 605-608.
- Kitao Y., Imai Y., Ozawa K., Kataoka A., Ikeda T., Soda M., Nakimawa K., Kiyama H., Stern D.M., Hori O., Wakamatsu K., Ito S., Itohara S., Takahashi R., Ogawa S. (2007). Pael receptor induces death of dopaminergic neurons in the substantia nigra via endoplasmic reticulum stress and dopamine toxicity, which is enhanced under condition of parkin inactivation. *Hum. Mol. Genet.* *16*, 50-60.
- Kirik D., Rosenblad C., Burger C., Lundberg C., Johansen T.E., Muzyczka N., Mandel R.J., Bjorklund A. (2002). Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. *J. Neurosci.* *22*, 2780-2791.
- Kirik D., Annett L.E., Burger C., Muzyczka N., Mandel R.J., Bjorklund A. (2003). Nigrostriatal alpha-synucleinopathy induced by viral vector-mediated overexpression of human alpha-synuclein: a new primate model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 2884-2889.
- Kish S.J., Kalasinsky K.S., Derkach P., Schmunk G.A., Guttman M., Ang L., Adams V., Furukawa Y., Haycock J.W. (2001). Striatal dopaminergic and serotonergic markers in human heroin users. *Neuropsychopharmacology* *24*, 561-567.
- Klivenyi P., Siwek D., Gardian G., Yang L., Starkov A., Cleren C., Ferrante R.J., Kowall N.W., Abeliovich A., Beal M.F. (2006). Mice lacking alpha-synuclein are resistant to mitochondrial toxins. *Neurobiol. Dis.* *21*, 541-548.
- Kolle G., Jansen A., Yamada T., Little M. (2003). In ovo electroporation of Crim1 in the developing chick spinal cord. *Dev. Dyn.* *226*, 107-111.

- Kotzbauer P.T., Giasson B.I., Kravitz A.V., Golbe L.I., Mark M.H., Trojanowski J.Q., Lee V.M. (2004). Fibrillization of alpha-synuclein and tau in familial Parkinson's disease caused by the A53T alpha-synuclein mutation. *Exp Neurol.* 187, 279-288.
- Kosaka K. Lewy bodies in cerebral cortex. Report of three cases. (1978). *Acta Neuropathol.* 42, 127-134.
- Krüger R., Kuhn W., Muller T., Woitalla D., Graeber M., Kosel S., Przuntek H., Epplen J.T., Schols L., Riess O. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 18, 106-108.
- Krüger R., Kuhn W., Leenders K.L., Sprengelmeyer R., Muller T., Woitalla D., Portman A.T., Maguire R.P., Veenma L., Schroder U., Schols L., Epplen J.T., Riess O., Przuntek H. (2001). Familial parkinsonism with synuclein pathology: clinical and PET studies of A30P mutation carriers. *Neurology* 56, 1355-1362.
- Kuwahara T., Koyama A., Gengyo-Ando K., Masuda M., Kowa H., Tsunoda M., Mitani S., Iwatsubo T. (2006). Familial Parkinson mutant alpha-synuclein causes dopamine neuron dysfunction in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 281, 334-340
- Lafuente A., Gonzalez-Carracedo A., Romero A., Cabaleiro T., Esquifino A.I. (2005). Toxic effects of cadmium on the regulatory mechanism of dopamine and serotonin on prolactin secretion in adult male rats. *Toxicol. Lett.* 155, 87-96.
- Lakso M., Vartiainen S., Moilanen A.M., Sirvio J., Thomas J.H., Nass R., Blakely R.D., Wong G. (2003). Dopaminergic neuronal loss and motor deficits in *Caenorhabditis elegans* overexpressing human alpha-synuclein. *J. Neurochem.* 86, 165-172.
- Lang A.E., Lozano A.M. (1998a). Parkinson's disease. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 339, 1044-1053.
- Lang A.E., Lozano A.M. (1998b) Parkinson's disease. Second of two parts. *N. Engl. J. Med.* 339, 1130-1143
- Langlais P.J., Thal L., Hansen L., Galasko D., Alford M., Masliah E. (1993). Neurotransmitters in basal ganglia and cortex of Alzheimer's disease with and without Lewy bodies. *Neurology* 43, 1927-1934.
- Langston J.W., Ballard P., Tetrud J.W., Irwin I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219, 979-980.
- Langston J.W., Forno L.S., Tetrud J., Reeves A.G., Kaplan J.A., Karluk D. (1999). Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann. Neurol.* 46, 598-605.
- Lansbury P.T. Jr., Brice A. (2002). Genetics of Parkinson's disease and biochemical studies of implicated gene products. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 299-306.
- Lauwers E., Debyser Z., Van Dorpe J., De Strooper B., Nuttin B., Baekelandt V. (2003). Neuropathology and neurodegeneration in rodent brain induced by lentiviral vector-mediated overexpression of alpha-synuclein. *Brain. Pathol.* 13, 364-372.
- Lauwers E., Beque D., Van Laere K., Nuyts J., Bormans G., Mortelmans L., Casteels C., Vercammen L., Bockstael O., Nuttin B., Debyser Z., Baekelandt V. (2006). Non-invasive imaging of neuropathology in a rat model of alpha-synuclein overexpression. *Neurobiol Aging*, in press

- Lee C.S., Sauer H., Bjorklund A. (1996). Dopaminergic neuronal degeneration and motor impairments following axon terminal lesion by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Neuroscience* 72, 641-653.
- Lee M.K., Stirling W., Xu Y., Xu X., Qui D., Mandir A.S., Dawson T.M., Copeland N.G., Jenkins N.A., Price D.L. (2002). Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 --> Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 8968-8973.
- Leonard B.E., Tuite M. (1981). Anatomical, physiological, and behavioral aspects of olfactory bulbectomy in the rat. *Int. Rev. Neurobiol.* 22, 251-286.
- Leplow B., Holl D., Zeng L., Herzog A., Behrens K., Mehdorn M. (2002). Spatial behaviour is driven by proximal cues even in mildly impaired Parkinson's disease. *Neuropsychologia* 40, 1443-1455.
- Leroy E., Boyer R., Polymeropoulos M.H. (1998). Intron-exon structure of ubiquitin c-terminal hydrolase-L1. *DNA Res.* 5, 397-400.
- Lewandoski M. (2001). Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat. Rev. Genet.* 2, 743-755.
- Lewy F.H. (1912). Paralysis agitans. In Lewandowsky M. (ed) : I. Pathologische Anatomie. In: *Handbuch der Neurologie*, Springer Verlag; Berlin, 920-933
- Liu Y., Fallon L., Lashuel H.A., Liu Z., Lansbury P.T. Jr. (2002). The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* 111, 209-218.
- Liu S., Ninan I., Antonova I., Battaglia F., Trinchese F., Narasanna A., Kolodilov N., Dauer W., Hawkins R.D., Arancio O. (2004). alpha-Synuclein produces a long-lasting increase in neurotransmitter release. *EMBO J.* 23, 4506-4516.
- Lione L.A., Carter R.J., Hunt M.J., Bates G.P., Morton A.J., Dunnett SB. (1999). Selective discrimination learning impairments in mice expressing the human Huntington's disease mutation. *J. Neurosci.* 19, 10428-10437.
- Liou H.H., Oon P.C., Lin H.C., Wang P.J., Chen T.H. (2001). Risk factors associated with infantile spasms: a hospital-based case-control study in Taiwan. *Epilepsy Res.* 47, 91-98.
- Lo Bianco C., Ridet J.L., Schneider B.L., Deglon N., Aebischer P. (2002). alpha-Synucleinopathy and selective dopaminergic neuron loss in a rat lentiviral-based model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 10813-10818.
- Logan J. (2000). Graphical analysis of PET data applied to reversible and irreversible tracers. *Nucl. Med. Biol.* 27, 661-70.
- Logue S.F., Paylor R., Wehner J.M. (1997). Hippocampal lesions cause learning deficits in inbred mice in the Morris water maze and conditioned-fear task. *Behav. Neurosci.* 111, 104-113.
- Lu J.F., Barron-Casella E., Deering R., Heinzer A.K., Moser A.B., deMesy Bentley K.L., Wand G.S., C McGuinness M., Pei Z., Watkins P.A., Pujol A., Smith K.D., Powers J.M. (2007). The role of peroxisomal ABC transporters in the mouse adrenal gland: the loss of Abcd2 (ALDR), Not Abcd1 (ALD), causes oxidative damage. *Lab. Invest.* 87, 261-272.

