

Charakterisierung des Einflusses einer Hochfett Diät auf die Neurodegeneration eines Mausmodells für α -Synukleinopathie

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Carola Rotermund

aus München

Tübingen

2014

Tag der mündlichen Qualifikation:

02.10.2014

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Philipp Kahle

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Olaf Rieß

**„Life is too important to be
taken seriously.“**

(Oscar Wilde)

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Abbildungsverzeichnis	V
III	Tabellenverzeichnis	VII
IV	Abkürzungsverzeichnis	VIII
V	Zusammenfassung	XI
1	Einleitung	1
1.1	Die Parkinson Krankheit	1
1.1.1	Genetische und nicht genetische Faktoren sind mit der Parkinson Krankheit assoziiert	1
1.1.2	Lewy Körperchen sowie der Untergang dopaminerger Neuronen sind die neuropathologischen Kennzeichen der Parkinson Krankheit	3
1.2	α -Synuklein	4
1.2.1	α -Synuklein ist ein natürlich ungefaltetes Protein und kann in drei Domänen unterteilt werden	5
1.2.2	Die physiologische Funktion von α -Synuklein ist mit zellulärem Transport assoziiert	6
1.2.3	α -Synuklein aggregiert bei der Parkinson Krankheit und anderen Synukleinopathien	8
1.2.4	α -Synuklein weist verschiedene Phosphorylierungsstellen auf	9
1.2.5	α -Synuklein interagiert mit freien Fettsäuren	11
1.2.6	Verschiedene Mausmodelle existieren für Synukleinopathien	12
1.3	Diabetes Mellitus	14
1.3.1	Genetische und nicht genetische Faktoren sind mit Diabetes Mellitus assoziiert	14
1.3.2	Übergewicht und Insulinresistenz können Diabetes Mellitus induzieren	15
1.3.3	Beeinträchtigt Insulin-Signaling über den Akt Signalweg kennzeichnet Diabetes Mellitus	16
1.3.4	Insulin spielt eine wichtige Rolle im zentralen Nervensystem	19
1.4	Übergewicht, Insulinresistenz und die Parkinson Krankheit	20

1.4.1	Widersprüchliche Ergebnisse über den Zusammenhang zwischen Diabetes Mellitus und der Parkinson Krankheit in Humanstudien	21
1.4.2	Widersprüchliche Ergebnisse über den Zusammenhang zwischen Fettaufnahme und der Parkinson Krankheit in Humanstudien.....	23
1.4.3	Mausstudien zeigen einen möglichen Zusammenhang zwischen Übergewicht, Insulinresistenz und der Parkinson Krankheit	24
1.5	Störungen in gemeinsamen Signalwegen bei Diabetes Mellitus und der Parkinson Krankheit	26
1.5.1	Störungen der Autophagie und der Mitochondrienfunktion sind mit der Parkinson Krankheit und mit Diabetes Mellitus assoziiert.....	26
1.5.2	Erhöhte periphere Inflammationsprozesse zeigen sich bei Diabetes Mellitus und der Parkinson Krankheit	28
1.5.3	Gesteigerte Neuroinflammation kann bei der Parkinson Krankheit und bei Diabetes Mellitus nachgewiesen werden.....	29
1.6	Die Rolle des Hirnstamms bei der Parkinson Krankheit und bei Diabetes Mellitus	31
1.7	Zielsetzung	34
2	Methoden	35
2.1	<i>In vivo</i> Experimente.....	35
2.1.1	Verwendete Tiere und Zuchtbedingungen.....	35
2.1.2	Hochfett-Futter	35
2.1.3	Glukose Toleranztest	36
2.1.4	Rota Rod	37
2.1.5	Cat Walk	37
2.1.6	Open Field	38
2.1.7	Angstkonditionierung	39
2.1.8	Töten der Mäuse und Gehirnentnahme.....	40
2.2	Proteinbiochemische Methoden	40
2.2.1	Lyse von Mäusegehirnen zur Proteinisolation	40
2.2.2	Bestimmen des Gesamtproteingehalts.....	41
2.2.3	SDS-PAGE	41
2.2.4	Western Blot	42
2.2.5	“Strippen” der PVDF-Membranen	43
2.3	Histologie	43
2.3.1	Präparation von Paraffin-Schnitten.....	43

2.3.2	Immunhistochemie	43
2.3.3	Gallyas Silber Färbung.....	44
2.3.4	Thioflavin-S Färbung	45
2.3.5	Mikroskopie und densitometrische Auswertung.....	45
2.3.6	Statistik.....	45
3	Ergebnisse	46
3.1	Einfluss der Hochfett Diät auf <i>in vivo</i> Parameter h[A30P]αSyn transgener Mäuse	46
3.1.1	Erhöhtes Körpergewicht.....	46
3.1.2	Verschlechterte Glukose-Toleranz	48
3.1.3	Verkürzte Lebensspanne	50
3.1.4	Beeinträchtigt Lernen in der Angstkonditionierung	52
3.1.5	Verschlechterte relative Laufleistung im Rota Rod	55
3.1.6	Verminderte Laufdistanz, Geschwindigkeit und Verweildauer in den inneren Zonen im Open Field	57
3.1.7	Vorzeitiges Scheitern im Cat Walk.....	61
3.1.8	Zusammenfassung des Einflusses der Hochfett Diät auf die untersuchten <i>in vivo</i> Parameter	63
3.2	Einfluss der Hochfett Diät auf histologische und proteinbiochemische Parameter.	65
3.2.1	Einfluss der Hochfett Diät auf die Entwicklung der Synukleinopathie im Hirnstamm.....	65
3.2.1.1	Kein Unterschied im h[A30P]αSyn Proteinlevel.....	65
3.2.1.2	Vorzeitige pathologische Phosphorylierung von α-Synuklein am Serin-129.....	66
3.2.1.3	Vorzeitiges Auftreten Gallyas-Silber positiver Strukturen.....	69
3.2.1.4	Vorzeitiges Auftreten Thioflavin-S positiver, amyloidartiger Strukturen.....	72
3.2.2	Vorzeitige Astrogliose im Hirnstamm nach Fütterung der Hochfett Diät ...	72
3.2.3	Kein Einfluss der Hochfett Diät auf Synukleinopathie und Astrogliose in anderen untersuchten Hirnregionen	75
3.2.4	Verminderte Akt-Phosphorylierung im Hirnstamm nach Fütterung der Hochfett Diät	77
3.2.5	Kein Einfluss der Hochfett Diät auf GRK 5 im Hirnstamm	79
3.2.6	Zusammenfassung des Einflusses der Hochfett Diät auf histologische und proteinbiochemische Parameter	81

4	Diskussion	82
4.1	Die Hochfett Diät beeinflusst <i>in vivo</i> Parameter bei h[A30P]αSyn transgenen Mäusen	82
4.1.1	Die Hochfett Diät induziert ein erhöhtes Körpergewicht und einen gestörten Glukosemetabolismus.....	83
4.1.2	Verkürzte Lebensspanne nach Fütterung der Hochfett Diät.....	84
4.1.3	Verfrühte Beeinträchtigungen im emotionalen Lernen durch die Hochfett Diät	86
4.1.4	Veränderungen in motorischen Parametern durch die Hochfett Diät.....	88
4.2	Die Hochfett Diät beeinflusst die Entwicklung histologischer und proteinbiochemischer Parameter im Hirnstamm	90
4.2.1	Verfrühte Ausprägung der Synukleinopathie nach Fütterung der Hochfett Diät	91
4.2.2	Vorzeitige Astrogliose nach Fütterung der Hochfett Diät.....	92
4.2.3	Verminderte Akt Phosphorylierung im Hirnstamm h[A30P]αSyn transgener Mäuse.....	94
4.2.4	Erhöhte GRK 5 Proteinmenge bei alten h[A30P]αSyn transgenen Mäusen, unabhängig von der Diät.....	95
4.3	Zusammenfassende Diskussion.....	97
5	Perspektiven	99
6	Materialien	103
6.1	Chemikalien.....	103
6.2	Puffer und Lösungen	104
6.3	Verbrauchsmaterialien.....	106
6.4	Kits	106
6.5	Geräte	106
7	Literaturverzeichnis	108
8	Anhang	141
8.1	Publikationen und Mitwirkungen	141
8.2	Danksagung	143

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Primärstruktur von α -Synuklein	5
Abbildung 1.2	Schematische Darstellung der α -Synuklein Aggregation.....	7
Abbildung 1.3	Akt Aktivierung über Rezeptor-Tyrosinkinasen und den PI3K Signalweg.	17
Abbildung 1.4	Beeinträchtigte Signalwege bei der Parkinson Krankheit und bei Diabetes Mellitus.....	26
Abbildung 1.5	Schematische Übersicht eines Sagittalschnitts eines Mausgehirns	32
Abbildung 2.1	Makronährstoffe und Fettsäureprofil von SD und HFD	36
Abbildung 2.2	Virtuelle Einteilung des Open Fields	38
Abbildung 3.1	Zeitliche Übersicht der <i>in vivo</i> Experimente	46
Abbildung 3.2	Erhöhtes Körpergewicht nach Fütterung der HFD	47
Abbildung 3.3	Verschlechterte Glukosetoleranz im GTT nach Fütterung der HFD	49
Abbildung 3.4	Verminderte Lebensspanne h[A30P] α Syn transgener Mäuse mit HFD	51
Abbildung 3.5	Verfrühte Beeinträchtigung h[A30P] α Syn transgener Mäuse im Kontext und Cued Lernen der Angstkonditionierung nach Fütterung der HFD ..	53
Abbildung 3.6	Verminderte Laufzeit im Rota Rod nach Fütterung der HFD	55
Abbildung 3.7	Verändertes Verhalten im Open Field nach Fütterung der HFD	58
Abbildung 3.8	Verfrühtes Scheitern im Cat Walk h[A30P] α Syn transgener Mäuse mit HFD	61
Abbildung 3.9	Kein Unterschied bei verschiedenen Schrittparametern zwischen h[A30P] α Syn transgenen Mäusen mit SD und mit HFD	62
Abbildung 3.10	Kein Unterschied in der h[A30P] α Syn Proteinmenge im Hirnstamm h[A30P] α Syn transgener Mäuse mit SD und mit HFD	66
Abbildung 3.11	Vorzeitige pathologische S129- α Syn Phosphorylierung im Hirnstamm h[A30P] α Syn transgener Mäuse mit HFD	67
Abbildung 3.12	Vorzeitig erhöhte pS129- α Syn Proteinmenge im Hirnstamm h[A30P] α Syn transgener Mäuse mit HFD bei unveränderter Menge an h[A30P] α Syn	68
Abbildung 3.13	Vorzeitiges Auftreten Gallyas-Silber positiver Strukturen im Hirnstamm h[A30P] α Syn transgener Mäuse Abbildung	70
Abbildung 3.14	Vorzeitiges Auftreten Thioflavin-S positiver, Amyloid-artiger Strukturen im Hirnstamm h[A30P] α Syn transgener Mäuse mit HFD	71

Abbildung 3.15	Vorzeitige Astrogliose im Hirnstamm h[A30P] α Syn transgener Mäuse mit HFD	74
Abbildung 3.16	Vorzeitig erhöhte GFAP-Proteinmenge im Hirnstamm h[A30P] α Syn transgener Mäuse mit HFD	75
Abbildung 3.17	Verminderte T308- und S473-Akt-Phosphorylierung im Hirnstamm h[A30P] α Syn transgener Mäuse mit HFD	78
Abbildung 3.18	Erhöhte GRK 5 Proteinmenge im Hirnstamm alter h[A30P] α Syn transgener Mäuse mit SD	80
Abbildung 3.19	Erhöhte GRK 5 Proteinmenge im Hirnstamm alter h[A30P] α Syn transgener Mäuse mit SD im Western Blot	81
Abbildung. 4.1	Übersicht der Auswirkungen der HFD im untersuchten h[A30P] α Syn transgenen Mausmodell	98

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Mit Parkinsonismus assoziierte Gene	2
Tabelle 1.2	Fall-Kontroll-Studien über den Zusammenhang von DM und der PK ..	22
Tabelle 1.3	Prospektive Kohorten Studien über den Zusammenhang von DM und der PK	23
Tabelle 2.1	Zusammensetzung der Makronährstoffe der HFD und SD	36
Tabelle 2.2	Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel der SDS-Page	41
Tabelle 2.3	Verwendete Primär- und Sekundär-Antikörper im Western Blot und der Immunohistochemie	42
Tabelle 3.1	Entwicklung des Körpergewichts	47
Tabelle 3.2	Blutglukosekonzentrationen im Glukose Toleranztest	50
Tabelle 3.3	Laufdistanz im Kontext und Cued Test der Angstkonditionierung	54
Tabelle 3.4	Laufleistung auf dem Rota Rod	56
Tabelle 3.5	Laufdistanz, Geschwindigkeit und Körpergewicht im Open Field	59
Tabelle 3.6	Verweildauer in den verschiedenen Zonen des Open Fields	60
Tabelle 3.7	Schrittlänge, Fußabdrucklänge und mittlere Abdruckintensität im Cat Walk	63
Tabelle 3.8	Kein Einfluss der HFD auf die Synukleinopathie und Astrogliose in Cortex, Cerebellum und Hippocampus	76

IV Abkürzungsverzeichnis

α Syn	α -Synuklein
α Syn HFD	h[A30P] α Synuklein transgene Mäuse mit HFD
α Syn SD	h[A30P] α Synuklein transgene Mäuse mit SD
AA	Arachidonsäure
Abb	Abbildung
AD	Autosomal-dominant
AGE	Advanced glycation endproduct
AK	Antikörper
ALP	Autophagy-lysosom pathway (Autophagie-Lysosom Signalweg)
AR	Autosomal-rezessiv
AS	Aminosäure(n) A: Alanin D: Asparaginsäure E: Glutaminsäure G: Glycin H: Histidin K: Lysin P: Prolin Q: Glutamin S: Serin T: Threonin Y: Tyrosin
ASe	Antiserum
AS160	Akt Substrat von 160 kDa
ATG7	Autophagy-related protein 7 (Autophagie verwandtes Protein 7)
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BLA	Basolaterale Amygdala
BMI	Body mass index (Körpermaßindex)
CA	<i>Cornu Ammonis</i>
CK	Casein Kinase
CS	Conditioned stimulus (Konditionierter Stimulus)
CSP- α	Cystein string protein- α
DAMP	Damage-associated molecular patterns
DHA	Docosahexaensäure
DLK	Demenz mit Lewy Körperchen
DM	Diabetes mellitus
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase (DNA-abhängige Proteinkinase)
DP	Dystonie-Parkinson
Dyrk-1A	Dual specificity tyrosine regulated kinase 1A
EtOH	Ethanol
EOPD	Early-onset parkinson disease (früh einsetzender Parkinson)
ER	Endoplasmatisches reticulum
FFA	Free fatty acids (Freie Fettsäuren)

GAP	GTPase activating protein (GTPase aktivierendes Protein)
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GCase	Glucocerebrosidase
GFAP	Glial fibrillary acidic protein (Saures Gliafaserprotein)
GH	Growth Hormone (Wachstumshormon)
GLUT-4	Glucose transporter 4 (Glukosetransporter 4)
GPCR	G protein-coupled receptor (G-Protein gekoppelter Rezeptor)
GRK	G protein-coupled receptor kinase (G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen)
GTT	Glukose Toleranztest
h	Human
h[A30P] α Syn	Humanes α Syn mit der A30P Punktmutation
HDAC 5	Histone deacetylase 5
HFD	Hochfett Diät
IAPP	Islet amyloid polypeptide (Insel Amyloid Polypeptid)
IGF	Insulin-like growth factor (Insulinähnlicher Wachstumsfaktor)
I κ B β	I-kappa-B-kinase
IL	Interleukin
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
IR	Insulin receptor (Insulinrezeptor)
IRS	Insulin receptor substrates (Insulinrezeptorsubstrat)
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KO	Knockout
KRS	Kufor-Rakeb-Syndrom
LRRK2	Leucin-Rich Repeat Kinase 2
LK	Lewy Körperchen
LN	Lewy Neuriten
LOPD	Late-onset parkinson disease (spät einsetzender Parkinson)
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MG	Morbus Gaucher
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
mTORC 1	Mechanistic target of rapamycin complex 1
MUFA	Monounsaturated fatty acid (Einfach ungesättigte Fettsäuren)
NAC	Non-A β -component
NEFA	Non-esterified fatty acid (unveresterte Fettsäure)
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLS	Nuclear localisation sequence (Kernlokalisierungssequenz)
NO	Nitric oxide (Stickstoffmonoxid)
NOS-2	Nitric oxide synthase 2 (Stickstoffmonoxid-Synthase-2)
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns (Pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PBS	Phosphat buffered saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PDGF β	Platelet derived growth factor β
PDK 1	3-Phosphoinositid-dependent Protein Kinase 1
PFA	Paraformaldehyd
PH	Pleckstrin-Homologie
PHLPP	PH domain and Leucine rich repeat Protein Phosphatase

Abkürzungsverzeichnis

PINK1	PTEN Induced Putative Kinase 1 (PTEN-induzierte-putative Kinase-1)
PIP ₂	Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate
PIP ₃	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate
PI3K	Phosphoinositid 3-kinase
PK	Parkinson Krankheit
PKB	Protein kinase B
PLK	Polo-like kinase
PPS	Parkinsonian-pyramidal syndrome (Parkinson'sches Pyramidal Syndrom)
PP2A	Protein phosphatase 2A
PrP	Prion-Protein
PSP	Progressive supranuclear palsy (Progressive supranukleäre Blickparese)
pS473-Akt	Am Serin-473 phosphoryliertes Akt
pS87- α Syn	Am Serin-87 phosphoryliertes α -Synuklein
pS129- α Syn	Am Serin-129 phosphoryliertes α -Synuklein
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
pT308-Akt	Am Threonin-308 phosphoryliertes Akt
PUFA	Polyunsaturated fatty acids (Mehrfach ungesättigte Fettsäuren)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBP-4	Retinol-binding protein 4 (Retinol-bindendes Protein 4)
RF	Risikofaktor
ROS	Reactive oxygen species (Reaktive Sauerstoffspezies)
RNS	Reactive nitrogen species (Reaktive Stickstoffspezies)
Rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RTK	Rezeptor Tyrosinkinase
SD	Standard Diät
SDS-Page	SDS – Polyacrylamidgel – Elektrophorese
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler)
SNP	Single-nucleotide polymorphism (Single-Nukleotid Polymorphismus)
SFA	Saturated fatty acid (Gesättigte Fettsäure)
SN	<i>Substantia Nigra</i>
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor (löslicher N-Ethylmaleimid-sensitiver Bindungsfaktor)
SNpc	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
StAbw	Standardabweichung
Tab	Tabelle
TBS	Tris buffered saline (Tris gepufferte Salzlösung)
TH	Tyrosinhydroxylase
TLR 4	Toll-like receptor 4
TNF α	Tumor necrosis factor α
T2DM	Typ 2 Diabetes mellitus
UPS	Ubiquitin-proteasom system
US	Unconditioned stimulus (Unkonditionierter Stimulus)
WT	Wild-Typ
WT HFD	WT Mäuse mit HFD
ZNS	Zentrales Nervensystem
6-OHDA	6-Hydroxydopamine

V Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen der lebenslangen Fütterung einer Hochfett Diät (HFD) auf die Entwicklung der Synukleinopathie sowie der damit einhergehenden motorischen und kognitiven Beeinträchtigungen in (Thy1)-h[A30P] α Syn transgenen Mäusen untersucht. Synukleinopathien, wie die Parkinson Krankheit (PK), gehören zu den häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen unserer Zeit, dennoch ist die Pathogenese der PK bis heute nicht genau bekannt (Di Napoli et al., 2007). Die A30P Mutation von α -Synuklein (α Syn) wird jedoch mit familiären Fällen der PK assoziiert (Kruger et al., 1998). Gleichzeitig steigt die Prävalenz von Typ 2 Diabetes mellitus besonders in den Industrieländern rapide an und wird unter anderem mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Santiago und Potashkin, 2013).

Im Rahmen der durchgeführten Arbeit konnten durch Fütterung einer HFD bei h[A30P] α Syn transgenen Mäusen metabolische Veränderungen im Sinne eines erhöhten Körpergewichts sowie einer gestörten Glukosetoleranz induziert werden. Die transgenen Mäuse, die eine HFD erhielten, wiesen außerdem eine verminderte Lebensspanne auf. Weiterhin konnte ein Einfluss der HFD auf die bekannten verhaltensbiologischen Beeinträchtigungen der h[A30P] α Syn transgenen Mäuse gezeigt werden, indem sowohl der motorische Phänotyp, als auch Defizite im emotionalen Lernen signifikant vorzeitig nachgewiesen wurden. Ebenso trat auch die Synukleinopathie des Hirnstamms, die mit einer massiven Astrogliose einherging, nach Fütterung der HFD signifikant verfrüht auf. Zusätzlich wurde eine vorzeitige Reduktion des phosphorylierten Akt bei transgenen Mäusen mit HFD nachgewiesen. Unabhängig von der Diät wurde zudem bei h[A30P] α Syn transgenen Mäusen eine im hohen Alter signifikant erhöhte Proteinmenge an GRK 5 gezeigt, wobei eine primär nukleäre Lokalisation der Kinase detektiert wurde.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der HFD die bekannte Synukleinopathie des h[A30P] α Syn transgenen Mausmodells sowie die damit einhergehenden verhaltensbiologischen Beeinträchtigungen verfrüht induziert werden. Dies weist auf einen Einfluss von Übergewicht und gestörter Glukosetoleranz auf die Entwicklung von Synukleinopathie und Neurodegeneration hin, wobei die mechanistischen Hintergründe jedoch weiterhin unklar bleiben und im Anschluss an diese Arbeit genauer untersucht werden könnten.

1 Einleitung

1.1 Die Parkinson Krankheit

Die Parkinson Krankheit (PK) ist nach Morbus Alzheimer die zweithäufigste progressive neurodegenerative Erkrankung und die häufigste neurodegenerative Bewegungsstörung, die in den Industrieländern etwa 1% der Bevölkerung über 60 Jahren betrifft. Das Auftreten der Krankheit steigt mit zunehmendem Alter, sodass die Prävalenz bei 85jährigen bei etwa 4-5% liegt (de Lau und Breteler, 2006; Wood-Kaczmar et al., 2006). Außerdem besteht eine Geschlechtsabhängigkeit, wobei Männer (3% der über 65jährigen) häufiger betroffen sind als Frauen (1,3% der über 65jährigen) (Weintraub et al., 2008a).

Die Symptome der PK wurden bereits 1817 von James Parkinson, nach dem die Krankheit später benannt werden sollte, in seiner Abhandlung „An essay on the shaking palsy“ an sechs Patienten beschrieben. Heute gelten Ruhetremor, unterschiedliche Stufen von Rigor, Akinesie / Bradykinesie sowie Gang- und Gleichgewichtsstörungen als klinische Kardinalsymptome (Jankovic, 2008). Zusätzlich können noch weitere, vom Bewegungsapparat unabhängige Symptome auftreten. Hierzu zählen beispielsweise kognitive Beeinträchtigungen, Sprachstörungen, Depressionen, Schlafstörungen sowie verminderte Geschmacks- und Geruchswahrnehmung. Einige Patienten entwickeln zudem mit Fortschritt der Krankheit eine Demenz (Jankovic, 2008; Weintraub et al., 2008a, b, c).

Bereits Mitte des letzten Jahrhunderts wurde erkannt, dass die motorischen Defizite der Parkinson Patienten auf den Verlust dopaminergener Neuronen und dem damit verbundenen Dopaminmangel in der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) sowie im Striatum zurückzuführen sind (Ehringer und Hornykiewicz, 1960; Poirier und Sourkes, 1965). In Folge dessen wurde mit der Behandlung mit Levodopa, einem Dopamin-Vorläufer, der die Blut-Hirn-Schranke überqueren kann, begonnen (Cotzias et al., 1969). Bis heute ist aufgrund der weiterhin letztlich unbekanntem Pathogenese die PK jedoch nur symptomatisch behandelbar und auch die Progression der Krankheit kann noch immer nicht verhindert werden.

1.1.1 Genetische und nicht genetische Faktoren sind mit der Parkinson Krankheit assoziiert

Die meisten untersuchten Fälle der PK sind sporadischen Ursprungs mit unklarer, multifaktorieller Ätiologie. Zu den Faktoren, denen im Zusammenspiel mit dem alternden Gehirn ein Einfluss auf die Entstehung dieser Formen zugeschrieben wird, gehören unter

Einleitung

anderem Neurotoxine, Neuroinflammation sowie die Interaktion genetischer Prädispositionen und Umweltfaktoren (Klein und Westenberger, 2012). Zudem werden immer mehr chromosomale Loci bekannt, die mit der PK in Verbindung stehen. Ihre Klassifikation und Benennung erfolgt in Reihenfolge ihrer Entdeckung (PARK 1-x), unabhängig von der Rolle, die sie bei der Entstehung der PK spielen (Tab. 1.1).

Locus	Gen	Genprodukt	Vererbung	Beginn	Referenz
Loci mit überzeugender Evidenz					
PARK 1/4	<i>SNCA</i>	α -Synuklein	AD / RF	EOPD	Polymeropoulos et al., 1997 Singelton et al., 2003
PARK 2	<i>PARKIN</i>	Parkin	AR	EOPD	Kitada et al., 1998
PARK 6	<i>PINK1</i>	PTEN Induced Putative Kinase 1	AR	EOPD	Valente et al., 2004
PARK 7	<i>DJ-1</i>	DJ-1	AR	EOPD	Bonifati et al., 2003
PARK 8	<i>LRRK2</i>	Leucin-Rich Repeat Kinase 2	AD	LOPD	Zimprich et al., 2004
PARK 9	<i>ATP13A2</i>	ATPase 13A2	AR	EOPD / KRS	Ramirez et al., 2006
Loci mit unklarer Relevanz					
PARK 3	Unbekannt	Unbekannt	AD	LOPD	Gasser et al., 1998
PARK 5	<i>UCHL1</i>	Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1	AD	LOPD	Leroy et al., 1998
PARK 10	Unbekannt	Unbekannt	Unsicher (RF?)	(LOPD?)	Hicks et al., 2002
PARK 11	Unbekannt (<i>GIGYF2?</i>)	(GRB10 interagierendes GYF Protein 2)	AD	LOPD	Lautier et al., 2008
PARK 12	Unbekannt	Unbekannt	Unsicher (RF?)	Unsicher	Pankratz et al., 2003
PARK 13	<i>Omi/HTRA2</i>	HtrA Serin Peptidase 2	Unsicher (AD?/RF?)	Unsicher	Strauss et al., 2005
PARK 14	<i>PLA2G6</i>	Phospholipase A2, Group VI	AR	DP	Paisan-Ruiz et al., 2009
PARK 15	<i>FBX07</i>	F-box Protein 7	AR	EOPD / PPS	Di Fonzo et al., 2009
Suszeptibilitätsgene					
PARK 16	Unbekannt	Unbekannt	RF	LOPD	Hamza et al., 2010
PARK 17	<i>VPS35</i>	Vacuolar Protein Sorting 35	AD	Klassisch?	Vilarino-Guell et al., 2011
PARK 18	<i>EIF4G1</i>	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1	AD	Klassisch?	Chartier-Harlin et al., 2011
FTDP-17	<i>MAPT</i>	microtubule-associated protein tau	RF	PSP / LOPD	Simon-Sanchez et al., 2009
Locus Gaucher	<i>GBA</i>	Glucocerebrosidase	AR	MG / LOPD	Sidransky et al., 2009

Tab. 1.1: Mit Parkinsonismus assoziierte Gene. AR: Autosomal rezessiv; AD: Autosomal dominant; DP: Dystonie-Parkinson; EOPD: Early-onset parkinson disease; KRS: Kufor-Rakeb-Syndrom; LOPD: Late-onset parkinson disease; MG: Morbus Gaucher; PPS: parkinsonian-pyramidal syndrome; PSP: Progressive supranuclear palsy; RF: Risikofaktor

Als häufigste monogen vererbte Risikofaktoren der PK gelten Mutationen im *GBA* Gen, welches für das Enzym Glucocerebrosidase kodiert (Aharon-Peretz et al., 2004; Mitsui et al.,

2009; Sidransky et al., 2009; Mata et al., 2010) sowie die G2019S Mutation in *LRRK2* (Berg et al., 2005; Di Fonzo et al., 2005). Die nach genomweite Assoziationsstudien (GWAS) häufigsten Risikofaktoren sind dagegen *SNCA* und *MAPT* (Satake et al., 2009; Simon-Sanchez et al., 2009).

Neben den sporadischen Fällen weisen etwa 5 bis 10% der Patienten monogenetische, erbliche Formen der Krankheit auf (Lesage und Brice, 2009). Von den bisher bekannten, mit der PK assoziierten Genen, werden diese monogenetischen Formen jedoch nur durch unabhängige Mutationen von sechs Genen bewirkt. Diese werden entweder autosomal dominant (*SNCA*, *LRRK2*) oder autosomal rezessiv (*PARKIN*, *PINK1*, *DJ-1*, *ATP13A2*) vererbt. Weitere Formen der PK sind sekundären Ursprungs. Sie werden beispielsweise durch Toxine (MPTP, Mangan, Kobalt, Zyanide), Traumata, Tumore, Hypoxien sowie postenzephalitische Infektionen ausgelöst (Dauer und Przedborski, 2003).

1.1.2 Lewy Körperchen sowie der Untergang dopaminerger Neuronen sind die neuropathologischen Kennzeichen der Parkinson Krankheit

Das pathologische Kennzeichen der PK ist der selektive Verlust dopaminerger Neuronen in der SNpc, woraus ein Dopamindefizit im Striatum resultiert. Dieses Defizit ist für die motorischen Hauptsymptome der Erkrankung verantwortlich (Hornykiewicz, 2008), welche aber erst nach Verlust des größten Teils dieser dopaminergen Neuronen auftreten (Bernheimer et al., 1973). Zusätzlich bilden sich intraneuronale, zytoplasmatische Proteineinschlüsse, so genannte Lewy-Körperchen (LK), sowie Lewy-Neuriten (LN). Den wesentlichen Bestandteil dieser Einschlüsse bildet das Protein α -Synuklein (α Syn), welches durch das Gen *SNCA* kodiert wird, das mit familiären Formen der PK assoziiert ist. Die LK sowie das darin enthaltene α Syn gelten als pathologisches Hauptmerkmal sowohl für die PK, als auch für andere neurodegenerative Erkrankungen. Zu diesen so genannten Synukleinopathien zählen neben der PK auch Multisystematrophie und Demenz mit LK (DLK) (Spillantini et al., 1997; Spillantini und Goedert, 2000; Dauer und Przedborski, 2003). LK treten in verschiedenen neuronalen Zelltypen und in unterschiedlichen Hirnregionen auf. Morphologisch erscheinen die klassischen LK des Hirnstamms als eosinophile, sphärische Körperchen mit dichtem Kern und kleinen, schwachen Halos. Zudem zeigen sie meist eine Immunoreaktivität für α Syn und Ubiquitin (Lowe et al., 1988; Campbell et al., 2001; Kuusisto et al., 2003). Andere LK, wie sie beispielsweise häufig im Cortex gefunden werden, weisen normalerweise keine Halo auf und häufiger kann auch keine Immunoreaktivität für α Syn nachgewiesen werden (Gomez-Tortosa et al., 2000; Sakamoto et al., 2002).

Für die Lewy-Pathologie wird bei der PK eine in der Regel fortschreitende Ausbreitung, vom unteren Hirnstamm über die Basalganglien zum zerebralen Cortex hin, angenommen, nach welcher eine Klassifikation in sechs Stufen vorgenommen wurde (Braak et al., 2002). Es ist jedoch anzumerken, dass diese Klassifikation für mindestens 15% der Parkinson Patienten nicht zutreffend ist (Jellinger, 2012). In einem neueren, vierstufigen Klassifikationssystem wird deshalb die α Syn-Pathologie mit der nigrostriatalen Degeneration sowie kognitiven und motorischen Beeinträchtigungen korreliert (Beach et al., 2009). Stufe 1 entspricht dabei einer auf den *Bulbus olfactorius* begrenzten Pathologie, Stufe 2 gliedert sich in eine überwiegend Hirnstamm- (2a) sowie eine überwiegend limbische Form (2b), in Stufe 3 sind dann sowohl Hirnstamm, als auch limbisches System betroffen. Die finale Stufe 4 entspricht einer Ausbreitung der Lewy-Pathologie bis hin zum Neocortex.

Weiterhin unklar bleibt jedoch die spezifische Rolle der LK bei der Progression der PK. Wahrscheinlich ist aber, dass sie nicht für die zelltoxischen Prozesse verantwortlich sind, sondern das Resultat zellprotektiver Mechanismen darstellen und die Zelle vor fehlgefalteten und nicht funktionierenden Proteinen schützen (Tompkins und Hill, 1997; Olanow et al., 2004; Tanaka et al., 2004; Shults, 2006).

1.2 α -Synuklein

SNCA, auch *PARK1* genannt, war das erste Gen, welches mit der PK in Verbindung gebracht wurde (Polymeropoulos et al., 1997). Es kodiert für α Syn, ein 140 Aminosäuren (AS) kleines, azidisches Protein (Maroteaux et al., 1988). α Syn ist Teil einer Familie von Proteinen, welcher außerdem noch β -Synuklein sowie γ -Synuklein angehören und denen eine charakteristische Konsensus-Sequenz (KTKEGV) gemein ist (Ueda et al., 1993; George, 2002). Bisher konnte jedoch nur α Syn eine Rolle bei der Entstehung der PK zugeschrieben werden (George, 2002). Im Gehirn ist α Syn, ebenso wie auch β -Synuklein, vor allem in präsynaptischen Endknöpfchen lokalisiert, wobei besonders hohe Konzentrationen im Neocortex, Hippocampus, Striatum, Thalamus sowie dem Cerebellum gefunden werden konnten (Nakajo et al., 1994; Iwai et al., 1995). γ -Synuklein wird ebenfalls in verschiedenen Hirnregionen stark exprimiert, findet sich in hohen Konzentrationen aber vor allem in der SN (*Substantia nigra*) (Lavedan, 1998). Die höchsten Konzentrationen α Syns finden sich zwar im zentralen Nervensystem (ZNS), allerdings konnte die Expression auch in der Peripherie nachgewiesen werden. So wurde α Syn in erythroiden Zellen (Nakai et al., 2007; Barbour et al., 2008), in Blutplättchen (Li et al., 2002; Michell et al., 2005), in Lymphozyten (Noori-Dalooi et al., 2010) und im Pankreas (Ueda et al., 1994; Geng et al., 2011) gefunden.

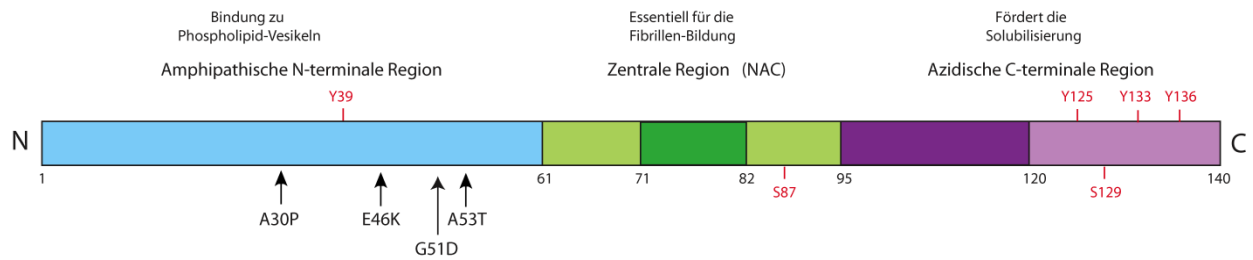


Abb. 1.1: Primärstruktur von α -Synuklein. α Syn ist in drei Regionen unterteilbar. Am N-terminalen, amphipathischen Ende treten die unabhängigen Punktmutationen A30P, E46K, G51D sowie A53T auf, die mit familiären Formen der PK assoziiert sind. Sie ist zudem bei der Bindung mit Vesikeln von Bedeutung. Die zentrale, stark hydrophobe NAC Domäne begünstigt die α Syn-Aggregation, während die azidische C-terminale Domäne die Proteinaggregation zu vermindern scheint. Zusätzlich weist α Syn verschiedene Phosphorylierungsstellen auf, hierzu zählen Tyrosin (Y) 39, Y125, Y133 und Y136 sowie S87 und S129.