- Luckey C.J., King G.M., Marto J.A., Venketeswaran S., Maier B.F., Crotzer V.L., Colella T.A., Shabanowitz J., Hunt D.F., Engelhard V.H. (1998). Proteasomes can either generate or destroy MHC class I epitopes: evidence for nonproteasomal epitope generation in the cytosol. *J. Immunol.* *161*, 112-121.
- Lucking C.B., Durr A., Bonifati V., Vaughan J., De Michele G., Gasser T., Harhangi B.S., Meco G., Deneffe P., Wood N.W., Agid Y., Brice A; French Parkinson's Disease Genetics Study Group; European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. (2000). Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N. Engl. J. Med.* *342*, 1560-1567.
- Macas J., Nern C., Plate K.H., Momma S. (2006). Increased generation of neuronal progenitors after ischemic injury in the aged adult human forebrain. *J. Neurosci.* *26*, 13114-13119.
- Manning-Bog A.B., McCormack A.L., Li J., Uversky V.N., Fink A.L., Di Monte D.A. (2002). The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* *277*, 1641-1644.
- Maraganore D.M., Farrer M.J., Hardy J.A., Lincoln S.J., McDonnell S.K., Rocca W.A. (1999). Case-control study of the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 gene in Parkinson's disease. *Neurology* *53*, 1858-1860.
- Marini A.M., Lipsky R.H., Schwartz J.P., Kopin I.J. (1992). Accumulation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in cultured cerebellar astrocytes. *J. Neurochem.* *58*, 1250-1258.
- Marshall L.E., Himes R.H. (1978). Rotenone inhibition of tubulin self-assembly. *Biochim. Biophys. Acta* *43*, 590-594.
- Martin L.J., Pan Y., Price A.C., Sterling W., Copeland N.G., Jenkins N.A., Price D.L., Lee M.K. (2006). Parkinson's disease alpha-synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial degeneration and cell death. *J. Neurosci.* *26*, 41-50.
- Marx F.P., Holzmann C., Strauss K.M., Li L., Eberhardt O., Gerhardt E., Cookson M.R., Hernandez D., Farrer M.J., Kachergus J., Engelender S., Ross C.A., Berger K., Schols L., Schulz J.B., Riess O., Kruger R. (2003). Identification and functional characterization of a novel R621C mutation in the synphilin-1 gene in Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* *12*, 1223-12231.
- Maskri L., Zhu X., Fritzen S., Kuhn K., Ullmer C., Engels P., Andriske M., Stichel C.C., Lubbert H. (2004). Influence of different promoters on the expression pattern of mutated human alpha-synuclein in transgenic mice. *Neurodegener Dis.* *1*; 255-265.
- Masliah E., Rockenstein E., Veinbergs I., Mallory M., Hashimoto M., Takeda A., Sagara Y., Sisk A., Mucke L. (2000). Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science* *287*, 1265-1269.
- Mattila P.M., Rinne J.O., Helenius H., Roytta M. (1999). Neuritic degeneration in the hippocampus and amygdala in Parkinson's disease in relation to Alzheimer pathology. *Acta Neuropathol. (Berl)*. *98*, 157-164.
- Matsuda N., Kitami T., Suzuki T., Mizuno Y., Hattori N., Tanaka K. (2006). Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyze multiple monoubiquitylation in vitro. *J. Biol. Chem.* *281*, 3204-3209
- Matsuoka Y., Vila M., Lincoln S., McCormack A., Picciano M., LaFrancois J., Yu X., Dickson D., Langston W.J., McGowan E., Farrer M., Hardy J., Duff K., Przedborski S., Di Monte D.A.

- (2001). Lack of nigral pathology in transgenic mice expressing human alpha-synuclein driven by the tyrosine hydroxylase promoter. *Neurobiol. Dis.* 8, 535-539.
- Matsuda I., Aiba A. (2004). Receptor knock-out and knock-in strategies. *Methods Mol. Biol.* 259, 379-390.
- Mayford M., Bach M.E., Huang Y.Y., Wang L., Hawkins R.D., Kandel E.R. (1996). Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* 274 1678-1683.
- McCormack A.L., Thiruchelvam M., Manning-Bog A.B., Thiffault C., Langston J.W., Cory-Slechta D.A., Di Monte D.A. (2002). Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol. Dis.* 10, 119-127.
- McNaught K.S., Mytilineou C., Jnobaptiste R., Yabut J., Shashidharan P., Jennert P., Olanow C.W. (2002). Impairment of the ubiquitin-proteasome system causes dopaminergic cell death and inclusion body formation in ventral mesencephalic cultures. *J. Neurochem.* 81, 301-306.
- McNish K.A., Davis M. (1997). Olfactory bulbectomy enhances sensitization of the acoustic startle reflex produced by acute or repeated stress. *Behav. Neurosci.* 111, 80-91.
- Melrose H., Lincoln S., Tyndall G., Dickson D., Farrer M. (2006). Anatomical localization of leucine-rich repeat kinase 2 in mouse brain. *Neuroscience* 139, 791-794
- Meulener M., Whitworth A.J., Armstrong-Gold C.E., Rizzu P., Heutink P., Wes P.D., Pallanck L.J., Bonini N.M. (2005). Drosophila DJ-1 mutants are selectively sensitive to environmental toxins associated with Parkinson's disease. *Curr. Biol.* 15, 1572-1577.
- Miwa H., Kubo T., Suzuki A., Kondo T. (2006). Intra-gastric proteasome inhibition induces alpha-synuclein-immunopositive aggregations in neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus in rats. *Neurosci. Lett.* 401, 146-149.
- Modler A.J., Gast K., Lutsch G., Damaschun G. (2003). Assembly of amyloid protofibrils via critical oligomers--a novel pathway of amyloid formation. *J. Mol. Biol.* 325, 135-48.
- Moore R.Y. (2003). Organization of midbrain dopamine systems and the pathophysiology of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 9 Suppl 2:S65-71.
- Mori H., Hattori N., Mizuno Y. (2003). Genotype-phenotype correlation: familial Parkinson disease. *Neuropathology* 23, 90-94
- Mori F., Tanji K., Yoshimoto M., Takahashi H., Wakabayashi K. (2002). Demonstration of alpha-synuclein immunoreactivity in neuronal and glial cytoplasm in normal human brain tissue using proteinase K and formic acid pretreatment. *Exp. Neurol.* 176, 98-104.
- Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* 11, 47-60.
- Morrow B.A., Redmond A.J., Roth R.H., Elsworth J.D. (2000). The predator odor, TMT, displays a unique, stress-like pattern of dopaminergic and endocrinological activation in the rat. *Brain Res.* 864, 146-151.
- Morrow B.A., Roth R.H., Elsworth J.D. TMT, a predator odor, elevates mesoprefrontal dopamine metabolic activity and disrupts short-term working memory in the rat. *Brain Res. Bull.* 52, 519-523.

- Mukoyama M., Yamazaki K., Kikuchi T., Tomita T. (1989). Neuropathology of gracile axonal dystrophy (GAD) mouse. An animal model of central distal axonopathy in primary sensory neurons. *Acta Neuropathol. (Berl)* 79, 294-299.
- Muller M., Fendt M. (2006). Temporary inactivation of the medial and basolateral amygdala differentially affects TMT-induced fear behavior in rats. *Behav. Brain Res.* 167, 57-62
- Mytilineou C., Werner P., Molinari S., Di Rocco A., Cohen G., Yahr M.D. (1994). Impaired oxidative decarboxylation of pyruvate in fibroblasts from patients with Parkinson's disease. *J. Neural. Transm. Park Dis. Dement. Sect. 8*, 223-228.
- Nagano T., Osakada M., Ago Y., Koyama Y., Baba A., Maeda S., Takemura M., Matsuda T. (2005). SEA0400, a specific inhibitor of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger, attenuates sodium nitroprusside-induced apoptosis in cultured rat microglia. *Br. J. Pharmacol.* 144, 669-679.
- Nakatomi H., Kuriu T., Okabe S., Yamamoto S., Hatano O., Kawahara N., Tamura A., Kirino T., Nakafuku M. (2002). Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110, 429-441.
- Neumann M., Kahle P.J., Giasson B.I., Ozmen L., Borroni E., Spooen W., Muller V., Odoy S., Fujiwara H., Hasegawa M., Iwatsubo T., Trojanowski J.Q., Kretschmar H.A., Haass C. (2002). Misfolded proteinase K-resistant hyperphosphorylated alpha-synuclein in aged transgenic mice with locomotor deterioration and in human alpha-synucleinopathies. *J. Clin. Invest.* 110, 1429-1439.
- Neumann M., Muller V., Gorner K., Kretschmar H.A., Haass C., Kahle P.J. (2004). Pathological properties of the Parkinson's disease-associated protein DJ-1 in alpha-synucleinopathies and tauopathies: relevance for multiple system atrophy and Pick's disease. *Acta Neuropathol (Berl)*. 107, 489-496.
- Nguyen T.V., Brownell A.L., Iris Chen Y.C., Livni E., Coyle J.T., Rosen B.R., Cavagna F., Jenkins B.G. (2000). Detection of the effects of dopamine receptor supersensitivity using pharmacological MRI and correlations with PET. *Synapse* 36, 57-65.
- Nichols W.C., Pankratz N., Hernandez D., Paisan-Ruiz C., Jain S., Halter C.A., Michaels V.E., Reed T., Rudolph A., Shults C.W., Singleton A., Foroud T.; Parkinson Study Group-PROGENI investigators. (2005). Genetic screening for a single common LRRK2 mutation in familial Parkinson's disease. *Lancet* 365, 410-412.
- Nishie M., Mori F., Fujiwara H., Hasegawa M., Yoshimoto M., Iwatsubo T., Takahashi H., Wakabayashi K. (2004). Accumulation of phosphorylated alpha-synuclein in the brain and peripheral ganglia of patients with multiple system atrophy. *Acta Neuropathol (Berl)*. 107, 292-298.
- Nuber S. (2002). Generierung und Charakterisierung transgener Mäuse für neurodegenerative Erkrankungen des Menschen am Beispiel der Synucleinopathien (Diplomarbeit; unveröffentlicht)
- Nutt J.G., Holford N.H. (1996). The response to levodopa in Parkinson's disease: imposing pharmacological law and order. *Ann. Neurol.* 39, 561-573.
- Ogura T., Ogata M., Akita H., Jitsuki S., Akiba L., Noda K., Hoka S., Saji M. (2005). Impaired acquisition of skilled behavior in rotarod task by moderate depletion of striatal dopamine in a pre-symptomatic stage model of Parkinson's disease. *Neurosci. Res.* 51, 299-308