1.2.1 α -Synuklein ist ein natürlich ungefaltetes Protein und kann in drei Domänen unterteilt werden

In wässriger Lösung formt α Syn keine definierte Struktur und wird daher zu den natürlich ungefalteten Proteinen gezählt, die durch eine hohe Nettoladung und eine geringe Hydrophobie charakterisiert sind (Weinreb et al., 1996).

Die Primärstruktur von α Syn wird in drei unterschiedliche Domänen unterteilt (Abb. 1.1). Die amphipathische N-terminale Region (AS 1-60) enthält sechs der sieben unvollständigen 11 AS Wiederholungen (XKTKEGVXXXX), welche den Lipid-Bindungsstellen der Apolipoproteine gleichen. Es wird davon ausgegangen, dass diese für die Bildung von amphiphilischen Helizes verantwortlich ist (Davidson et al., 1998; Bisaglia et al., 2009) und bei der Bindung an Lipide und Vesikel eine α -helikale Sekundärstruktur annimmt (Weinreb et al., 1996; Chandra et al., 2003; Bartels et al., 2011; Wang et al., 2011). Innerhalb der N-terminalen Region befinden sich zudem die unabhängigen Punktmutationen A53T (Polymeropoulos et al., 1997), A30P (Kruger et al., 1998), E46K (Zarranz et al., 2004) und G51D (Lesage et al., 2013), die mit familiären, autosomal dominanten Formen von EOPD Parkinson in Verbindung stehen. Bei sporadischen Fällen wurden außerdem die Mutationen H50Q (Appel-Cresswell et al., 2013; Proukakis et al., 2013), A18T und A29S (Hoffman-Zacharska et al., 2013) beschrieben.

Die zentrale, hydrophobe NAC („non-A β -component“) - Region (AS 61–95) ist für die Protein-Aggregation sowie die β -Faltblatt-Entstehung verantwortlich (Ueda et al., 1993; Giasson et al., 2001). Innerhalb der NAC-Domäne befindet sich eine Phosphorylierungsstelle

am Serin (S) 87 (Okochi et al., 2000; Paleologou et al., 2010). Das an den AS Prolin, Glutamin und Asparagin reiche und stark negativ geladene Carboxyl-Ende (AS 96-140) ist im Gegensatz zu den anderen Domänen weniger konserviert (Lavedan, 1998). Das azidische C-terminale Ende bleibt ungefaltet und scheint durch die negative Ladung der α Syn Aggregation entgegenzuwirken. Zudem wird angenommen, dass es den Kern der α Syn Fibrillen bildet und einerseits die α Syn Fibrillisierung sowie andererseits den Durchmesser der Filamente reguliert (Eliezer et al., 2001; Murray et al., 2003). Ebenso scheint das C-terminale Ende eine wichtige Rolle bei der Chaperon-artigen Aktivität, die α Syn gegenüber anderen Proteinen aufweist, zu spielen (Souza et al., 2000; Park et al., 2002). Am Carboxyl-Ende befinden sich außerdem weitere Phosphorylierungs-Stellen, von welchen vor allem die Phosphorylierung des S129 von besonderer Bedeutung ist (Okochi et al., 2000; Fujiwara et al., 2002; Anderson et al., 2006).

1.2.2 Die physiologische Funktion von α -Synuklein ist mit zellulärem Transport assoziiert

Die exakte physiologische Funktion von α Syn ist noch immer nicht definiert. Unter physiologischen Bedingungen wird α Syn vor allem in präsynaptischen Endknöpfchen exprimiert und findet sich dort speziell in der Nähe von synaptischen Vesikeln (George, 2002). Zudem konnte sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* gezeigt werden, dass α Syn mit Membranen interagiert (Davidson et al., 1998; Jo et al., 2000; Fortin et al., 2004). Dementsprechend wird angenommen, dass die physiologische Funktion von α Syn entweder mit der Integrität der Membranen oder aber mit dem zellulären Transport assoziiert ist. So kann α Syn modulierend auf die synaptische Übertragung wirken (Abeliovich et al., 2000; Cabin et al., 2002) und die Neurotransmitter-Freisetzung beeinflussen (Fortin et al., 2005; Diogenes et al., 2012). Hierbei spielt möglicherweise die beschriebene transiente Bindung von α Syn mit Vesikeln eine wichtige Rolle, wobei α Syn zudem auch in die Biogenese von Vesikeln involviert sein könnte (Murphy et al., 2000).

Für verschiedene Proteine, welche beispielsweise mit der Signaltransduktion, dem Ubiquitin-Proteasom-System, dem Vesikel-Recycling, der Regulation von oxidativem Stress oder der mitochondrialen Funktion in Verbindung stehen, wurden Wechselwirkungen mit α Syn beschrieben (Dev et al., 2003; Zhou et al., 2004; Bisaglia et al., 2009). Hierzu zählen unter anderem auch Rab GTPasen, welche wichtige Regulationsfaktoren verschiedener Transportaktivitäten zwischen Organellen darstellen (Sung et al., 2001; Dalfo et al., 2004; Gitler et al., 2008).

Aufgrund der Sequenz-Homologie α Syns mit den Phosphat-abhängigen Signal-Chaperon-Proteinen 14-3-3 sowie der Fähigkeit von α Syn mit diesen zu interagieren, entstand die Hypothese, dass α Syn als Chaperon bei der Stabilisierung von Proteinen agieren kann. Hierfür scheint vor allem der azidische C-Terminus von Bedeutung (Ostrerova et al., 1999; Kim et al., 2000; Souza et al., 2000). Ebenso wie 14-3-3 Proteine ist α Syn in der Lage die Aktivität der Tyrosinhydroxylase (TH), dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Dopamin-Synthese, zu modulieren (Perez et al., 2002). Möglicherweise spielt α Syn zudem eine Rolle bei der Dopamin-Neurotransmission, da die Expression von α Syn die über den Dopamin-Transporter vermittelte Aufnahme von synaptischem Dopamin beeinflussen kann (Sidhu et al., 2004; Yavich et al., 2004).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass α Syn in Synergie mit CSP- α (Cystein string protein- α) beim Aufbau des SNARE-Komplexes (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor) agiert, der die Membranfusion erleichtert und damit essentiell für die Regulation der Neurotransmitterfreisetzung ist (Chandra et al., 2005; Burre et al., 2010). Allerdings scheint α Syn die SNARE-vermittelte Membranfusion zu inhibieren, ohne dabei direkt an SNARE zu binden, was auf eine Regulationsfähigkeit von α Syn bei der Vesikelfusion schließen lässt (DeWitt und Rhoades, 2013).

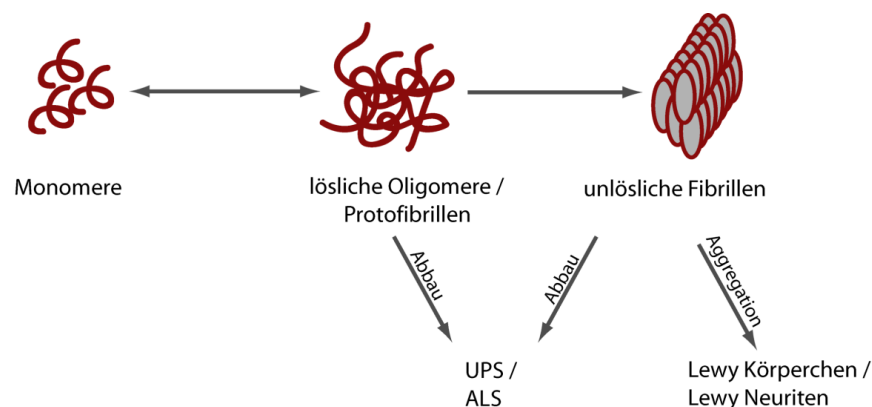


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der α -Synuklein Aggregation. Monomeres α Syn lagert sich unter pathologischen Bedingungen zu fehlgefalteten, pathogenen Oligomeren zusammen. Diese aggregieren weiter zu Protofibrillen und Fibrillen, aus denen sich dann LK und LN bilden. Der Abbau der fehlgefalteten Proteine geschieht sowohl über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), als auch über den Autophagie-Lysosom-Signalweg (ALS).

1.2.3 α -Synuklein aggregiert bei der Parkinson Krankheit und anderen Synukleinopathien

α Syn wird sowohl genetisch, als auch neuropathologisch mit der PK in Verbindung gebracht und spielt auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen, den so genannten Synukleinopathien, eine wichtige Rolle. So bildet unlösliches und fibrilläres α Syn den Hauptbestandteil der LK, den die PK kennzeichnenden Proteinaggregaten im Zytoplasma (Spillantini et al., 1997; Baba et al., 1998). Zudem akkumuliert α Syn auch bei DLK sowie bei Multisystematrophie (Baba et al., 1998; Scholz et al., 2009).

Das natürlich ungefaltete α Syn besitzt die Fähigkeit zur Aggregation (Abb. 1.2). Hierbei bildet sich zunächst dimeres α Syn, welches sich dann zu oligomeren Protofibrillen zusammenlagert, bevor ausgereifte, unlösliche Aggregate entstehen (Conway et al., 1998). Die Protofibrillen können dabei verschiedene Formen annehmen, hierzu gehören sphärische, ringartige, Poren-ähnliche, granuläre und schnurartige Gebilde (Conway et al., 2000a; Ding et al., 2002; Lashuel et al., 2002; Apetri et al., 2006; Bhak et al., 2009; Hong et al., 2011).

Es ist jedoch noch immer unklar, welche dieser Aggregationsstufen für das toxische Potential von α Syn verantwortlich ist. Allerdings wird angenommen, dass vor allem die löslichen, oligomeren Protofibrillen neurotoxisch wirken (Goldberg und Lansbury, 2000; Caughey und Lansbury, 2003; Tsigelny et al., 2008). So konnte sowohl in Zellkultur, als auch *in vivo* gezeigt werden, dass artifizielle α Syn Mutanten, welche die Ausbildung löslicher Oligomere der reifer Aggregate bevorzugen, zu erhöhter Neurotoxizität führen (Karpinar et al., 2009; Winner et al., 2011). Ebenso scheinen große α Syn Oligomere über die Bindung an Synaptobrevin-2 die Bildung von SNARE-Komplexen zu verhindern und so die Dopamin-Freisetzung zu inhibieren (Choi et al., 2013).

Bisher werden vier *SNCA*-Punktmutationen - A53T (Polymeropoulos et al., 1997), A30P (Kruger et al., 1998), E46K (Zarranz et al., 2004) und G51D (Lesage et al., 2013) - mit familiären Formen der PK in Verbindung gebracht. Die A53T Mutation führt zu einer verstärkten Bildung der β -Faltblattstruktur (Biere et al., 2000). Patienten mit dieser Mutation zeigen einen relativ früh einsetzenden Parkinson mit schwerem Verlauf, häufig in Verbindung mit einer Demenz (Spira et al., 2001). Die A30P Mutation reduziert *in vitro* die Fähigkeit α Syns an Lipidmembranen zu binden und führt zu einer erhöhten Oligomerisationsrate jedoch nicht zu einer erhöhten Fibrillisierung des Proteins (Conway et al., 2000b; Yonetani et al., 2009). Bei Patienten führt diese Mutation zu einem spät einsetzenden Parkinson mit einer späten und milden Form der Demenz. Neuropathologisch zeigen sich ein Rückgang der Neuronen in der SN, im *Locus coeruleus* und dem *Nucleus dorsalis nervi vagi* sowie weit

verbreitete LK, LN und gliale Aggregate (Kruger et al., 1998; Seidel et al., 2010). Die E46K Mutation verändert die Wechselwirkung von α Syn mit Phospholipiden, erlaubt zudem die Bindung mit negativ geladenen Liposomen und führt zu einer erhöhten Bildung toxischer Oligomere (Rospigliosi et al., 2009). Patienten mit dieser Mutation zeigen ein ähnliches klinisches Bild wie Patienten mit der A53T Mutation (Zarranz et al., 2004). Die G51D Mutation vermindert die α Syn Aggregation sowie die Fähigkeit zur Membranbindung und führt zudem zu einer verstärkten nukleären Lokalisation α Syns (Fares et al., 2014). Klinisch zeigen die Patienten einen früh einsetzenden Parkinson mit einer schnellen Progression (Lesage et al., 2013). Die in einem Einzelfall, der jedoch eine Familiengeschichte der PK aufweist, beschriebene H50Q Mutation beschleunigt die Aggregation von α Syn und führt zu einem spät einsetzenden Parkinson, dessen klinisches Bild mit dem von Patienten mit A53T und E46K Mutationen vergleichbar ist (Appel-Cresswell et al., 2013; Ghosh et al., 2013).

Neben diesen Punktmutationen führen auch Duplikation sowie Triplikation des gesamten Synuklein-Lokus durch die damit verbundene erhöhte α Syn Expression zur Entstehung familiärer Formen (Singleton et al., 2003; Chartier-Harlin et al., 2004). Duplikationen führen dabei zu spät einsetzendem Parkinson, der mit L-Dopa behandelbar ist, während Triplikationen zu schwereren Formen mit frühem Beginn, schneller Progression und fortschreitender Demenz führen (Fuchs et al., 2007; Ibanez et al., 2009).

Weiterhin sind auch SNPs (Single-nucleotide polymorphism) in der 5' Promotor-Region sowie in der 3' flankierenden Region des *SNCA* Gens, die die α Syn Proteinkonzentration beeinflussen, mit einer erhöhten Anfälligkeit für idiopathischen Parkinson assoziiert (Winkler et al., 2007; Fuchs et al., 2008; Mata et al., 2010). In Genom-weiten Assoziationsstudien konnte zudem *SNCA* als ein allgemeiner Risikofaktor für die PK identifiziert werden (Satake et al., 2009; Simon-Sanchez et al., 2009).

1.2.4 α -Synuklein weist verschiedene Phosphorylierungsstellen auf

α Syn kann an verschiedenen AS phosphoryliert werden. Hierzu zählen S129 und S87 (Okochi et al., 2000) sowie Tyrosin (Y) 39, Y125, Y133 und Y136 (Ellis et al., 2001; Nakamura et al., 2001; Chen et al., 2009; Mahul-Mellier et al., 2014). Bisher konnte jedoch nur für die Phosphorylierungen am S129 (pS129 α Syn) sowie am S87 (pS87 α Syn) ein Zusammenhang mit der Entstehung der PK gezeigt werden, während die Phosphorylierung am Y125 möglicherweise sogar neuroprotektiv wirkt (Chen et al., 2009).

Der größte Teil des α Syns in den LK bei DLK ist am S129 phosphoryliert (Fujiwara et al., 2002; Saito et al., 2003; Anderson et al., 2006). Ebenso konnte pS129 α Syn in den LK von

Parkinson Patienten (Saito et al., 2003; Covy et al., 2009) sowie von Patienten mit Multisystematrophie (Nishie et al., 2004) nachgewiesen werden. Auch in verschiedenen α Syn transgenen Mausmodellen wurde am S129 phosphoryliertes α Syn detektiert, wobei es sowohl in Oligodendrozyten, als auch in somalen und neuritischen Ablagerungen sowie in dopaminergen Neuronen nachgewiesen werden konnte (Kahle et al., 2000; Neumann et al., 2002; Wakamatsu et al., 2007; Schell et al., 2009; Paleologou et al., 2010).

Anhand von *in vitro* Studien konnten verschiedene Kinasen identifiziert werden, die in der Lage sind α Syn am S129 zu phosphorylieren. Hierzu zählen einerseits CK (Casein kinase) 1 und 2 (Okochi et al., 2000; Lee et al., 2004; Zabrocki et al., 2008). Für CK 2 konnte die Kolokalisierung mit pS129 α Syn in Gehirnen α Syn transgener Mäuse gezeigt werden (Wakamatsu et al., 2007). Zudem wurde CK 2 als die wesentliche Kinase identifiziert, die für die S129 Phosphorylierung von α Syn in Rattengehirnen verantwortlich ist (Ishii et al., 2007). Andererseits wurden *in vitro* auch GRK (G protein-coupled receptor kinase) 1-6 als Kinasen der S129 α Syn Phosphorylierung detektiert (Pronin et al., 2000; Arawaka et al., 2006; Sakamoto et al., 2009). Gleichermaßen konnte dies auch für PLK (Polo-like kinase) 1-3 gezeigt werden (Inglis et al., 2009; Mbefo et al., 2010; Waxman und Giasson, 2011).

Weiterhin unklar ist jedoch, warum α Syn in den LK größtenteils am S129 phosphoryliert ist und welche physiologische Rolle diese Phosphorylierung spielt. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die S129 Phosphorylierung die α Syn Fibrillisierung inhibiert (Paleologou et al., 2010; Waxman und Giasson, 2011). Zudem wurde einerseits die Kolokalisierung von α Syn mit spezifischen Kinasen in LK demonstriert (Arawaka et al., 2006; Ryu et al., 2008), andererseits scheint aggregiertes α Syn ein besseres Substrat für CK 1-2 und PLK 1-3 darzustellen (Mbefo et al., 2010; Paleologou et al., 2010; Waxman und Giasson, 2011). Eine erhöhte Phosphorylierung führt außerdem nicht zu einer Inhibierung der α Syn Aggregation (Oueslati et al., 2010). Deshalb wird vermutet, dass die Phosphorylierung am S129 der Stabilisierung und Akkumulation toxischer α Syn Oligomere dient (Guerrero et al., 2013) und wahrscheinlich erst nach der α Syn Fibrillisierung geschieht (Beyer und Ariza, 2013).

Neben pS129 α Syn, konnte auch pS87 α Syn in den LK von Patienten mit DLK nachgewiesen werden (Paleologou et al., 2010). Die Phosphorylierung am S87 scheint die Membranbindung von α Syn und dadurch seine biologischen Funktionen zu beeinflussen (Paleologou et al., 2010). Bisher konnten mit CK 1 und Dyrk 1A (dual specificity tyrosine regulated kinase 1A) jedoch nur zwei Kinasen gefunden werden, die α Syn am S87 phosphorylieren können (Okochi et al., 2000; Kim et al., 2006). Allerdings inhibiert auch die

S87 Phosphorylierung die α Syn Aggregation *in vitro*, was ebenfalls gegen eine Aggregationsförderung durch die Phosphorylierung spricht (Mbefo et al., 2010; Beyer und Ariza, 2013).

1.2.5 α -Synuklein interagiert mit freien Fettsäuren

Bei den meisten übergewichtigen Menschen finden sich erhöhte Spiegel an freien Fettsäuren (FFA) im Plasma (Opie und Walfish, 1963). FFA können sowohl über Diffusion, als auch über spezielle Transportsysteme über die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn gelangen (Hamilton und Brunaldi, 2007; Mitchell und Hatch, 2011). Das Gehirn selbst weist eine hohe Konzentration an Lipiden auf, wobei es besonders reich an Phospholipiden ist, die etwa 6% der Trockenmasse ausmachen (Ruiperez et al., 2010). Besonders angereichert sind die zwei mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs) Arachidonsäure (AA) (n-6, 20:4) und Docosahexaensäure (DHA) (n-3, 22:6) (Chen et al., 2008a). Sowohl DHA, als auch AA sind in der Lage Syntaxin-3 zu aktivieren, einen kritischen Faktor bei Wachstum und Regeneration der Neurone (Darios und Davletov, 2006; Connell et al., 2007). AA scheint außerdem eine Rolle bei der Membranplastizität zu spielen und die Fluidität der Membranen des Hippocampus zu erhalten (Kotani et al., 2003; Fukaya et al., 2007). Ebenso konnte für AA gezeigt werden, dass sie die Bildung des neuronalen SNARE-Komplexes beeinflusst und die Fusion synaptischer Vesikel stimuliert, wodurch die Neurotransmitterfreisetzung gefördert wird (Connell et al., 2007; Darios et al., 2007). Die Aufnahme von DHA scheint den Verlust der kognitiven Funktionen bei älteren Menschen zu vermindern (Issa et al., 2006; van Gelder et al., 2007) und protektive Effekte auf neuronale Zellen zu haben (Lukiw et al., 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Lipide wie Sphingomyelin einen wesentlichen Bestandteil der LK darstellen (den Hartog Jager, 1969; Gai et al., 2000). Es wurde postuliert, dass ein Teil dieser Fettsäuren degradierten Organellen, wie zum Beispiel abgebauten Mitochondrien entstammt (Gai et al., 2000).

α Syn vermag Lipide unterschiedlicher Art zu binden, hierzu gehören Lipidmembranen (Jo et al., 2000; Stockl et al., 2008; Bodner et al., 2010), Fettsäuren (Sharon et al., 2001; Lucke et al., 2006; Salem et al., 2007) und intrazelluläre Lipidtropfen (Cole et al., 2002). Da α Syn zudem eine Sequenz-Homologie mit Fettsäure-bindenden Proteinen aufweist, wurde ihm unter anderem eine Rolle im Transport von Fettsäuren zugeschrieben (Sharon et al., 2001). Bei der Bindung von α Syn mit azidischen Phospholipid-Vesikeln vollzieht sich eine strukturelle Änderung des Proteins von der willkürlichen Spirale hin zu einer α -helikalen Konformation (Davidson et al., 1998; Jo et al., 2000; Eliezer et al., 2001). Ebenso können

sowohl DHA, als auch AA, jedoch nicht gesättigte Fettsäuren (SFAs), α Syn in eine α -helikale Form bringen (Broersen et al., 2006). Des Weiteren scheint die Aggregation und Fibrillisierung von α Syn in der Anwesenheit von Lipidmembranen, Fettsäuren und Liposomen stimuliert zu werden (Jo et al., 2000; Perrin et al., 2001; Lee et al., 2002a). So interagiert α Syn mit freien PUFAs, in dessen Folge lösliche Oligomere entstehen, aus welchen sich dann unlösliche, mit Neurodegeneration in Verbindung stehende Aggregate bilden (Sharon et al., 2003). Besonders DHA scheint dabei die α Syn Fibrillisierung zu fördern (Broersen et al., 2006; De Franceschi et al., 2011). Für einfach ungesättigte (MUFAs) sowie gesättigte Fettsäuren konnte ein solcher Zusammenhang jedoch nicht gezeigt werden (Sharon et al., 2003).

Zudem scheint α Syn eine regulierende Funktion im Fettsäure-Metabolismus einzunehmen. So konnte gezeigt werden, dass α Syn Knockout (KO) Mäuse eine verminderte AA-Konzentration in den Phospholipiden des Gehirns aufwiesen, während die Menge an DHA erhöht war (Golovko et al., 2007). In der löslichen Fraktion von Gehirnen von Patienten mit der PK sowie DLK konnten außerdem erhöhte Level an PUFAs gemessen werden, während keine Unterschiede an MUFAs oder SFAs erkennbar waren (Sharon et al., 2003). Ebenso finden sich in α Syn KO Mäusen weniger freie PUFAs als in WT Mäusen, während in mesencephalischen neuronalen Zellen bei überexprimiertem α Syn erhöhte Level an PUFAs detektiert wurden (Sharon et al., 2003).

Aufgrund dieser Wechselwirkungen zwischen den PUFAs des Gehirns und α Syn sowie der veränderten Lipidzusammensetzung der Gehirne von Parkinson Patienten kann vermutet werden, dass sich ein veränderter FFA-Stoffwechsel, wie er beispielsweise bei Übergewicht und Insulinresistenz auftritt, auf die Entstehung der Synukleinopathie auswirkt.

1.2.6 Verschiedene Mausmodelle existieren für Synukleinopathien

Um den Einfluss von α Syn auf neurodegenerative Erkrankungen zu untersuchen, wurden verschiedene Mausmodelle generiert. Dabei wurde entweder menschliches Wild-Typ (WT) α Syn oder aber mutiertes (A53T, A30P, E46K) mit Hilfe unterschiedlicher Promotoren exprimiert.

Ein früher Versuch ein [wt] α Syn-Mausmodell zu kreieren erfolgte mit Hilfe des PDGF β (platelet-derived growth factor β) - Promotors, welcher zu einer vorwiegend neuronalen Expression des Transgens führt (Masliah et al., 2000). In diesem Mausmodell konnte das transgene α Syn in neuronalen Zellkörpern und in Neuriten nachgewiesen werden, außerdem zeigte sich eine leicht verminderte Dichte von TH-positiven Neuronen und deren Endstücken.

Des Weiteren konnte eine im Alter verschlechterte Lokomotorik auf dem Rota Rod gefunden werden.

Weitere Mausmodelle wurden unter Verwendung des TH - Promotors kreiert, welcher zu einer Expression des Transgens in katecholaminergen Neuronen führt. Bislang wurden unter ihm [wt] α Syn, [A53T] α Syn sowie [A30P] α Syn exprimiert, allerdings konnte kein eindeutiger Phänotyp festgestellt werden (Kahle, 2008). Jedoch zeigt sich bei diesen Modellen mit der somatodendritischen Akkumulation eine histologische Gemeinsamkeit (Matsuoka et al., 2001; Rathke-Hartlieb et al., 2001; Maskri et al., 2004).

Der PrP (Prion-Protein) - Promotor wurde bisher verwendet um [A53T] α Syn (Giasson et al., 2002; Lee et al., 2002b), [A30P] α Syn (Nieto et al., 2006) sowie [E46K] α Syn (Emmer et al., 2011) neuronal zu exprimieren. Diesen Modellen ist der progressive Verlust der Lokomotorik gemein, histologisch zeigt sich auch hier eine somatodendritische Akkumulation des transgenen α Syns sowie eine verstärkte Astrogliose (Giasson et al., 2002; Lee et al., 2002b; Gomez-Isla et al., 2003).

Der Promotor Thy1 führt zu einer ZNS-spezifischen, neuronalen Expression. Er wurde bislang in verschiedenen Studien verwendet, um [wt] α Syn, [A53T] α Syn sowie [A30P] α Syn zu exprimieren. Auch diesen Modellen ist die somatodendritische Akkumulation von transgenem α Syn gemein (Kahle et al., 2000; van der Putten et al., 2000; Rockenstein et al., 2002; Maskri et al., 2004). Ebenso zeigen alle Modelle lokomotorische Auffälligkeiten, die sich jedoch in Art und Stärke unterscheiden (van der Putten et al., 2000; Fleming und Chesselet, 2006; Freichel et al., 2007). Die verwendeten (Thy1)-h[A30P] α Syn transgenen Mäuse überexprimieren humanes, A30P mutiertes α Syn (h[A30P] α Syn) im ZNS, wobei bereits relativ früh Ablagerungen von unlöslichem α Syn auftreten. Während des Alterns nimmt ein Teil dieses transgenen α Syn eine fibrilläre, amyloidartige Konformation ein. Zudem zeigt sich eine verstärkte Phosphorylierung am S129 sowie eine erhöhte Oxidation und Ubiquitinylierung des Proteins (Neumann et al., 2002). Die Verteilung dieses fibrillären, Proteinase-K resistenten α Syn ist spezifisch für verschiedene Gehirnregionen, geht mit kognitiven Beeinträchtigungen der Mäuse einher (Freichel et al., 2007) und korreliert außerdem mit den Stadien der Synukleinopathie in menschlichen Patienten (Neumann et al., 2004). Auch die Verteilung des am S129 phosphorylierten α Syn ist hirnregionspezifisch und altersabhängig. So findet sich in neuronalen Nuclei verschiedener kortikaler Areale sowie der hippocampalen Regionen *Cornu Ammonis* (CA) 1, CA2 und CA3 und der basolateralen Amygdala (BLA) bereits bei jungen (Thy1)-h[A30P] α Syn transgenen Mäusen am S129 phosphoryliertes α Syn. Besonders in der BLA nimmt die Intensität der pS129 Färbung im

Alter stark zu, im zentralen Nucleus der Amygdala zeigt sich außerdem eine pS129 positive, LN-artige, nicht-amyloide Pathologie (Schell et al., 2009). Diese Linie ermöglicht somit eine genaue Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem Fibrillierungsprozess von α Syn und damit einhergehenden Verhaltensbeeinträchtigungen sowie der progressiven Neurodegeneration (Kahle, 2008).

Eine weitere Form der Mausmodelle für Synukleinopathien wird mit Hilfe von viralen Vektoren erzeugt. Hierfür werden vor allem Lentiviren sowie Adeno-assoziierte Viren verwendet (St Martin et al., 2007; Alerte et al., 2008). Dieser Ansatz führt zu einer rapiden Degeneration nigrostriataler Neuronen (Kirik und Bjorklund, 2003). Vorteil dieser Methode ist die gut kontrollierte regionale und temporale Überexpression des Transgens (Chesselet, 2008). Nachteilig ist jedoch die erhöhte Variabilität der Transgen-Expression, ebenso ist die Untersuchung von Wechselwirkungen verschiedener betroffener neuronaler Systeme im Krankheitsverlauf nicht möglich (Kirik und Bjorklund, 2003).

1.3 Diabetes Mellitus

In Europa weisen etwa 15% der Menschen mittleren Alters sowie 35-40% der älteren Menschen eine Insulinresistenz auf (Decode Study Group, 2003). Insulinresistenz geht dabei typischerweise der Entstehung eines Typ 2 Diabetes mellitus voraus (T2DM), dessen globale Prävalenz im Jahr 2000 bei 2,8% lag, bis 2030 jedoch wahrscheinlich bis auf 4,4% gestiegen sein wird (Wild et al., 2004). Allein in Deutschland waren im Jahr 2004 6,4 Millionen Menschen an Diabetes erkrankt, wobei etwa 90% einen T2DM aufwiesen (Deutsche Diabetes Union, 2008). Die Folgen dieser Epidemie sind dabei enorm. So entwickeln viele T2DM Patienten langfristige Komplikationen, zu denen unter anderem Retinopathie, Nephropathie und kardiovaskuläre Schäden zählen. Diese sekundären Folgeerkrankungen stellen die häufigsten Ursachen für die erhöhte Morbidität und Mortalität der Patienten dar (Krolewski et al., 1996; Morrish et al., 2001).

1.3.1 Genetische und nicht genetische Faktoren sind mit Diabetes Mellitus assoziiert

Typischerweise gilt T2DM als eine heterogene und komplexe Krankheit, gekennzeichnet durch Hyperglykämie und ausgelöst durch die Interaktion von genetischen Prädispositionen mit vielfältigen Umweltfaktoren (Stumvoll et al., 2008; Unger, 2008). Die Rolle der genetischen Faktoren ist dabei gut dokumentiert, wenn auch nicht vollständig verstanden. Das Risiko an T2DM zu erkranken liegt bei Verwandten ersten Grades eines Patienten mit

Diabetes dreifach höher, als bei Personen ohne familiären Hintergrund (Florez et al., 2003; Gloyn, 2003; Hansen, 2003). Ebenso beträgt das Erkrankungsrisiko 40%, wenn ein Elternteil betroffen ist, und 70%, wenn beide betroffen sind (Groop et al., 1996). Eineiige Zwillinge zeigen zudem eine wesentlich höhere Übereinstimmung in der Erkrankungsrate als zweieiige Zwillinge oder Geschwister (Poulsen et al., 1999). Bei nicht-diabetischen Nachkommen von Patienten mit T2DM konnte sowohl Insulinresistenz, als auch eine Dysfunktion der β -Zellen des Pankreas mit erhöhten Insulinkonzentrationen nachgewiesen werden (Stadler et al., 2009). Zudem zeigen sich Unterschiede innerhalb ethnischer Gruppen sogar nach Migration in andere Länder, die unabhängig von Umweltfaktoren scheinen (Flegal et al., 1991).

Andererseits ist aber auch der Einfluss der Umweltfaktoren auf die Entwicklung von T2DM gut dokumentiert. Übergewicht gilt dabei als einer der Hauptrisikofaktoren, wobei zwischen 60% und 90% der T2DM Fälle auf ein erhöhtes Körpergewicht zurückzuführen sind (Anderson et al., 2003). Als weiterer Hauptfaktor bei der Entstehung von T2DM wird körperliche Inaktivität angesehen (Manson et al., 1991; Levine et al., 2005). So senkt tägliche physische Aktivität von mehr als 30 Minuten signifikant das Risiko an T2DM zu erkranken (Hu, 2003). Erhöhte Kalorienaufnahme, eine sitzende Lebensweise sowie das daraus resultierende Übergewicht treten in Populationen mit höherem Lebensstandard und einem westlichen Lebensstil vermehrt auf und sind daher wesentlich für den Anstieg der Inzidenz von T2DM verantwortlich (Neel, 1999; Shaw und Chisholm, 2003; van Dam, 2003). Zusätzlich führt auch die immer weiter steigende Lebenserwartung zu einer erhöhten Prävalenz von Übergewicht und T2DM (Davidson, 1979).

1.3.2 Übergewicht und Insulinresistenz können Diabetes Mellitus induzieren

T2DM ist charakterisiert durch Hyperglykämie im Kontext von Insulinresistenz und β -Zell Dysfunktion (Unger, 2003). Insulinresistenz, der zentrale Punkt bei der Entwicklung eines T2DM, kann als verminderte Insulinsensitivität auf Gewebe- sowie auf Zellebene aufgrund einer beeinträchtigten Insulin-Signalübertragung definiert werden. Die Entstehung der Insulinresistenz verläuft meist über einen größeren Zeitraum und hängt mit verschiedenen Faktoren zusammen, wobei die genauen zugrunde liegenden Mechanismen weiterhin unklar sind. Eine zentrale Rolle wird jedoch Übergewicht sowie der durch Übergewicht induzierten chronischen Inflammation zugeschrieben. Das Fettgewebe gilt als wichtiges endokrines Gewebe, das NEFAs (non-esterified fatty acids), Glycerol, RBP-4 (Retinol-binding protein-4), verschiedene Hormone sowie proinflammatorische Zytokine wie TNF α (tumor necrosis factor α), IL (interleukin) 6 und MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) abgibt und so

den Metabolismus beeinflusst (Graham et al., 2006; Shoelson et al., 2006). Übergewicht verändert den Stoffwechsel des Fettgewebes und führt zu einer beeinträchtigten Produktion von Adiponektin und einer erhöhten Freisetzung von NEFAs und proinflammatorischen Zytokinen (Gesta et al., 2007). Hierdurch kann Übergewicht eine systemische, niedrigstufige Entzündungsreaktion auslösen, wodurch Gewebe-Makrophagen zum viszeralen Fettgewebe rekrutiert werden, welche die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und MCP unterstützen (Shi et al., 2006). Es wird angenommen, dass diese Faktoren das Insulin-Signaling (siehe 1.3.3) beeinträchtigen und so mit der Zeit Insulinresistenz induzieren.

Zuerst kompensieren die β -Zellen des Pankreas die Insulinresistenz des peripheren Gewebes mit einer erhöhten Insulinausschüttung, was letztendlich aber in einer gestörten Insulinsekretion und einer beeinträchtigten Regulation der Blutglukosekonzentration resultiert (Unger, 2003; Kasuga, 2006; Prentki und Nolan, 2006). So konnte anhand von Post-mortem Studien ein signifikanter Rückgang der β -Zellmasse bei Patienten mit T2DM festgestellt werden, der wahrscheinlich auf eine erhöhte Apoptose zurückzuführen ist (Butler et al., 2003; Donath und Halban, 2004; Jin und Patti, 2009). Der Untergang der β -Zellen ist dabei zum Teil auf die durch den gesteigerten Insulinbedarf erhöhte Belastung der Zellen zurückzuführen, jedoch spielen auch weitere Faktoren eine wesentliche Rolle. So wird einerseits angenommen, dass die hohen Konzentration an Glukose und SFAs im Blut sowie die erhöhte Expression von IAPP (islet amyloid polypeptide), das für die amyloiden Ablagerungen im Pankreas hauptsächlich verantwortlich ist, oxidativen Stress und ER (endoplasmic reticulum) Stress induzieren. Andererseits scheinen auch pro-inflammatorischen Zytokine, die vom Fettgewebe abgegeben werden, eine wichtige Rolle zu spielen (Novials et al., 1993; Gasa et al., 2001; Hotamisligil, 2006). Diese Faktoren führen zusammen mit der lokalen Entzündungsreaktion zur Erschöpfung der β -Zellen und letztendlich zu deren Untergang (Montane et al., 2014).