- Ohtsuki S., Sato S., Yamaguchi H., Kamoi M., Asashima T., Terasaki T. (2007). Exogenous expression of claudin-5 induces barrier properties in cultured rat brain capillary endothelial cells. *J. Cell Physiol.* *210*, 81-86.
- O'Keefe J., Nadel L. (1978). *The Hippocampus as a Cognitive Map*, Oxford University Press.
- Olton, D.S., Samuelson, R.J. (1976). Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *J. Exp. Psych. Anim. Beh. Proc.* *2*, 97-116.
- Oluwatosin-Chigbu Y., Robbins A., Scott C.W., Arriza J.L., Reid J.D., Zysk J.R. (2003). Parkin suppresses wild-type alpha-synuclein-induced toxicity in SHSY-5Y cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *309*, 679-684.
- Olzmann J.A., Brown K., Wilkinson K.D., Rees H.D., Huai Q., Ke H., Levey A.I., Li L., Chin L.S. (2004). Familial Parkinson's disease-associated L166P mutation disrupts DJ-1 protein folding and function. *J. Biol. Chem.* *279*, 8506-8515.
- Ordonez C., Navarro A., Perez C., Astudillo A., Martinez E., Tolivia J. (2006). Apolipoprotein D expression in substantia nigra of Parkinson disease. *Histol. Histopathol.* *21*, 361-366.
- Ossowska K., Wardas J., Smialowska M., Kuter K., Lenda T., Wieronska J.M., Zieba B., Nowak P., Dabrowska J., Bortel A., Kwiecinski A., Wolfarth S. (2005). A slowly developing dysfunction of dopaminergic nigrostriatal neurons induced by long-term paraquat administration in rats: an animal model of preclinical stages of Parkinson's disease? *Eur. J. Neurosci.* *22*, 1294-1304.
- Ostrerova N., Petrucelli L., Farrer M., Mehta N., Choi P., Hardy J., Wolozin B. (1999). alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *J. Neurosci.* *19*, 5782-5791.
- Oyadomari S., Yun C., Fisher E.A., Kreglinger N., Kreibich G., Oyadomari M., Harding H.P., Goodman A.G., Harant H., Garrison J.L., Taunton J., Katze M.G., Ron D. (2006). Cotranslocational degradation protects the stressed endoplasmic reticulum from protein overload. *Cell* *126*, 727-739.
- Paisan-Ruiz C., Jain S., Evans E.W., Gilks W.P., Simon J., van der Brug M., Lopez de Munain A., Aparicio S., Gil A.M., Khan N., Johnson J., Martinez J.R., Nicholl D., Carrera I.M., Pena A.S., de Silva R., Lees A., Marti-Masso J.F., Perez-Tur J., Wood N.W., Singleton A.B. (2004). Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* *44*, 595-600.
- Palacino J.J., Sagi D., Goldberg M.S., Krauss S., Motz C., Wacker M., Klose J., Shen J. (2004). Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J. Biol. Chem.* *279*, 18614-18622.
- Palucha A., Branski P., Szewczyk B., Wieronska J.M., Klak K., Pilc A. (2005). Potential antidepressant-like effect of MTEP, a potent and highly selective mGluR5 antagonist. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *81*, 901-906.
- Pankhaniya R., Jabrane-Ferrat N., Gaufo G.O., Sreedharan S.P., Dazin P., Kaye J., Goetzl E.J. (1998). Vasoactive intestinal peptide enhancement of antigen-induced differentiation of a cultured line of mouse thymocytes. *FASEB J.* *12*, 119-127.
- Panov A., Dikalov S., Shalbuyeva N., Taylor G., Sherer T., Greenamyre J.T. (2005). Rotenone model of Parkinson disease: multiple brain mitochondria dysfunctions after short term systemic rotenone intoxication. *J. Biol. Chem.* *280*, 42026-42035.

- Papadimitriou A., Veletza V., Hadjigeorgiou G.M., Patrikiou A., Hirano M., Anastasopoulos I. (1999). Mutated alpha-synuclein gene in two Greek kindreds with familial PD: incomplete penetrance? *Neurology*. *52*, 651-654.
- Park J., Lee S.B., Lee S., Kim Y., Song S., Kim S., Bae E., Kim J., Shong M., Kim J.M., Chung J. (2006). Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* *441*, 1157-1161
- Park S.H., Bolender N., Eisele F., Kostova Z., Takeuchi J., Coffino P., Wolf D.H. (2007). The cytoplasmic Hsp70 chaperone machinery subjects misfolded and endoplasmic reticulum import-incompetent proteins to degradation via the ubiquitin-proteasome system. *Mol. Biol. Cell*. *18*, 153-165.
- Parker W.D. Jr, Swerdlow R.H. (1998). Mitochondrial dysfunction in idiopathic Parkinson disease. *Am. J. Hum. Genet.* *62*, 758-762
- Parkinson, J. (2002). An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. *14*, 223-236
- Paxinos G., Franklin K.B. (2001). The mouse brain in stereotaxic coordinates (2nd ed. San Diego, CA: Academic Press).
- Perez F.A., Palmiter R.D. (2005). Parkin-deficient mice are not a robust model of parkinsonism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 2174-2179.
- Petrasch-Parwez E., Nguyen H.P., Löbbecke-Schumacher M., Habbes H.W., Wieczorek S., Riess O., Andres K.H., Dermietzel R., von Hörsten S. (2007). Cellular and subcellular localization of huntingtin aggregates in the brain of a rat transgenic for Huntington disease. *J.Comp.Neurol.* *501*, 716-730.
- Petit A., Kawarai T., Paitel E., Sanjo N., Maj M., Scheid M., Chen F., Gu Y., Hasegawa H., Salehi-Rad S., Wang L., Rogaeva E., Fraser P., Robinson B., St George-Hyslop P., Tandon A. (2005). Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations. *J. Biol. Chem.* *280*, 34025-34032.
- Petersen K., Olesen O.F., Mikkelsen J.D. (1999). Developmental expression of alpha-synuclein in rat hippocampus and cerebral cortex. *Neuroscience*. *91*, 651-659.
- Petrucelli L., O'Farrell C., Lockhart P.J., Baptista M., Kehoe K., Vink L., Choi P., Wolozin B., Farrer M., Hardy J., Cookson M.R. (2002). Parkin protects against the toxicity associated with mutant alpha-synuclein: proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons. *Neuron* *36*, 1007-1019.
- Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E., Ide S.E., Dehejia A., Dutra A., Pike B., Root H., Rubenstein J., Boyer R., Stenroos E.S., Chandrasekharappa S., Athanassiadou A., Papapetropoulos T., Johnson W.G., Lazzarini A.M., Duvoisin R.C., Di Iorio G., Golbe L.I., Nussbaum R.L. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* *276*, 2045-2047.
- Porsolt R.D., Bertin A., Jalfre M. (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* *229*, 327-236.
- Pramstaller P.P., Schlossmacher M.G., Jacques T.S., Scaravilli F., Eskelson C., Pepivani I., Hedrich K., Adel S., Gonzales-McNeal M., Hilker R., Kramer P.L., Klein C. (2005). Lewy body Parkinson's disease in a large pedigree with 77 Parkin mutation carriers. *Ann Neurol*. *58*, 411-422.

- Prediger R.D., Batista L.C., Medeiros R., Pandolfo P., Florio J.C., Takahashi R.N. (2006). The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 202, 391-403.
- Primeaux S.D., Barnes M.J., Bray G.A. (2007). Olfactory bulbectomy increases food intake and hypothalamic neuropeptide Y in obesity-prone but not obesity-resistant rats. *Behav. Brain Res.* (in press)
- Pritts T.A., Hungness E.S., Hershko D.D., Robb B.W., Sun X., Luo G.J., Fischer J.E., Wong H.R., Hasselgren P.O. (2002). Proteasome inhibitors induce heat shock response and increase IL-6 expression in human intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 282, 1016-1026.
- Przedborski S., Jackson-Lewis V. (1998). Experimental developments in movement disorders: update on proposed free radical mechanisms. *Curr. Opin. Neurol.* 11, 335-339
- Przedborski S., Jackson-Lewis V., Vila M., Wu D.C., Teismann P., Tieu K., Choi D.K., Cohen O. (2003). Free radical and nitric oxide toxicity in Parkinson's disease. *Adv. Neurol.* 91, 83-94.
- Ramsay R.R., Krueger M.J., Youngster S.K., Gluck M.R., Casida J.E., Singer T.P. (1991). Interaction of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) and its analogs with the rotenone/piericidin binding site of NADH dehydrogenase. *J. Neurochem.* 56, 1184-1190.
- Rajput A.H., Rozdilsky B., Rajput A. (1991). Accuracy of clinical diagnosis in parkinsonism--a prospective study. *Can. J. Neurol. Sci.* 18, 275-278.
- Remondes M., Schuman E.M. (2003). Molecular mechanisms contributing to long-lasting synaptic plasticity at the temporoammonic-CA1 synapse. *Learn. Mem.* 10, 247-252.
- Reynolds G.P., Garrett N.J. (1986). Striatal dopamine and homovanillic acid in Huntington's disease. *J. Neural. Transm.* 65, 151-155.
- Richfield E.K., Thiruchelvam M.J., Cory-Slechta D.A., Wuertzer C., Gainetdinov R.R., Caron M.G., Di Monte D.A., Federoff H.J. (2002). Behavioral and neurochemical effects of wild-type and mutated human alpha-synuclein in transgenic mice. *Exp. Neurol.* 175, 35-48.
- Riederer P., Youdim M.B. (1986). Monoamine oxidase activity and monoamine metabolism in brains of parkinsonian patients treated with l-deprenyl. *J. Neurochem.* 46, 1359-1365.
- Riekkinen P., Jr, Kejonen K., Laakso M.P., Soininen H., Partanen K., Riekkinen M. (1998). Hippocampal atrophy is related to impaired memory, but not frontal functions in non-demented Parkinson's disease patients. *Neuroreport* 9, 1507-1511
- Rivest R., Marsden C.A. (1992). Differential effects of amfonelic acid on the haloperidol- and clozapine-induced increase in extracellular DOPAC in the nucleus accumbens and the striatum. *Synapse* 10, 71-78.
- Rizzu P., Hinkle D.A., Zhukareva V., Bonifati V., Severijnen L.A., Martinez D., Ravid R., Kamphorst W., Eberwine J.H., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Heutink P. (2004). DJ-1 colocalizes with tau inclusions: a link between parkinsonism and dementia. *Ann. Neurol.* 55, 113-118.
- Roberts D.C., Zis A.P., Fibiger H.C. (1975). Ascending catecholamine pathways and amphetamine-induced locomotor activity: importance of dopamine and apparent non-involvement of norepinephrine. *Brain Res.* 93, 441-454.

- Rochet JC, Lansbury PT Jr. (2000). Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 60-68
- Rockenstein E., Mallory M., Hashimoto M., Song D., Shults C.W., Lang I., Masliah E. (2002). Differential neuropathological alterations in transgenic mice expressing alpha-synuclein from the platelet-derived growth factor and Thy-1 promoters. *J. Neurosci. Res.* 68, 568-578.
- Rossi L., Lombardo M.F., Ciriolo M.R., Rotilio G. (2004). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases associated with copper imbalance. *Neurochem. Res.* 29, 493-504.
- Roy S., Wolman L. (1969). Ultrastructural observations in Parkinsonism. *J. Pathol.* 99, 39-44.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sato Y., Nishio Y., Sekine O., Kodama K., Nagai Y., Nakamura T., Maegawa H., Kashiwagi A. (2007). Increased expression of CCAAT/enhancer binding protein-beta and -delta and monocyte chemoattractant protein-1 genes in aortas from hyperinsulinaemic rats. *Diabetologia* 50, 481-489.
- Satoh J., Kuroda Y. (2001). A polymorphic variation of serine to tyrosine at codon 18 in the ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 gene is associated with a reduced risk of sporadic Parkinson's disease in a Japanese population. *J. Neurol. Sci.* 189, 113-117.
- Savitt J.M., Dawson V.L., Dawson T.M. (2006). Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. *J. Clin. Invest.* 116, 1744-1754
- Schuler F., Casida J.E. (2001). Functional coupling of PSST and ND1 subunits in NADH:ubiquinone oxidoreductase established by photoaffinity labeling. *Biochim. Biophys. Acta* 1506, 79-87.
- Shults C.W. (2004). Mitochondrial dysfunction and possible treatments in Parkinson's disease--a review. *Mitochondrion* 4, 641-648.
- Sedelis M., Schwarting R.K., Huston J.P. (2001). Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behav. Brain Res.* 125, 109-125.
- Setsuie R., Wang Y.L., Mochizuki H., Osaka H., Hayakawa H., Ichihara N., Li H., Furuta A., Sano Y., Sun Y.J., Kwon J., Kabuta T., Yoshimi K., Aoki S., Mizuno Y., Noda M., Wada K. (2007). Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant. *Neurochem. Int.* 50, 119-129.
- Schapira A.H., Mann V.M., Cooper J.M., Dexter D., Daniel S.E., Jenner P., Clark J.B., Marsden C.D. (1990) Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 55, 2142-2145.
- Shan X., Chi L., Bishop M., Luo C., Lien L., Zhang Z., Liu R. (2006). Enhanced de novo neurogenesis and dopaminergic neurogenesis in the substantia nigra of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease-like mice. *Stem Cells* 24, 1280-1287.
- Shendelman S., Jonason A., Martinat C., Leete T., Abeliovich A. (2004). DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation. *PLoS. Biol.* 2, e362
- Sheehan J.P., Palmer P.E., Helm G.A., Tuttle J.B. (1997). MPP+ induced apoptotic cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells: an electron microscope study. *J. Neurosci. Res.* 48, 226-237.

- Shimizu K., Matsubara K., Ohtaki K., Shiono H. (2003). Paraquat leads to dopaminergic neural vulnerability in organotypic midbrain culture. *Neurosci. Res.* *46*, 523-532.
- Shimura H., Schlossmacher M.G., Hattori N., Frosch M.P., Trockenbacher A., Schneider R., Mizuno Y., Kosik K.S., Selkoe D.J. (2001). Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science* *293*, 263-269.
- Shinde S., Pasupathy K. (2006). Respiratory-chain enzyme activities in isolated mitochondria of lymphocytes from patients with Parkinson's disease: preliminary study. *Neurol. India* *54*, 390-393.
- Shoffner J.M., Watts R.L., Juncos J.L., Torroni A., Wallace D.C. (1991). Mitochondrial oxidative phosphorylation defects in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* *30*, 332-339.
- Silvestri L., Caputo V., Bellacchio E., Atorino L., Dallapiccola B., Valente E.M., Casari G. (2005). Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 3477-3492
- Simon-Sanchez J., Herranz-Perez V., Olucha-Bordonau F., Perez-Tur J. (2006). LRRK2 is expressed in areas affected by Parkinson's disease in the adult mouse brain. *Eur. J. Neurosci.* *23*, 659-666.
- Singleton A.B., Farrer M., Johnson J., Singleton A., Hague S., Kachergus J., Hulihan M., Peuralinna T., Dutra A., Nussbaum R., Lincoln S., Crawley A., Hanson M., Maraganore D., Adler C., Cookson M.R., Muentner M., Baptista M., Miller D., Blancato J., Hardy J., Gwinn-Hardy K. (2003). alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* *302*, 841.
- Smith E.D., Xu Y., Tomson B.N., Leung C.G., Fujiwara Y., Orkin S.H., Crispino J.D. (2004). More than blood, a novel gene required for mammalian postimplantation development. *Mol. Cell Biol.* *24*, 1168-1173.
- Smith W.W., Jiang H., Pei Z., Tanaka Y., Morita H., Sawa A., Dawson V.L., Dawson T.M., Ross C.A. (2005). Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant alpha-synuclein-induced toxicity. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 3801-3811
- Sohmiya M., Tanaka M., Aihara Y., Hirai S., Okamoto K. (2001). Age-related structural changes in the human midbrain: an MR image study. *Neurobiol Aging.* *22*, 595-601.
- Sohmiya M., Tanaka M., Aihara Y., Okamoto K. (2004). Structural changes in the midbrain with aging and Parkinson's disease: an MRI study. *Neurobiol Aging.* *25*, 449-453.
- Sofic E., Riederer P., Heinsen H., Beckmann H., Reynolds G.P., Hebenstreit G., Youdim M.B. (1988). Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. *J. Neural Transm.* *74*, 199-205.
- Sossi V., de La Fuente-Fernandez R., Holden J.E., Doudet D.J., McKenzie J., Stoessl A.J., Ruth T.J. (2002). Increase in dopamine turnover occurs early in Parkinson's disease: evidence from a new modeling approach to PET 18 F-fluorodopa data. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *22*, 232-239.
- Song D.D., Haber S.N. (2000). Striatal responses to partial dopaminergic lesion: evidence for compensatory sprouting. *J. Neurosci.* *20*, 5102-5114.
- Song D.D., Shults C.W., Sisk A., Rockenstein E., Masliah E. (2004). Enhanced substantia nigra mitochondrial pathology in human alpha-synuclein transgenic mice after treatment with MPTP. *Exp. Neurol.* *186*; 158-172.