1.3.3 Beeinträchtigt Insulin-Signaling über den Akt Signalweg kennzeichnet Diabetes Mellitus

Beeinträchtigungen in der Insulin-Signalübertragung stehen im Zentrum der Entwicklung von Insulinresistenz und Diabetes. Insulin wird in Reaktion auf einen erhöhten Blutglukosespiegel ausgeschüttet und wirkt in verschiedenen Organen und Geweben, wie Leber, Skelettmuskeln und Fettgewebe. Die Aktivierung des PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) - Akt Signalwegs über den IR (Insulin receptor) und die IRS (Insulin receptor substrates) – Proteine spielt bei den metabolischen Wirkungen von Insulin eine zentrale Rolle (Shepherd et al., 1998). Dieser Signalweg ist hochkonserviert und seine Aktivierung wird

streng über einen mehrstufigen Prozess kontrolliert (Hemmings und Restuccia, 2012). Akt, auch PKB (Protein kinase B) genannt, besitzt über 100 bekannte Substrate und hat diverse Effekte auf die zelluläre Funktion und das Zellwachstum (Manning und Cantley, 2007).

PI3Ks können unter anderem über Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK), wie den IR, und über deren Adaptermoleküle, wie beispielsweise IRS, sowie auch über GPCRs (G protein-coupled receptors) aktiviert werden (Wymann et al., 2003). Aktiviertes PI3K löst die Umwandlung des membrangebundenen PIP₂ (Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate) zu PIP₃ (Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate) aus.

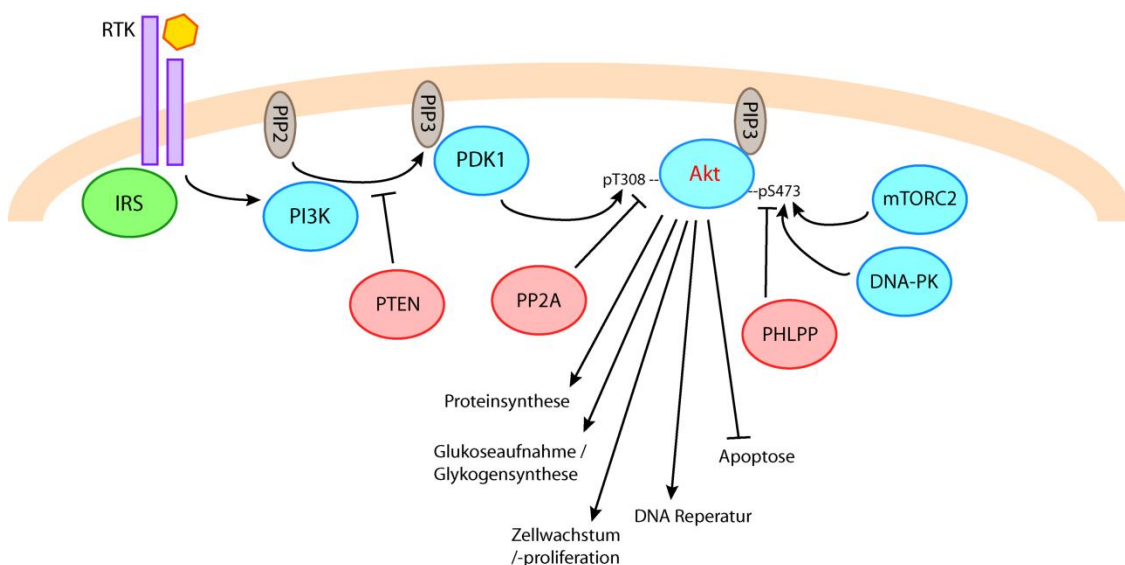


Abb. 1.3: Akt Aktivierung über Rezeptor-Tyrosinkinasen und den PI3K Signalweg. PI3K wird über RTK direkt oder indirekt aktiviert und erwirkt die Umwandlung von PIP₂ zu PIP₃. Hierdurch wird PDK 1 aktiviert, das Akt am T308 phosphoryliert, während mTORC 2 und DNA-PK am S473 phosphorylieren. Aktiviertes Akt verfügt über vielfältige zelluläre Funktionen. Die Dephosphorylierung erfolgt über PP2A und PHLPP.

Akt besteht aus einer N-terminalen Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne, einer zentralen Kinase-Domäne und einer Carboxyl-terminalen regulatorischen Domäne, die ein hydrophobes Motiv enthält. Akt bindet mit hoher Affinität über die PH-Domäne an PIP₃ (Andjelkovic et al., 1997) und wird in der Folge von PDK 1 (3-Phosphoinositid-dependent Protein Kinase 1) am Threonin (T) 308, einer der zwei regulatorischen Phosphorylierungsstellen, phosphoryliert (Stephens et al., 1998). T308 befindet sich im Aktivierungsring innerhalb der Kinasedomäne und wird zur initialen, partiellen Aktivierung von Akt benötigt (Alessi et al., 1997). Die T308 Phosphorylierung scheint ausreichend, um mTORC 1 (mechanistic target of rapamycin complex 1) zu aktivieren, worüber die Proteinsynthese und die Zellproliferation stimuliert werden. Die Phosphorylierung von S473, der zweiten regulatorischen Phosphorylierungsstelle

in der C-terminalen regulatorischen Domäne, durch mTOR (mechanistic Target of Rapamycin) (Sarbasov et al., 2005) oder DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) (Feng et al., 2004) hat alleine nur geringen Einfluss auf die Akt-Aktivität (Alessi et al., 1996), führt aber in Kombination mit der T308 Phosphorylierung zur vollständigen Aktivierung von Akt. Darauf folgt die Phosphorylierung weiterer Substrate, wie beispielsweise die inhibitorische Phosphorylierung der pro-apoptotischen FOXO-Proteine (Guertin et al., 2006). Voll aktiviertes Akt beeinflusst vielfältige zelluläre Funktionen, wie die Angiogenese, das Zellwachstum, die Zellproliferation, die Glukoseaufnahme, die Protein- und Glykogensynthese sowie die Apoptose (Manning und Cantley, 2007) (Abb. 1.3).

Die Dephosphorylierung am T308 durch PP2A (Protein phosphatase 2A) (Andjelkovic et al., 1997) und am S473 durch PHLPP1/2 (PH domain and Leucine rich repeat Protein Phosphatases) (Brognard et al., 2007) sowie die Umwandlung von PIP₃ in PIP₂ durch PTEN (Phosphatase and tensin homolog) (Stambolic et al., 1998) wirken der Akt-Aktivierung entgegen.

Der Akt-Signalweg spielt sowohl in den Muskeln, als auch im Fettgewebe eine zentrale Rolle bei der Insulin-stimulierten Glukoseaufnahme (Steinberg und Kemp, 2009). Die Bindung von Insulin an RTK führt zu einer Aktivierung des Akt-Signalwegs und in der Folge zur Translokation von GLUT-4 (glucose transporter 4) zur Zellmembran und einer erleichterten Glukoseaufnahme (Mora et al., 2004). Dies geschieht unter anderem über die Phosphorylierung des Akt Substrats von 160 kDa (AS160), das über die Bindung von 14-3-3 Proteinen eine reduzierte Rab-GAP (GTPase activating protein) Aktivität induziert und so die GLUT-4 Translokation und die Glukoseaufnahme fördert (Kohn et al., 1996; Howlett et al., 2007; Sakamoto und Holman, 2008). Insulinresistenz wird dabei mit Störungen sowohl von Akt vorgelagerten, als auch nachgelagerten Proteinen assoziiert. Hierzu zählen beispielsweise der Verlust des IRs, eine erhöhte Dephosphorylierung von IRS 1 sowie der komplette Verlust der IRS-Proteine (Yamauchi et al., 1996; Bruning et al., 1998; Previs et al., 2000), eine reduzierte PI3K Aktivität (Tremblay et al., 2001) und eine beeinträchtigte Phosphorylierung des AS160 (Karlsson et al., 2005).

Störungen im Akt Signalweg werden zudem sowohl mit Alzheimer, als auch mit der Huntington Krankheit in Verbindung gebracht (Colin et al., 2005; Griffin et al., 2005). Ebenso scheint der Akt Signalweg bei Entstehung der PK eine wichtige Rolle zu spielen, wobei die medikamentöse Behandlung der gestörten Akt Aktivität eine mögliche Behandlungsstrategie für die Krankheit darstellen könnte (Burke, 2007; Levy et al., 2009). So konnte gezeigt werden, dass die Signaltransduktion über den Akt Signalweg in der SNpc von

Parkinson Patienten stark vermindert ist (Malagelada et al., 2008; Timmons et al., 2009). Zudem spielt der Akt Signalweg eine wichtige Rolle bei der Regulation der dopaminergen Transporter sowie der Dopaminrezeptoren (Garcia et al., 2005; Beaulieu et al., 2007), sodass Medikamente der PK, die das dopaminerge System beeinflussen, über die Aktivierung von Akt neuroprotektiv wirken (Fallon et al., 2006; Weinreb et al., 2006; Sagi et al., 2007; Lim et al., 2008). Verschiedene Akt 1 Haplotypen gelten außerdem als protektiv gegenüber der PK (Xiromerisiou et al., 2008) und Parkin und DJ-1 können das Akt-Signaling fördern (Kim et al., 2005; Yang et al., 2005; Fallon et al., 2006).

1.3.4 Insulin spielt eine wichtige Rolle im zentralen Nervensystem

Die Insulinkonzentration im Gehirn steht in engem Zusammenhang mit seiner Konzentration im Serum, da Insulin die Blut-Hirn-Schranke überqueren kann (Woods und Porte, 1977; Banks et al., 1997a). Die Aufnahme von Insulin aus dem Blut ins ZNS geschieht dabei nicht-linear via eines sättigungsabhängigen, Rezeptor-gesteuerten Transport-Systems (Baura et al., 1993; Banks et al., 1997b). Insulin, IGF (Insulin-like growth factor) 1 und 2 sowie die entsprechenden Rezeptoren werden zudem im gesamten Gehirn exprimiert, unter anderem auch in Neuronen (Gammeltoft et al., 1985; Hill et al., 1986) und Gliazellen (D'Ercole, 1993; Freude et al., 2009). Interessanterweise finden sich die höchsten Expressionsniveaus in Gehirnarealen, die auch besonders durch Neurodegeneration betroffen sind (de la Monte et al., 2009).

Insulin dient dem ZNS als hormonelles Signal, das benötigt wird, um Körpergewicht, Nahrungsaufnahme und metabolische Homöostase zu kontrollieren, wobei vor allem eine langfristige Wirkung postuliert wird (Woods et al., 1979; Schwartz et al., 2000; Obici et al., 2002; Porte et al., 2002). Das Insulin-Signaling im Gehirn vermindert die Nahrungsaufnahme, sodass die Insulinsekretion auf lange Sicht als negatives Feedback Signal der Energieaufnahme und des Körperfetts wirkt (Havel, 2001; Morton et al., 2006). Hierbei spielen vor allem die Neurone des ventromedialen Hypothalamus eine zentrale Rolle, auf die Insulin neuromodulatorisch wirken kann (McGowan et al., 1992). Diese neuromodulierende Funktion von Insulin konnte unter anderem in elektrophysiologischen Studien nachgewiesen werden (Plum et al., 2005; Kovacs und Hajnal, 2009). Zudem kann Insulin die Expression der Dopamin-Rezeptoren sowie die Konzentration des Neurotransmitters Dopamin beeinflussen (Lozovsky et al., 1981; Danguir et al., 1984; Lozovsky et al., 1985).

Ebenso konnte ein Einfluss von Insulin auf Gedächtnis und Wahrnehmung nachgewiesen werden. So besteht ein Zusammenhang zwischen DM und einer verminderten kognitiven

Funktion (Hershey et al., 1997; Allen et al., 2004), welcher zudem abhängig vom Alter und der Krankheitsdauer ist (Reaven et al., 1990; Elias et al., 1997). Die wiederholte intranasale Gabe von Insulin kann das verbale Gedächtnis von Alzheimer Patienten verbessern (Reger et al., 2006). Bei Ratten scheint die Wirkung von Insulin auf das räumliche Lernen dosisabhängig (Haj-ali et al., 2009) und intrahippocampalen Insulin-Infusionen können über einen PI3K abhängigen Prozess das räumlichen Arbeitsgedächtnis verbessern (McNay et al., 2010). Weiterhin konnten bei Ratten Veränderungen in den hippocampalen Konzentrationen von IR und IRS 1 nach Lernaufgaben gezeigt werden (Zhao et al., 1999; Dou et al., 2005).

Insulin spielt außerdem eine wichtige neuroprotektive Rolle, indem es den neuronalen Zelltod unterdrückt und antiapoptotisch wirkt. Die antiapoptotische Wirkung wird dabei hauptsächlich über den PI3K-Signalweg vermittelt (Tanaka et al., 1995; Barber et al., 2001; Yu et al., 2006; Moosavi et al., 2008). Insulin scheint die Apoptose auch während der neuronalen Entwicklung verhindern zu können (Tanaka et al., 1995). Weiterhin wirkt Insulin neuroprotektiv, indem es den schädlichen Effekten von oxidativem Stress entgegen wirkt (Duarte et al., 2003; Duarte et al., 2004; Yu et al., 2006) und vor β -Amyloid induziertem Zelltod schützt (Takadera et al., 1993; Rensink et al., 2004; Di Carlo et al., 2010).

Zusätzlich verfügt Insulin im ZNS auch über eine wichtige neurotrophe Funktion. So spielt es eine Rolle in der neuronalen Proliferation sowie im neuronalen Wachstum und ist in die Regulation der Gehirnentwicklung involviert (Roger und Fellows, 1980; Schubert et al., 2003; Farrar et al., 2005; Yu et al., 2008). Ebenso beeinflusst es die neuronale Differenzierung (Aizenman et al., 1986; Wozniak et al., 1993; Schechter und Abboud, 2001). Es wird angenommen, dass das Insulin-Signaling einen integrativen Faktor darstellt, der die neuronale Differenzierung mit Nahrungsinformationen koordiniert und so die Geschwindigkeit der Differenzierung an Veränderungen des Ernährungszustands anpassen kann (Leopold, 2004). Schließlich verfügt Insulin auch über eine das Neuritenwachstum stimulierenden Funktion (Recio-Pinto et al., 1984; Recio-Pinto et al., 1986), die wahrscheinlich in Abhängigkeit von Astrozyten agiert (Ang et al., 1993; Heni et al., 2011).

1.4 Übergewicht, Insulinresistenz und die Parkinson Krankheit

Verschiedene epidemiologische Studien haben eine potentielle Verbindung von Diabetes und neurodegenerativen Erkrankungen hergestellt. So konnte für Patienten mit Diabetes ein erhöhtes Risiko für Demenz (Peila et al., 2002), für Neuropathie (Charles et al., 2011) und für Alzheimer (Arvanitakis et al., 2004a) gezeigt werden. Ein möglicher Zusammenhang

zwischen Übergewicht, Insulinresistenz, Diabetes und Parkinson wurde ebenfalls in vielen Studien analysiert und wird im Folgenden genauer dargelegt.

1.4.1 Widersprüchliche Ergebnisse über den Zusammenhang zwischen Diabetes Mellitus und der Parkinson Krankheit in Humanstudien

Verschiedene klinische Studien haben eine mögliche Assoziation von DM und Parkinson untersucht. Die Ergebnisse sind dabei, ebenso wie das Design der Studien, unterschiedlich und der Zusammenhang zwischen diesen beiden Erkrankungen damit weiter unklar.

Bei einem großen Teil der Studien handelt es sich um retrospektive Fall-Kontroll-Studien sowie um Querschnittsstudien (Tab. 1.2), die jedoch unterschiedliche Ergebnisse lieferten. So zeigte sich bei einigen dieser Studien ein inverser Zusammenhang zwischen DM und der Entwicklung der PK (Powers et al., 2006; Scigliano et al., 2006; D'Amelio et al., 2009; Miyake et al., 2010). Ein anderer Teil der Studien konnte dagegen keinen Zusammenhang zwischen Parkinson und DM feststellen (Leibson et al., 2006; Becker et al., 2008), während ein dritter Teil eine positive Assoziation zwischen DM und Parkinson postulierte (Schernhammer et al., 2011; Sun et al., 2012). Zusätzlich konnte für Parkinson Patienten mit Insulinresistenz ein erhöhtes Risiko für Demenz sowie bei Patienten mit DM stärker ausgeprägte Symptome der PK gefunden werden (Bosco et al., 2012; Cereda et al., 2012). Die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Studien sind wahrscheinlich vor allem auf die meist sehr kleinen Kohortengrößen sowie die Datenerfassung durch Selbstangaben zurückzuführen.

Bei einem weiteren Teil der klinischen Untersuchungen handelt es sich um prospektive Kohorten-Studien (Tab. 1.3), die aber ebenfalls zu unterschiedlichen Ergebnissen kamen. So konnte auch hier einerseits keine Assoziation zwischen Parkinson und Diabetes gefunden werden (Simon et al., 2007; Palacios et al., 2011), andererseits zeigten einige Studien einen positiven Zusammenhang (Hu et al., 2007; Driver et al., 2008; Xu et al., 2011). Eine inverse Assoziation der beiden Krankheiten wurde dagegen nicht gefunden.

Somit ist ein positiver Zusammenhang zwischen DM und der PK durchaus denkbar, konnte jedoch in klinischen Studien bislang noch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Weitere Patientenstudien, die diese Assoziation genauer untersuchen, scheinen deshalb notwendig.

Fall-Kontroll-Studien				
Referenz	Studiendesign	Nachweis von DM / PK	Kohorten- größe	Hauptresultat
Studien mit einer inversen Assoziation				
Powers et al., 2006	- klinische Daten - Querschnittsstudie - Amerikanische Population (Washington State)	<u>PK</u> : Patientendaten / diagnostizierte Fälle <u>DM</u> : Selbstangaben, abgesichert über medizinische Aufzeichnungen	<u>PK</u> : 352 <u>Kontrollen</u> : 484	Inverse Assoziation zwischen Parkinson und DM bei Männern
Scigliano et al., 2006	- klinische Daten - Retrospektiv, ϕ 17 Jahre - Italienische Population	<u>PK</u> : Patientendaten / diagnostizierte Fälle <u>DM</u> : Patientendaten / diagnostizierte Fälle	<u>PK</u> : 178 <u>Kontrollen</u> : 533	Inverse Assoziation von Parkinson und DM
D'Amelio et al., 2009	- klinische Daten - Querschnittsstudie - Italienische Population	<u>PK</u> : Selbstangaben, nicht abgesichert <u>DM</u> : Selbstangaben, abgesichert über medizinische Aufzeichnungen	<u>PK</u> : 318 <u>Kontrollen</u> : 318	Inverse Assoziation von Parkinson und vorausgehendem DM
Miyake et al., 2010	- klinische Daten - Querschnittsstudie - Japanische Population	<u>PK</u> : Patientendaten / diagnostizierte Fälle <u>DM</u> : Selbstangaben, nicht abgesichert	<u>PK</u> : 249 <u>Kontrollen</u> : 368	Inverse Assoziation von Parkinson und DM
Studien ohne Assoziation				
Leibson et al., 2006	- klinische Daten - Retrospektiv, ϕ 19 Jahre - Amerikanische Population (Minnesota)	<u>PK</u> : Patientendaten / diagnostizierte Fälle <u>DM</u> : Patientendaten / diagnostizierte Fälle	<u>PK</u> : 197 <u>Kontrollen</u> : 197	Keine Assoziation zwischen Parkinson und DM
Becker et al., 2008	- "General Practice Research Database" - Retrospektiv, ϕ 11 Jahre - Britische Population	<u>PK</u> : Patientendaten / diagnostizierte Fälle <u>DM</u> : Patientendaten / diagnostizierte Fälle	<u>PK</u> : 3637 <u>Kontrollen</u> : 3637	Keine Assoziation zwischen Parkinson und DM
Studien mit einer positiven Assoziation				
Schernhammer et al., 2011	- Danish Hospital Register - Retrospektiv, ϕ 5 Jahre - Dänische Population	<u>PK</u> : Pharmazie-Berichte Parkinson-Medikamente <u>DM</u> : Pharmazie-Berichte Diabetes-Medikamente	<u>PK</u> : 1931 <u>Kontrollen</u> : 9651	Signifikante Assoziation zwischen DM und Parkinson, speziell bei Fällen der PK mit jungem Anfangsalter
Bosco et al., 2012	- Klinische Daten - Prospektiv, ϕ 3 Jahre - Italienische Population	<u>PK</u> : diagnostizierte Fälle <u>DM</u> : Glukose Toleranztest	<u>PK</u> : 57 <u>PK mit Demenz</u> : 53	Insulinresistenz bei Parkinsonpatienten ist mit einem erhöhten Risiko für Demenz assoziiert
Cereda et al., 2012	- Klinische Daten - Querschnittsstudie - Italienische Population	<u>PK</u> : in der Klinik diagnostizierte Fälle <u>DM</u> : Selbstangaben, abgesichert über Interviews	<u>PK</u> : 89 <u>PK und DM</u> : 89	DM als Risikofaktor für stärkere Parkinson Symptome
Sun et al., 2012	- „Taiwan's National Health Insurance (NHI) database" - Retrospektiv, ϕ 8 Jahre - Taiwanische Population	<u>PK</u> : Patientenberichte, Krankenhausberichte <u>DM</u> : zu Messbeginn diagnostizierte Fälle	<u>DM</u> : 603 416 <u>Kontrollen</u> : 472 188	DM ist mit einem erhöhten Risiko für Parkinson assoziiert

Tab. 1.2: Fall-Kontroll-Studien über den Zusammenhang von DM und der PK. DM: Diabetes Mellitus; PK: Parkinson Krankheit; ϕ : Durchschnittliche Untersuchungsdauer

Prospektive Kohorten-Studien				
Referenz	Studiendesign	Nachweis von DM / PK	Kohortengröße	Hauptresultat
Studien ohne Assoziation				
Simon et al., 2007	<u>Frauen:</u> - Nurses' Health Study - ϕ 22,9 Jahre <u>Männer:</u> - Health Professionals Follow-up Study - Amerikanische Population - ϕ 12,6 Jahre	<u>PK:</u> Selbstangaben, abgesichert über Arztbefragung <u>DM:</u> Selbstangaben, nicht abgesichert	<u>Frauen:</u> 121 064 - davon DM: 2155 - davon PK: 264 <u>Männer:</u> 50 833 - davon DM: 1604 - davon PK: 266	Keine Assoziation zwischen Parkinson und DM
Palacios et al., 2011	- Cancer Prevention Study II, Nutrition Cohort - ϕ 18 Jahre - Amerikanische Population	<u>PK:</u> Selbstangaben, abgesichert über Arztbefragung <u>DM:</u> Selbstangaben, nicht abgesichert → Diabetes zu Messbeginn	<u>Frauen:</u> 79 949 - davon PK: 236 <u>Männer:</u> 63 306 - davon PK: 420	Keine Assoziation zwischen Parkinson und DM
Studien mit positiver Assoziation				
Hu et al., 2007	- ϕ 18 Jahre, - Finnische Population	<u>PK:</u> Medikamenten-Verschreibungen <u>T2DM:</u> Selbstangaben, abgesichert über Krankenhausregister und Medikamenten-Verschreibungen → Diabetes zu Messbeginn	<u>Frauen:</u> 26 384 - davon DM: 507 - davon PK: 309 <u>Männer:</u> 25 168 - davon DM: 591 - davon PK: 324	T2DM ist mit einem erhöhten Parkinson Risiko assoziiert
Driver et al., 2008	- Physicians' Health Study - ϕ 23 Jahre - Amerikanische Population	<u>PK:</u> Selbstangaben, in 73 Fällen abgesichert über medizinische Berichte <u>DM:</u> Selbstangaben, nicht abgesichert	<u>Männer:</u> 21 841 - davon DM: 2410 - davon PK: 556	DM ist ein Risikofaktor für Parkinson bei Männern
Xu et al., 2011	- National Institute of Health-AARP Diet and Health Study - ϕ 15 Jahre - Amerikanische Population	<u>PK:</u> Selbstangaben, abgesichert über Arztbefragung <u>DM:</u> Selbstangaben, nicht abgesichert	<u>Kohorte:</u> 288 662 - davon DM: 21 611 - davon PK: 1565	DM ist mit einem erhöhten Parkinson Risiko assoziiert

Tab. 1.3: Prospektive Kohorten Studien über den Zusammenhang von DM und der PK. DM: Diabetes Mellitus; PK: Parkinson Krankheit; ϕ : Durchschnittliche Untersuchungsdauer

1.4.2 Widersprüchliche Ergebnisse über den Zusammenhang zwischen Fettaufnahme und der Parkinson Krankheit in Humanstudien

Neben Insulinresistenz und Übergewicht wird auch die Fettaufnahme mit der Diät als ein möglicher Risikofaktor bei der Entwicklung der PK angesehen, weshalb dieser potentielle Zusammenhang in verschiedenen klinischen Studien untersucht wurde. Einige Studien konnten dabei eine hohe Aufnahme an tierischen Fetten mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung der PK assoziieren (Logroscino et al., 1996; Anderson et al., 1999; Johnson et al., 1999). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei anderen klinischen Studien jedoch kein signifikanter Zusammenhang (Hellenbrand et al., 1996; Chen et al., 2003; Powers et al., 2003). Diese inkonsistenten Ergebnisse sind wahrscheinlich vor allem auf die relativ kleinen

Kohortengrößen sowie die Erfassung der Fettaufnahme anhand von Fragebögen und Interviews zurückzuführen.

Neben dem Gesamtfettgehalt der Diät scheint besonders die Zusammensetzung des aufgenommenen Fettes eine Rolle bei der Entwicklung einer neurodegenerativen Erkrankung zu spielen. Dabei wird vor allem die Aufnahme von MUFAs und PUFAs mit einem verminderten Risiko für die PK assoziiert (Seidl et al., 2014). Ungesättigte Fettsäuren sind ein wichtiger Bestandteil neuronaler Zellmembranen, deren Zusammensetzung durch die mit der Diät aufgenommenen Fettsäuren beeinflusst wird (Youdim et al., 2000). Besonders PUFAs weisen anti-oxidative, anti-inflammatorische und neuroprotektive Eigenschaften auf (Blok et al., 1996; Kim et al., 2001; Robinson und Mazurak, 2013; Zhang et al., 2013). Eine verminderte PUFA-Konzentration in neuronalen Membranen kann in verstärkter Lipidperoxidation und erhöhtem oxidativen Schaden resultieren und so möglicherweise zum Absterben der Neuronen beitragen (Farooqui und Horrocks, 1998). Die potentiell protektive Rolle der mehrfach ungesättigten Fettsäuren bei der Entstehung der PK zeigte sich auch in verschiedenen klinischen Studien. So ist die Aufnahme an MUFAs und PUFAs invers mit der Entstehung der PK assoziiert (Abbott et al., 2003; de Lau et al., 2005). Zudem zeigte eine Meta-Analyse eine inverse Assoziation der PK mit der Aufnahme der essentiellen α -Linolensäure (Kamel et al., 2014). Ebenso konnten in der SN von Parkinson-Patienten erhöhte Konzentrationen an PUFA-Peroxidations-Metaboliten und verminderte Konzentrationen an PUFAs und Glutathion gefunden werden (Chen et al., 2003).

1.4.3 Mausstudien zeigen einen möglichen Zusammenhang zwischen Übergewicht, Insulinresistenz und der Parkinson Krankheit

Der mögliche Zusammenhang zwischen Neurodegeneration und Insulinresistenz wurde auch im Tiermodell untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Übergewicht und Diabetes zu einer milden Atrophie und Insulinresistenz des Gehirns führen und dabei Neuroinflammation, oxidativer Stress und Defizite in der cholinergen Funktion entstehen (Winocur et al., 2005; Moroz et al., 2008). Übergewichtige Ratten leiden unter kognitiven Beeinträchtigungen sowie Defiziten im räumlichen Lernen und im Erinnerungsvermögen (Winocur und Greenwood, 2005; Winocur et al., 2005). Zudem verschlimmert die metabolische Inflammation in übergewichtigen sowie in diabetischen Mäusen die Degeneration der doperminergen Neuronen (Wang et al., 2014). Zusätzlich konnten bei Ratten kognitive Beeinträchtigungen nach Fütterung einer Hochfett Diät (HFD) nachgewiesen werden (Greenwood und Winocur, 1996). Eine Diät mit erhöhten Konzentrationen an SFAs

und Cholesterol führte ebenfalls zu Beeinträchtigungen im Gedächtnis und veränderte die hippocampale Morphologie (Granholm et al., 2008). Effekte einer HFD können sehr schnell nachgewiesen werden, sodass bei Ratten nach nur 9 Tagen eine verminderte kognitive Leistung gezeigt wurde (Murray et al., 2009). Weiterhin scheint eine HFD während der Schwangerschaft auch die kognitiven Funktionen der Nachkommen zu beeinträchtigen und zu erhöhtem oxidativen Stress und Inflammation zu führen (White et al., 2009).

Zudem konnte anhand von Nagern Modellen auch ein Einfluss der HFD auf sowohl den mesolimbischen, als auch den nigrostriatalen Dopamin-Signalweg nachgewiesen (Fulton et al., 2006; Palmiter, 2007; Davis et al., 2008b; Geiger et al., 2009). Ebenso führte eine HFD zu einer erhöhten Empfindlichkeit der Dopamin produzierenden Neuronen in der SN gegenüber Parkinson-induzierenden Toxinen, was im verstärkten Absterben dieser Neurone resultierte (Choi et al., 2005; Morris et al., 2010; Bousquet et al., 2012). Anhand von striatalen Gehirnschnitten konnte zudem gezeigt werden, dass sowohl das lang-, als auch das kurzfristige Füttern einer HFD die Dopamin Freisetzung erhöht (Zhang et al., 2005; Geiger et al., 2009).

Oxidativer Stress und Inflammation spielen möglicherweise Schlüsselrollen bei dem durch HFD induzierten kognitiven Verlust. So konnte bei Mäusen, die eine HFD erhielten und eindeutige kognitive Beeinträchtigungen zeigten, sowohl oxidativer Stress, als auch Inflammation im Gehirn nachgewiesen werden (Zhang et al., 2005; Souza et al., 2007; Pistell et al., 2010). Zudem führte eine HFD zu erhöhtem altersabhängigen oxidativen Stress im Gehirn (Mattson et al., 2003; Perry et al., 2003). Möglicherweise ist aber auch BDNF (brain derived neurotrophic factor) in die Reduktion der kognitiven Funktion involviert. BDNF unterstützt die synaptische Plastizität und die neuronale Erregbarkeit (Jovanovic et al., 2000) und scheint bei der Erhaltung der Lernfähigkeit und der Gedächtnisfunktion speziell im alternden Gehirn eine wichtige Rolle zu spielen (Croll et al., 1998; Kovalchuk et al., 2002). Beeinträchtigungen in der kognitiven Funktion nach Fütterung einer HFD waren sowohl bei Ratten, als auch bei Mäusen mit verminderten Konzentrationen an BDNF assoziiert (Wu et al., 2004; Stranahan et al., 2008; Pistell et al., 2010).

Eine kürzlich durchgeführte Studie mit [A53T] α Syn transgenen Mäusen konnte jedoch keine Verschlechterung der kognitiven Funktion nach Fütterung einer hochkalorischen Diät nachweisen. Stattdessen waren die Mäuse resistent gegenüber durch HFD induziertem Übergewicht und Insulinresistenz und wiesen ein vermindertes Körperfett und einen erhöhten Kalorienverbrauch auf (Rothman et al., 2014).

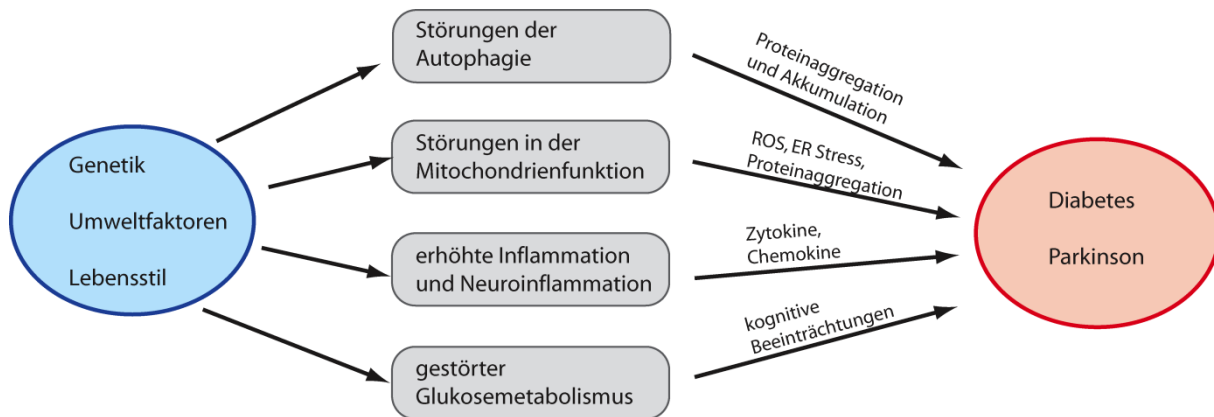


Abb. 1.4: Beeinträchtigte Signalwege bei der Parkinson Krankheit und bei Diabetes Mellitus. Genetik, Umweltfaktoren sowie der persönliche Lebensstil können Autophagie, Mitochondrienfunktion, Inflammationsprozesse und den Glukosemetabolismus beeinflussen. Störungen in diesen Prozessen können unter anderem sowohl die Entstehung der PK, als auch von DM befördern.

1.5 Störungen in gemeinsamen Signalwegen bei Diabetes Mellitus und der Parkinson Krankheit

Obwohl Parkinson und Diabetes klinisch unterschiedliche Krankheiten darstellen, weisen beide Krankheiten Beeinträchtigungen in gemeinsamen Signalwegen auf. Möglicherweise kann eine Störung in einem dieser Signalwege das Risiko sowohl für die PK, als auch für DM erhöhen (Santiago und Potashkin, 2013) (Abb. 1.4).

1.5.1 Störungen der Autophagie und der Mitochondrienfunktion sind mit der Parkinson Krankheit und mit Diabetes Mellitus assoziiert

Sowohl bei Parkinson, als auch bei DM, konnten mitochondriale Beeinträchtigungen nachgewiesen werden. Parkinson Patienten zeigen einen Funktionsverlust des mitochondrialen Komplex 1 in Teilen des Gehirns, wie der SN und dem frontalem Cortex, sowie in anderem Gewebe, wie Muskeln und Blutplättchen (Schapira et al., 1989; Shoffner et al., 1991; Haas et al., 1995; Parker et al., 2008). Ebenso stehen die mit der PK assoziierten Gene *PINK1*, *PARKIN*, *SNCA*, *LRRK2* und *DJ-1* mit der mitochondrialen Funktion in Verbindung. So wird DJ-1 in Neuronen bei oxidativem Stress hochreguliert und schützt diese vor mitochondrialer Dysfunktion (Hao et al., 2010; McCoy und Cookson, 2012). Zudem wurden einerseits im ZNS von Parkinson Patienten, andererseits aber auch in den Inselzellen des Pankreas bei Patienten mit T2DM verminderte DJ-1 Konzentrationen nachgewiesen. DJ-1 defiziente Mäuse zeigen sowohl im Alter, als auch bei über die Diät induzierter

Gewichtszunahme eine verschlechterte Glukosetoleranz und eine verminderte β -Zell-Fläche (Jain et al., 2012).

Auch für Patienten mit DM konnten mitochondriale Störungen nachgewiesen werden, die jedoch vor allem die Skelettmuskeln betreffen. So weisen Patienten mit T2DM eine verminderte Anzahl und morphologisch veränderte Mitochondrien auf (Kelley et al., 2002). Zudem korreliert die oxidative Kapazität des Skelettmuskels, welche hauptsächlich von der mitochondrialen Funktion abhängig ist, direkt mit der Insulinsensitivität (Razak und Anand, 2004). Diät-induzierte diabetische Mäuse zeigen außerdem eine erhöhte ROS (reactive oxygen species) Produktion im Skelettmuskel, was ebenfalls mit einer veränderten Mitochondrienstruktur assoziiert ist (Bonnard et al., 2008).