- Sparfel L., Van Grevenynghe J., Le Vee M., Aninat C., Fardel O. (2006). Potent inhibition of carcinogen-bioactivating cytochrome P450 1B1 by the p53 inhibitor pifithrin alpha. *Carcinogenesis* 27, 656-663.
- Specht C.G., Schoepfer R. (2001). Deletion of the alpha-synuclein locus in a subpopulation of C57BL/6J inbred mice. *BMC Neurosci.* 2:11.
- Spink B.C., Katz B.H., Hussain M.M., Pang S., Connor S.P., Aldous K.M., Gierthy J.F., Spink DC. (2000). SULT1A1 catalyzes 2-methoxyestradiol sulfonation in MCF-7 breast cancer cells. *Carcinogenesis* 21, 1947-1957.
- Sperl W. (1997). Diagnosis and therapy of mitochondriopathies. *Wien Klin. Wochenschr.* 109, 93-99.
- Spillantini M.G., Crowther R.A., Jakes R., Hasegawa M., Goedert M. (1998). alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6469-6473.
- Springer W., Hoppe T., Schmidt E., Baumeister R. (2005). A *Caenorhabditis elegans* Parkin mutant with altered solubility couples alpha-synuclein aggregation to proteotoxic stress. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3407-3423
- Srinivasan V., Pandi-Perumal S.R., Maestroni G.J., Esquifino A.I., Hardeland R., Cardinali D.P. (2005). Role of melatonin in neurodegenerative diseases. *Neurotox. Res.* 7, 293-318.
- Sriram S.R., Li X., Ko H.S., Chung K.K., Wong E., Lim K.L., Dawson V.L., Dawson T.M. (2005). Familial-associated mutations differentially disrupt the solubility, localization, binding and ubiquitination properties of parkin. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2571-2586.
- Stefanis L., Larsen K.E., Rideout H.J., Sulzer D., Greene L.A. (2001). Expression of A53T mutant but not wild-type alpha-synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. *J. Neurosci.* 21, 9549-9560.
- Steffenach H.A., Sloviter R.S., Moser E.I., Moser M.B. (2002). Impaired retention of spatial memory after transection of longitudinally oriented axons of hippocampal CA3 pyramidal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 3194-3198.
- Stinnett L., Lewin T.M., Coleman R.A. (2007). Mutagenesis of rat acyl-CoA synthetase 4 indicates amino acids that contribute to fatty acid binding. *Biochim. Biophys. Acta.* 1771, 119-125.
- St Martin J.L., Klucken J., Outeiro T.F., Nguyen P., Keller-McGandy C., Cantuti-Castelvetri I., Grammatopoulos T.N., Standaert D.G., Hyman B.T., McLean P.J. (2007). Dopaminergic neuron loss and up-regulation of chaperone protein mRNA induced by targeted over-expression of alpha-synuclein in mouse substantia nigra. *J. Neurochem.* 100, 1449-1457
- Strauss K.M., Martins L.M., Plun-Favreau H., Marx F.P., Kautzmann S., Berg D., Gasser T., Wszolek Z., Muller T., Bornemann A., Wolburg H., Downward J., Riess O., Schulz J.B., Kruger R. (2005). Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2099-2111
- Sulis M.L., Parsons R. (2003). PTEN: from pathology to biology. *Trends Cell Biol.* 13, 478-483

- Sultana H., Rivero F., Blau-Wasser R., Schwager S., Balbo A., Bozzaro S., Schleicher M., Noegel A.A. (2005). Cyclase-associated protein is essential for the functioning of the endo-lysosomal system and provides a link to the actin cytoskeleton. *Traffic* 6, 930-946.
- Svatkova R., Cervinkova Z., Kalous M., Rauchova H., Drahota Z. (1996). Respiratory control index of mitochondria isolated from regenerating rat liver. *Physiol. Res.* 45, 249-252.
- Swerdlow R.H., Parks J.K., Miller S.W., Tuttle J.B., Trimmer P.A., Sheehan J.P., Bennett J.P. Jr., Davis R.E., Parker W.D. Jr. (1996). Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 40, 663-671.
- Taira T., Saito Y., Niki T., Iguchi-Arigo S.M., Takahashi K., Arigo H. (2004). DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep.* 5, 213-218.
- Takahashi L.K., Nakashima B.R., Hong H., Watanabe K. (2005). The smell of danger: a behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 1157-1167.
- Takahashi T., Yamashita H., Nagano Y., Nakamura T., Kohriyama T., Matsumoto M. (2006). Interactions of Synphilin-1 with phospholipids and lipid membranes. *FEBS Lett.* 580, 4479-4484.
- Takamatsu H., Kakiuchi T., Noda A., Uchida H., Nishiyama S., Ichise R., Iwashita A., Mihara K., Yamazaki S., Matsuoka N., Tsukada H., Nishimura S. (2004). An application of a new planar positron imaging system (PPIS) in a small animal: MPTP-induced parkinsonism in mouse. *Ann. Nucl. Med.* 18, 427-431.
- Tan E.K., Tan C., Shen H., Chai A., Lum S.Y., Teoh M.L., Yih Y., Wong M.C., Zhao Y. (2003). Alpha synuclein promoter and risk of Parkinson's disease: microsatellite and allelic size variability. *Neurosci Lett.* 336, 70-72.
- Tan E.K., Puong K.Y., Fook-Chong S., Chua E., Shen H., Yuen Y., Pavanni R., Wong M.C., Puvan K., Zhao Y. (2006) Case-control study of UCHL1 S18Y variant in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 21, 1765-1768.
- Tanaka Y., Engelender S., Igarashi S., Rao R.K., Wanner T., Tanzi R.E., Sawa A., Dawson V., Dawson T.M., Ross C.A. (2001). Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. *Hum. Mol. Genet.* 10, 919-926.
- Tanaka M., Kim Y.M., Lee G., Junn E., Iwatsubo T., Mouradian M.M. (2004). Aggregates formed by alpha-synuclein and synphilin-1 are cytoprotective. *J. Biol. Chem.* 279, 4625-4631.
- Tanner C.M., Ottman R., Goldman S.M., Ellenberg J., Chan P., Mayeux R., Langston J.W. (1999). Parkinson disease in twins: an etiologic study. *JAMA* 281, 341-346.
- Teubner W., Meinel W., Florian S., Kretschmar M., Glatt H. (2007). Identification and localization of soluble sulfotransferases in the human gastrointestinal tract. *Biochem. J.* (in press)
- Thies E., Mandelkow E.M. (2007). Misrouting of tau in neurons causes degeneration of synapses that can be rescued by the kinase MARK2/Par-1. *J. Neurosci.* 27, 2896-2907.
- Totterdell S., Hanger D., Meredith G.E. (2004). The ultrastructural distribution of alpha-synuclein-like protein in normal mouse brain. *Brain Res.* 1004, 61-72.
- Tremblay P., Meiner Z., Galou M., Heinrich C., Petromilli C., Lisse T., Cayetano J., Torchia M., Mobley W., Bujard H., DeArmond S.J., Prusiner S.B. (1998). Doxycycline control of prion

protein transgene expression modulates prion disease in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *95*, 12580-1285.

Tofaris G.K., Garcia Reitböck P., Humby T., Lambourne S.L., O'Connell M., Ghetti B., Gossage H., Emson P.C., Wilkinson L.S., Goedert M., Spillantini M.G. (2006). Pathological changes in dopaminergic nerve cells of the substantia nigra and olfactory bulb in mice transgenic for truncated human alpha-synuclein(1-120): implications for Lewy body disorders. *J. Neurosci.* *26*, 3942-3950.

Turmaine M., Raza A., Mahal A., Mangiarini L., Bates G.P., Davies S.W. (2000). Nonapoptotic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *97*, 8093-8097.

Tycko R. (2004). Progress towards a molecular-level structural understanding of amyloid fibrils. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *14*, 96-103

Unger E.L., Eve D.J., Perez X.A., Reichenbach D.K., Xu Y., Lee M.K., Andrews A.M. (2006). Locomotor hyperactivity and alterations in dopamine neurotransmission are associated with overexpression of A53T mutant human alpha-synuclein in mice. *Neurobiol. Dis.* *21*, 431-443.

Ungerstedt U. (1968). 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur. J. Pharmacol.* *5*, 107-110.

Valente E.M., Salvi S., Ialongo T., Marongiu R., Elia A.E., Caputo V., Romito L., Albanese A., Dallapiccola B., Bentivoglio A.R. (2004a). PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann. Neurol.* *56*, 336-341.

Valente E.M., Abou-Sleiman P.M., Caputo V., Muqit M.M., Harvey K., Gispert S., Ali Z., Del Turco D., Bentivoglio A.R., Healy D.G., Albanese A., Nussbaum R., Gonzalez-Maldonado R., Deller T., Salvi S., Cortelli P., Gilks W.P., Latchman D.S., Harvey R.J., Dallapiccola B., Auburger G., Wood N.W. (2004b). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* *304*, 1158-1160

van der Putten H., Wiederhold K.H., Probst A., Barbieri S., Mistl C., Danner S., Kauffmann S., Hofele K., Spooren W.P., Ruegg M.A., Lin S., Caroni P., Sommer B., Tolnay M., Bilbe G. (2000) Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein. *J. Neurosci.* *20*, 6021-6029.

van de Warrenburg B.P., Lammens M., Lucking C.B., Deneffe P., Wesseling P., Booij J., Praamstra P., Quinn N., Brice A., Horstink M.W. (2001). Clinical and pathologic abnormalities in a family with parkinsonism and parkin gene mutations. *Neurology* *56*, 555-557.

Voikar V., Koks S., Vasar E., Rauvala H. (2001). Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. *Physiol. Behav.* *72*, 271-281.

Volles M.J., Lansbury P.T. Jr. (2002). Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism. *Biochemistry* *41*, 4595-4602.

von Bohlen und Halbach O., Schober A., Kriegstein K. (2004). Genes, proteins, and neurotoxins involved in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* *73*, 151-177

von Coelln R., Dawson V.L., Dawson T.M. (2004a). Parkin-associated Parkinson's disease. *Cell Tissue Res.* *318*, 175-184

- Von Coelln R., Thomas B., Savitt J.M., Lim K.L., Sasaki M., Hess E.J., Dawson V.L., Dawson T.M. (2004b). Loss of locus coeruleus neurons and reduced startle in parkin null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 10744-10749.
- von Coelln R., Thomas B., Andrabi S.A., Lim K.L., Savitt J.M., Saffary R., Stirling W., Bruno K., Hess E.J., Lee M.K., Dawson V.L., Dawson T.M. (2006). Inclusion body formation and neurodegeneration are parkin independent in a mouse model of alpha-synucleinopathy. *J. Neurosci.* *26*, 3685-3696.
- Vyas I., Heikkila R.E., Nicklas W.J. (1986). Studies on the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: inhibition of NAD-linked substrate oxidation by its metabolite, 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J. Neurochem.* *46*, 1501-1507.
- Wakabayashi K., Engelender S., Yoshimoto M., Tsuji S., Ross C.A., Takahashi H. (2000). Synphilin-1 is present in Lewy bodies in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* *47*, 521-523.
- Wallace K.J., Rosen J.B. (2000). Predator odor as an unconditioned fear stimulus in rats: elicitation of freezing by trimethylthiazoline, a component of fox feces. *Behav. Neurosci.* *114*, 912-922.
- Wallace K.J., Rosen J.B. (2001). Neurotoxic lesions of the lateral nucleus of the amygdala decrease conditioned fear but not unconditioned fear of a predator odor: comparison with electrolytic lesions. *J. Neurosci.* *21*, 3619-3627
- Wang Y.L., Takeda A., Osaka H., Hara Y., Furuta A., Setsuie R., Sun Y.J., Kwon J., Sato Y., Sakurai M., Noda M., Yoshikawa Y., Wada K. (2004). Accumulation of beta- and gamma-synucleins in the ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1-deficient gad mouse. *Brain Res.* *1019*, 1-9.
- Wang Q.J., Ding Y., Kohtz D.S., Mizushima N., Cristea I.M., Rout M.P., Chait B.T., Zhong Y., Heintz N., Yue Z. (2006). Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration. *J. Neurosci.* *26*, 8057-8068.
- Watts R.L., Raiser C.D., Stover N.P., Cornfeldt M.L., Schweikert A.W., Allen R.C., Subramanian T., Doudet D., Honey C.R., Bakay R.A. (2003). Stereotaxic intrastriatal implantation of human retinal pigment epithelial (hRPE) cells attached to gelatin microcarriers: a potential new cell therapy for Parkinson's disease. *J. Neural. Transm. Suppl.* 215-227
- Werner S.R., Lee P.A., DeCamp M.W., Crowell D.N., Randall S.K., Crowell P.L. (2003). Enhanced cell cycle progression and down regulation of p21(Cip1/Waf1) by PRL tyrosine phosphatases. *Cancer Lett.* *202*, 201-211.
- Wersinger C., Sidhu A. (2003) Attenuation of dopamine transporter activity by alpha-synuclein. *Neurosci. Lett.* *340*, 189-192.
- Weissman L., de Souza-Pinto N.C., Stevnsner T., Bohr V.A. (2006). DNA repair, mitochondria, and neurodegeneration. *Neuroscience* (in press)
- West A.B., Moore D.J., Biskup S., Bugayenko A., Smith W.W., Ross C.A., Dawson V.L., Dawson T.M. (2005). Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 16842-16847
- West A.B., Maidment N.T. (2004). Genetics of parkin-linked disease. *Hum. Genet.* *114*, 327-336
- Whone A.L., Moore R.Y., Piccini P.P., Brooks D.J. (2003). Plasticity of the nigropallidal pathway in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* *53*, 206-213.

- Winkler J., Ramirez GA., Thal L.J., Waite J.J. (2000). Nerve growth factor (NGF) augments cortical and hippocampal cholinergic functioning after p75NGF receptor-mediated deafferentation but impairs inhibitory avoidance and induces fear-related behaviors. *J. Neurosci.* *20*, 834-844.
- Winner B., Lie D.C., Rockenstein E., Aigner R., Aigner L., Masliah E., Kuhn H.G., Winkler J. (2004). Human wild-type alpha-synuclein impairs neurogenesis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *63*, 1155-1166.
- Winner B., Geyer M., Couillard-Despres S., Aigner R., Bogdahn U., Aigner L., Kuhn G., Winkler J. (2006). Striatal deafferentation increases dopaminergic neurogenesis in the adult olfactory bulb. *Exp. Neurol.* *197*, 113-121.
- Winner B., Rockenstein E., Lie D.C., Aigner R., Mante M., Bogdahn U., Couillard-Depres S., Masliah E., Winkler J. (2007). Mutant alpha-synuclein exacerbates age-related decrease of neurogenesis. *Neurobiol. Aging* (in press)
- Wood-Kaczmar A., Gandhi S., Wood N.W. (2006). Understanding the molecular causes of Parkinson's disease. *Trends Mol. Med.* *12*, 521-528.
- Xing D., Chen P., Keil R., Kilts C.D., Shi B., Camp V.M., Malveaux G., Ely T., Owens M.J., Votaw J., Davis M., Hoffman J.M., BaKay R.A., Subramanian T., Watts R.L., Goodman M.M. (2000). Synthesis, biodistribution, and primate imaging of fluorine-18 labeled 2beta-carbo-1'-fluoro-2-propoxy-3beta-(4-chlorophenyl)tr opanes. Ligands for the imaging of dopamine transporters by positron emission tomography. *J. Med. Chem.* *43*, 639-648.
- Yang Y., Gehrke S., Imai Y., Huang Z., Ouyang Y., Wang J.W., Yang L., Beal M.F., Vogel H., Lu B. (2006). Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila Pink1* is rescued by *Parkin*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 10793-10798.
- Yamada M., Mizuno Y., Mochizuki H. (2005). *Parkin* gene therapy for alpha-synucleinopathy: a rat model of Parkinson's disease. *Hum. Gene.* *16*, 262-270.
- Yamada M., Onodera M., Mizuno Y., Mochizuki H. (2004). Neurogenesis in olfactory bulb identified by retroviral labeling in normal and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated adult mice. *Neuroscience* *124*, 173-181.
- Yamamoto A., Lucas J.J., Hen R. (2000). Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* *101*, 57-66.
- Yamazaki K., Wakasugi N., Tomita T., Kikuchi T., Mukoyama M., Ando K. (1988). Gracile axonal dystrophy (GAD), a new neurological mutant in the mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* *187*, 209-215.
- Yasuda T., Miyachi S., Kitagawa R., Wada K., Nihira T., Ren Y.R., Hirai Y., Ageyama N., Terao K., Shimada T., Takada M., Mizuno Y., Mochizuki H. (2007). Neuronal specificity of alpha-synuclein toxicity and effect of *Parkin* co-expression in primates. *Neuroscience* *144*, 743-753.
- Yavich L., Tanila H., Vepsalainen S., Jakala P. (2004). Role of alpha-synuclein in presynaptic dopamine recruitment. *J. Neurosci.* *24*, 11165-11170.
- Ye Y., Shibata Y., Yun C., Ron D., Rapoport T.A. (2004). A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* *429*, 841-847.