Sowohl die PK, als auch DM sind zudem mit Störungen in Signalwegen des Proteinabbaus assoziiert. Fehlgefaltete lösliche sowie aggregierte unlösliche Proteine werden einerseits über das UPS (Ubiquitin-proteasom system) und andererseits über den ALP (Autophagy-lysosom pathway) abgebaut (Ciechanover, 2005; Rubinsztein, 2006). Eine Beeinträchtigung in einem dieser Signalwege kann zur Akkumulation und Aggregation von Proteinen und damit zu zellulärer Toxizität führen. Störungen in der Autophagie zeigen sich bei der PK vor allem im ZNS. So basiert die exzessive Proteinaggregation der PK möglicherweise auch auf einer Deregulierung der Autophagie. Sowohl Störungen im UPS (Olanow und McNaught, 2006), als auch im ALP wurden bereits mit der PK in Verbindung gebracht (Pan et al., 2008), da beide Signalwege auch in den Abbau von α Syn involviert sind (Webb et al., 2003; Ferrucci et al., 2008; Spencer et al., 2009). Einige Proteine, die genetisch mit der PK assoziiert sind, spielen ebenfalls eine Rolle bei der Autophagie. Sowohl Mutationen in *LRRK2*, als auch der Verlust der DJ-1 Funktion resultieren in Störungen der Autophagie (Alegre-Abarrategui et al., 2009; Krebiehl et al., 2010; Ramonet et al., 2011). Parkin und Pink1 werden zu geschädigten Mitochondrien rekrutiert und fördern dort die Autophagie (Narendra et al., 2008; Vives-Bauza et al., 2010). Die PK wird außerdem mit der Morbus Gaucher, einer lysosomalen Speicherkrankheit, die durch den Mangel an Glucocerebrosidase (GCCase) verursacht wird, assoziiert. Mutationen in dem für das Enzym kodierenden *GBA* Gen wurden als häufiger monogenetischer Risikofaktor für die PK und für DLK identifiziert (Aharon-Peretz et al., 2004; Mitsui et al., 2009; Sidransky et al., 2009; Mata et al., 2010). Es wird angenommen, dass die GCCase die Aggregation von α Syn beeinflusst. So konnte bei Patienten mit sowohl der PK oder DLK, als auch *GBA* Mutationen eine starke Kolo-kalisation von α Syn und GCCase in LK und LN nachgewiesen werden (Goker-Alpan et al., 2010). Zudem resultiert der

funktionelle Verlust der GCase in erhöhter α Syn Aggregation und gesteigerter Neurotoxizität (Cuervo et al., 2004; Mazzulli et al., 2011).

Auch DM wird mit Störungen der Autophagie assoziiert, die sich, anders als bei der PK, jedoch vor allem im Pankreas zeigen. So weisen sowohl transgene diabetische, als auch WT Mäuse mit HFD eine erhöhte Auophagosom-Bildung in den β -Zellen des Pankreas auf (Ebato et al., 2008; Bartolome et al., 2012). Zudem resultiert der KO von ATG7 (Autophagy-related protein 7), einem für die Autophagosombildung essentiellen Gen, in β -Zellen in einer Degenerierung der Langerhans'schen Inseln sowie beeinträchtigter Glukosetoleranz und reduzierter Insulinsekretion (Ebato et al., 2008; Quan et al., 2012). Der Ausfall der Autophagie in den pankreatischen β -Zellen kann so den Übergang von Übergewicht zu DM fördern (Quan et al., 2012). Sowohl das ER, als auch Mitochondrien sind zudem einerseits mit dem Lipid- und dem Glukosemetabolismus, andererseits aber auch mit dem korrekten Ablauf der Autophagie verbunden. Werden diese Organe oxidativ gestresst, so kann T2DM entstehen (Rieusset, 2011). Chronische Überernährung kann zudem zu einer erhöhten Apoptoserate in ausgewachsenen Neuronen (Moraes et al., 2009), in neugeborenen Neuronen, in sich teilenden Zellen (McNay et al., 2012) sowie in neuronalen Stammzellen (Li et al., 2012) des Hypothalamus führten.

Somit konnten sowohl für die PK, als auch für DM Störungen in der Autophagie und in mitochondrialen Funktionen nachgewiesen werden. Während diese sich bei der PK jedoch vor allem auf das ZNS beschränken, sind bei DM hauptsächlich der Pankreas und die Skelettmuskeln betroffen. Unklar bleibt, ob bei DM auch autophagische Prozesse im Gehirn beeinträchtigt sind, welche möglicherweise zu der Entstehung der PK beitragen können sowie ob die Störungen der Autophagie bei der PK sich auf die Progression von DM auswirken können.

1.5.2 Erhöhte periphere Inflammationsprozesse zeigen sich bei Diabetes Mellitus und der Parkinson Krankheit

Besonders bei der Entstehung von Insulinresistenz spielen periphere Inflammationsprozesse eine wesentliche Rolle. Anhand von Humanstudien konnte ein klarer Zusammenhang zwischen der chronischen Aktivierung von pro-inflammatorischen Signalwegen und verminderter Insulinsensitivität gezeigt werden (de Luca und Olefsky, 2008). In verschiedenen Stadien von DM und Insulinresistenz wurden erhöhte Serum-Konzentrationen der Zytokine TNF α sowie IL 6 und 8 gemessen (Hotamisligil et al., 1995; Roytblat et al., 2000; Straczkowski et al., 2002). Auch im Tiermodell zeigt sich der

Zusammenhang zwischen Insulinresistenz und verstärkten Inflammationsprozessen. So ist bei übergewichtigen Nagern die TNF Produktion im Fettgewebe erhöht, zudem zeigt sich in Leber, Fettgewebe und der Skelettmuskulatur eine erhöhte JNK (c-Jun N-terminal kinase) Aktivität, einer Kinase die durch Stressreaktionen aktiviert werden kann und zu den inflammatorischen Reaktionen beiträgt (Hotamisligil et al., 1993; Hirosumi et al., 2002). Verschiedene Induktoren der Insulinresistenz, wie beispielsweise FFA, pro-inflammatorische Zytokine und oxidativer Stress aktivieren die Expression des *nos-2* (nitric oxide synthase 2) Gens, welche für iNOS (inducible nitric oxide synthase) kodiert, eine Kinase die große Mengen an NO (nitric oxide) produzieren kann (Sugita et al., 2005). iNOS KO Mäuse sind dagegen vor durch Übergewicht ausgelöste Insulinresistenz geschützt und zeigen eine erhöhte PI3K Aktivität (Perreault und Marette, 2001).

Auch bei der PK können periphere Inflammationsprozesse nachgewiesen werden. So zeigen sich bei Parkinson Patienten erhöhte Serumkonzentrationen an TNF α sowie der Zytokine IL 2, IL 4, IL 6 und IL 10 (Dufek et al., 2009; Reale et al., 2009; Scalzo et al., 2009; Mosley et al., 2012). Erhöhte Plasmakonzentrationen an IL 6 korrelieren dabei mit einem gesteigerten Risiko für die PK (Chen et al., 2008b). Zudem konnten erhöhte Konzentrationen an Autoantikörpern gegen α Syn im Serum sowie in der Cerebrospinalflüssigkeit von Parkinson Patienten nachgewiesen werden (Papachroni et al., 2007; Maetzler et al., 2011).

1.5.3 Gesteigerte Neuroinflammation kann bei der Parkinson Krankheit und bei Diabetes Mellitus nachgewiesen werden

Als Kennzeichen der Neuroinflammation gelten aktivierte Mikroglia, reaktive Astrozyten und infiltrierende T-Zellen im Parenchym des ZNS. Diese Veränderungen werden von einer erhöhten Produktion von Zytokinen, Chemokinen, Prostaglandinen, Proteinen der Komplementkaskade und ROS sowie RNS (reactive nitrogen species) begleitet, was in manchen Fällen in einem Riss in der Blut-Hirn-Schranke resultieren kann (Ransohoff und Perry, 2009).

Mikroglia sind sesshafte, phagozytische und im ganzen ZNS verbreitete Zellen, die die erste Line der Immunabwehr des Gehirns bilden. Sie besitzen TLRs (toll like receptors) sowie Zytokin- und Chemokinrezeptoren (Stone et al., 2009). Aktivierte Mikroglia geben verschiedene Stoffe ab, die toxische Substanzen abwehren können, aber besonders bei chronischer Aktivierung auch die Verletzung und das Absterben von Neuronen beschleunigen können. Zu diesen Stoffen gehören ROS, RNS, proinflammatorische Zytokine und Prostaglandine (Stone et al., 2009; More et al., 2013). Astrozyten sind die häufigsten

Gliazellen des Gehirns, die ebenfalls im ganzen Gehirn verbreitet sind (Sherwood et al., 2006). Sie geben Neuronen strukturelle Unterstützung und spielen außerdem eine aktive und integrale Rolle bei der Vermittlung des physiologischen und pathologischen Status von Neuronen (Mena und Garcia de Yebenes, 2008; Heneka et al., 2010). Auch Astrozyten weisen unter anderem Zytokinrezeptoren und TLRs auf (Bsibsi et al., 2002; Carpentier et al., 2005). TLRs sind evolutionär konservierten Rezeptoren, die pathogene Muster erkennen und so eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Krankheitserregern spielen. TLRs aktivieren eine Immunantwort nach Erkennen spezifischer pathogener Liganden wie PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) sowie nach Gewebeschädigung und nach entzündungsinduzierten, nicht-mikrobischen Gefahren durch DAMPs (damage-associated molecular patterns) (Kawai und Akira, 2010; Jialal et al., 2014).

Vor allem die PK wird mit einer erhöhten Neuroinflammation in Verbindung gebracht. Die Fehlregulierung des Immunsystems gilt als langsamer und kontinuierlicher Faktor der neuronalen Dysfunktion und bedingt unter anderem die chronische Natur der PK (Hirsch und Hunot, 2009; Lee et al., 2009; More et al., 2013). In der SN sowie im Striatum von Gehirnen von Parkinson Patienten konnten beispielsweise aktivierte Mikroglia und eine erhöhte Dichte von Astroglia nachgewiesen werden (McGeer et al., 1988; Damier et al., 1993; Hunot et al., 1999). Ebenso wurde ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung von Mikroglia und dem Fortschreiten der Krankheit gefunden (McGeer et al., 1988; Czlonkowska et al., 1996; He et al., 2001; Sugama et al., 2003; Block und Hong, 2007) und die Anzahl der Astrozyten verhält sich invers proportional zum Untergang dopaminerger Neuronen (Damier et al., 1993). Auch bei einer α Syn überexprimierenden Mauslinie konnte eine erhöhte Aktivierung der Mikroglia nachgewiesen werden, in anderen Nagermodellen für die PK zeigte sich eine verstärkte Astroglia Reaktion (Czlonkowska et al., 1996; Rodrigues et al., 2001; Su et al., 2008). Anhand von [A53T] α Syn transgenen Mäusen konnten nach LPS (Lipopolysaccharid) Stimulation zudem verstärkte Neuroinflammation, das Absterben dopaminerger Neuronen und zytoplasmatische α Syn Einschlüsse nachgewiesen werden (Gao et al., 2008). α Syn kann zudem Mikroglia direkt aktivieren und dabei die TLR Expression beeinflussen (Beraud et al., 2011). Außerdem wurden sowohl im Blut, als auch in Gehirnen von Parkinson Patienten erhöhte Konzentrationen von proinflammatorischen Markern wie TNF α , IL 1 β , IL 6, ROS und Eicosanoiden gemessen (McGeer et al., 1988; Mogi et al., 1994; Nagatsu et al., 2000).

Auch chronische Überernährung und Insulinresistenz können Inflammation im Gehirn auslösen. Während bei der PK jedoch vor allem die SN betroffen ist, beeinträchtigt die Insulinresistenz hauptsächlich regulatorische Funktionen des Hypothalamus (Thaler und

Schwartz, 2010; Cai, 2013). So führen Übergewicht, Überernährung und eine chronische Störung des Energiegleichgewichts zu einer Hochregulierung des I κ B (I-kappa-B-kinase)–NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) Signalings im Gehirn, wodurch inflammatorische Prozesse induziert und Veränderungen in Körpergewicht und Fettmasse gefördert werden können (Zhang et al., 2008; Milanski et al., 2009; Posey et al., 2009; Oh et al., 2010; Meng und Cai, 2011). Dies geschieht unter anderem über TLRs, die auch durch zirkulierende FFA stimuliert werden können und dabei neben dem I κ B – NF κ B Signalweg auch JNK und andere intrazelluläre inflammatorische Signale aktivieren (Fessler et al., 2009). Die Fähigkeit TLRs zu stimulieren konnte beispielsweise für Palmitinsäure (n-3; 16:0) (Kim et al., 2007; Davis et al., 2008a; Kleinridders et al., 2009), aber auch für Stearinsäure (18:0) und Linolensäure (18:3) gezeigt werden (Milanski et al., 2009). Zudem können die Fütterung einer HFD sowie intracerebroventrikuläre Lipidinfusionen bei Nagern das hypothalamische IKK β - NF- κ B Signaling und eine erhöhte mRNA Expression von TLR 4, NF- κ B, TNF α , IL 1 β und IL 6 induzieren (Zhang et al., 2008; Milanski et al., 2009; Posey et al., 2009; Wang et al., 2012).

Die Aktivierung inflammatorischer Mediatoren wird auch über die Bildung von AGEs (advanced glycation endproducts) aus Proteinen und Lipiden stimuliert (Yan et al., 1994; Xie et al., 2013). Zusätzlich konnten auch Astroglia und Mikroglia als Förderer der hypothalamischen Inflammation bei durch die Diät entstandenem Übergewicht identifiziert werden (Horvath et al., 2010; Thaler et al., 2012). So wirken AGEs auf verschiedene Rezeptoren in Mikroglia und Makrophagen und stimulieren so die Produktion von Zytokinen und Chemokinen (Vlassara et al., 2002; Wada und Yagihashi, 2005).

1.6 Die Rolle des Hirnstamms bei der Parkinson Krankheit und bei Diabetes Mellitus

Anatomisch gesehen besteht der Hirnstamm aus Mittelhirn (*mesencephalon*), Brücke (*pons*) und verlängertem Mark (*medulla oblongata*) (Abb. 1.5). Im Mittelhirn befinden sich große Ansammlungen von Nervenzellkörpern, wie der SN und dem *nucleus ruber*, die für Muskelaktivitäten wichtig sind. Ebenso liegen hier die Ursprungsorte des III. und des IV. Hirnnervs, welche die Augenmuskeln innervieren. Das *Mesencephalon* durchlaufen wichtige afferente und efferente Bahnen zwischen Gehirn und Rückenmark, zudem enthält es Anteile der Seh- und der Hörbahn. Die *Pons* beinhaltet die Nervenzellkörper für die V. bis VIII. Hirnnerven sowie für Teile des Kreislauf- und des Aktivitätszentrums. Sie erhält außerdem

Informationen aus dem Hörorgan und dem Gesicht, welche sie an das Kleinhirn weiterleitet. In der *Medulla oblongata* befinden sich die Ursprungsorte der IX. bis XII. Hirnnerven. Ebenso enthält sie die Pyramidenbahn, die größte der vom Gehirn das Rückenmark absteigenden Nervenbahnen, die die Impulse der willkürlichen Motorik überträgt. Außerdem beinhaltet sie Gruppen von Nervenzellen, die zusammen mit anderen Teilen des Hirnstamms das Atem- und Kreislaufzentrum bilden.

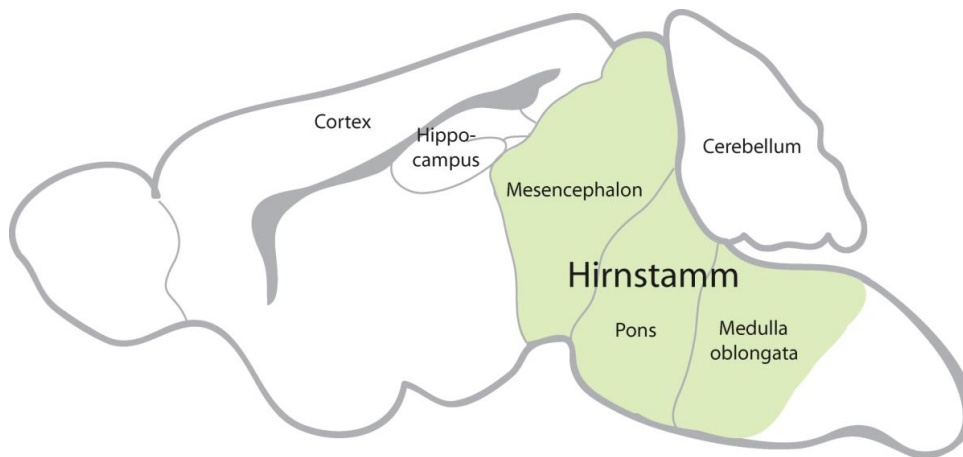


Abb. 1.5: Schematische Übersicht eines Sagittalschnitts eines Mausgehirns. Der Sagittalschnitt erlaubt einen guten Überblick über die unterschiedlichen Hirnregionen des Mausgehirns. Der Hirnstamm befindet sich im hinteren Drittel des Gehirns und kann in *Mesencephalon*, *Pons* und *Medulla oblongata* unterteilt werden. Er ist sowohl bei der Entstehung von DM, als auch bei der PK involviert.

Der Hirnstamm spielt sowohl bei der Entstehung von DM, als auch bei der PK eine wichtige Rolle. So sind die Neurone des Hirnstamms direkt in die Kontrolle der Energiehomöostase involviert, indem sie Statusinformationen über den energetischen Zustand des Körpers auf verschiedenen Ebenen verarbeiten (Schneeberger et al., 2014). Sie erkennen beispielsweise zirkulierende Metabolite und Hormone, die von peripheren Organen ausgeschüttet wurden, und erhalten über den *Nervus Vagus* Informationen über den Gastrointestinaltrakt (Silver et al., 1989; Grill et al., 1998; Gao und Horvath, 2007; Schwartz, 2010). Ebenso empfangen sie neuronale Inputs von Nuclei des Mittel- und Vorderhirns, die ebenfalls energiebezogene Signale wahrnehmen und integrieren. Zudem projizieren sie in lokale Kreisläufe des Hirnstamms sowie in andere Gehirnregionen und geben so Informationen für die Kontrolle der Energiebilanz weiter (Sahu et al., 1988; Horvath et al., 1999; Blevins und Baskin, 2010; Warden et al., 2012). Übergewicht und Insulinresistenz gehen somit nicht nur mit Änderungen im peripheren Stoffwechsel einher, sondern wirken

sich auch auf neuronale Kreisläufe sowie die Neurone des Hirnstamms aus (Morton et al., 2006; Schneeberger et al., 2014).

Bei der Entstehung der PK spielt der Hirnstamm eine wesentliche Rolle und ist recht früh von der Synukleinopathie betroffen (Beach et al., 2009). Der Verlust der dopaminergen Neuronen in der SN gilt zudem als hauptverantwortlich für die motorischen Symptome der PK (Surmeier und Sulzer, 2013). So weisen Patienten mit der PK einen Verlust von Neuromelanin in der SNpc auf (Greenfield und Bosanquet, 1953). In den Neuromelanin-positiven Zellen der SNpc kann bei Parkinson Patienten zudem fast immer Lewy Pathologie nachgewiesen werden (Del Tredici et al., 2002). Auch im *Nucleus dorsalis nervi vagi*, dem größten parasymphatischen Nucleus des Hirnstamms und einer der Hirnnervenkerne des *Nervus vagus*, treten LK und der Verlust von Neuronen auf (Gai et al., 1992; Del Tredici et al., 2002). Diese Symptomatik kann ebenfalls in der intermediären Retikulärformation (Hirsch et al., 1987; Jellinger, 1988) sowie in den Raphe Kernen, die für die serotoninerogene Innervation des ZNS verantwortlich sind, gefunden werden (Halliday et al., 1990; Gai et al., 1991). Neuronaler Verlust und Lewy Pathologie zeigt sich weiterhin im *Locus caeruleus* (Greenfield und Bosanquet, 1953; Zarow et al., 2003) und im *Nucleus pedunculopontine* (Hirsch et al., 1987; Jellinger, 1988). Zusätzlich scheint die Hirnstamm Pathologie auch für nicht motorische Symptome der PK mitverantwortlich zu sein und gastrointestinale Probleme, Schmerzen, Depressionen und Schlafstörungen zu verstärken (Grinberg et al., 2010).

1.7 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss der lebenslangen Fütterung einer HFD (40 kcal% Fett) auf verhaltensbiologische, histologische sowie proteinbiochemische Parameter bei (Thy1)-h[A30P] α Syn transgenen Mäusen zu untersuchen.

Die verwendeten Mäuse entwickeln während des Alterns eine hirnregionsspezifische Synukleinopathie, die mit motorischen und kognitiven Beeinträchtigungen einhergeht und mit den Stadien der Synukleinopathie in menschlichen Patienten korreliert (Neumann et al., 2002; Neumann et al., 2004; Freichel et al., 2007). Mit Hilfe einer HFD kann Insulinresistenz nicht nur in peripheren Organen, sondern auch im Gehirn induziert (Winzell und Ahren, 2004; Obrosova et al., 2007; Metlakunta et al., 2008) und so unter anderem die Entwicklung von neurodegenerativen Vorgängen beeinflusst werden (Choi et al., 2005; Morris et al., 2010; Bousquet et al., 2012; Wang et al., 2014).

In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb folgende Fragestellungen genauer untersucht werden:

1. Können durch Fütterung der HFD erhöhtes Körpergewicht und eine gestörte Glukosetoleranz bei h[A30P] α Syn transgenen Mäusen induziert werden und sind diese metabolischen Veränderungen vergleichbar mit denen bei WT Mäusen?
2. Werden die altersabhängigen motorischen sowie kognitiven Defizite der h[A30P] α Syn transgenen Mäuse durch die HFD beeinflusst?
3. Wird die hirnregionsspezifische Ausbildung der Synukleinopathie sowie die damit einhergehende Astroglieose durch Fütterung der HFD beeinflusst?
4. Können weitere Effekte der HFD nachgewiesen werden? Führt die HFD beispielsweise zu Veränderungen im PI3K – Akt Signalweg, der sowohl mit DM, als auch mit der PK in Verbindung gebracht wird?

Zusätzlich sollten die verschiedenen Kinasen, denen bislang eine Rolle bei der Phosphorylierung von α Syn zugeschrieben wurde, genauer untersucht werden (Dzamko et al., 2014), wobei ein besonderes Augenmerk auf GRK 5 gelegt wurde. Von Interesse war einerseits ob GRK 5 im untersuchten Mausmodell für die pathologische S129- α Syn Phosphorylierung verantwortlich ist. Andererseits stellte sich die Frage ob die HFD einen Einfluss auf Lokalisation und Proteinmenge der Kinase ausübt.

2 Methoden

2.1 *In vivo* Experimente

2.1.1 Verwendete Tiere und Zuchtbedingungen

In allen Experimenten wurden ausschließlich männliche (Thy1)-h[A30P] α Syn transgene Mäuse (C57/Bl6 Hintergrund, Generierung beschrieben in Kahle et al., 2001 und Neumann et al., 2002) bzw. als Kontrollen C57/Bl6 Wild-Typ (WT) Mäuse, welche durch Rückkreuzung aus heterozygoten (Thy1)-h[A30P] α Syn transgenen Mäusen gewonnen wurden, verwendet. Die verwendeten Mäuse exprimieren humanes α Syn mit der A30P Punktmutation (h[A30P] α Syn) unter Kontrolle des ZNS spezifischen Promotors Thy1, was zu einer zwei- bis dreifachen Erhöhung an α Syn im ZNS führt (Kahle et al., 2001). Alle Mäuse wurden unter kontrollierten Bedingungen (Raumtemperatur: 21°C, relative Luftfeuchtigkeit: 55-65%) in einem zirkadianen Rhythmus (12 h Dunkel- und 12 h Hellphase) in der Tierhaltung des Hertie-Instituts für klinische Hirnforschung, Tübingen, in Typ 4 long Käfigen gehalten. Ab einem Alter von 4 Wochen erhielten die Mäuse entweder eine (SD, 9 kcal% Fett, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) oder eine HFD (45 kcal% Fett, Harlan Laboratories, Niederlande). Das Körpergewicht wurde von diesem Zeitpunkt an wöchentlich bestimmt.

Alle Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt und liegen unter den Bewilligungsnummern N2/10 sowie N9/12 vor.

2.1.2 Hochfett-Futter

Ab einem Alter von 4 Wochen erhielten jeweils 56 h[A30P] α Syn transgene Mäuse sowie 52 WT Kontrollen eine spezielle HFD (TD.06415 Adjusted Calories Diet 45/Fat, Teklad Custom Research Diets, Harlan Laboratories, Niederlande) mit einem Gesamtfettgehalt von 45 kcal%. Der Fettanteil der Diät wurde durch 36% SFAs, 47% MUFAs sowie 17% PUFAs gebildet. Der Kohlenhydratanteil der Diät betrug 36,2 kcal%, Proteine machen 19,0% der Gesamtkalorien aus (Abb. 2.1, Tab. 2.1). Weitere 56 transgene α Syn Mäuse erhielten ab dem Alter von 4 Wochen eine SD (ssniff R/M-H Extrudat, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest), in welcher die Gesamtkalorien nur zu 9% durch Fett gebildet wurden. Dieser Fettanteil wurde zu 17,5% aus SFA, zu 19,9% aus MUFA sowie zu 62,6% aus PUFA zusammengesetzt. Im Vergleich zur HFD wurde ein wesentlich höherer Anteil der Gesamtkalorien der SD durch Kohlenhydrate (58 kcal%) sowie durch Proteine (33 kcal%) gebildet (Tab. 2.1). Diese

Unterschiede in der Verteilung der Energielieferanten sind auf eine erhöhte Fettmenge in der Trockenmasse der HFD zurückzuführen (22,8% HFD vs. 3,8% SD), während der Gesamtgehalt an Kohlenhydraten (41,4% HFD vs. 47,2% SD) sowie Proteinen (21,7% HFD vs. 21,6% SD) vergleichbar war (Tab. 2.1).

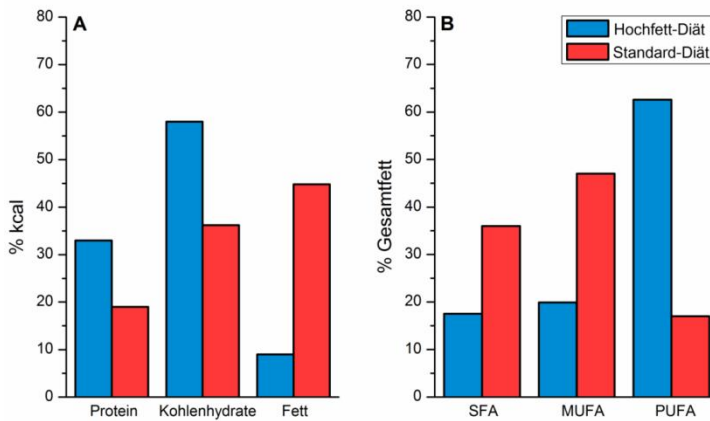


Abb. 2.1: Makronährstoffe und Fettsäureprofil von SD und HFD. Haupt-Kalorienlieferanten der SD sind Kohlenhydrate sowie Proteine, während die Energie der HFD vor allem durch Fett gebildet wird (A). Das Gesamtfett der SD wird hauptsächlich durch PUFAs gebildet, während die HFD vor allem aus SFA sowie MUFAs besteht (B).

	Hochfett-Diät		Standard-Diät	
	% Gesamtanteil	% kcal	% Gesamtanteil	% kcal
Protein	21,7	19,0	21,6	33
Kohlenhydrate	41,4	36,2	47,2	58
Fett	22,8	44,8	3,8	9

Tab. 2.1: Zusammensetzung der Makronährstoffe der HFD und SD.

Zusammengefasst bedeutet dies, dass die HFD einen erhöhten Gesamtanteil an Fett enthielt, was zu einer veränderten prozentualen kalorischen Zusammensetzung der Makronährstoffe führte. Zudem unterschied sich auch das Fettsäureprofil der beiden Diäten. Dieser Unterschied in der Zusammensetzung führte zu einer erhöhten Energiedichte der HFD im Vergleich mit der SD (HFD: 4,6 kcal / g vs. SD: 3,1 kcal / g).

2.1.3 Glukose Toleranztest

Der Glukose Toleranztest (GTT) dient der Überprüfung der Insulinsekretion als Antwort auf eine hohe Glukosezufuhr. Hierfür wurde den für 12 Stunden auf Nahrungsentzug gesetzten Mäusen 2 g Glukose pro kg Körpergewicht (Glukosteril 50%, Fresenius Kabi GmbH, Bad-Homburg) intraperitoneal injiziert. Während des Tests wurden die Mäuse

weiterhin unter Karenz gehalten. Direkt vor der Glukose-Injektion sowie 15, 30, 60, 90 und 120 min danach wurde der Blutzuckerspiegel mit einem Blutglukose Messgerät (Accu-Check® Sensor, Roche, Mannheim) bestimmt. Der GTT wurde im Alter von 13 sowie 43 Wochen mit jeweils 9 h[A30P] α Syn transgenen Mäusen mit SD (α Syn SD), 9 h[A30P] α Syn transgenen Mäusen mit HFD (α Syn HFD) sowie 9 WT Mäusen mit HFD (WT HFD) durchgeführt.

2.1.4 Rota Rod

Mit Hilfe des Rota Rods (TSE Systems, Bad Homburg) kann die lokomotorische Aktivität und Koordination der Mäuse untersucht werden. Ziel war es eine möglicherweise verfrüht eintretende lokomotorische Beeinträchtigung der h[A30P] α Syn transgenen Mäuse mit HFD zu untersuchen. Das Rota Rod besteht aus einer horizontalen Laufrolle, welche durch Trennwände in fünf einzelne Bahnen geteilt wird. Die Laufrolle befindet sich 14,7 cm oberhalb des Bodengitters und damit hoch genug, um bei den Tieren eine Fallaversion auszulösen, aber so niedrig, dass sich die Mäuse beim Fall nicht verletzen. Die Mäuse wurden zuerst trainiert auf der rotierenden Laufrolle zu laufen. Während des Testes beschleunigt die Laufrolle innerhalb von 120 Sekunden von 0 auf 18 rpm (rounds per minute) (Phase 1) und dreht sich dann für weitere 120 Sekunden mit 18 rpm (Phase 2). Fällt ein Tier von der Laufrolle, so wird automatisch eine Lichtschranke aktiviert und der Lauf gestoppt.

Die maximale Laufdauer auf dem Rota Rod wurde ab dem Alter von 26 Wochen alle 2 Wochen bei 19 α Syn SD, 17 α Syn HFD sowie 19 WT HFD Mäusen getestet. Es wurden jeweils vier einzelne Läufe durchgeführt, zwischen denen die Mäuse mindestens 90 Sekunden pausierten, und der Lauf mit der besten Laufzeit gewertet.

2.1.5 Cat Walk

Mit Hilfe des Cat Walk Systems (CatWalk XT, Noldus Information Technology, Niederlande) kann das Laufmuster von Mäusen analysiert und somit möglicherweise vorhandene Veränderungen in der Motorik in Folge der erhöhten Fettfütterung und der dadurch eventuell verfrüht induzierten Synukleinopathie überprüft werden.

Im Cat Walk laufen die Mäuse über eine etwa 90 cm lange Glasplatte durch einen etwa 10 cm breiten, durch Wände abgetrennten Gang. Unter der Glasplatte ist eine Kamera installiert, welche die Bewegung der Mäuse aufzeichnet. Die Kamera befindet sich dabei 22 cm unterhalb der Glasplatte, die Kameraverstärkung wurde auf 37 fixiert, die Intensitätsschwelle

auf 0,27. Mit Hilfe dieses Aufbaus können mit der zugehörigen Software (CatWalk XT 9.0, Noldus Information Technology, Niederlande) verschiedenste Bewegungs-Parameter der Mäuse untersucht werden. Hierfür müssen die Fußabdrücke jeweils manuell benannt und klassifiziert werden, die Software führt anschließend alle Analysen automatisch durch. Alle weiteren Berechnungen wurden in Excel sowie Origin Pro 8G durchgeführt. Für die Studie von Interesse waren dabei vor allem die Intensität, welche die Maus mit den Hinterläufen auf die Glasplatte ausübt sowie die Schrittlänge und die Fußabdrucklänge.

Im Alter von 30 Wochen wurden 14 α Syn SD sowie 10 α Syn HFD Mäuse zunächst trainiert angstfrei über die Glasplatte zu laufen und dann anschließend ab einem Alter von 31 Wochen im zweiwöchigen Rhythmus getestet. Ein Lauf bestand dabei aus drei Einzelläufen. Nur Läufe mit einer Dauer von weniger als 10 Sekunden und mit einer maximalen Varianz von 60% wurden als gültig gewertet.

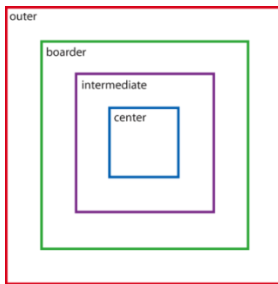


Abb. 2.2: Virtuelle Einteilung des Open Fields. Das Open Field wird in die Zonen „outer“, „border“, „intermediate“ und „center“ eingeteilt und die jeweilige Aufenthaltsdauer sowie die zurückgelegte Distanz der Mäuse in den einzelnen Zonen gemessen.

2.1.6 Open Field

Das Open Field (Hall und Ballachey, 1932; Hall, 1934) besteht aus einer 60 cm x 60 cm großen, nach oben hin offenen Box, über welcher eine Videokamera angebracht ist. Mit Hilfe dieses Tests kann das Erkundungs- sowie Vermeidungsverhalten von Mäusen untersucht und Aussagen über Aktivitätsmuster getroffen werden. Untersucht werden sollte, ob diese Parameter bei h[A30P] α Syn transgenen Mäusen durch Fütterung der HFD beeinflusst wurden.

Hierfür wurden die Mäuse einzeln in eine Ecke des Open Fields gesetzt und ihre Bewegung 10 Minuten lang aufgezeichnet. So konnten beispielsweise die insgesamt zurückgelegte Distanz sowie die explorierte Fläche analysiert werden. Durch virtuelle Einteilung des Open Fields in vier verschiedene Zonen („outer“ – „border“ – „intermediate“ – „center“) war es zudem möglich zu unterscheiden, ob eine Maus hauptsächlich nur den Rand der Box erkundet, oder sich auch in die Mitte des Open Fields begibt (Abb. 2.2). Das Open Field wurde im Alter von 24 sowie von 42 Wochen mit jeweils 20 α Syn SD, α Syn HFD sowie WT HFD Mäusen durchgeführt.

2.1.7 Angstkonditionierung

Mit Hilfe der Angstkonditionierung kann das emotionale Lernen der Mäuse überprüft und Informationen über die Amygdala- sowie Hippocampus-Funktion gesammelt werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Fähigkeit zum emotionalen Lernen bei h[A30P] α Syn transgenen Mäusen im Alter beeinträchtigt ist (Freichel et al., 2006). Anhand der Angstkonditionierung sollte eine möglicherweise verfrühte Beeinträchtigung des emotionalen Lernens bei h[A30P] α Syn transgenen Mäusen durch die erhöhte Fettaufnahme überprüft werden.

Für die Angstkonditionierung wurden die Mäuse einzeln in die AKS Fear-Conditioning Box Advanced (TSE Systems, Bad Homburg) gesetzt. Diese besteht aus einer hölzernen Box mit integrierter Messkammer. Die Messkammer wird entweder von durchsichtigen oder von schwarzen Plexiglas-Wänden umgeben und enthält ein Fußschockgitter. Unter dem Gitter befindet sich eine Abfallschale, welche mit Papiertüchern abgedeckt wird. Nach jedem Tier wurden Gitter und Abfallschale gereinigt, um einen konstanten Geruch in der Kammer zu gewährleisten. Über der Kammer befinden sich zwei Lichtquellen sowie an der Seite eine Tonquelle, die einen 2,9 kHz Ton abgibt. Licht- und Tonquelle sowie der Fußschock werden durch das AKS Fear Conditioning Control Unit 2 kontrolliert.

Während der 6-minütigen Konditionierungsphase wurden schwarze Plexiglaswände verwendet. Die Konditionierung wurde durch einen 20-sekündigen Licht- und Tonstimulus (CS, conditioned stimulus) angekündigt. Direkt nach dem CS erhielten die zu konditionierenden Tiere einen einsekündigen Fußschock von 2x 0,6 mA (US, unconditioned stimulus). Die Kontrolltiere wurden nur mit dem CS stimuliert, erhielten aber keinen US (2x 0,0 mA). Die Konditionierung wurde innerhalb der 6 Minuten 8 Mal wiederholt.

Um das emotionale Kontext Lernen zu bestimmen, wurden die Mäuse 24 Stunden nach der Konditionierung für 3 Minuten in die gleiche Kammer, die bereits bei der Konditionierung verwendet wird, gesetzt. Konditionierte Tiere reagieren bei funktionierendem Kontext Lernen mit reduziertem Explorationsverhalten sowie erhöhter Schockstarre. Weitere 6 Stunden später erfolgte die Messung des emotional assoziativen Cued Lernens abhängig. Hierfür wurde der Kontext der Messkammer geändert, indem die schwarzen Plexiglaswände durch durchsichtige ersetzt und das Fußschockgitter durch einen laminierten und von Einstreu bedeckten Pappboden verdeckt wurde. Um einen konstanten Geruch zu garantieren wurde die Einstreu nach jedem Tier gewechselt und die Wände gereinigt. Die Mäuse wurden für 5 Minuten in die Messkammer gesetzt und die Bewegung aufgezeichnet. Während der ersten Minuten konnten die Mäuse die Kammer ohne weitere Beeinträchtigung explorieren. Darauf folgte eine

dreiminütige Präsentation des CS, was bei konditionierten und lernfähigen Tieren zu einer sinkenden Exploration sowie erhöhter Schockstarre und geringerer Laufdistanz führt. Der Test wurde mit einer weiteren einminütigen Phase ohne Stimuluspräsentation beendet.

Die Angstkonditionierung wurde im Alter von 4 Monaten mit jeweils 11 nicht konditionierten α Syn SD, α Syn HFD und WT HFD Mäusen sowie mit jeweils 9 konditionierten α Syn SD, α Syn HFD und WT HFD Mäusen durchgeführt. Im Alter von 9 Monaten wurden 12 konditionierte sowie 12 nicht konditionierte α Syn SD, 10 konditionierte sowie 10 nicht konditionierte α Syn HFD und 9 konditionierte sowie 9 nicht konditionierte WT HFD Mäuse verwendet. Im Alter von 12 Monaten wurde der Versuch mit 9 konditionierten sowie 9 nicht konditionierten α Syn SD, 8 konditionierten sowie 9 nicht konditionierten α Syn HFD und 9 konditionierten sowie 8 nicht konditionierten WT HFD Mäusen durchgeführt.

2.1.8 Töten der Mäuse und Gehirnentnahme

Alle Mäuse wurden durch zervikale Dislokation mit anschließender Dekapitation getötet. Das Gehirn wurde entnommen und entweder zur Proteinextraktion oder für die Immunohistochemie weiter verarbeitet. Für die Proteinextraktion wurden die Gehirne in einem Eppendorf-Gefäß in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bei -80° Celsius bis zur Verwendung gelagert. Um eine Immunohistochemie durchführen zu können, wurden die Gehirne zunächst in TBS gewaschen und anschließend in 4% PFA in PBS fixiert. Es folgte die sagittale oder coronare Einbettung in Paraffin.

2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.1 Lyse von Mäusegehirnen zur Proteinisolation

Das Gehirn wurde zunächst in Cerebellum, Hirnstamm und Cortex sowie das Resthirn getrennt und in jeweils einzelne 2 ml Reaktionsgefäße gegeben. Anschließend wurde jeder Teil einzeln, zusammen mit jeweils 100 μ l RIPA-Puffer pro mg Gehirn in einen Homogenisatorgefäß nach Dounce (Kleinfeld Labortechnik GmbH, Gehrden) gegeben und manuell homogenisiert. Das Homogenisat wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit RIPA-Puffer auf 2 ml aufgefüllt. Es folgte eine 30 minütige Lyse auf Eis. Anschließend wurde 15 min bei 14000 rpm und 4° C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.2.2 Bestimmen des Gesamtproteingehalts

Die Proteinkonzentration der Zellysate wurde mit dem BCA-Kit (Pierce, USA) gemessen. Hierfür wurde jeweils 10 µl einer 1 : 10 Verdünnung der Probe mit 100 µl des Detektionsreagenz in einer Mikrotiterplatte vermischt. Je Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Zugleich wurde eine Standardkurve aus BSA (Bovine Serum Albumin) in Lysepuffer mit Konzentrationen von 0,025 – 2 mg / ml pipettiert und ebenfalls mit dem Detektionsreagenz vermischt. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 30 min. Anschließend erfolgte die Messung der Extinktion bei 560 nm mit einem Mikrotiterplattenphotometer (Biorad, München), wobei die Proteinkonzentration anhand der Standardkurve berechnet wurde.

kleine Gele	Trenngel (7,5%)	Trenngel (10%)	Trenngel (15%)	Sammelgel
Trenngelpuffer	2,75 ml	2,75 ml	2,75 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	0,69 ml
40% Acrylamid 19:1	2,07 ml	2,75 ml	4,1 ml	0,31 ml
ddH ₂ O	6,06 ml	5,38 ml	4,1 ml	1,72 ml
10% APS	0,11 ml	0,11 ml	0,11 ml	0,028 ml
TEMED	0,011 ml	0,011 ml	0,011 ml	0,003 ml
große Gele	Trenngel (7,5%)	Trenngel (10%)	Trenngel (15%)	Sammelgel
Trenngelpuffer	6,05 ml	6,05 ml	6,05 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	1,51 ml
40% Acrylamid 19:1	4,55 ml	6,00 ml	9,02 ml	0,68 ml
ddH ₂ O	13,33 ml	11,83 ml	9,02 ml	3,79 ml
10% APS	0,242 ml	0,242 ml	0,242 ml	0,061 ml
TEMED	0,024 ml	0,024 ml	0,024 ml	0,006 ml

Tab. 2.2: Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel der SDS-Page.

2.2.3 SDS-PAGE

Mit Hilfe der SDS-PAGE (SDS – Polyacrylamidgel – Elektrophorese) können Proteine ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt werden. Durch Binden des negativ geladenen SDS an die Proteine erhalten diese eine negative Gesamtladung, sodass die Laufgeschwindigkeit im Gel vor allem vom Molekulargewicht der Proteine abhängt. Es wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE mit Trenn- und Sammelgel verwendet (Zusammensetzung: siehe Tab. 2.2). Die Acrylamid-Konzentration des Trenngels wurde in Abhängigkeit von der Größe des zu detektierenden Proteins gewählt. Jeweils 25 µg Proteinlysate wurden im Verhältnis 5 : 1 mit 6x Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970) vermischt, für 5 min bei 95°C aufgeköcht und anschließend auf das Gel aufgetragen. Es wurden sowohl kleine Gele (Mini Trans Blot Cell, Biorad, München; 10 x 7,5 cm), als auch große Gele (Trans Blot Cell,

Methoden

Biorad, München; 15 x 20 cm) verwendet. Als Molekulargewichtsstandard wurden zudem 10 µl Proteinmarker (Biorad, München) geladen. Die Laufkammer wurde mit Laufpuffer gefüllt und die Elektrophorese für die ersten 30 min bei 110 V (kleine Gele) bzw. 130 V (große Gele) und anschließend bis zum Ende bei 140 V (kleine Gele) bzw. 165 V (große Gele) durchgeführt.

Antigen	Spezies	Verdünnung (Western Blot)	Verdünnung (Immunohistochemie)	Herkunft
humanes α Syn (15G7)	Ratte	1 : 5	1 : 50	Eigene Herstellung (Kahle et al., 2000)
pS129- α Syn	Kaninchen	1 : 1000	1 : 500	Abcam (ab51253)
GAPDH	Maus	1 : 50 000	--	Meridian Life Science (#H86504M)
GFAP	Kaninchen	1 : 10000	1 : 2500	Abcam (ab7260)
GRK 5	Kaninchen	1 : 500	1 : 500	Abcam (ab64943)
AKT	Kaninchen	1 : 2000	--	Cell Signaling (#9272)
pS473-AKT	Kaninchen	1 : 1000	--	Cell Signaling (#4060)
pT308-AKT	Kaninchen	1 : 1000	--	Cell Signaling (#4056)
Kaninchen-HRP (Western Blot)	Ziege	1 : 1000	--	Jackson
Maus-HRP (Western Blot)	Ziege	1 : 1000	--	Jackson
Ratte-HRP (Western Blot)	Ziege	1 : 1000	--	Jackson

Tab. 2.3: Verwendete Primär- und Sekundär-Antikörper im Western Blot und der Immunohistochemie.

2.2.4 Western Blot

Nach erfolgreicher Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE erfolgte der Transfer auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) – Membran, welche zuvor für 10 Sekunden in Methanol aktiviert wurde. Bei kleinen Gelen wurde der Transfer via eines nassen Tank-Blot Systems (Mini Trans-Blot, BioRad, München) bei 4°C für 2 h bei 100 V durchgeführt. Transferiert wurde von Kathode zu Anode, wofür ein Blot-Sandwich mit folgendem Aufbau hergestellt wurde: Kathode – Schwamm – Blotting-Papier – Gel – PVDF-Membran – Blotting-Papier – Schwamm – Anode. Die Schwämme sowie das Blotting-Papier wurden vor dem Zusammenbau in Transfer-Puffer getränkt. Große Gele wurden bei 4°C für 2 h bei 20 V halbtrocken geblottet (Semi-Dry Electrobloetter Sedec, peqlab, Erlangen). Das Blotting Sandwich hatte dabei folgenden Aufbau: Kathode – 3x Blotting-Papier – Gel – PVDF-Membran – 3x Blotting Papier – Anode.

Nach Beenden des Transfers wurde die Membran aus der Transfer-Kammer entnommen und für eine Stunde bei Raumtemperatur in Block-Lösung gewaschen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C, anschließend wurde 3x 5 min in TBST gewaschen sowie weitere 5 min geblockt. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur sowie weiteres Waschen (3x 15 min) in TBST. Für die Detektion wurde Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, USA) verwendet, wobei pro Membran jeweils 1 ml der Detektionslösungen A und B vermischt wurden und die Membran damit für 5 min inkubiert wurde. Anschließend folgte die Signalübertragung auf Hyperfilm (Hyperfilm ECL high performance chemiluminescence, GE-Healthcare, München).

2.2.5 “Strippen” der PVDF-Membranen

Um nach der Kopplung eines Antikörpers weitere Antikörper auf der gleichen Membran verwenden zu können, wurde diese für 30 min bei 56°C in Stripping-Puffer inkubiert. Anschließend wurde 3x 15 min bei Raumtemperatur in TBST gewaschen sowie eine Stunde geblockt. Danach wurde die Membran mit einem neuen Primärantikörper inkubiert.

2.3 Histologie

2.3.1 Präparation von Paraffin-Schnitten

Das frisch entnommene Gehirn wurde in 4% PFA in PBS für mindestens 48 Stunden fixiert. Anschließend wurden die Gehirne entweder sagittal oder coronar in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden mit einem Mikrotom (Mikrotom Microm HM355S, Fisher Scientific, Schwerte) in 4 µm dicke Schnitte geschnitten und auf einem Objektträger (SuperFrost Plus, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) fixiert. Auf jedem Objektträger wurden jeweils drei aufeinanderfolgende Schnitte fixiert, anschließend wurden sechs Schnitte verworfen und die folgenden drei Schnitte auf dem nächsten Objektträger fixiert.

2.3.2 Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie wurden die Schnitte zuerst in einem Glasständer über Nacht bei 58° C aufgebacken. Anschließend wurde de-paraffiniert sowie hydriert (2x 5 min Xylene → 2x 3 min 100% EtOH → 2x 3 min 95% EtOH → 2x 3 min 75% EtOH → 2x 3 min TBS). Um die Peroxidase Aktivität zu inhibieren wurden die Schnitte für 30 min in 0,3% H₂O₂

(Roth, Karlsruhe) in TBS inkubiert und anschließend 3x 8 min in TBS gewaschen. Zur Freilegung der Antigene wurden die Schnitte für 35 min auf 90°C in Zitratpuffer erhitzt, bei Raumtemperatur abgekühlt (30 – 45 min) und wiederum in TBS gewaschen (3x 5 min). Anschließend wurde 60 min mit 5% Antiserum in TBS geblockt, wobei das Antiserum (ASe) abhängig vom zu verwendenden Erstantikörper (1. AK) gewählt wurde (1. AK Hase → ASe Ziege; 1. AK Maus → ASe Pferd; 1. AK Ratte → ASe Hase) (Tab. 2.3). Das Blocking-Reagenz wurde abgenommen, der Erstantikörper mit 2% Antiserum in TBS zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Waschen in TBS (3x 5 min) wurde der Zweitantikörper (1:200 Biotinyliertes IgG, Vectastain Vector Laboratories, USA) mit 3% Antiserum in TBS auf die Schnitte pipettiert und 60 min inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift (TBS, 3x 8 min) und anschließend die Signalamplifizierung mittels Avidin-Biotin-Komplex (ABC-AP Kit, Vector Laboratories, USA) für 30 min bei Raumtemperatur. Nach Waschen in TBS (3x 5 min) erfolgte die sichtbare Reaktion mittels Alkaline-Phosphatase (Vector Blue Alkaline Phosphatase Substrate Kit, Vector Laboratories, USA) für 20 - 30 min bei Raumtemperatur. Um die Reaktion zu stoppen, wurde in TBS gewaschen. Anschließend wurde mit Nuclear Fast Red (Vector Nuclear Fast Red, Vector Laboratories, USA) für 5 min gegengefärbt. Nach Waschen mit Leitungswasser wurden die Schnitte dehydriert (5 min 70% Ethanol – 2x 5 min 95% Ethanol – 2 5 min 100% Ethanol – 2x 5 min Xylen) und in Pertex (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckelt.

2.3.3 Gallyas Silber Färbung

Für die Silber Färbung nach Gallyas wurden die Schnitte zunächst aufgebacken und deparaffiniert / hydriert (siehe 2.3.2). Anschließend wurden die Schnitte für 5 min in 5% Periodsäure, welches als starkes Oxidationsmittel agiert, gegeben. Die Schnitte wurden gewaschen (2x 5 min), unter leichtem Schütteln für eine Minute erst in alkaliner Silber-Iodid Lösung und anschließend für 10 min in 0,5% Azetsäure inkubiert. Es folgte die 20-30 minütige Entwicklung in der frisch hergestellten Entwicklerlösung. Anschließend wurden die Schnitte für 3 min in 0,5% Azetsäure inkubiert, 5 min in H₂O gewaschen, für 5 min in 0,1% Goldchlorid inkubiert, mit H₂O gespült, für 5 min in 1% Natrium-Thiosulfat inkubiert und wiederum mit H₂O gespült. Es folgte die Gegenfärbung mit Nuclear Fast Red (Vector Nuclear Fast Red, Vector Laboratories, USA), die Dehydrierung und das Eindeckeln mit Pertex (Merck, Darmstadt).

2.3.4 Thioflavin-S Färbung

Um die in Paraffin eingebetteten Schnitte mit Thioflavin-S färben zu können, wurden die Schnitte zunächst ebenfalls über Nacht in einem Glasständer bei 58°C aufgebacken. Es folgte die De-Paraffinierung / Hydrierung sowie die Inhibierung mit H₂O₂ (siehe 2.3.2). Alle weiteren Schritte wurden unter Lichtausschluss durchgeführt. Die Schnitte wurden für 30 min in Thioflavin-S und Hoechst-Farbstoff (0,1% Thioflavin S, 1:1000 Hoechst in TBS) inkubiert. Anschließend wurde 2x 2 min in 70% Ethanol gewaschen, bis kein gelber Farbstoff mehr von den Schnitten in das Ethanol überging. Es folgte ein Waschschrift (2x 3min) in TBS. Die Schnitte wurden wässrig eingedeckelt (Vectamount AQ, Vector Laboratories, USA) und mit Nagellack versiegelt.

2.3.5 Mikroskopie und densitometrische Auswertung

Die gefärbten Schnitte wurden mit dem Axioplan 2 (Carl Zeiss AG, Jena) mikroskopiert. Für die einzelnen Hirnregionen wurden jeweils Mosaik-Bilder unterschiedlicher Vergrößerung angefertigt (4x / 20x / 40x). Die Verarbeitung der mikroskopierten Bilder erfolgte mit der Axio Vision Rel. 4.8 Software (Carl Zeiss AG, Jena). Für die densitometrische Auswertung wurde pro Maus jeweils ein 610 µm x 610 µm großes repräsentatives Mikroskopiebild einer 20x Vergrößerung ausgewählt und mit Hilfe der Image J Software (National Institute of Health, USA) weiter verarbeitet. Dabei wurde zuerst die gesamte Gewebefläche und anschließend die gefärbte Fläche des Ausschnittes gemessen. Anschließend wurde mit Excel die prozentual gefärbte Fläche bestimmt und der Durchschnitt pro Gruppe berechnet.

2.3.6 Statistik

Alle mathematischen Berechnungen sowie sämtliche T-Tests wurden mit Excel 2010 (Microsoft, USA) durchgeführt. Alle weitere Statistik wurde mit Origin Pro 8G (OriginLab, USA) durchgeführt, womit auch die Diagramme erstellt wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss der Hochfett Diät auf *in vivo* Parameter h[A30P] α Syn transgener Mäuse

Um den Einfluss der HFD auf Verhaltensebene zu untersuchen, wurden verschiedene *in vivo* Experimente mit h[A30P] α Syn transgenen mit SD gefütterten (α Syn SD), mit h[A30P] α Syn transgenen mit HFD gefütterten (α Syn HFD) sowie mit HFD gefütterten WT Mäusen (WT HFD, n = 20) durchgeführt (Abb. 3.1). Hierzu zählen der Glukose Toleranztest mit 13 sowie mit 43 Wochen, die Angstkonditionierung mit 17, 39 und 52 Wochen (4, 9 und 12 Monaten) und das Open Field mit 24 und 42 Wochen. Des Weiteren wurden ab einem Alter von 26 Wochen Versuche auf dem Rota Rod sowie ab einem Alter von 31 Wochen auf dem Cat Walk, jeweils im zweiwöchentlichen Rhythmus durchgeführt.

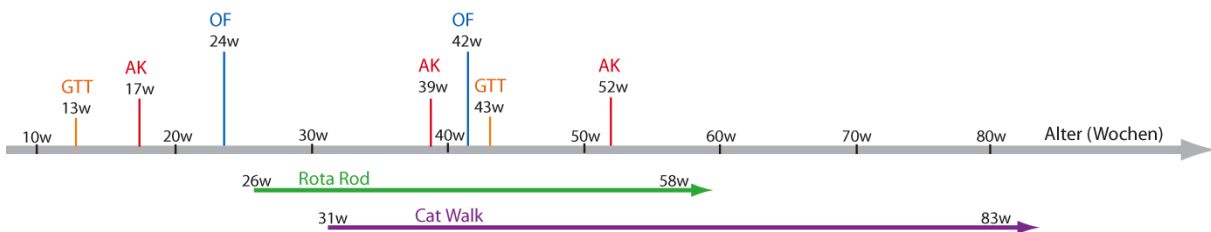


Abb. 3.1: Zeitliche Übersicht der *in vivo* Experimente. Verschiedene *in vivo* Experimente wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt. Hierzu zählen der Glukose Toleranztest (GTT) mit 13 sowie mit 43 Wochen, die Angstkonditionierung (AK) mit 17, 39 und 52 Wochen (4, 9 und 12 Monaten) und das Open Field (OF) mit 24 und 42 Wochen. Zudem wurden jeweils zweiwöchentlich Tests auf dem Rota Rod, ab einem Alter von 26 Wochen, sowie auf dem Cat Walk, ab einem Alter von 31 Wochen, durchgeführt.

3.1.1 Erhöhtes Körpergewicht

Das Körpergewicht spielt bei der Entstehung von Insulinresistenz und DM eine entscheidende Rolle, wobei besonders ein erhöhtes Gewicht als Risikofaktor angesehen wird. Um den Einfluss der HFD auf das Körpergewicht zu untersuchen, wurden α Syn SD (n = 20), α Syn HFD (n = 20) sowie WT HFD Mäuse (n = 20) wöchentlich gewogen, das Körpergewicht notiert und für die einzelnen Gruppen gemittelt.

Dabei zeigte sich, dass die α Syn HFD Mäuse bereits im Alter von 10 Wochen ein um etwa 2 g signifikant erhöhtes Körpergewicht im Vergleich mit den α Syn SD Mäusen aufwiesen.

Dieser signifikante Unterschied vergrößerte sich weiter und blieb bis zum zuletzt gemessenen Zeitpunkt von 55 Wochen bestehen, an welchem die α Syn HFD Mäuse etwa 12 g schwerer waren, als die mit SD gefütterten transgenen Tiere. Die mit HFD gefütterten WT Mäuse wiesen ab dem Alter von 15 Wochen ein signifikant erhöhtes Körpergewicht im Vergleich mit den α Syn SD Mäusen auf. Dieser anfängliche Gewichtsunterschied von etwa 3,5 g vergrößerte sich kontinuierlich bis zum zuletzt gemessenen Zeitpunkt von 55 Wochen, an dem er etwa 20 g betrug. Im Gegensatz dazu war zwischen den mit HFD gefütterten h[A30P] α Syn transgenen und den mit HFD gefütterten WT Mäusen zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Gewichtsunterschied messbar (Abb. 3.2, Tab. 3.1).

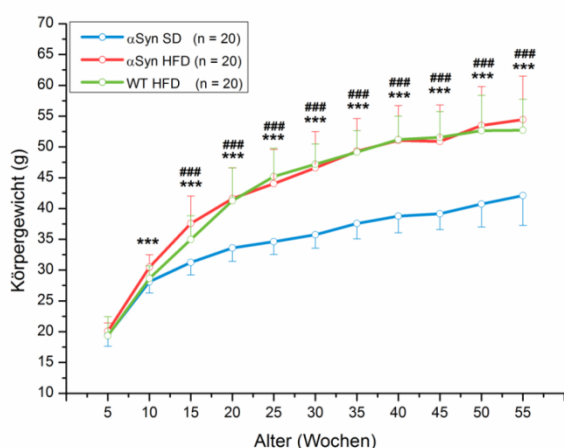


Abb. 3.2: Erhöhtes Körpergewicht nach Fütterung der HFD. Die HFD führte ab einem Alter von 10 Wochen (α Syn HFD) bzw. 15 Wochen (WT HFD) zu einem erhöhten Körpergewicht [g] im Vergleich mit α Syn SD Mäusen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm StAbw, signifikante Unterschiede wurden mittels beidseitigem T-Test berechnet (α Syn HFD vs. α Syn SD: ***P < 0,001 / WT HFD vs. α Syn SD: ###P < 0,001).

	Körpergewicht [g]		
	α Syn SD (n = 20)	α Syn HFD (n = 20)	WT HFD (n = 20)
5 Wochen	19,41 \pm 1,77	20,07 \pm 1,38	19,35 \pm 3,12
10 Wochen	28,11 \pm 1,81	30,45 \pm 2,04***	28,65 \pm 2,01
15 Wochen	31,25 \pm 2,05	37,55 \pm 4,48***	34,95 \pm 3,87###
20 Wochen	33,60 \pm 2,19	41,60 \pm 5,01***	41,25 \pm 5,39###
25 Wochen	34,60 \pm 2,06	44,05 \pm 5,54***	45,20 \pm 4,61###
30 Wochen	35,75 \pm 2,20	46,60 \pm 5,90***	47,20 \pm 3,29###
35 Wochen	37,55 \pm 2,48	49,30 \pm 5,32***	49,15 \pm 3,48###
40 Wochen	38,75 \pm 2,69	51,05 \pm 5,68***	51,20 \pm 3,81###
45 Wochen	39,15 \pm 2,56	50,90 \pm 5,92***	51,55 \pm 4,19###
50 Wochen	40,75 \pm 3,77	53,50 \pm 6,30***	52,65 \pm 5,70###
55 Wochen	42,10 \pm 4,87	54,45 \pm 7,05***	52,71 \pm 5,03###

Tab. 3.1: Entwicklung des Körpergewichts. Angegeben sind Mittelwerte \pm StAbw [g] für α Syn SD, α Syn HFD sowie WT HFD Mäuse ab dem Alter von 5 Wochen. Signifikante Unterschiede wurden mittels beidseitigem T-Test ermittelt und beziehen sich einerseits auf den Vergleich α Syn HFD vs. α Syn SD (***P < 0,001), andererseits auf den Vergleich WT HFD vs. α Syn SD Mäuse (##P < 0,01; ###P < 0,001).

Diese Ergebnisse zeigen, dass mit Hilfe der HFD sowohl bei WT Mäusen, als auch bei h[A30P] α Syn transgenen Mäusen ein signifikant erhöhtes Körpergewicht induziert werden konnte. Da zwischen mit HFD gefütterten WT Mäusen und h[A30P] α Syn Mäusen kein Unterschied gefunden wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die HFD einen vergleichbaren Einfluss auf das Körpergewicht beider Mauslinien ausübt.

3.1.2 Verschlechterte Glukose-Toleranz

Der GTT wird eingesetzt, um die Insulinsekretion der Skelettmuskeln in Reaktion auf eine hohe Glukosezufuhr zu überprüfen und hilft eine gestörte Glukosetoleranz zu erkennen. Für den Glukose Toleranztest wurden neun α Syn HFD, neun α Syn SD sowie neun WT HFD Mäuse im Alter von 13 Wochen sowie jeweils neun weitere Mäuse im Alter von 43 Wochen untersucht.

Anhand Abb. 3.3 (A) sowie Tab. 3.2 ist zu erkennen, dass im Alter von 13 Wochen im nüchternen Zustand kein Unterschied in der Blutglukosekonzentration zwischen den einzelnen Gruppen gefunden werden konnte. Nach Glukoseinjektion zeigte sich jedoch bereits nach 15 Minuten sowohl bei den α Syn HFD Mäusen, als auch bei den WT HFD Mäusen ein im Vergleich mit α Syn SD Mäusen signifikant erhöhter Blutglukosespiegel. Während der Blutglukosespiegel der α Syn SD Mäuse nach 15 Minuten sein Maximum aufwies und sich danach kontinuierlich verringerte, stieg der Blutglukosespiegel der α Syn HFD sowie der WT HFD Mäuse weiter an und erreichte erst 30 min nach Glukoseinjektion sein Maximum. Anschließend sank auch bei den mit HFD gefütterten Mäusen der Blutglukosespiegel, blieb jedoch weiterhin signifikant über dem der Tiere mit SD. Nach 120 min erreichte der Blutglukosespiegel der α Syn SD Mäuse wieder annähernd das Ausgangsniveau, während der der α Syn HFD Mäuse sowie der WT HFD Mäuse weiter erhöht blieb. Zwischen den mit HFD gefütterten h[A30P] α Syn transgenen und den mit HFD gefütterten WT Mäusen konnte dagegen während des gesamten Tests kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Diese Resultate korrelieren mit dem zum Zeitpunkt der Messung im Vergleich zu den α Syn SD Tieren ($26,3 \pm 1,5$ g) bereits signifikant erhöhtem Körpergewicht der α Syn HFD ($30,4 \pm 3,71$ g) sowie der WT HFD Mäuse ($31,3 \pm 3,7$ g).

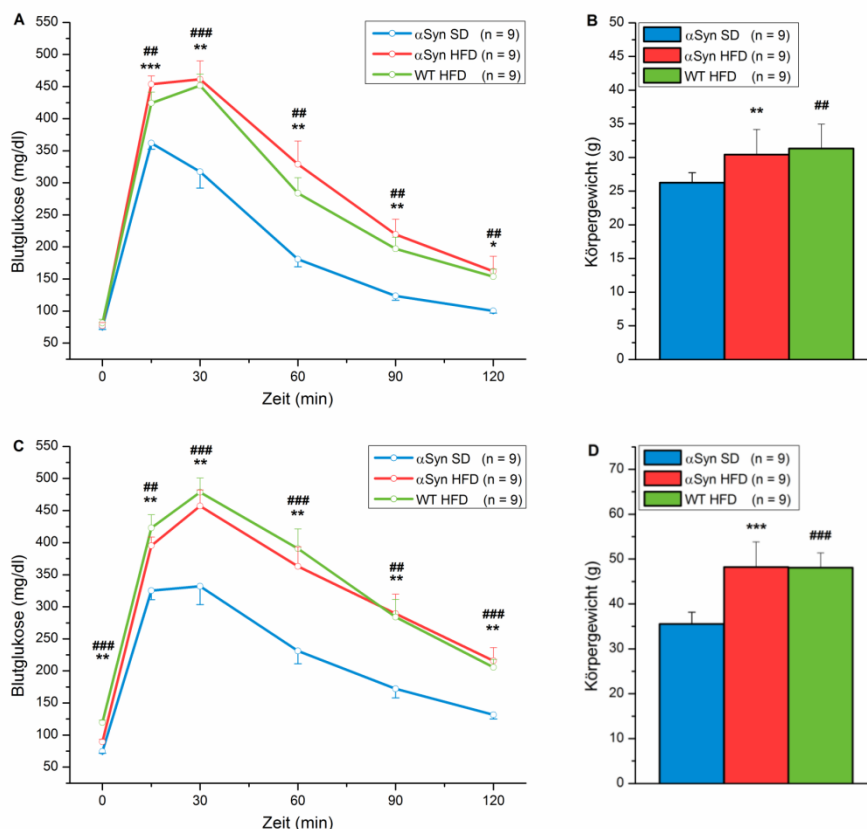


Abb. 3.3: Verschlechterte Glukosetoleranz im GTT nach Fütterung der HFD. Im Alter von 13 Wochen fanden sich sowohl bei α Syn HFD, als auch bei WT HFD Mäusen 15 min nach Glukoseapplikation und bis zum Ende des Tests signifikant erhöhte Blutglukosespiegel (A). Im Alter von 43 Wochen war bereits der Nüchtern-Blutglukosespiegel der α Syn HFD sowie der WT HFD Mäuse erhöht und lag auch während des gesamten Tests über dem Blutglukosespiegel der α Syn SD Mäuse (C). Ebenso war das Körpergewicht der Mäuse mit HFD sowohl im Alter von 13 Wochen (B), als auch mit 43 Wochen signifikant erhöht (D). Zwischen α Syn HFD und WT HFD Mäusen konnten dagegen keine Unterschiede gefunden werden. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm SEM (A / C) bzw. \pm StAbw (B / D), signifikante Unterschiede wurden mittels beidseitigem T-Test berechnet (α Syn HFD vs. α Syn SD: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ / WT HFD vs. α Syn SD: ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$).

Im Alter von 43 Wochen wiesen sowohl die α Syn HFD Mäuse, als auch die WT HFD Mäuse eine im Vergleich mit den α Syn SD Mäusen bereits signifikant erhöhte Nüchtern-Blutglukose auf (Abb. 3.3 (C) und Tab. 3.2). Auch nach Glukoseinjektion blieb die signifikant erhöhte Blutglukosekonzentration bei den Mäusen mit HFD bestehen. 30 Minuten nach Injektion wurde für alle Gruppen die maximale Blutglukosekonzentration gemessen. Anschließend sank der Blutglukosespiegel jeweils kontinuierlich ab, erreichte aber bei den α Syn SD Mäusen nach 120 min ein wesentlich geringeres Niveau, als bei den α Syn HFD sowie den WT HFD Mäusen. Das Körpergewicht der untersuchten Mäuse mit HFD unterschied sich dabei nicht (α Syn HFD: $48,2 \pm 5,6$ g vs. WT HFD: $48,1 \pm 1,1$ g). Im

Gegensatz dazu lag jedoch das Körpergewicht der α Syn SD Tiere ($35,6 \pm 2,6$ g) signifikant unter dem der α Syn HFD Mäuse sowie dem der WT HFD Mäuse.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die HFD sowohl im Alter von 13 Wochen, als auch von 43 Wochen zu einer signifikant verschlechterten Glukosetoleranz bei h[A30P] α Syn transgenen sowie bei WT Mäusen im Vergleich zu mit SD gefütterten h[A30P] α Syn Mäusen führte. Im Alter von 43 Wochen führte die HFD zudem zu einer signifikant erhöhten Nüchtern-Blutglukose. Zwischen α Syn HFD und WT HFD Mäusen konnte dagegen kein Unterschied gefunden werden, weshalb von einer gleichartigen Wirkung der Diät auf die Mäuse beider Genotypen ausgegangen werden kann.

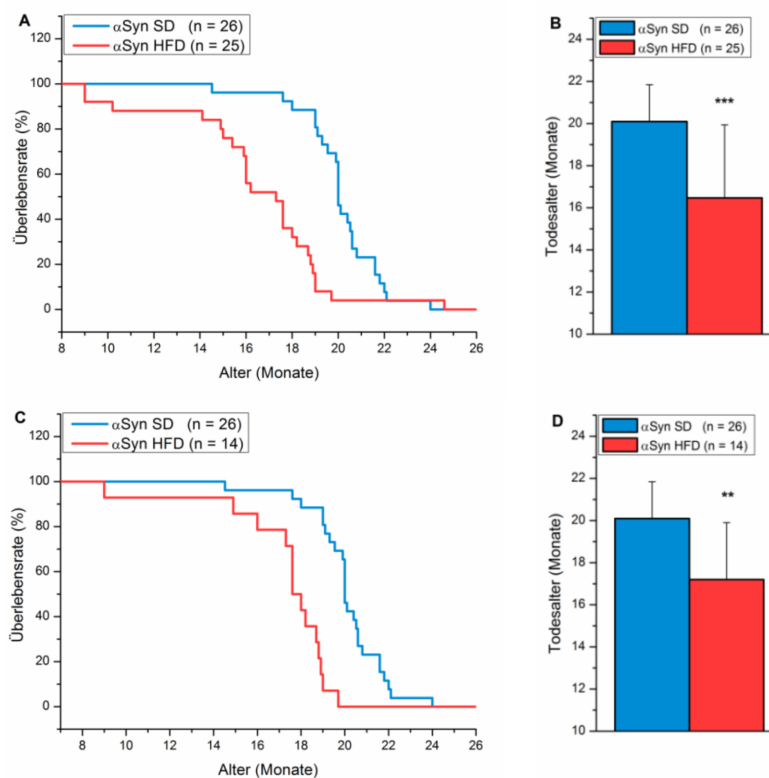
13 Wochen	0 min [mg / dl]	15 min [mg / dl]	30 min [mg / dl]	60 min [mg / dl]	90 min [mg / dl]	120 min [mg / dl]
αSyn SD (n = 9)	74,9 $\pm 3,5$	361,8 $\pm 9,5$	317,4 $\pm 25,7$	180,8 $\pm 11,8$	123,4 $\pm 6,7$	100,2 $\pm 3,4$
αSyn HFD (n = 9)	77,1 $\pm 4,8$	414,5 $\pm 13,0^{***}$	461,3 $\pm 28,6^{**}$	328,9 $\pm 36,3^{**}$	219,6 $\pm 23,7^{**}$	161,9 $\pm 23,5^*$
WT HFD (n = 9)	81,4 $\pm 5,8$	424,3 $\pm 17,1^{##}$	451,4 $\pm 18,1^{###}$	283,9 $\pm 24,3^{##}$	197,1 $\pm 17,9^{##}$	153,7 $\pm 11,6^{##}$

43 Wochen	0 min [mg / dl]	15 min [mg / dl]	30 min [mg / dl]	60 min [mg / dl]	90 min [mg / dl]	120 min [mg / dl]
αSyn SD (n = 9)	74,3 $\pm 2,8$	325,3 $\pm 14,3$	332,0 $\pm 28,4$	231,1 $\pm 19,9$	172,0 $\pm 13,9$	131,56 $\pm 6,6$
αSyn HFD (n = 9)	89,3 $\pm 4,1^{**}$	395,3 $\pm 13,4^{**}$	457,1 $\pm 25,3^{**}$	363,2 $\pm 30,4^{**}$	289,2 $\pm 30,5^{**}$	215,8 $\pm 20,5^{**}$
WT HFD (n = 9)	119,7 $\pm 3,5^{###}$	478,8 $\pm 20,6^{##}$	390,8 $\pm 21,9^{###}$	283,9 $\pm 30,6^{###}$	284,1 $\pm 27,5^{##}$	205,6 $\pm 12,4^{###}$

Tab. 3.2: Blutglukosekonzentrationen im Glukose Toleranztest. Die Blutglukosekonzentrationen wurden für α Syn SD, α Syn HFD sowie WT HFD Mäuse im Alter von 13 sowie 43 Wochen zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt und für die einzelnen Gruppen gemittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM [mg/dl]. Signifikante Unterschiede wurden mittels beidseitigem T-Test ermittelt und beziehen sich einerseits auf den Vergleich zwischen α Syn HFD und α Syn SD Mäusen (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001) sowie andererseits zwischen WT HFD und α Syn SD Mäusen (##P < 0,01; ###P < 0,001).