- Yokota T., Sugawara K., Ito K., Takahashi R., Ariga H., Mizusawa H. (2003). Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *312*, 1342-1348.
- Yoshino H., Nakagawa-Hattori Y., Kondo T., Mizuno Y. (1992). Mitochondrial complex I and II activities of lymphocytes and platelets in Parkinson's disease. *J. Neural. Transm. Park. Dis. Dement. Sect.* *4*, 27-34.
- Yu H., Sternad D., Corcos D.M., Vaillancourt D.E. (2007). Role of hyperactive cerebellum and motor cortex in Parkinson's disease. *Neuroimage* *35*, 222-233.
- Zabetian C.P., Samii A., Mosley A.D., Roberts J.W., Leis B.C., Yearout D., Raskind W.H., Griffith A. (2005). A clinic-based study of the LRRK2 gene in Parkinson disease yields new mutations. *Neurology* *65*, 741-744.
- Zarranz J.J., Alegre J., Gomez-Esteban J.C., Lezcano E., Ros R., Ampuero I., Vidal L., Hoenicka J., Rodriguez O., Ateas B., Llorens V., Gomez Tortosa E., del Ser T., Munoz D.G., de Yebenes J.G. (2004). The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.* *55*, 164-173.
- Zeng B.Y., Medhurst A.D., Jackson M., Rose S., Jenner P. (2005). Proteasomal activity in brain differs between species and brain regions and changes with age. *Mech. Ageing Dev.* *126*, 760-766
- Zhao M., Momma S., Delfani K., Carlen M., Cassidy R.M., Johansson C.B., Brismar H., Shupliakov O., Frisen J., Janson A.M. (2003). Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *100*, 7925-7930.
- Zhang Y., Gao J., Chung K.K., Huang H., Dawson V.L., Dawson T.M. (2000). Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*, 13354-13359.
- Zhou W., Zhu M., Wilson M.A., Petsko G.A., Fink A.L. (2006). The oxidation state of DJ-1 regulates its chaperone activity toward alpha-synuclein. *J. Mol. Biol.* *356*, 1036-1048.
- Zhu X., Siedlak S.L., Smith M.A., Perry G., Chen SG. (2006). LRRK2 protein is a component of Lewy bodies. *Ann. Neurol.* *60*, 617-618
- Zigmond M.J., Abercrombie E.D., Berger T.W., Grace A.A., Stricker E.M. (1990). Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications. *Trends Neurosci.* *13*, 290-296.
- Zimprich A., Biskup S., Leitner P., Lichtner P., Farrer M., Lincoln S., Kachergus J., Hulihan M., Uitti R.J., Calne D.B., Stoessl A.J., Pfeiffer R.F., Patenge N., Carbajal I.C., Vieregge P., Asmus F., Muller-Myhsok B., Dickson D.W., Meitinger T., Strom T.M., Wszolek Z.K., Gasser T. (2004). Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* *44*, 601-607.
- Zu T., Duvick L.A., Kaytor M.D., Berlinger M.S., Zoghbi H.Y., Clark H.B., Orr H.T. (2004). Recovery from polyglutamine-induced neurodegeneration in conditional SCA1 transgenic mice. *J. Neurosci.* *24*, 8853-8861.
- Zueger M., Urani A., Chourbaji S., Zacher C., Roche M., Harkin A., Gass P. (2005). Olfactory bulbectomy in mice induces alterations in exploratory behavior. *Neurosci. Lett.* *374*, 142-146.

7 Anhang

7.1 Tagungsbeiträge und Auszeichnungen (Poster Communications)

7.1.1 Leipzig: 13th Annual Meeting GSHG: 29.09.-02.10.2002

S.Nuber², C.Holzmann¹, T.Schmidt¹, I.Schmitt³, M.Neumann⁴, A.Bornemann⁵, F. Zimmermann⁶, S.B. Prusiner⁸, W.Kuhn⁷, A.Servadio⁹ U.Grasshoff² and O.Riess² (2002) **Conditional Expression of Human alpha-Synuclein in Mice.** *MedGen, Vol.3:* 331

7.1.2 Ulm: 8.Tagung der Gesellschaft für Neurogenetik: 05.-07. Dezember 2002

S.Nuber¹, C.Holzmann², T.Schmidt¹, I.Schmitt³, M.Neumann⁴, A.Bornemann⁵, F. Zimmermann⁶, S.B.Prusiner⁷, W.Kuhn⁸, U.Grasshoff¹, A.Wree⁹, and O.Riess¹ (2002) **Conditional Expression of Human alpha-Synuclein in Mice.**

7.1.3 Tübingen: 9. Tagung der Gesellschaft für Neurogenetik: 2003

S. Nuber¹, Th. Schmidt¹, D. Berg¹, U. Grasshoff¹, C. Holzmann², I.Schmitt³, M. Neumann⁴, A. Bornemann⁵, F. Zimmermann⁶, S.B. Prusiner⁷, W. Kuhn⁸, A. Servadio⁹ and O. Riess¹ (2003) **Conditional Expression of Wild-Type and Parkinson's Disease-Associated Mutant alpha-Synuclein in Transgenic Mice.**

7.1.4 Marburg: 14th Annual Meeting of the German Society of Human Genetics: 01.-04.Oktober 2003

S. Nuber¹, Th. Schmidt¹, D. Berg¹, C. Holzmann², U. Grasshoff¹, I.Schmitt³, M. Neumann⁴, A. Bornemann⁵, F. Zimmermann⁶, S.B. Prusiner⁷, W. Kuhn⁸, A. Wree⁹, A. Servadio¹⁰ and O. Riess¹ (2003) **Characterization of a conditional mouse-model for alpha-synucleinopathies.** *MedGen, Vol.3:* 345

7.1.5 Dresden: 3. Dt. Parkinsonkongress, Dresden: 05.-08.März 2003

S. Nuber¹, C. Holzmann², T. Schmidt¹, I. Schmitt³, M. Neumann⁴, A. Bornemann⁵, F. Zimmermann⁶, S.B. Prusiner⁷, W. Kuhn⁸, U. Grasshoff¹ A. Wree⁹ and O. Riess¹ (2003) **Synucleinopathies: An inducible Mouse-Model.** *J Neural Transm* 110:1435-1463 (**Poster-Preis**)

7.1.6 Hamburg: Dt. Gesellschaft für Neurologie, Hamburg:03.-06.September 2003

S.Nuber¹, Th. Schmidt¹, D.Berg¹, U.Grasshoff¹, C.Holzmann², I.Schmitt³, M.Neumann⁴, A.Bornemann⁵, F. Zimmermann⁶, S.B. Prusiner⁸, W.Kuhn⁷, A.Servadio⁹, and O.Riess¹ (2004) **Characterization of an inducible mouse-model, expressing the human alpha-synuclein.** *Aktuelle Neurologie*, 30, Suppl 1:S1-S236 (**Poster-Preis**)

7.1.7 München: European Human Genetic Conference, München: 12.-15. Juni 2004

S.Nuber¹, Th.Schmidt¹, D.Berg¹, M.Neumann⁴, C.Holzmann², M.Fendt¹⁰, U.Grasshoff¹, I.Schmitt³, A.Bornemann⁵, F.Zimmermann⁶, W.Kuhn⁷, S.B.Prusiner⁸, M.Bonin¹, A.Servadio⁹, and O.Riess¹ (2004) **Inducible expression of human alpha-synuclein in transgenic mice.** *Eur J Hum Genet* 12, Suppl 1: 330-31

7.1.8 Düsseldorf: Dt.Gesellschaft für Neurologie, Düsseldorf: 06.-09. Oktober 2004

S.Nuber¹, Th.Schmidt¹, D.Berg¹, M.Neumann⁴, C.Holzmann², M.Fendt¹⁰, U.Grasshoff¹, I.Schmitt³, A.Bornemann⁵, F.Zimmermann⁶, W.Kuhn⁷, S.B.Prusiner⁸, M.Bonin¹, A.Servadio⁹, and O.Riess¹ (2004) **Conditional Control of human Wild-Type and Parkinson's Disease-Associated Mutant alpha-Synuclein in Transgenic Mouse Brain.** *Aktuelle Neurologie*,31, Suppl 1: S1-S190 (**Poster-Preis**)