3.1.3 Verkürzte Lebensspanne

Die kontinuierliche Expression von humanem [A30P] α Syn führt bei den verwendeten transgenen Mäusen im Alter von etwa anderthalb bis zwei Jahren zur Ausprägung eines eindeutigen motorischen Phänotyps mit einer starken Lähmung der Hinterläufe, der eine Tötung der Mäuse unumgänglich macht. Um einen möglichen Einfluss der HFD auf die zeitliche Entwicklung der Symptomatik zu untersuchen, wurde die Lebensspanne von 26 α Syn Mäusen mit SD sowie 25 α Syn Mäusen mit HFD bestimmt und auf einer Überlebenskurve aufgetragen (Abb. 3.4).



Bei Vergleich des Todesalters aller Mäuse (Abb. 3.4 A / B) zeigte sich eine signifikant verminderte Lebensspanne der αSyn HFD Mäuse im Vergleich mit den αSyn SD Tieren (αSyn SD: $20,1 \pm 1,7$ Monate vs. αSyn HFD: $16,5 \pm 3,5$ Monate). Da einige Tiere mit HFD auch durch andere Ursachen als die phänotypische Symptomatik ums Leben kamen, wurden in einem zweiten Schritt nur die Mäuse untersucht, deren Ableben auf die Ausprägung des Phänotyps zurückgeführt werden konnte (Abb. 3.4 C / D). Aufgrund dessen verringerte sich die Anzahl der αSyn HFD Mäuse auf 14, während die Anzahl der untersuchten αSyn SD Mäuse konstant blieb. Auch diese allein auf das Phänotyp-bedingte Ableben konzentrierte Analyse zeigte ein signifikant verfrühtes Ableben der αSyn HFD Mäuse im Vergleich mit den αSyn SD Tieren (αSyn SD: $20,1 \pm 1,7$ Monate vs. HFD: $17,2 \pm 2,7$ Monate).

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die HFD zu einer verringerten Lebensspanne bei h[A30P] α Syn Mäusen führte, welche unter anderem auf eine verfrühte Ausprägung des motorischen Phänotyps zurückzuführen ist.

3.1.4 Beeinträchtigt Lernen in der Angstkonditionierung

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die verwendeten h[A30P] α Syn transgenen Mäuse im Alter von 12 Monaten ein im Vergleich mit WT Mäusen signifikant verschlechtertes Cued-Lernen in der Angstkonditionierung aufweisen (Freichel et al., 2007). Von Interesse war deshalb, ob die zusätzliche Fütterung einer HFD die emotionale Lernfähigkeit in der Angstkonditionierung bei diesen Mäusen weiter beeinträchtigt. Hierfür wurden im Alter von 4, 9 sowie 12 Monaten α Syn SD, α Syn HFD sowie WT HFD Mäuse konditioniert einen Licht- und Tonstimulus mit einem Fußschock zu verbinden. Am folgenden Tag wurde die Laufdistanz der Tiere sowohl im Kontext-, als auch im Cued Test gemessen.

Im Alter von 4 Monaten zeigte sich im Kontext Test sowohl bei den konditionierten α Syn SD, als auch bei den konditionierten α Syn HFD und den konditionierten WT HFD Mäusen eine signifikant verminderte Laufdistanz im Vergleich mit den jeweils nicht konditionierten Kontrollen. Ebenso konnte auch im Cued Test eine signifikant verminderte Laufdistanz der konditionierten Mäuse aller Gruppen im Vergleich mit den nicht konditionierten Kontrollen gemessen werden (Tab. 3.3, Abb. 3.5 A / B).

Auch im Alter von 9 Monaten konnte im Kontext Test für alle Gruppen eine signifikant verminderte Laufdistanz der konditionierten Mäuse im Vergleich mit den jeweils nicht konditionierten Kontrollen gemessen werden (C). Bei Überprüfen des Cued Lernens konnte bei den α Syn SD Mäuse sowie den WT HFD Mäuse weiterhin eine signifikant verminderte Laufdistanz der konditionierten Mäuse gemessen werden. Im Gegensatz dazu zeigten konditionierte α Syn HFD Mäuse keine signifikante Reduktion der Laufdistanz (D).

Im Alter von 12 Monaten konnte sowohl bei den α Syn SD Mäusen, als auch bei den WT HFD Mäusen eine signifikant verminderte Laufdistanz der konditionierten Mäuse im Kontext-Test gemessen werden. Dagegen konnte zwischen konditionierten α Syn HFD Mäusen und nicht konditionierten Kontrollen kein signifikanter Unterschied gefunden werden (E). Im Cued Test zeigten nur konditionierte WT HFD Mäuse eine signifikant reduzierte Laufdistanz, während bei den α Syn SD Mäusen sowie bei den α Syn HFD Mäusen kein signifikanter Unterschied zwischen konditionierten Tieren und Kontrollmäusen gemessen werden konnte (F).

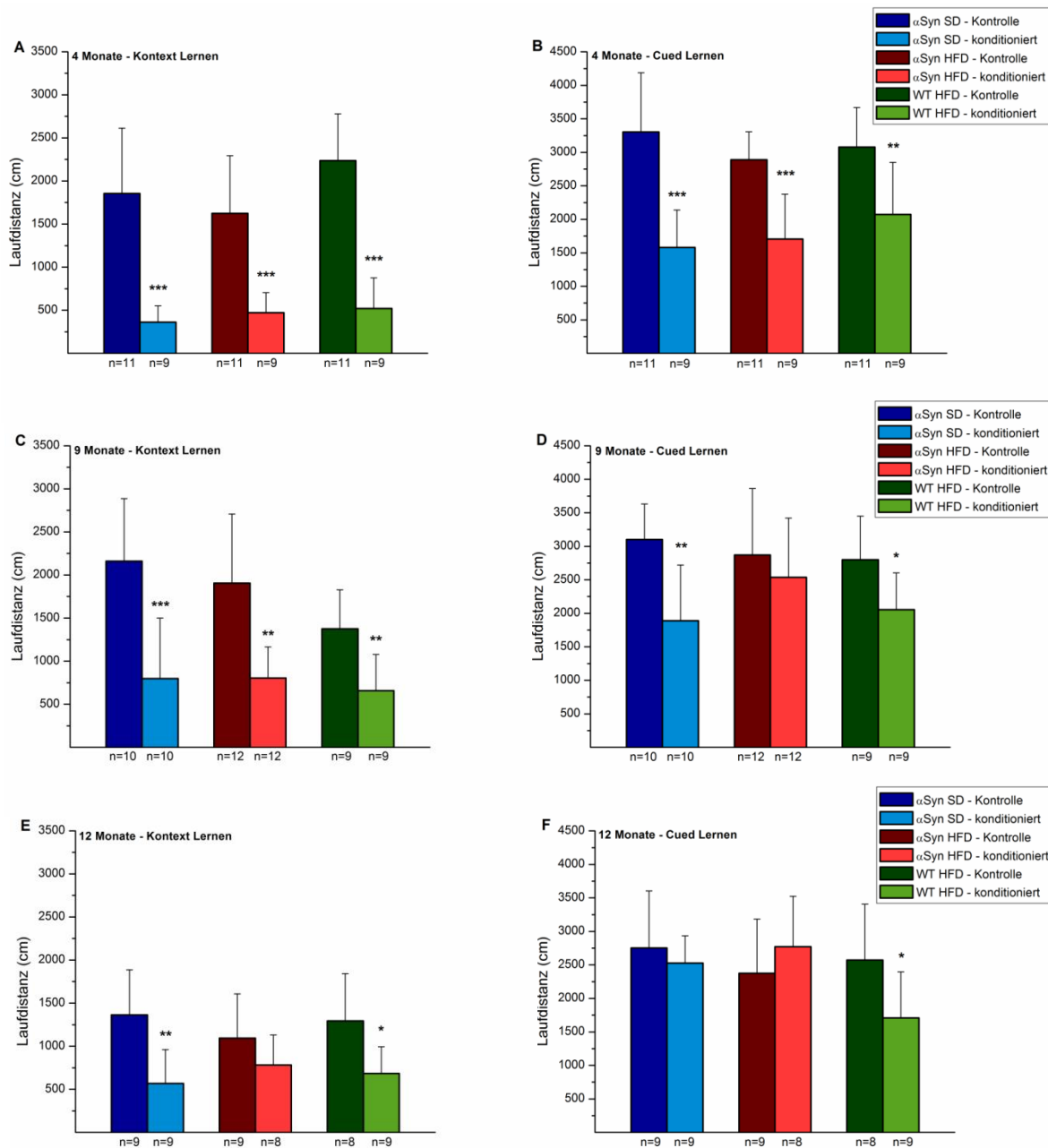


Abb. 3.5: Verfrühte Beeinträchtigung h[A30P]αSyn transgener Mäuse im Kontext und Cued Lernen der Angstkonditionierung nach Fütterung der HFD. Die Laufdistanz von konditionierten αSyn SD, αSyn HFD und WT HFD Mäusen sowie von jeweils nicht konditionierten Kontrollen wurde im Kontext Test (A / C / E) sowie im Cued Test (B / D / F) bestimmt. Der Test wurde im Alter von 4 (A / B), 9 (C / D) sowie 12 Monaten (E / F) durchgeführt. Dabei zeigte sich sowohl im Kontext, als auch im Cued Test eine vorzeitige Beeinträchtigung der αSyn HFD Mäuse. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM [cm], signifikante Unterschiede wurden mittels beidseitigem T-Test berechnet und beziehen sich jeweils auf den Vergleich zwischen konditionierten und nicht konditionierten Mäusen der gleichen Gruppe (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001).

Zusammenfassend zeigte die Angstkonditionierung, dass sich das emotionale Lernen der mit HFD gefütterten WT Mäuse, sowohl im Kontext, als auch im Cued Test, im Alterungsprozess zwar verschlechterte, jedoch bis zum Alter von 12 Monaten bestehen blieb. Im Gegensatz dazu konnte bei h[A30P] α Syn Mäusen mit SD im Alter von 12 Monaten kein funktionales Cued-Lernen mehr festgestellt werden. Die Kombination von h[A30P] α Syn Genotyp und HFD führte zur stärksten Beeinträchtigung im emotionalen Lernen. So konnte bereits im Alter von 9 Monaten kein funktionales Cued-Lernen mehr festgestellt werden, im Alter von 12 Monaten zeigte sich zudem eine signifikante Beeinträchtigung des Kontext-Lernen.

4 Monate	Laufdistanz [cm]			
	Kontext Nicht konditioniert	Kontext Konditioniert	Cued Nicht konditioniert	Cued Konditioniert
αSyn SD	1854,72 \pm 228,73 (n = 11)	361,62 \pm 62,99*** (n = 9)	3304,45 \pm 266,63 (n = 11)	1581,11 \pm 185,86*** (n = 9)
αSyn HFD	1624,92 \pm 201,46 (n = 11)	471,32 \pm 77,5*** (n = 9)	2890,67 \pm 125,67 (n = 11)	1704,71 \pm 223,48*** (n = 9)
WT HFD	2236,45 \pm 163,49 (n = 11)	520,28 \pm 118,34*** (n = 9)	3078,85 \pm 178,06 (n = 11)	2073,34 \pm 258,79** (n = 9)

9 Monate	Kontext Nicht konditioniert	Kontext Konditioniert	Cued Nicht konditioniert	Cued Konditioniert
	αSyn SD	2161,27 \pm 229,53 (n = 10)	797,58 \pm 222,44*** (n = 10)	3101,77 \pm 167,13 (n = 10)
αSyn HFD	1905,66 \pm 231,44 (n = 12)	804,32 \pm 104,45** (n = 12)	2870,51 \pm 286,49 (n = 12)	2538,33 \pm 255,01 (n = 12)
WT HFD	1376,33 \pm 150,80 (n = 9)	658,36 \pm 139,86** (n = 9)	2798,33 \pm 216,99 (n = 9)	2053,27 \pm 183,09* (n = 9)

12 Monate	Kontext Nicht konditioniert	Kontext Konditioniert	Cued Nicht konditioniert	Cued Konditioniert
	αSyn SD	1362,53 \pm 175,06 (n = 9)	567,01 \pm 131,37** (n = 9)	2771,38 \pm 251,47 (n = 9)
αSyn HFD	1904,26 \pm 171,13 (n = 9)	782,65 \pm 122,84 (n = 8)	2527,70 \pm 135,63 (n = 9)	2753,48 \pm 300,56 (n = 8)
WT HFD	1294,19 \pm 194,03 (n = 8)	683,36 \pm 103,31* (n = 9)	2571,61 \pm 295,45 (n = 8)	1707,51 \pm 229,91* (n = 9)

Tab. 3.3: Laufdistanz im Kontext und Cued Test der Angstkonditionierung. Die Laufdistanz wurde für konditionierte sowie nicht konditionierte α Syn SD, α Syn HFD und WT HFD Mäuse im Alter von 4, 9 sowie 12 Monaten bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM [cm]. Signifikante Unterschiede wurden mittels beidseitigem T-Test berechnet und beziehen sich jeweils auf den Vergleich von konditionierten mit nicht konditionierten Mäusen der gleichen Gruppe (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001).

3.1.5 Verschlechterte relative Laufleistung im Rota Rod

Das Rota Rod diente der Untersuchung einer möglicherweise frühzeitigen motorischen Einschränkung der α Syn HFD Mäuse ($n = 17$) im Vergleich mit α Syn SD Mäusen ($n = 19$) sowie mit WT HFD Mäusen ($n = 19$). Neben der absoluten Laufleistung (s) erfolgte auch die Betrachtung der relativen Laufleistung, indem die Laufzeiten der einzelnen Mäuse mit 26 Wochen jeweils als 100 % angesehen und die Zeiten der folgenden Wochen hierzu in prozentuale Relation gesetzt wurden.

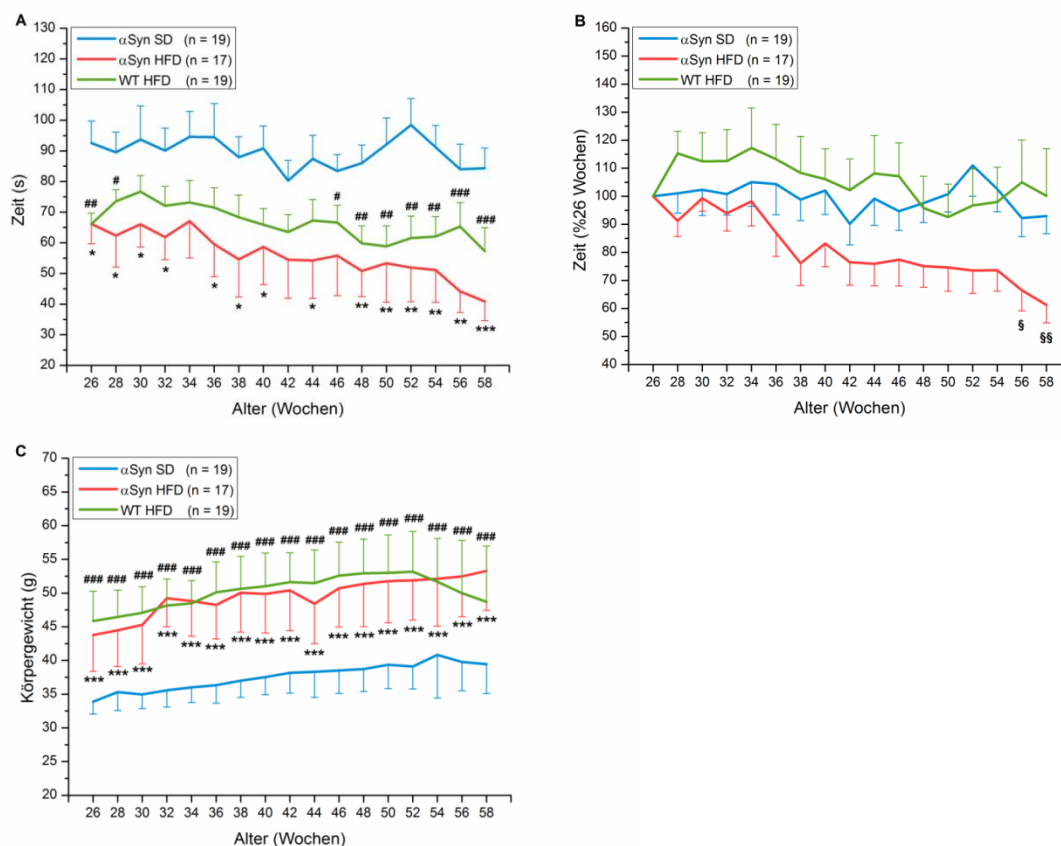


Abb. 3.6: Verminderte Laufzeit im Rota Rod nach Fütterung der HFD. Die absolute Laufzeit [s] der α Syn HFD sowie der WT HFD Mäuse lag während der gesamten Testdauer deutlich unter der der α Syn SD Mäuse (A). Bei Betrachtung der relativen Laufzeit [%26 Wochen] zeigte sich allein bei den α Syn HFD Mäusen eine signifikant sinkende Laufleistung im Zeitverlauf (B). Das Körpergewicht aller Mäuse mit HFD war während der gesamten Testdauer signifikant erhöht (C). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm SEM (A / B) bzw. Mittelwerte \pm StAbw (C), signifikante Unterschiede wurden mittels beidseitigem T-Test berechnet (Vergleich α Syn SD vs. α Syn HFD: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ / Vergleich α Syn SD vs. WT HFD: # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ / Vergleich α Syn HFD vs. α Syn HFD 26 Wochen: § $P < 0,05$; §§ $P < 0,05$).

Alter [Wo- chen]	Zeit [s]			Zeit [%26 Wochen]			Körpergewicht [g]		
	α Syn SD	α Syn HFD	WT HFD	α Syn SD	α Syn HFD	WT HFD	α Syn SD	α Syn HFD	WT HFD
26	92,56 ± 7,18	66,17 ± 6,49*	66,09 ± 3,60 ^{###}	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	33,89 ± 1,85	43,76 ± 5,37 ^{***}	45,84 ± 4,45 ^{###}
28	89,52 ± 6,64	62,39 ± 10,32*	73,51 ± 3,85 [#]	101,09 ± 7,06	91,24 ± 5,56	115,28 ± 7,91	35,32 ± 2,75	44,47 ± 5,35 ^{***}	46,47 ± 3,96 ^{###}
30	93,72 ± 10,91	66,06 ± 7,47*	76,67 ± 5,27	102,33 ± 9,20	99,33 ± 4,65	112,49 ± 10,18	34,95 ± 2,09	45,29 ± 5,81 ^{***}	47,06 ± 3,90 ^{###}
32	90,09 ± 7,30	61,86 ± 7,35*	72,08 ± 6,32	100,78 ± 7,49	93,94 ± 6,29	112,58 ± 11,21	35,58 ± 2,48	49,24 ± 4,25 ^{***}	48,16 ± 3,93 ^{###}
34	94,62 ± 8,25	67,04 ± 11,96	73,18 ± 7,18	105,06 ± 8,63	98,21 ± 8,79	117,21 ± 14,34	36,00 ± 2,24	48,82 ± 5,22 ^{***}	48,47 ± 3,39 ^{###}
36	94,44 ± 10,97	59,57 ± 10,64*	71,51 ± 6,46	98,83 ± 7,51	87,00 ± 8,41	113,28 ± 12,36	36,32 ± 2,65	48,24 ± 5,04 ^{***}	50,11 ± 4,53 ^{###}
38	87,89 ± 6,71	54,62 ± 12,32*	68,34 ± 7,23	98,83 ± 7,51	76,12 ± 7,95	108,35 ± 13,01	37,00 ± 2,47	50,06 ± 5,86 ^{***}	50,63 ± 4,81 ^{###}
40	90,81 ± 7,29	58,65 ± 12,31*	65,93 ± 5,24	102,03 ± 8,51	83,17 ± 8,28	106,12 ± 10,86	37,53 ± 2,61	49,88 ± 5,81 ^{***}	51,00 ± 4,94 ^{###}
42	80,26 ± 6,61	54,46 ± 12,57	63,53 ± 5,66	90,12 ± 7,44	76,50 ± 7,84	102,16 ± 11,16	38,16 ± 3,02	50,41 ± 5,96 ^{***}	51,63 ± 4,35 ^{###}
44	87,40 ± 7,71	54,25 ± 12,44*	67,23 ± 6,87	99,18 ± 9,49	75,90 ± 7,84	108,13 ± 13,50 [§]	38,32 ± 3,79	48,41 ± 5,91 ^{***}	51,47 ± 4,94 ^{###}
46	83,42 ± 5,37	55,83 ± 13,05	66,61 ± 5,63 [#]	94,72 ± 6,87	77,40 ± 9,41	107,16 ± 11,87	38,74 ± 3,41	50,71 ± 5,73 ^{***}	52,58 ± 4,98 ^{###}
48	85,96 ± 5,93	50,82 ± 8,39 ^{**}	59,81 ± 5,69 ^{###}	97,56 ± 6,90	75,10 ± 7,54	95,80 ± 11,36	38,74 ± 3,33	51,35 ± 6,33 ^{***}	52,95 ± 5,05 ^{###}
50	92,09 ± 8,65	53,30 ± 12,71 ^{**}	58,89 ± 6,65 ^{###}	100,81 ± 6,38	74,61 ± 8,45	92,60 ± 11,74	39,37 ± 3,53	51,76 ± 6,19 ^{***}	53,00 ± 5,62 ^{###}
52	98,42 ± 8,67	51,94 ± 11,21 ^{**}	61,52 ± 7,20 ^{###}	111,00 ± 10,95	73,56 ± 8,20	96,75 ± 13,04	39,11 ± 3,33	51,88 ± 5,87 ^{***}	53,16 ± 6,00 ^{###}
54	91,22 ± 7,12	51,12 ± 10,57 ^{**}	62,03 ± 6,60 ^{###}	102,58 ± 8,07	73,61 ± 7,50	98,02 ± 12,34	40,84 ± 6,41	52,12 ± 7,02 ^{***}	51,68 ± 6,41 ^{###}
56	83,99 ± 8,19	44,14 ± 6,95 ^{**}	65,35 ± 7,79 ^{###}	92,26 ± 6,69 [§]	66,48 ± 7,38	104,98 ± 15,04	39,79 ± 4,28	52,47 ± 5,97 ^{***}	50,00 ± 7,81 ^{###}
58	84,32 ± 6,62	40,85 ± 6,21 ^{***}	57,31 ± 7,60 ^{###}	92,93 ± 6,28 ^{§§}	61,25 ± 6,42	100,14 ± 16,89	39,47 ± 4,39	53,29 ± 5,88 ^{***}	48,71 ± 8,26 ^{###}

Tab. 3.4: Laufleistung auf dem Rota Rod. Die Laufzeit [s] auf dem Rota Rod wurde für α Syn SD (n = 19), α Syn HFD (n = 17) sowie WT HFD (n = 19) ab dem Alter von 26 Wochen alle zwei Wochen bestimmt und zudem das Körpergewicht [g] ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (Laufzeit) bzw. \pm StAbw (Körpergewicht), signifikante Unterschiede wurden mittels beidseitigem T-Test berechnet (Vergleich α Syn SD vs. α Syn HFD: *P < 0,05; **P < 0,01 / Vergleich α Syn SD vs. WT HFD: #P < 0,05; ##P < 0,01; ###P < 0,001 / Vergleich α Syn HFD vs. α Syn HFD 26 Wochen: §P < 0,05; §§P < 0,01).

Anhand Abb. 3.6 (A) sowie Tab. 3.4 ist zu erkennen, dass im Alter von 26 Wochen sowohl die α Syn HFD, als auch die WT HFD Mäuse signifikant kürzer auf dem Rota Rod verblieben, als die α Syn SD Tiere. Diese verminderte absolute Laufzeit der Mäuse mit HFD blieb während der gesamten Testdauer bestehen und wurde auch beim zuletzt untersuchten Zeitpunkt von 58 Wochen gemessen. Die Unterschiede in der Laufzeit korrelieren mit dem während der gesamten Testdauer signifikant erhöhten Körpergewicht der Mäuse mit HFD

(Abb. 3.6 C / Tab. 3.4). Im Gegensatz dazu konnte zwischen α Syn HFD und WT HFD Mäusen kein signifikanter Unterschied in der absoluten Laufzeit auf dem Rota Rod gefunden werden.

Bei Betrachtung der relativen Laufleistung (Abb. 3.6 B) zeigte sich, dass sowohl die Laufzeit der α Syn SD Mäuse, als auch der WT HFD Mäuse im Zeitverlauf relativ konstant blieb. So lag die Laufzeit der α Syn SD Mäuse im Alter von 48 Wochen bei $97,56 \pm 6,90\%$, die der WT HFD Mäuse bei $96,80 \pm 11,36\%$. Im Gegensatz dazu verschlechterte sich die relative Laufzeit der α Syn HFD Mäuse im Zeitverlauf stark und lag im Alter von 48 Wochen bei nur noch $75,10 \pm 7,54\%$. In den folgenden Wochen sank die relative Laufleistung der α Syn HFD Mäuse weiter und lag bei den zuletzt untersuchten Zeitpunkten von 56 und 58 Wochen signifikant unter der erzielten Zeit mit 26 Wochen. Es ist davon auszugehen, dass diese Ergebnisse nicht ausschließlich auf das erhöhte Körpergewicht der α Syn HFD Mäuse zurückzuführen sind, da die WT HFD Tiere ein vergleichbares Gewicht aufwiesen, ohne dass jedoch eine sinkende Laufleistung nachgewiesen werden konnte.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die absolute Laufzeit auf dem Rota Rod vor allem durch das Körpergewicht beeinflusst wurde und unabhängig vom Genotyp war. Im Gegensatz dazu führte die Kombination von HFD und h[A30P] α Syn Genotyp ab einem Alter von 56 Wochen zu einer signifikant verminderten Laufleistung auf dem Rota Rod.

3.1.6 Verminderte Laufdistanz, Geschwindigkeit und Verweildauer in den inneren Zonen im Open Field

Mit Hilfe des Open Fields sollte ein möglicherweise verändertes Aktivitätsmuster sowie das Erkundungs- und Vermeidungsverhalten der mit HFD gefütterten h[A30P] α Syn Mäuse untersucht werden. Hierfür wurden im Alter von 24 sowie 42 Wochen jeweils 20 α Syn SD, α Syn HFD und WT HFD Mäuse im Open Field getestet.

Wie anhand Tab. 3.5 und Abb. 3.7 A zu erkennen zeigte sich im Alter von 24 Wochen eine deutlich erhöhte Laufaktivität der h[A30P] α Syn transgenen Mäuse im Vergleich mit den WT HFD Tieren. So legten sowohl die α Syn SD, als auch die α Syn HFD Mäuse eine signifikant größere Laufdistanz zurück als die WT HFD Tiere. Dies korrelierte mit der ebenfalls signifikant geringeren Laufgeschwindigkeit der WT HFD Mäuse im Vergleich mit den α Syn SD sowie den α Syn HFD Mäusen (B). Das Körpergewicht der α Syn HFD und der WT HFD Mäuse unterschied sich dagegen nicht, lag aber jeweils signifikant über dem der α Syn SD Mäuse (Tab. 3.5).

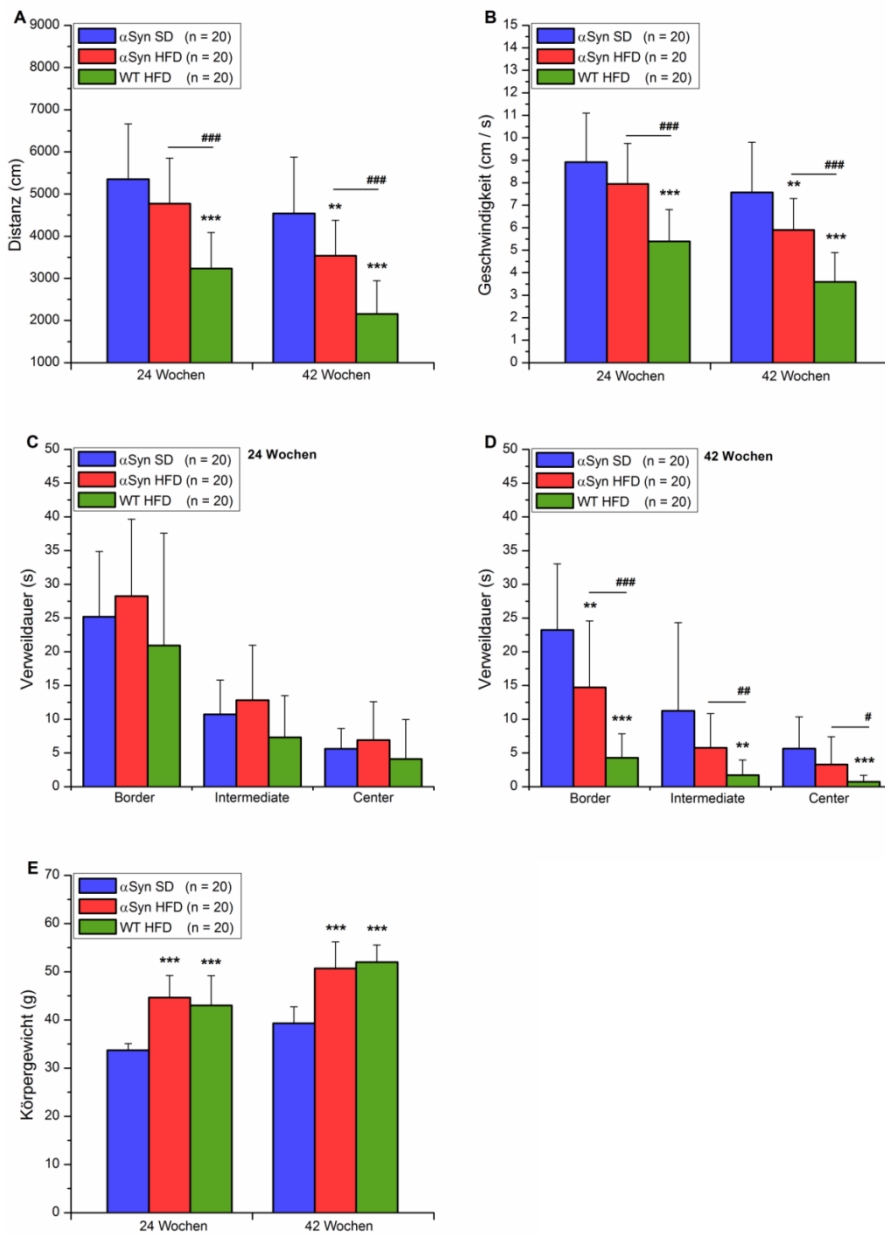


Abb. 3.7: Verändertes Verhalten im Open Field nach Fütterung der HFD. Sowohl im Alter von 24, als auch von 42 Wochen zeigten WT HFD Mäuse eine verminderte Laufdistanz [cm] und Laufgeschwindigkeit [cm/s]. Im Alter von 42 Wochen waren auch die Laufdistanz und Laufgeschwindigkeit der αSyn HFD Mäuse vermindert (A / B). Im Alter von 24 Wochen konnten keine Unterschiede in der Verweildauer [s] in den inneren Zonen gefunden werden (C). Im Alter von 42 Wochen zeigten WT HFD Mäuse sowohl im Vergleich mit αSyn SD, als auch mit αSyn HFD Mäusen eine signifikant verminderte Verweildauer in den inneren Zonen (D). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte ± StAbw, signifikante Unterschiede wurden mittels beidseitigem T-Test berechnet (Vergleich αSyn SD vs. αSyn HFD bzw. vs. WT HFD: **P < 0,01; ***P < 0,001 / Vergleich αSyn HFD vs. WT HFD: #P < 0,05; ##P < 0,01; ###P < 0,001).

<u>Laufdistanz [cm]</u>	<u>αSyn SD (n = 20)</u>	<u>αSyn HFD (n = 20)</u>	<u>WT HFD (n = 20)</u>
24 Wochen	5351,92 ± 1307,57 ^{§§§}	4771,33 ± 1076,99 ^{§§§}	3232,99 ± 853,11
42 Wochen	4539,76 ± 1334,75 ^{§§§}	3538,05 ± 839,68 ^{§§§/**}	2156,41 ± 788,29
<u>Geschwindigkeit [cm/s]</u>	<u>αSyn SD (n = 20)</u>	<u>αSyn HFD (n = 20)</u>	<u>WT HFD (n = 20)</u>
24 Wochen	8,92 ± 2,18 ^{§§§}	7,95 ± 1,80 ^{§§§}	5,39 ± 1,42
42 Wochen	7,57 ± 2,23 ^{§§§}	5,90 ± 1,40 ^{§§§/**}	3,59 ± 1,31
<u>Körpergewicht [g]</u>	<u>αSyn SD (n = 20)</u>	<u>αSyn HFD (n = 20)</u>	<u>WT HFD (n = 20)</u>
24 Wochen	33,70 ± 1,38	44,65 ± 4,56 ^{***}	43,00 ± 6,18 ^{***}
42 Wochen	39,20 ± 3,42	50,70 ± 5,50 ^{***}	52,00 ± 3,53 ^{***}

Tab. 3.5: Laufdistanz, Geschwindigkeit und Körpergewicht im Open Field. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte ± StAbw für αSyn SD, αSyn HFD und WT HFD Mäuse im Alter von 24 und 42 Wochen. Signifikante Unterschiede wurden mittels beidseitigem T-Test berechnet (Vergleich αSyn SD vs. αSyn HFD bzw. vs. WT HFD: **P < 0,01; ***P < 0,001 / Vergleich αSyn WT vs. αSyn SD bzw. αSyn HFD: §§§P < 0,001).

Auch im Alter von 42 Wochen konnte eine signifikant größere Laufdistanz der αSyn SD sowie der αSyn HFD Mäuse im Vergleich mit WT HFD Mäusen gemessen werden (Tab. 3.5 und Abb. 3.7 A). Zusätzlich zeigte sich aber auch eine signifikant verminderte Laufdistanz der αSyn HFD Mäuse im Vergleich zu den αSyn SD Mäusen. Auch in diesem Alter korrelierte die verminderte Laufdistanz der mit HFD gefütterten Mäuse mit der ebenfalls geringeren Laufgeschwindigkeit. So lag die Geschwindigkeit der αSyn HFD Mäuse signifikant unter der der αSyn SD Tiere. Die Geschwindigkeit der WT HFD Mäuse war sowohl signifikant geringer als die der αSyn SD, als auch als die der αSyn HFD Mäuse (B). Ebenso wie auch mit 24 Wochen, lag auch im Alter von 42 Wochen das Körpergewicht der αSyn SD Mäuse signifikant unter dem der αSyn HFD sowie dem der WT HFD Mäuse, während zwischen den Gruppen mit HFD kein Unterschied gemessen werden konnte.

Es kann somit angenommen werden, dass die Laufdistanz sowie die Laufgeschwindigkeit im Alter von 24 Wochen vor allem durch das h[A30P]αSyn Transgen beeinflusst wurden, während ein Einfluss der HFD nicht nachgewiesen werden konnte. Im Alter von 42 Wochen scheint das h[A30P]αSyn Transgen weiterhin eine erhöhte Laufdistanz sowie Laufgeschwindigkeit zu induzieren. Andererseits scheint in diesem Alter die HFD die Aktivität ebenfalls zu beeinflussen und zu vermindern.

Durch virtuelle Einteilung des Open Fields in verschiedene Zonen kann das Erkundungs- und Vermeidungsverhalten der Mäuse untersucht werden. Hierfür wurde die Verweildauer der Mäuse in den drei inneren Zonen „Border“, „Intermediate“ und „Center“ untersucht (Abb. 3.7 C / D und Tab. 3.6). Dabei zeigte sich, dass im Alter von 24 Wochen alle drei Gruppen die

drei inneren Zonen ähnlich lang besuchten, sodass keine signifikanten Unterschiede gefunden werden konnten.