7.1.9 Frankfurt: 4. Dt.Parkinson-Kongress, Frankfurt am Main 03.-05. März 2005

S.Nuber¹, Th.Schmidt¹, H.W. Habbes², M. Löbbbecke-Schumacher², D.Berg¹, M. Neumann³, C.Holzmann⁴, M.Fendt⁵, U.Grasshoff¹, J. Boy¹, I.Schmitt⁶, A.Bornemann⁷, F.Zimmermann⁸, W.Kuhn⁹, S.B.Prusiner¹⁰, A.Servadio¹¹, E. Petrasch-Parwez² and O.Riess¹ (2005) **Konditionelle Expression des humanen alpha-Synucleins in einem Mausmodell für den Morbus Parkinson.** *Neurologie, 32, Suppl 1: S1-S38*

7.1.10 Berlin: 16th International Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders: 05.-09. Juni 2005

S.Nuber¹, Th.Schmidt¹, H.W. Habbes², M. Löbbbecke-Schumacher², P.Teismann³, JB Schulz³, M. Neumann⁴, M.Fendt⁵, D.Berg¹, C.Holzmann⁶, U.Grasshoff¹, J. Boy¹, I.Schmitt⁷, A.Bornemann⁸, F.Zimmermann⁹, W.Kuhn¹⁰, S.B.Prusiner¹¹, E. Petrasch-Parwez² and O.Riess¹ (2005) **Conditional Control of Human alpha-Synuclein Expression in Mouse Models of Parkinson's Disease.** *Parkinsonism & Related Disorders (11), Suppl 2*

7.1.11 Wiesbaden: Dt.Gesellschaft für Neurologie, Wiesbaden: 21.-24. September 2005

S.Nuber¹, Th.Schmidt¹, H.W. Habbes², M. Löbbbecke-Schumacher², P.Teismann³, JB Schulz³, B. Pichler⁴, M. Neumann⁵, M.Fendt⁶, D.Berg¹, C.Holzmann⁷, U.Grasshoff¹, J. Boy¹, I.Schmitt⁸, A.Bornemann⁹, F.Zimmermann¹⁰, W.Kuhn¹¹, S.B.Prusiner¹², E. Petrasch-Parwez² and O.Riess¹ **Conditional Control of Human Wildtype and Mutated [A30P] alpha-Synuclein in a Mouse Model of Parkinson's Disease.** *Aktuelle Neurologie, 32, Suppl 4: S113-S296 (Poster-Preis)*

7.1.12 Berlin: Abstract for Neurodegenerative Diseases: Molecular Mechanisms in a Functional Genomics Framework; Berlin: 6.-9. September 2006

S. Nuber¹, E. Petrasch-Parwez², B. Winner³, J. Winkler³, F.Gellerich⁴, Th. Schmidt¹, H.W. Habbes², M. Löbbbecke-Schumacher², P.Teismann⁵, JB Schulz⁶, M. Neumann⁷, M.Fendt⁸, H. Nguyen¹, D.Berg¹, C.Holzmann⁹, J. Boy¹, M.Kuhn¹, S. von Hörsten¹⁰, I. Schmitt¹¹, A.Bornemann¹², F.Zimmermann¹³, W.Kuhn¹⁴, S.B.Prusiner¹⁵, A. Servadio¹⁶, K. Dietz¹⁷ B. Pichler¹⁸ and O.Riess¹

INDUCIBLE EXPRESSION OF PARKINSON'S DISEASE ASSOCIATED HUMAN ALPHA-SYNUCLEIN IN TRANSGENIC MICE.

7.1.13 Mannheim: Abstract für 79. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) 32. Jahrestagung der Gesellschaft für Neuropädiatrie (GNP) NEUROWOCHE 2006; Mannheim: 20. bis 24. September 2006

S.Nuber¹, E. Petrasch-Parwez², Th.Schmidt¹, H. Habbes², M. Löbbbecke-Schumacher², P.Teismann³, JB Schulz⁴, M. Neumann⁵, M.Fendt⁶, B. Pichler⁷, H. Nguyen¹, D.Berg¹, C.Holzmann⁸, J. Boy¹, M.Kuhn¹, S. von Hörsten⁹, I.Schmitt¹⁰, A.Bornemann¹¹, F.Zimmermann¹², W.Kuhn¹³, S.B.Prusiner¹⁴, A. Servadio¹⁵, K. Dietz¹⁶ and O.Riess (2006)

Characterization of a Conditional Mouse-Model of Parkinson's Disease.

Aktuelle Neurologie, Suppl S

7.1.14 Atlanta: Society's 36th annual meeting, Atlanta: 14.-18. Oktober 2006

S.Nuber¹, E. Petrasch-Parwez², F.N. Gellerich³, Th.Schmidt¹, P.Teismann⁴, JB Schulz⁵, M.Fendt⁶, C.Holzmann⁷, H. Nguyen¹, M.Kuhn¹, J. Boy¹, S.B.Prusiner⁸, K. Dietz⁹, B.Pichler¹⁰ and O.Riess¹ (2006) **Conditional Mouse-Models of Parkinson's Disease.**

Soc Neurosci Abstr Vol Part p

CURRICULUM VITAEPersönliche Daten

Silke Maria Nuber

Geboren am 04. 11. 1977 in Krumbach (Schwaben)

Schulbildung1988 – 1997 Ringeisen-Gymnasium der Sankt Josefkongregation Ursberg
(Schwaben)

27.06. 1997 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

1997 – 2002 Studium der Biologie an der Universität Rostock

29. 09. 1999 Diplom-Vorprüfung

09. 2001 – 08. 2002 Diplomarbeit unter der Leitung von Prof. Dr. O. Rieß mit dem Thema
„Generierung und Charakterisierung transgener Mäuse für
neurodegenerative Erkrankungen des Menschen am Beispiel der
Synucleinopathien“

16. 12. 2002 Abschluss als Diplom-Biologin

01. 2003 – 06. 2007 Promotion in der Abteilung für Medizinische Genetik der
Universitätsklinikums Tübingen der Universität Tübingen unter der
Leitung von Prof. Dr. O. Rieß mit dem Thema „Untersuchung des
Expressionsmusters und der Neuropathologie konditionaler
Mausmodelle des Morbus Parkinson“

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. O. Rieß danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die ausgezeichnete Betreuung und Förderung und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der Medizinischen Genetik.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. M. Schwarz für die Übernahme des Korreferates.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Elisabeth Petrasch-Parwez für die intensive Betreuung bei der immunhistochemischen Analyse, die vielen Ratschläge und konstruktiven Diskussionen, die die Analyse dieser Mausmodelle auf ein höheres Niveau setze. Mein zweiter ganz besonderer Dank gilt Dr. Thorsten Schmidt, für die ständige Hilfsbereitschaft, die kritische Durchsicht dieser Arbeit und Vorschlägen bei schwierigen Fragestellungen.

Ebenso danken möchte ich Dr. Peter Teismann für die aufwendigen HPLC-Messungen, und Prof. Dr. Jürgen Winkler und Dr. Beate Winner für die uneingeschränkte und so freundliche Kooperation. Für das gemeinsame Angehen von Pilotprojekten, die immer viel Zeit- und Arbeitsaufwand bedeuten, möchte ich mich bei Prof. Dr. Klaus Dietz, Dr. Frank N. Gellerich, Dr. Bernd Pichler und Dr. Lars Stolze ganz herzlich danken. Dr. Daniela Berg und Dr. Stephan von Hörsten möchte ich ebenso für die Anregungen in- und ausserhalb des Rahmens der Parkinson-Treffen danken. Jana Boy, Melanie Kuhn und Silke Metzger möchte ich für die schöne Zeit und einer Freundschaft danken, die über die alltägliche Arbeit hinausging. Arne Bartol, Felix Schaller, Julia Zerle und Hakan Essmer danke ich für die tatkräftige Unterstützung und die freundlichen Worte im Laboralltag. Dr. Hoa Nguyen möchte ich besonders für die zahlreichen Paper, die hilfreichen Diskussionen und dafür danken, dass er neue Wege zeigt.

Darüberhinaus gilt mein Dank allen anderen Mitarbeitern der Abteilung für Medizinische Genetik für ein sehr nettes und kollegiales Arbeitsklima.

Meinen Eltern Heidrun und Gerhard Nuber bin ich zu besonderem Dank verpflichtet. Sie haben immer hinter mir gestanden und ohne ihre Unterstützung wären Studium und Promotion niemals möglich gewesen.

Mein größter Dank gilt aber meinem Lebensgefährten Dieter Sievert der mir wann immer möglich den Rücken freigehalten hat und für seine liebevolle moralische Unterstützung in harten Zeiten.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig erfasst und bei keiner anderen Fakultät eingereicht und dass ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Es handelt sich bei der heute von mir eingereichten Dissertation um 6 in Wort und Bild völlig übereinstimmende Exemplare. Weiterhin erkläre ich, dass digitale Abbildungen nur die originalen Daten enthalten und in keinem Fall inhaltsverändernde Bildbearbeitung vorgenommen wurde.

Tübingen den,

(Unterschrift)