24 Wochen	Outer [s]	Border [s]	Intermediate [s]	Center [s]
αSyn SD (n = 20)	558,30 \pm 16,41	25,19 \pm 9,67	10,71 \pm 5,09	5,62 \pm 3,00
αSyn HFD (n = 20)	552,01 \pm 22,66	28,24 \pm 11,39	12,81 \pm 8,15	6,90 \pm 5,70
WT HFD (n = 20)	567,85 \pm 27,50	20,93 \pm 16,65	7,31 \pm 6,17	4,11 \pm 5,84

42 Wochen	Outer [s]	Border [s]	Intermediate [s]	Center [s]
αSyn SD (n = 20)	599,86 \pm 23,69	23,23 \pm 9,81	11,25 \pm 13,06	5,64 \pm 4,70
αSyn HFD (n = 20)	576,20 \pm 16,51*	14,72 \pm 9,87**	5,76 \pm 5,09	3,30 \pm 4,09
WT HFD (n = 20)	593,28 \pm 6,55***/####	4,28 \pm 3,57***/####	1,71 \pm 2,26**/###	0,71 \pm 0,97***/#

Tab. 3.6: Verweildauer in den verschiedenen Zonen des Open Fields. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm StAbw [s] für α Syn SD, α Syn HFD und WT HFD Mäuse im Alter von 24 sowie 42 Wochen. Signifikante Unterschiede wurden mittels beidseitigem T-Test berechnet (Vergleich α Syn SD vs. α Syn HFD bzw. vs. WT HFD: *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001 / Vergleich α Syn HFD vs. WT HFD: #P < 0,05; ##P < 0,01; ###P < 0,001).

Im Alter von 42 Wochen verbrachten die α Syn SD Mäuse ähnlich viel Zeit in den inneren Regionen wie auch schon mit 24 Wochen (Abb. 3.7 C / D und Tab. 3.6). Im Gegensatz dazu sank die Verweildauer der α Syn HFD sowie der WT HFD Mäuse im Alter von 42 Wochen in den inneren Zonen stark ab. So lag die Verweildauer der α Syn HFD Mäuse in der Border-Zone signifikant unter der der α Syn SD Tiere und die Verweildauer der WT HFD Mäuse war sowohl signifikant geringer als die der α Syn SD, als auch der α Syn HFD Mäuse. Auch in der Intermediate-Zone zeigte sich bei den α Syn SD Mäusen eine ähnliche Zeit wie auch mit 24 Wochen, während die der α Syn HFD Mäuse vermindert war und die der WT HFD Mäuse signifikant unter der der α Syn SD sowie der α Syn HFD Mäuse lag. Im Center des Open Fields verbrachten die WT HFD Mäuse ebenfalls signifikant weniger Zeit, als die α Syn SD Mäuse und die α Syn HFD Mäuse.

Dementsprechend scheint im Alter von 24 Wochen weder das h[A30P] α Syn Transgen, noch die HFD das im Open Field messbare Erkundungs- und Vermeidungsverhalten signifikant zu beeinflussen. Im Alter von 42 Wochen scheint die HFD dagegen einen Einfluss auszuüben und zu einer verminderten Verweildauer der Mäuse mit HFD in den inneren Regionen des Open Fields zu führen. Dieser Effekt war jedoch bei den WT HFD Mäusen wesentlich stärker ausgeprägt, als bei den h[A30P] α Syn transgenen Tieren mit HFD.

3.1.7 Vorzeitiges Scheitern im Cat Walk

Mit Hilfe des CatWalk Systems kann das Laufmuster von Mäusen analysiert und so möglicherweise vorhandene Veränderungen in der Motorik aufgrund der erhöhten Fettfütterung überprüft werden. Hierfür wurden 10 α Syn HFD sowie 14 α Syn SD Mäuse ab einem Alter von 31 Wochen alle zwei Wochen getestet.

Anhand Abb. 3.8 ist zu erkennen, dass bei den α Syn HFD Mäusen der Cat Walk Test im Alter von durchschnittlich $76,80 \pm 5,85$ Wochen und damit signifikant früher in Folge der motorischen Symptomatik abgebrochen werden musste, als bei den α Syn SD Mäusen ($83,71 \pm 7,51$ Wochen).

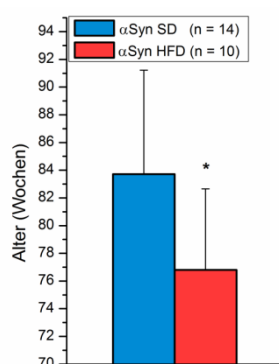


Abb. 3.8: Verfrühtes Scheitern im Cat Walk h[A30P] α Syn transgener Mäuse mit HFD. Die α Syn HFD Mäuse waren aufgrund der motorischen Symptomatik vorzeitig nicht mehr in der Lage den Cat Walk zu durchlaufen. Angegeben ist das durchschnittliche Abbruchsalter, dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm StAbw, signifikante Unterschiede wurden mittels beidseitigem T-Test berechnet (*P < 0,05).

Bei Untersuchungen von Schrittlänge (mm), Fußabdrucklänge (mm) sowie der mittleren Abdruckintensität konnten dagegen keine signifikanten Unterschiede in der Ausprägung zwischen α Syn SD und α Syn HFD Mäusen und somit kein Einfluss der HFD auf die betrachteten Parameter festgestellt werden. Ebenfalls unabhängig von der Diät zeigte sich, dass bei allen Mäusen mit Beginn der motorischen Symptomatik, sowohl Schrittlänge, als auch Fußabdrucklänge und mittlere Abdruckintensität aller Gliedmaßen stark absanken (Abb. 3.9 / Tab. 3.7).

Während des gesamten Test wiesen die α Syn HFD Mäuse ein im Vergleich mit den α Syn SD Mäusen signifikant erhöhtes Körpergewicht auf. Da trotz des deutlich höheren Körpergewichts der α Syn HFD Mäuse keine Unterschiede in der Ausprägung der untersuchten Parameter gefunden werden konnten, ist davon auszugehen, dass die Ergebnisse des Cat Walks unabhängig vom Körpergewicht der Mäuse sind.

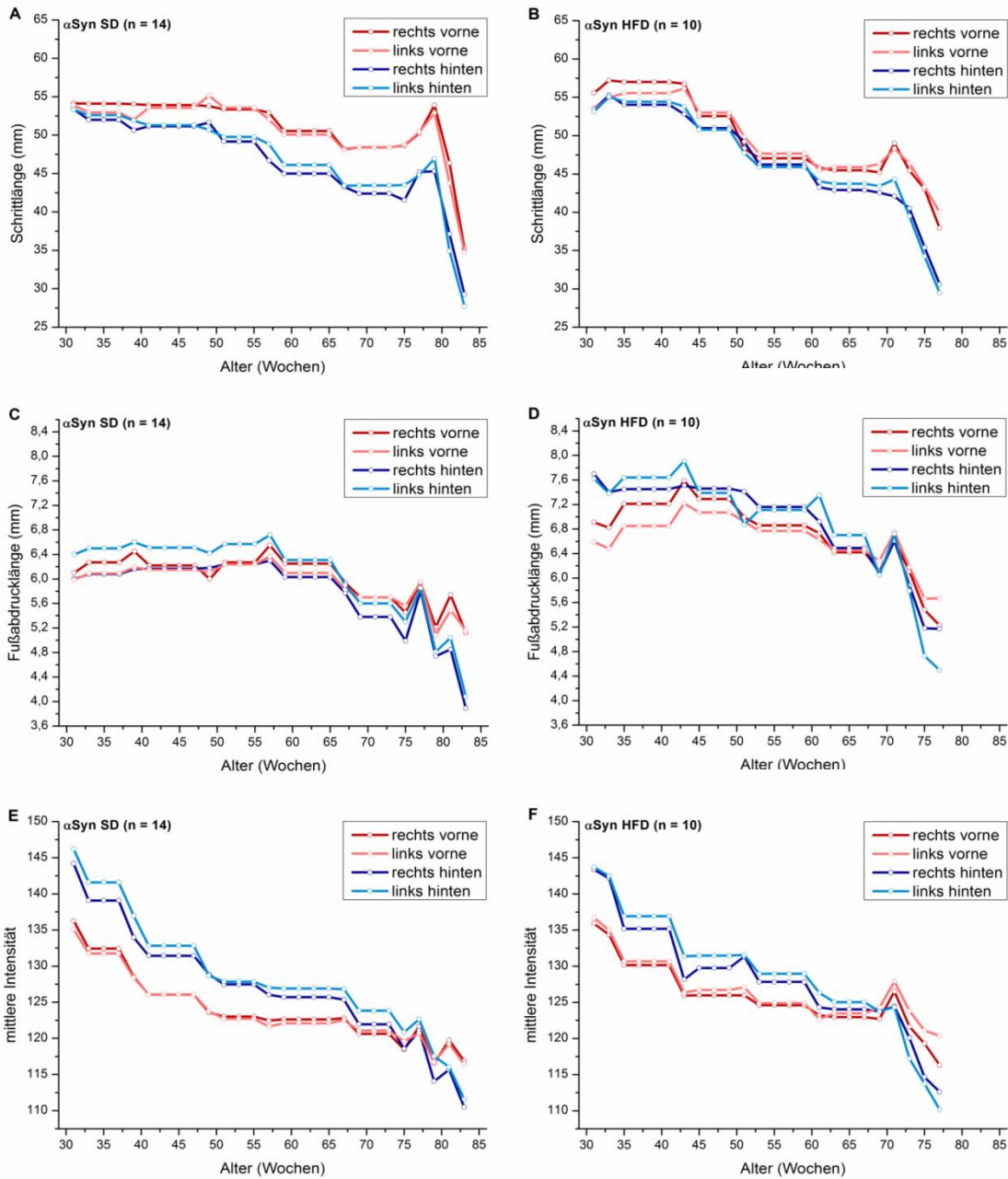


Abb. 3.9: Kein Unterschied bei verschiedenen Schrittparametern zwischen h[A30P] α Syn transgenen Mäusen mit SD und mit HFD. 14 α Syn SD sowie 10 α Syn HFD Mäuse wurden ab einem Alter von 31 Wochen zweiwöchentlich auf dem Cat Walk getestet und die Schrittlänge [mm], die Fußabdrucklänge [mm] sowie die mittlere Abdruckintensität für jede Gruppe bestimmt und gemittelt.

Alter [Wochen]	Schrittlänge [mm]							
	α Syn SD				α Syn HFD			
	RF	RH	LF	LH	RF	RH	LF	LH
31	54,77 ± 10,76	54,21 ± 11,37	54,53 ± 11,56	54,02 ± 11,27	53,95 ± 8,04	51,65 ± 5,56	51,87 ± 8,31	51,21 ± 7,72
67	48,17 ± 10,42	43,29 ± 12,04	48,10 ± 10,47	43,41 ± 11,20	45,19 ± 8,21	42,55 ± 8,81	46,29 ± 4,51	43,41 ± 7,82
77	50,25 ± 9,31	45,21 ± 8,26	50,41 ± 8,19	44,80 ± 7,68	37,91 ± 11,15	30,59 ± 8,78	40,00 ± 8,73	29,46 ± 11,43
83	35,23 ± 10,52	29,26 ± 11,46	34,75 ± 10,68	27,70 ± 13,02				
Alter [Wochen]	Fußabdrucklänge [mm]							
	α Syn SD				α Syn HFD			
	RF	RH	LF	LH	RF	RH	LF	LH
31	6,09 ± 1,05	6,00 ± 1,66	5,98 ± 0,84	6,40 ± 1,25	6,99 ± 0,72	8,00 ± 0,78	6,70 ± 0,80	7,87 ± 1,40
67	5,94 ± 1,16	5,77 ± 2,02	5,83 ± 1,32	5,90 ± 1,87	6,11 ± 1,53	6,07 ± 1,48	6,28 ± 1,26	6,05 ± 1,75
77	5,94 ± 1,53	5,81 ± 1,09	5,95 1,40	5,85 ± 1,12	5,23 ± 1,18	5,17 ± 2,46	5,67 ± 1,08	4,50 ± 2,15
83	5,12 ± 1,11	3,89 ± 2,22	5,16 ± 0,93	4,08 ± 2,09				
Alter [Wochen]	Mittlere Abdruckintensität							
	α Syn SD				α Syn HFD			
	RF	RH	LF	LH	RF	RH	LF	LH
31	136,28 ± 21,40	144,18 ± 23,22	135,10 ± 18,98	146,19 ± 19,63	137,45 ± 4,60	144,55 ± 4,39	138,48 ± 7,06	144,92 ± 4,62
67	122,79 ± 6,50	125,36 ± 7,85	122,53 ± 6,93	126,82 ± 10,98	122,69 ± 12,04	123,76 ± 10,70	124,28 ± 11,43	123,72 ± 10,38
77	121,64 ± 10,46	121,10 ± 9,20	120,72 ± 7,74	122,65 ± 8,09	116,30 ± 9,42	112,63 ± 9,74	120,33 ± 11,03	110,16 ± 11,37
83	116,88 ± 7,02	110,49 ± 9,30	116,45 ± 6,28	111,59 ± 10,88				

Tab. 3.7: Schrittlänge, Fußabdrucklänge und mittlere Abdruckintensität im Cat Walk. 14 α Syn SD sowie 10 α Syn HFD Mäuse wurden ab einem Alter von 31 Wochen auf dem Cat Walk getestet. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm StAbw.

3.1.8 Zusammenfassung des Einflusses der Hochfett Diät auf die untersuchten *in vivo* Parameter

Anhand der *in vivo* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der HFD sowohl ein erhöhtes Körpergewicht, als auch eine gestörte Glukosetoleranz bei h[A30P] α Syn transgenen sowie bei WT Mäusen induziert werden konnte. Bei den transgenen Mäusen führte die HFD außerdem durch verfrühtes Auftreten des motorischen Phänotyps zu einer verminderten Lebensspanne.

Mit der Angstkonditionierung konnte gezeigt werden, dass allein das h[A30P] α Syn Transgen zu einer Beeinträchtigung im Cued Lernen im Alter von 12 Monaten führte. Transgene Mäuse mit zusätzlicher HFD verloren allerdings bereits im Alter von 9 Monaten ihre Fähigkeit zum Cued Lernen und wiesen im Alter von 12 Monaten auch kein funktionales

Kontext Lernen mehr auf. Dementsprechend scheint die HFD sowohl das Amygdala-, als auch das Hippocampus-abhängige Lernen der transgenen Mäuse verfrüht zu beeinträchtigen.

Das Rota Rod zeigte, dass die absolute Laufzeit vor allem vom Körpergewicht der Mäuse abhängig ist. Folglich konnte kein Unterschied zwischen α Syn HFD und WT HFD Mäusen gefunden werden, während die h[A30P] α Syn Mäuse mit SD signifikant besser abschnitten. Bei Betrachten der relativen Laufleistung in % zu der Laufzeit mit 24 Wochen zeigte sich jedoch ab einem Alter von 56 Wochen eine signifikante Verschlechterung bei den h[A30P] α Syn Mäusen mit HFD, während die relative Laufleistung der WT HFD sowie der h[A30P] α Syn Mäuse mit SD über den Zeitverlauf konstant blieb. Demnach scheint die HFD in Kombination mit dem h[A30P] α Syn Genotyp zu einer verfrühten motorischen Beeinträchtigung auf dem Rota Rod zu führen.

Im Open Field zeigte sich, dass sowohl die zurückgelegte Laufdistanz, als auch die Laufgeschwindigkeit bei h[A30P] α Syn transgenen Mäusen signifikant erhöht war. Während sich im Alter von 24 Wochen jedoch kein Einfluss der HFD zeigte, führte diese im Alter von 42 Wochen zu einer verminderten Laufdistanz und Geschwindigkeit. Weiterhin konnte im Open Field gezeigt werden, dass im Alter von 24 Wochen das Erkundungs- und Vermeidungsverhalten der Mäuse weder durch den h[A30P] α Syn Genotyp, noch durch die HFD beeinflusst wurde. Im Alter von 42 Wochen schien dagegen die HFD zu einem verminderten Erkundungs- sowie einem erhöhten Vermeidungsverhalten zu führen.

Der Cat Walk Test musste bei den h[A30P] α Syn HFD Mäusen in Folge der motorischen Symptomatik signifikant früher abgebrochen werden als bei den h[A30P] α Syn SD Tieren. Abgesehen davon konnten keine Unterschiede in der Ausprägung der untersuchten Parameter und damit kein Einfluss der HFD festgestellt werden.

3.2 Einfluss der Hochfett Diät auf histologische und proteinbiochemische Parameter

3.2.1 Einfluss der Hochfett Diät auf die Entwicklung der Synukleinopathie im Hirnstamm

Anatomisch gesehen besteht der Hirnstamm aus Mittelhirn, *Pons* und *Medulla oblongata*. Er besitzt verschiedene physiologische Funktionen und ist beispielsweise in die Kontrolle des kardiovaskulären und respiratorischen Systems sowie in Schmerzempfinden und Bewusstsein involviert. Zudem verfügt er über sensorische und motorische Funktionen und hat außerdem eine wichtige Leitungsaufgabe, da alle Informationen von Cerebellum und Cerebrum in Richtung des Körpers und zurück durch ihn hindurch geführt werden.

Bei der Synukleinopathie ist der Hirnstamm eine früh und häufig stark von der Lewy-Pathologie betroffene Hirnregion (Beach et al., 2009; Braak et al., 2002). Untersucht werden sollte deshalb, ob die HFD die Entwicklung der Synukleinopathie im Hirnstamm beeinflusst.

3.2.1.1 Kein Unterschied im h[A30P] α Syn Proteinlevel

Die verwendeten transgenen Mäuse exprimieren humanes transgenes α -Synuklein (h[A30P] α Syn) mit der A30P-Punktmutation unter der Kontrolle des ZNS-spezifischen Promotors Thy1. Um einen möglichen Einfluss der HFD auf die h[A30P] α Syn Proteinkonzentration zu untersuchen, wurden Sagittalschnitte von α Syn SD, α Syn HFD und WT HFD Mäusen immunohistochemisch mit einem spezifischen Antikörper für humanes α Syn (15G7) gefärbt.

Anhand Abb. 3.10 ist zu erkennen, dass sowohl bei 16 Monate alten α Syn HFD Mäusen (C-D), als auch bei 16 sowie 20 Monate alten α Syn SD Mäusen (A-B, E-F) großflächig humanes, transgenes α Syn nachgewiesen werden konnte. Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen waren dabei nicht zu erkennen. Im Gegensatz dazu zeigten WT HFD Mäuse (G-H) keine 15G7 positive Färbung. Somit konnte bei allen transgenen Mäusen, nicht jedoch bei WT HFD Mäusen, das transgene α Syn im Hirnstamm nachgewiesen werden. Die HFD zeigte allerdings keinen erkennbaren Einfluss auf die Verteilung oder Ausprägungsstärke des h[A30P] α Syns.

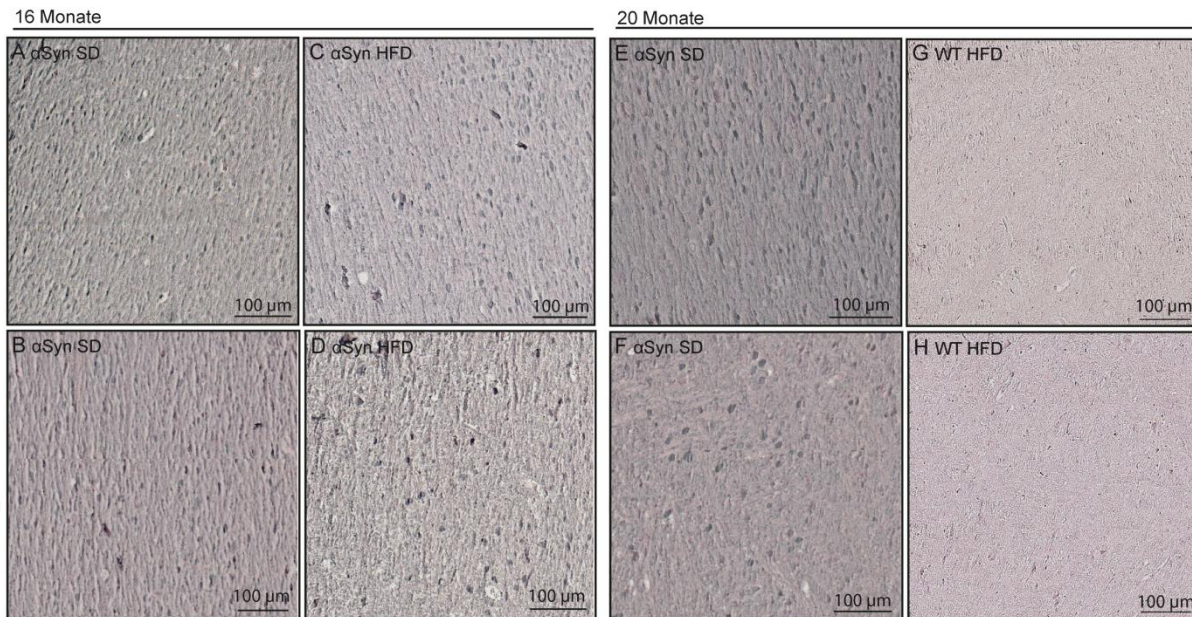


Abb. 3.10: Kein Unterschied in der h[A30P] α Syn Proteinmenge im Hirnstamm h[A30P] α Syn transgener Mäuse mit SD und mit HFD. Sagittalschnitte von Gehirnen 16 Monate alter α Syn SD (n = 5) und α Syn HFD (n=4) sowie 20 Monate alter α Syn SD (n = 8) und WT HFD Mäusen (n = 4) wurden immunohistochemisch mit einem 15G7-spezifischen Antikörper gefärbt. Dabei konnte bei 16 Monate alten α Syn HFD (C-D) sowie bei 16 und 20 Monate alten α Syn SD Mäusen (A-B, E-F) humanes α Syn nachgewiesen werden. Unterschiede zwischen den Gruppen konnten nicht festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigten WT HFD Mäuse auch im Alter von 20 Monaten keine 15G7 positive Färbung (G-H).

3.2.1.2 Vorzeitige pathologische Phosphorylierung von α -Synuklein am Serin-129

Das wesentliche neuropathologische Kennzeichen der PK sind Protein-Aggregate, die zu einem großen Teil aus Amyloid-artigem, fibrillären und am S129 phosphorylierten α Syn bestehen (Spillantini et al., 1997; Okochi et al, 2000). Um den Einfluss der HFD auf die pathologische Phosphorylierung von α Syn im Hirnstamm zu untersuchen, wurden Sagittalschnitte von α Syn SD, α Syn HFD sowie WT HFD Mäusen immunohistochemisch mit einem pS129- α Syn spezifischen Antikörper (ab51253, abcam) gefärbt.

Anhand Abb. 3.11 ist zu erkennen, dass im Alter von 16 Monaten bei α Syn SD Mäusen (n = 5) nur vereinzelt eine S129- α Syn Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte (A-B). Im Gegensatz dazu wurden bei α Syn HFD Mäusen (n = 5) im Alter von 16 Monaten bereits großflächige und starke S129-Phosphorylierungen des α Syn gefunden (C-D). Stärkere Vergrößerung brachte dabei sowohl Lewy-Neurit-ähnliche (C') und Spheroid-ähnliche Strukturen (C''), als auch Lewy-artige Akkumulierungen in neuronalen Zellkörpern (D'-D'') zum Vorschein. Bei α Syn SD Mäusen konnte diese starke pathologische S129- α Syn Phosphorylierung erst im Alter von 20 Monaten (n = 8) nachgewiesen werden (E-F). Die

gefunden Strukturen (E'-F'') unterschieden sich dabei nicht von denen der 16 Monate alten α Syn HFD Mäuse. Im Gegensatz dazu zeigten die WT HFD Mäuse (n = 4) auch im Alter von 20 Monaten keine S129- α Syn Phosphorylierung (G-H).

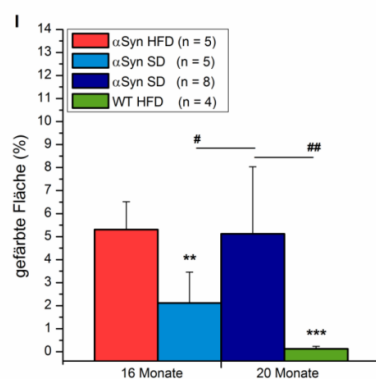
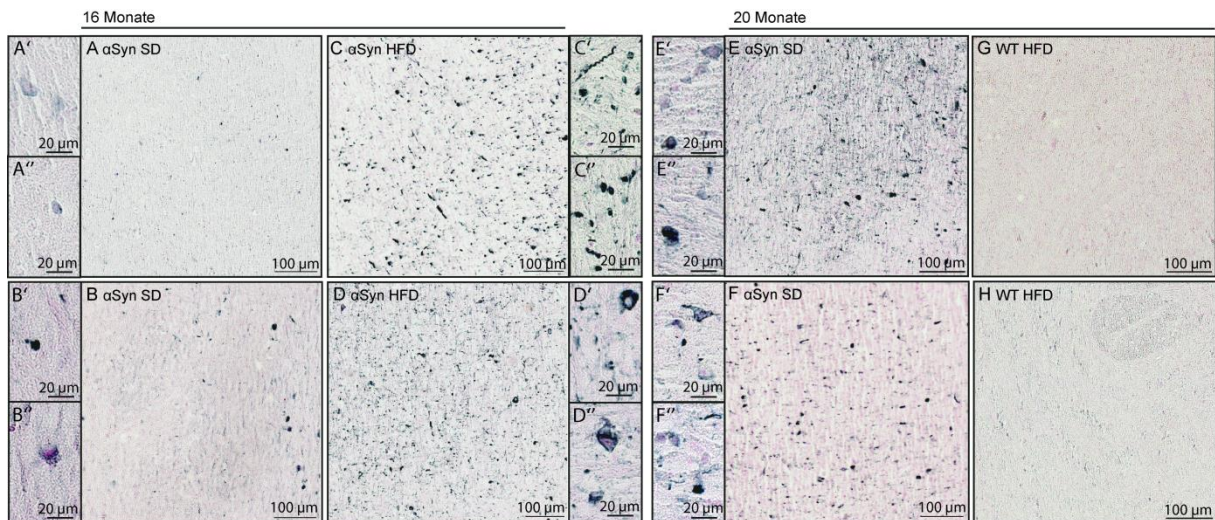


Abb. 3.11: Vorzeitige pathologische S129- α Syn Phosphorylierung im Hirnstamm h[A30P] α Syn transgener Mäuse mit HFD. Sagittalschnitte von Gehirnen von α Syn SD, α Syn HFD und WT HFD Mäusen wurden immunohistochemisch mit einem Antikörper gegen pS129- α Syn gefärbt. Im Alter von 16 Monaten konnte bei α Syn SD Mäusen (n = 5; A-B) die neuropathologische Phosphorylierung nur vereinzelt nachgewiesen werden, während diese bei α Syn HFD Mäusen (n = 5; C-D) bereits stark ausgeprägt war. Im Alter von 20 Monaten zeigten auch α Syn SD Mäuse eine stark pS129- α Syn-positive Färbung (n = 8; E-F), während bei WT HFD Mäusen (n = 4; G-H) weiterhin keine positiven Signale gefunden werden konnte. Densitometrische Auswertung (I) bestätigte das signifikant verfrühte Auftreten der pS129- α Syn positiven Färbung bei α Syn HFD Mäusen. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm StAbw, signifikante Unterschiede wurden mittels beidseitigem T-Test berechnet (Vergleich zu α Syn HFD 16 Monate: **P < 0,01; ***P < 0,001 / Vergleich zu α Syn SD, 20 Monate: #P < 0,05; ##P < 0,01).

Densitometrische Auswertung der gefärbten Fläche bestätigte das signifikant vorzeitige Auftreten der starken S129- α Syn Phosphorylierung bei 16 Monate alten α Syn HFD Mäusen ($5,31 \pm 1,21\%$) im Vergleich mit gleich alten α Syn SD Mäusen ($2,12 \pm 1,34\%$), ebenso wie

im Vergleich mit 20 Monate alten WT HFD Mäusen ($0,13 \pm 0,11\%$). Im Alter von 20 Monaten war die S129- α Syn Phosphorylierung auch bei α Syn SD Mäusen ($5,12 \pm 2,92\%$), sowohl im Vergleich mit 16 Monate alten α Syn SD Mäusen, als auch im Vergleich mit 20 Monate alten WT HFD Mäusen, signifikant erhöht. Zwischen 20 Monate alten α Syn SD und 16 Monate alten α Syn HFD Mäusen konnte dagegen kein Unterschied gefunden werden.

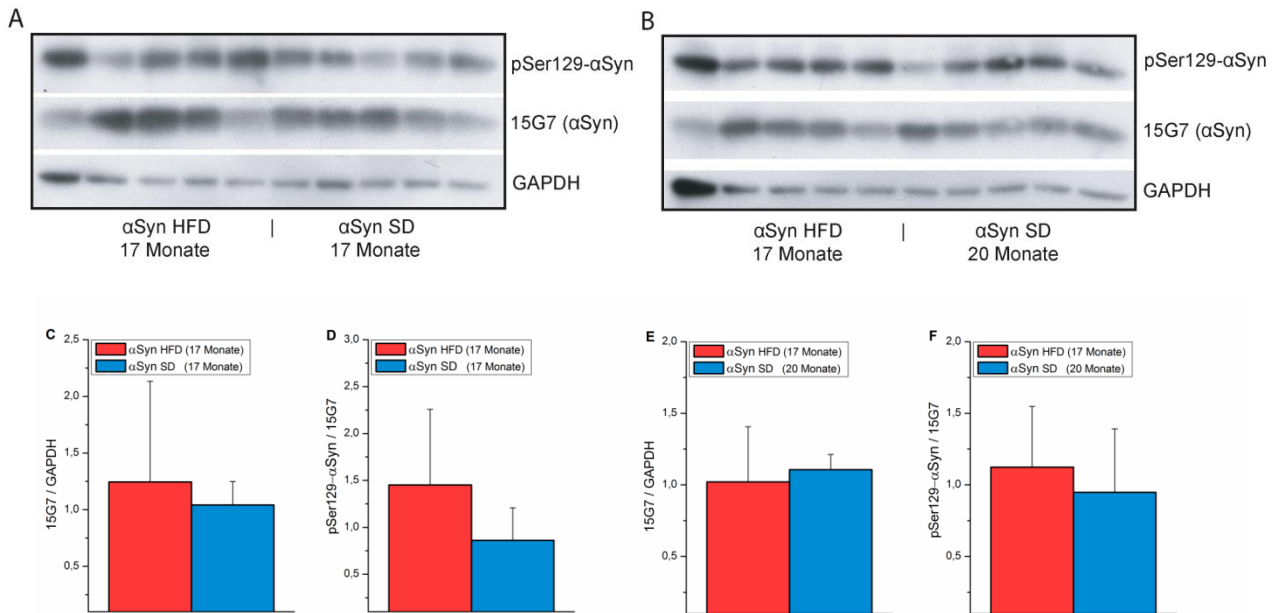


Abb. 3.12: Vorzeitig erhöhte pS129- α Syn Proteinmenge im Hirnstamm h[A30P] α Syn transgener Mäuse mit HFD bei unveränderter Menge an h[A30P] α Syn. Die Proteinmenge an pS129- α Syn, an humanem α Syn (15G7) sowie an GAPDH wurde von 17 Monate alten α Syn HFD und α Syn SD Mäusen (A) sowie von 17 Monate alten α Syn HFD und 20 Monate alten α Syn SD Mäusen (B) im Immunoblot detektiert. Quantifizieren der Bandenstärke zeigte eine erhöhte pSer129- α Syn Proteinmenge bei 17 Monate alten α Syn HFD Mäusen im Vergleich mit gleich alten α Syn SD Mäusen (D) und eine ähnlich starke Phosphorylierung im Vergleich mit 20 Monate alten α Syn SD Mäusen (F). Im Gegensatz dazu konnte kein Unterschied in der h[A30P] α Syn-Proteinmenge gefunden werden (C, E). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm StAbw.

Bei Überprüfen des pS129- α Syn Proteinlevels im Immunoblot (Abb. 3.12) zeigte sich ein ähnliches Bild, wie auch schon in der immunohistochemischen Färbung. Hierfür wurde die Proteinmenge an pSer129- α Syn sowie an humanem α Syn in Hirnstammlysaten von 17 Monate alten α Syn HFD ($n = 5$) und α Syn SD Mäusen ($n = 5$) (A) sowie von 17 Monate alten α Syn HFD und 20 Monate alten α Syn SD ($n = 5$) (B) detektiert. Quantifizieren der Bandenstärke ließ eine erhöhte S129- α Syn Phosphorylierung bei 17 Monate alten α Syn HFD im Vergleich mit ebenso alten α Syn SD Mäusen erkennen (D). Im Alter von 20 Monaten zeigte sich dann auch bei den α Syn SD Mäusen ein erhöhtes pSer129- α Syn Proteinlevel, vergleichbar mit dem der 17 Monate alten α Syn HFD Tiere (F). Wie schon bei der

immunohistochemischen Untersuchung konnte auch im Immunoblot kein Unterschied in der Proteinmenge an h[A30P] α Syn zwischen den transgenen Mäusen mit den unterschiedlichen Diäten gefunden werden (C, E).

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die HFD die neuropathologische S129- α Syn Phosphorylierung im Hirnstamm h[A30P] α Syn transgener Mäusen vorzeitig induziert wurde. Da jedoch keine Änderungen in Muster oder Ausprägung der Phosphorylierung nachgewiesen werden konnten, ist von einem rein zeitlichen, nicht aber einem qualitativen Einfluss der HFD auszugehen.

3.2.1.3 Vorzeitiges Auftreten Gallyas-Silber positiver Strukturen

Die Gallyas Silberfärbung wird allgemein verwendet, um pathologische, neurofibrilläre Ablagerungen sichtbar zu machen. Um einen möglichen Einfluss der HFD auf diese Ablagerungen im Hirnstamm zu untersuchen, wurden Sagittalschnitte von α Syn SD, α Syn HFD sowie von WT HFD Mäusen mit der Gallyas Silberfärbung behandelt.

Anhand Abb. 3.13 ist zu erkennen, dass bei den α Syn HFD Mäusen ($n = 5$) im Alter von 16 Monaten pathologische Ablagerungen bereits großflächig zu erkennen waren (C-D). Eine stärkere Vergrößerung machte sowohl Lewy-Neurit-artige Strukturen (C', D'), als auch Färbungen neuronaler Zellkörper (C'', D'') erkennbar. Im Gegensatz dazu konnten bei α Syn SD Mäusen im Alter von 16 Monaten ($n = 6$) keine Silber-positiven Ablagerungen gefunden werden (A-B). Diese zeigten sich erst im Alter von 20 Monaten ($n = 8$; E-F), wobei ebenfalls sowohl gefärbte neuronale Zellkörper (E'', F''), als auch Lewy-Neurit-artige Strukturen (E', F') erkennbar waren. Bei WT HFD Mäusen ($n = 4$) konnten selbst im Alter von 20 Monaten keine Silber-positiven Ablagerungen nachgewiesen werden (G-H). Densitometrische Auswertung der Silber-positiv gefärbten Flächen zeigte, dass bei den 16 Monate alten α Syn HFD Mäusen $2,1 \pm 1,2$ % des untersuchten Hirnstammgewebes gefärbt war und damit eine signifikant größere Fläche als bei den 16 Monate alten α Syn SD Mäusen ($0,26 \pm 0,31$ %) sowie den 20 Monate alten WT HFD Mäusen ($0,02 \pm 0,01$ %). Die gefärbte Fläche der α Syn SD Mäuse mit 20 Monaten ($1,24 \pm 0,31$ %) lag ebenfalls sowohl signifikant über der 16 Monate alten α Syn SD Mäuse, als auch über der 20 Monate alten WT HFD Mäuse. Zwischen 16 Monate alten α Syn HFD und 20 Monate alten α Syn SD Mäusen konnte dagegen kein signifikanter Unterschied gefunden werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die HFD die neuropathologischen Silber-positiven Ablagerungen im Hirnstamm h[A30P] α Syn transgener Mäusen vorzeitig induzierte. Da keine Unterschiede in Muster und Ausprägung der Färbung gefunden werden konnten, ist davon auszugehen, dass die HFD die Gallyas-Silber positive Neuropathologie nur zeitlich, nicht aber qualitativ beeinflusst.

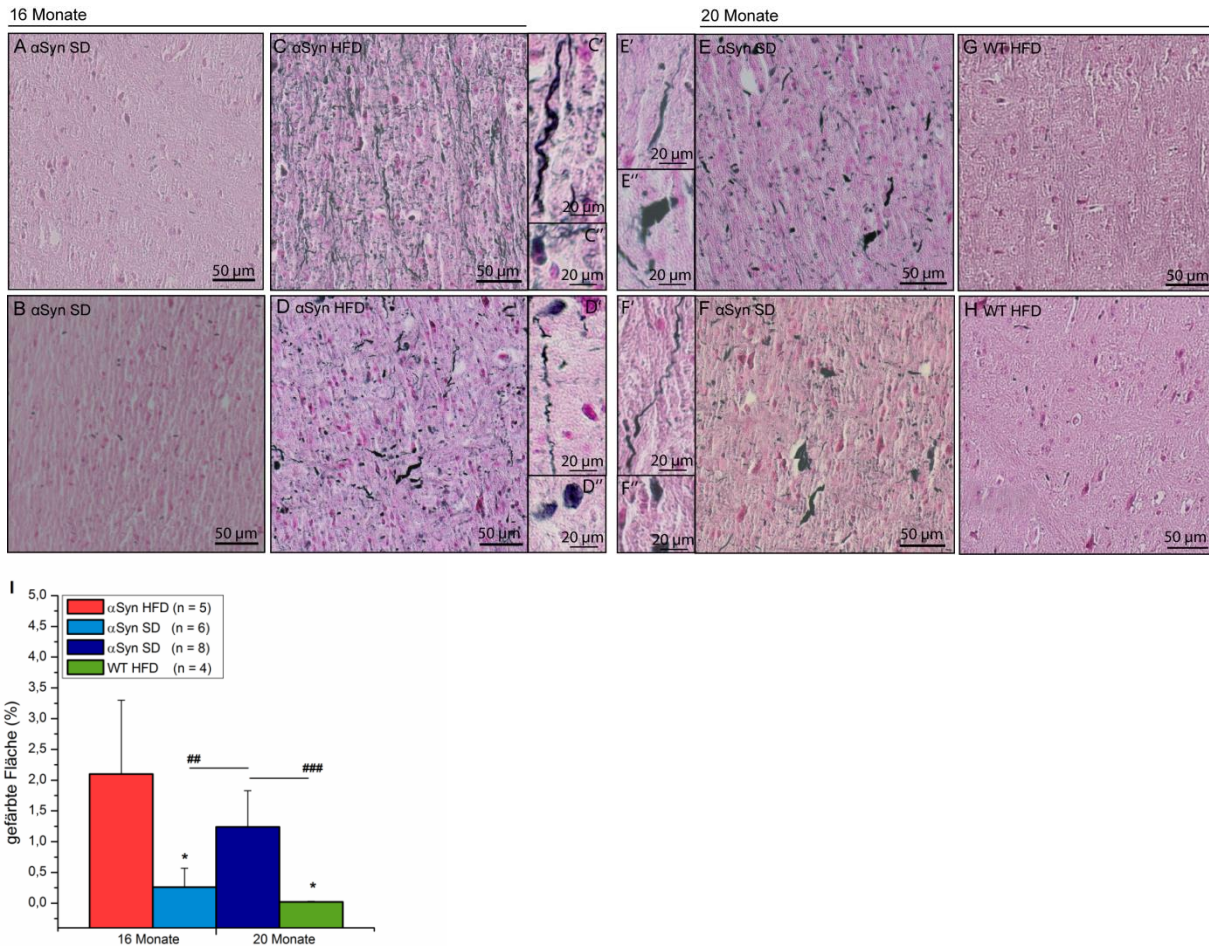


Abb. 3.13: Vorzeitiges Auftreten Gallyas-Silber positiver Strukturen im Hirnstamm h[A30P] α Syn transgener Mäuse mit HFD. Sagittalschnitte von α Syn SD, α Syn HFD und WT HFD Mäusen wurden immunohistochemisch mit der Gallyas Silberfärbung gefärbt. Im Alter von 16 Monaten konnten bei α Syn SD Mäusen (n = 6; A-B) keine pathologischen Silber-positiven Ablagerungen gefunden werden, während diese bei α Syn HFD Mäusen (n = 5; C-D) schon großflächig vorhanden waren. Ähnlich starke, Silber-positive Färbung zeigte sich bei α Syn SD Mäusen erst im Alter von 20 Monaten (n = 8; E-F), während bei WT HFD Mäusen (n = 4; G-H) weiterhin keine positiven Signale gefunden werden konnten. Densitometrische Auswertung (I) bestätigte das signifikant vorzeitige Auftreten der Silber-positiven Färbung bei α Syn HFD Mäusen im Vergleich mit α Syn SD Tieren. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm StAbw, signifikante Unterschiede wurden mittels beidseitigem T-Test berechnet (Vergleich zu α Syn HFD 16 Monate: *P < 0,05 / Vergleich zu α Syn SD 20 Monate: ##P < 0,01; ###P < 0,001).

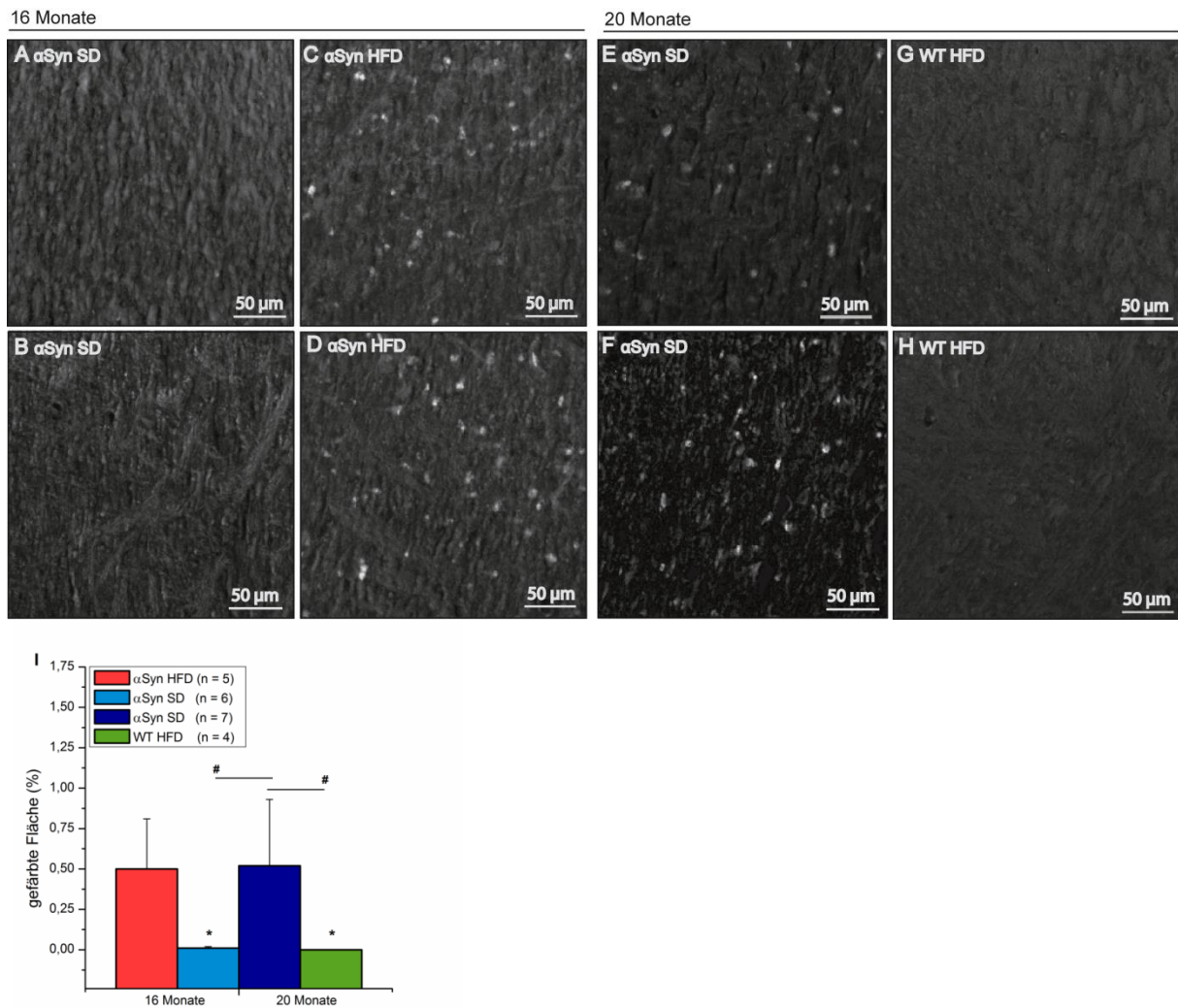


Abb. 3.14: Vorzeitiges Auftreten Thioflavin-S positiver, Amyloid-artiger Strukturen im Hirnstamm h[A30P] α Syn transgener Mäuse mit HFD. Sagittalschnitte von Gehirnen von α Syn SD, α Syn HFD sowie WT HFD Mäusen wurden immunohistochemisch mit Thioflavin-S gefärbt. Im Alter von 16 Monaten konnten bei α Syn SD Mäusen (n = 6; A-B) keine Thioflavin-S positiven, Amyloid-artigen Strukturen gefunden werden, während diese bei α Syn HFD Mäusen (n = 5; C-D) schon vielfach sichtbar waren. Im Alter von 20 Monaten zeigten auch α Syn SD Mäuse stark Thioflavin-S-positive Färbung (n = 7; E-F), während bei WT HFD Mäusen (n = 4; G-H) weiterhin keine positiven Signale gefunden werden konnten. Densitometrische Auswertung (I) bestätigte das signifikant verfrühte Auftreten der Thioflavin-S positiven Strukturen bei α Syn HFD Mäusen im Vergleich zu α Syn SD Tieren. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm StAbw, signifikante Unterschiede wurden mittels beidseitigem T-Test berechnet (Vergleich zu α Syn HFD 16 Monate: *P < 0,05 / Vergleich zu α Syn SD 20 Monate: #P < 0,05).

3.2.1.4 Vorzeitiges Auftreten Thioflavin-S positiver, amyloidartiger Strukturen

Mit Hilfe der Thioflavin-S Färbung kann die Amyloid-artige Qualität der Synukleinopathie untersucht werden. Um den Einfluss der HFD auf die amyloidäre Struktur im Hirnstamm zu untersuchen, wurden Sagittalschnitte von α Syn SD, α Syn HFD sowie WT HFD Mäusen mit Thioflavin-S gefärbt.

Wie anhand Abb. 3.14 zu erkennen, zeigten α Syn SD Mäusen ($n = 6$) im Alter von 16 Monaten noch keine Thioflavin-S positive Fluoreszenzfärbung (A-B). Im Gegensatz dazu konnten bei α Syn HFD Mäusen ($n = 5$) in diesem Alter bereits Thioflavin-S positive amyloidäre Strukturen nachgewiesen werden (C-D). Vergleichbare Amyloid-artige Strukturen zeigten sich erst bei 20 Monate alten α Syn SD Mäusen ($n = 7$; D-E), während bei WT HFD Mäusen ($n = 4$) weiterhin keine positiven Signale gefunden werden konnten (F-G). Densitometrische Auswertung der gefärbten Fläche bestätigte das signifikant verfrühte Auftreten dieser amyloidären Strukturen bei 16 Monate alten α Syn HFD Mäusen ($0,50 \pm 0,31\%$) im Vergleich mit ebenso alten α Syn SD Mäusen ($0,01 \pm 0,01\%$) sowie mit 20 Monate alten WT HFD Mäusen ($0 \pm 0\%$). Bei 20 Monate alten α Syn SD Mäusen ($0,52 \pm 0,41\%$) war die positiv gefärbte Fläche ebenfalls signifikant größer als bei 16 Monate alten α Syn SD Mäusen sowie bei 20 Monate alten WT HFD Mäusen. Im Gegensatz dazu konnte kein Unterschied zwischen den 16 Monate alten α Syn HFD und den 20 Monate alten α Syn SD Mäusen gefunden werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die HFD die Bildung von mit Thioflavin-S nachweisbaren, amyloid-artigen Strukturen im Hirnstamm h[A30P] α Syn transgener Mäusen verfrüht induziert werden konnte. Da keine Unterschiede in Art und Verbreitung des Färbemusters im Vergleich mit älteren Tieren mit SD gefunden werden konnte, ist von einer rein zeitlich verfrühten Induktion, nicht aber von einer qualitativen Änderung auszugehen.

3.2.2 Vorzeitige Astroglie im Hirnstamm nach Fütterung der Hochfett Diät

Das Protein GFAP (Glial fibrillary acidic protein) bildet den Hauptbestandteil der Intermediärfilamente im Zytoplasma von Gliazellen und wird als ein Marker für Astroglie eingesetzt. Verschiedene Studien zeigen, dass eine HFD bei Nagern mit Astrozyten-getriebener Inflammation und Hypertrophie in Verbindung steht (Choi et al., 2005; Dunbar et al., 2005; Sriram et al., 2002, White et al., 2009). Von Interesse war, ob die HFD einen Einfluss auf die Astroglie im Hirnstamm h[A30P] α Syn transgener Mäuse ausübt. Hierfür

wurden Sagittalschnitte von α Syn SD, α Syn HFD und WT HFD mit einem GFAP spezifischen Antikörper (ab7260, Abcam) immunohistochemisch gefärbt.

Wie anhand Abb. 3.15 zu erkennen, konnten im Alter von 16 Monaten bei α Syn SD Mäusen ($n = 5$; A-B) nur vereinzelte und schwache GFAP-positive Signale nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten die α Syn HFD Mäuse ($n = 5$) im Alter von 16 Monaten bereits eine starke Astrogliose (C-D). Eine ähnlich starke Astrogliose konnte bei α Syn SD Mäusen ($n = 8$) erst im Alter von 20 Monaten nachgewiesen werden (E-F), während die WT HFD Mäuse ($n = 5$) auch in diesem Alter nur vereinzelte GFAP-positive Signale zeigten (G-H). Densitometrische Auswertung der gefärbten Fläche bestätigte die verfrühte GFAP-Induktion bei den α Syn HFD Mäusen. Im Alter von 16 Monaten zeigten diese mit $6,99 \pm 2,52\%$ eine signifikant größere positiv gefärbte Fläche als gleich alte α Syn SD Mäuse ($1,34 \pm 1,23\%$) sowie 20 Monate alte WT HFD Mäuse ($0,62 \pm 0,42\%$). Im Alter von 20 Monaten war die positiv gefärbte Fläche bei α Syn SD Mäusen ebenfalls stark erhöht ($4,79 \pm 1,98\%$) und lag signifikant über der 16 Monate alter α Syn SD Mäuse sowie 20 Monate alter WT HFD Mäuse. Zwischen den 20 Monate alten α Syn SD und den 16 Monate alten α Syn HFD Mäusen konnte dagegen kein signifikanter Unterschied gefunden werden.

Analyse des GFAP-Proteinlevels im Immunoblot (Abb. 3.16) zeigte ein ähnliches Bild wie auch schon die immunohistochemische Färbung. Hierfür wurde Hirnstammlysat von 17 Monate alten α Syn HFD ($n = 6$) und α Syn SD Mäusen ($n = 6$) sowie von 20 Monate alten α Syn SD ($n = 6$) und WT HFD Mäusen ($n = 5$) im Immunoblot detektiert. Dabei war sowohl bei 17 Monate alten α Syn HFD, als auch bei 20 Monate alten α Syn SD Mäusen ein stark erhöhtes GFAP-Signal erkennbar, während bei 17 Monate alten α Syn SD sowie 20 Monate alten WT HFD Mäusen nur schwache Signale detektiert werden konnten. Quantifizieren der Bandenstärke zeigte eine signifikante Erhöhung des GFAP-Proteinlevels bei 17 Monate alten α Syn HFD Mäusen im Vergleich mit ebenso alten α Syn SD Tieren sowie mit 20 Monate alten WT HFD Mäusen. Im Alter von 20 Monaten war das GFAP-Proteinlevel bei α Syn SD Mäusen ebenfalls sowohl im Vergleich mit gleich alten WT HFD Mäusen, als auch im Vergleich mit 17 Monate alten α Syn SD Mäusen signifikant erhöht. Zwischen den 20 Monate alten α Syn SD Mäusen und den 17 Monate alten α Syn HFD Tieren konnte dagegen auch im Immunoblot kein Unterschied in der GFAP-Proteinmenge gefunden werden.

Diese Ergebnisse zeigen eine signifikant verfrühte, massive Astrogliose im Hirnstamm h[A30P] α Syn transgener Mäuse mit HFD. Da jedoch keine Unterschiede in der Ausprägung der Astrogliose im Vergleich mit älteren α Syn SD Mäusen gefunden werden konnten, ist von einer rein zeitlich verfrühten und nicht qualitativ veränderten GFAP-Induktion auszugehen.

Ebenso scheint die HFD allein zu keiner Astroglieose zu führen, da bei WT HFD Mäusen auch im Alter von 20 Monaten keine signifikant erhöhte GFAP-Menge nachgewiesen werden konnte.

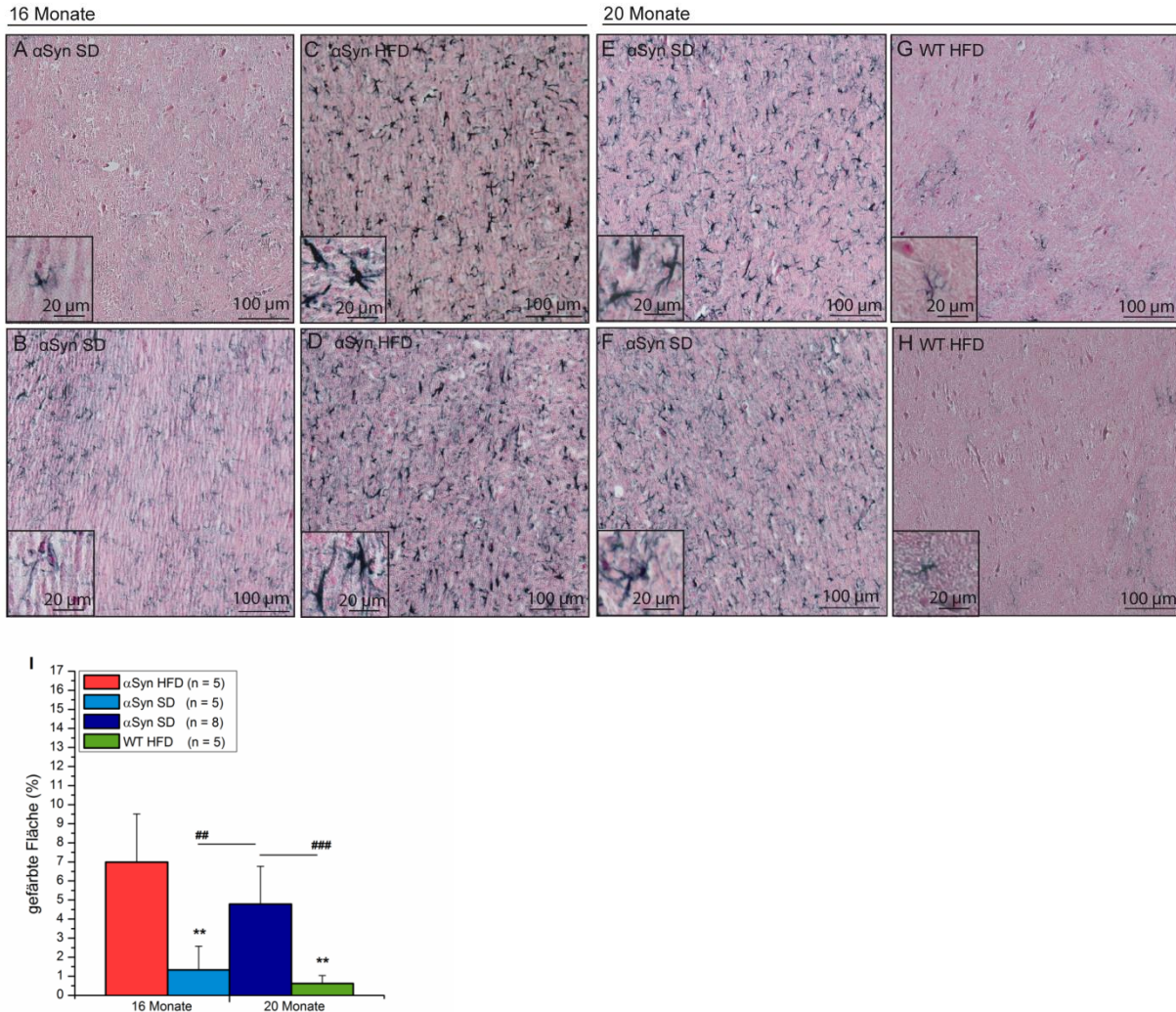


Abb. 3.15: Vorzeitige Astroglieose im Hirnstamm h[A30P]αSyn transgener Mäuse mit HFD. Sagittalschnitte von Gehirnen von αSyn SD, αSyn HFD sowie WT HFD Mäusen wurden immunohistochemisch mit einem GFAP-spezifischen Antikörper gefärbt. Im Alter von 16 Monaten konnten bei αSyn SD Mäusen (n = 5; A-B) nur schwache und vereinzelte GFAP-positive Signale gefunden werden, während bei αSyn HFD Mäusen (n = 5; C-D) bereits massive Astroglieose erkennbar war. Eine solche Astroglieose wurde bei αSyn SD Mäusen erst im Alter von 20 Monaten gefunden (n = 8; E-F), während bei WT HFD Mäusen (n = 5; G-H) auch in diesem Alter nur äußerst vereinzelte positive Signale nachzuweisen waren. Densitometrische Auswertung (I) bestätigte die signifikant verfrühte Induktion der Astroglieose bei αSyn HFD Mäusen im Vergleich zu αSyn SD Tieren. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte ± StAbw, signifikante Unterschiede wurden mittels beidseitigem T-Test berechnet (Vergleich zu αSyn HFD 16 Monate: **P < 0,01 / Vergleich zu αSyn SD 20 Monate: ##P < 0,01; ###P < 0,001).

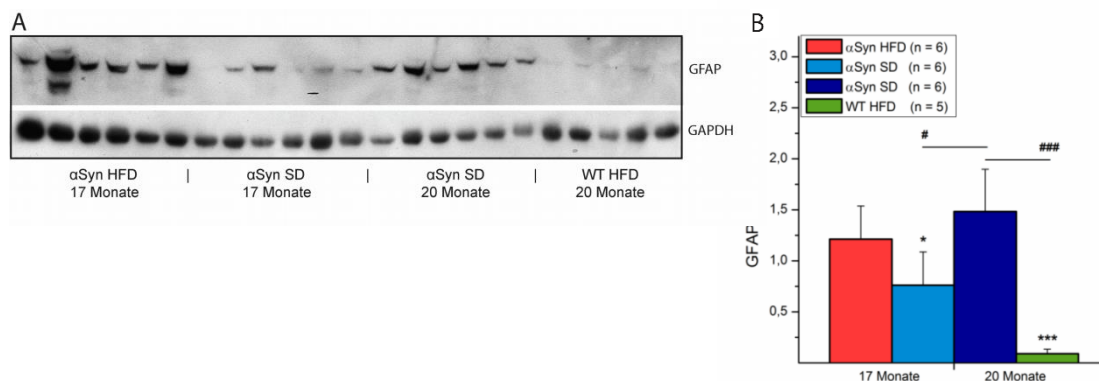


Abb. 3.16: Vorzeitig erhöhte GFAP-Proteinmenge im Hirnstamm h[A30P]αSyn transgener Mäuse mit HFD. Die Proteinmenge an GFAP sowie an GAPDH wurde von 17 Monate alten αSyn HFD und αSyn SD sowie von 20 Monate alten αSyn SD und WT HFD Mäusen im Immunoblot detektiert (A). Quantifizieren der Bandenstärke bestätigte eine signifikant verfrühte Erhöhung der GFAP-Proteinmenge bei 17 Monate alten αSyn HFD Mäusen, vergleichbar mit der 20 Monate alter αSyn SD Mäuse (B). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte ± StAbw, signifikante Unterschiede wurden mittels beidseitigem T-Test berechnet (Vergleich zu αSyn HFD 17 Monate: *P < 0,05; ***P < 0,001 / Vergleich zu αSyn SD 20 Monate: #P < 0,05; ###P < 0,001).

3.2.3 Kein Einfluss der Hochfett Diät auf Synukleinopathie und Astrogliose in anderen untersuchten Hirnregionen

Neben dem Hirnstamm sind auch andere Hirnregionen von der Synukleinopathie betroffen (Braak et al., 2002; Beach et al., 2009). Von Interesse war deshalb, ob die HFD die Entwicklung der Synukleinopathie sowie der Astrogliose auch in anderen Regionen des Gehirns beeinflusst. Hierfür wurden Sagittalschnitte von αSyn SD, αSyn HFD sowie WT HFD Mäusen ab einem Alter von 4 Monaten mit den unterschiedlichen Färbungen behandelt und anschließend Hirnstamm, Cerebellum, Cortex und Hippocampus untersucht.

Wie anhand Tab. 3.8 zu erkennen, konnte bei h[A30P]αSyn transgenen Mäusen bereits im Alter von 4 Monaten humanes αSyn in allen untersuchten Hirnregionen mit dem spezifischen 15G7 Antikörper nachgewiesen werden. Unterschiede zwischen transgenen Mäusen mit SD und solchen mit HFD konnten jedoch nicht gefunden werden. Im Gegensatz dazu wurde bei WT HFD Mäusen bis zum Alter von 20 Monaten kein 15G7- positives Signal detektiert.

S129 phosphoryliertes αSyn konnte in Cortex und Hippocampus sowohl bei αSyn SD, als auch bei αSyn HFD Mäusen ebenfalls ab dem Alter von 4 Monaten großflächig nachgewiesen werden. In der weißen Substanz des Cerebellums fanden sich zudem vereinzelt positive Signale. Unterschiede zwischen den Gruppen konnten dabei nicht nachgewiesen werden und zeigten sich auch nicht im Verlauf des Alterns. Im Gegensatz dazu konnte bei WT HFD

Mäusen in den untersuchten Hirnregionen weder bei jungen noch bei alten Tieren am S129-phosphoryliertes α Syn nachgewiesen werden.

Gallyas-Silber positive, neurofibrilläre Ablagerungen konnten ausschließlich im Hirnstamm α Syn transgener Mäuse ab einem Alter von 16 Monaten (α Syn HFD) beziehungsweise 20 Monaten (α Syn SD) detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurden in Cortex, Cerebellum und Hippocampus zu keinem Zeitpunkt Silber-positive Strukturen gefunden. Bei WT HFD Mäusen konnten selbst bei alten Tieren in keiner der untersuchten Hirnregionen Silber-positive Signale nachgewiesen werden.

	humanes α Syn (15G7)			pS129- α Syn		
	h[A30P] α Syn SD	h[A30P] α Syn HFD	WT HFD	h[A30P] α Syn SD	h[A30P] α Syn HFD	WT HFD
Cortex	4 Monate	4 Monate	--	4 Monate	4 Monate	--
Cerebellum	4 Monate	4 Monate	--	--	--	--
Hippocampus	4 Monate	4 Monate	--	4 Monate	4 Monate	--
Hirnstamm	4 Monate	4 Monate	--	16 Monate	20 Monate	--

	Gallyas-Silber Färbung			Thioflavin-S Färbung		
	h[A30P] α Syn SD	h[A30P] α Syn HFD	WT HFD	h[A30P] α Syn SD	h[A30P] α Syn HFD	WT HFD
Cortex	--	--	--	--	--	--
Cerebellum	--	--	--	--	--	--
Hippocampus	--	--	--	--	--	--
Hirnstamm	16 Monate	20 Monate	--	16 Monate	20 Monate	--

	Astrogliose (GFAP)		
	h[A30P] α Syn SD	h[A30P] α Syn HFD	WT HFD
Cortex	--	--	--
Cerebellum	4 Monate	4 Monate	4 Monate
Hippocampus	4 Monate	4 Monate	4 Monate
Hirnstamm	16 Monate	20 Monate	--

Tab. 3.8: Kein Einfluss der HFD auf die Synkleinopathie und Astroglieose in Cortex, Cerebellum und Hippocampus. Sagittalschnitte von α Syn SD, α Syn HFD und WT HFD Mäusen wurden ab einem Alter von 4 Monaten jeweils mit den unterschiedlichen Färbungen behandelt. Nur im Hirnstamm, nicht aber in Cortex, Cerebellum und Hippocampus, konnten Unterschiede zwischen α Syn SD und α Syn HFD gefunden werden. Angegeben ist jeweils das Alter des ersten Auftretens einer positiven Färbung. Ist kein Alter angegeben, so konnte zu keinem Zeitpunkt eine positive Färbung detektiert werden.

Die mit der Thioflavin-S Färbung untersuchte amyloid-artige Struktur der Synukleinopathie konnte ebenfalls nur im Hirnstamm von α Syn HFD (16 Monate) sowie α Syn SD Mäusen (20 Monate) nachgewiesen werden. In den Cortex, Cerebellum und Hippocampus sowie bei WT HFD Mäusen konnten dagegen keine Thioflavin-S positiven Signale detektiert werden.

Mit Hilfe des Astroglieosemarkers GFAP konnten bereits im Alter von 4 Monaten positive Signale in Cerebellum und Hippocampus bei α Syn SD, α Syn HFD sowie WT HFD Mäusen gefunden werden. Unterschiede in der Quantität und Qualität der Färbung wurden dabei nicht festgestellt und zeigten sich auch nicht mit steigendem Alter der Mäuse. Im Gegensatz dazu konnten im Cortex zu keinem Zeitpunkt GFAP-positive Signale gefunden werden. Einzig im Hirnstamm zeigte sich ein Unterschied zwischen α Syn HFD Mäusen, bei denen ab einem Alter von 16 Monaten stark GFAP-positive Signale detektiert werden konnten, und α Syn SD Mäusen, bei denen diese erst im Alter von 20 Monaten gefunden wurden. Bei WT HFD Mäusen zeigte sich dagegen auch im hohen Alter keine Astroglieose im Hirnstamm.

3.2.4 Verminderte Akt-Phosphorylierung im Hirnstamm nach Fütterung der Hochfett Diät

Der PI3K-Akt Signalweg ist hochkonserviert und wird unter anderem durch neurotrophe Faktoren sowie Insulin beeinflusst (Hemmings und Restuccia, 2012). Akt besitzt über 100 bekannte Substrate und hat diverse Effekte auf die zelluläre Funktion und das Zellwachstum (Manning und Cantley, 2007). Für eine maximale Akt-Aktivierung ist eine Phosphorylierung sowohl am T308, als auch am S473 notwendig (Alessi et al., 1997). Untersucht werden sollte, ob die HFD die Phosphorylierung von Akt im Hirnstamm h[A30P] α Syn transgener Mäuse beeinflusst. Hierfür wurde im Immunoblot mit spezifischen Antikörpern die Proteinmenge an pT308-Akt (#2965, Cell Signaling), pS473-Akt (#4060, Cell Signaling) und Akt (#9272, Cell Signaling) im Hirnstamm 17 Monate alter α Syn SD (n = 6) und α Syn HFD Mäuse (n = 6) sowie 20 Monate alter α Syn SD (n = 6) und WT HFD Mäuse (n = 5) detektiert.

Zuerst wurde die Phosphorylierung von Akt am T308 untersucht (Abb. 3.17 A) und die Bandenstärke quantifiziert (C). Dabei war eine nur schwache T308-Akt-Phosphorylierung bei 17 Monate alten α Syn HFD und 20 Monate alten α Syn SD Mäusen erkennbar, während die Phosphorylierung bei 17 Monate alten α Syn SD und 20 Monate alten WT HFD Mäusen deutlich stärker war. Quantifizieren der Bandenstärke zeigte, dass die T308-Akt-Phosphorylierung der 17 Monate alten α Syn HFD Mäusen sowohl im Vergleich mit gleich alten α Syn SD Mäusen, als auch im Vergleich mit 20 Monate alten WT HFD Tieren

signifikant vermindert war. Ebenso lag auch die T308-Akt-Phosphorylierung der 20 Monate alten α Syn SD Mäuse signifikant unter der 17 Monate alten α Syn SD Mäuse. Ein Unterschied zwischen den 17 Monate alten α Syn HFD und den 20 Monate alten α Syn SD Mäusen konnte dagegen nicht gefunden werden.

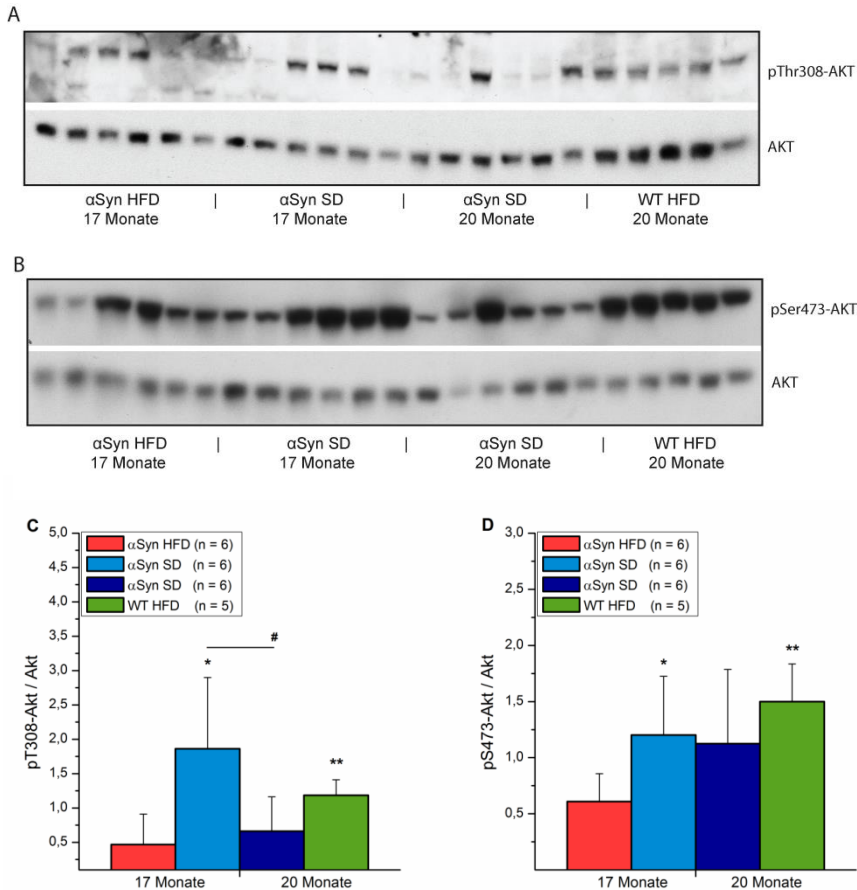


Abb. 3.17: Verminderte T308- und S473-Akt-Phosphorylierung im Hirnstamm h[A30P] α Syn transgener Mäuse mit HFD. Die Proteinmenge an pT308-Akt (A) sowie pSer473-Akt (B) und jeweils als Kontrolle von Akt wurde im Immunoblot bei 17 Monate alten α Syn HFD und α Syn SD sowie 20 Monate alten α Syn SD und WT HFD bestimmt. Quantifizieren der Bandenstärke bestätigte eine signifikant verminderte pT308-Akt (C) sowie pS473-Akt Menge bei den 17 Monate alten α Syn HFD Mäusen. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm StAbw, signifikante Unterschiede wurden mittels beidseitigem T-Test berechnet (Vergleich zu α Syn HFD 17 Monate: *P < 0,05; **P < 0,01 / Vergleich zu α Syn SD 17 Monate: #P < 0,05).

Anschließend wurde die Phosphorylierung von Akt am S473 untersucht (Abb. 3.17 B) und die Bandenstärke quantifiziert (D). Dabei zeigte sich ebenfalls eine signifikant verminderte Phosphorylierung bei den α Syn HFD Mäusen im Alter von 17 Monaten im Vergleich mit gleich alten α Syn SD Tieren sowie im Vergleich mit 20 Monate alten WT HFD Mäusen. Allerdings konnte keine signifikant verminderte S473-Akt-Phosphorylierung bei 20 Monate alten α Syn SD Mäusen festgestellt werden, was aber möglicherweise mit der großen Varianz

zwischen den einzelnen Mäusen zu erklären ist. Die stärkste Phosphorylierung war zudem bei 20 Monate alten WT Mäusen zu erkennen.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die T308-Akt-Phosphorylierung bei h[A30P] α Syn transgenen Mäusen in einem hohen Alter vermindert wird und dies bei Fütterung einer HFD verfrüht geschieht. Zudem führt die HFD bei h[A30P] α Syn Mäusen mit 17 Monaten zu einer verminderten S473-Akt-Phosphorylierung, was jedoch bei 20 Monate alten und ebenfalls symptomatischen α Syn SD Mäusen nicht gezeigt werden konnte.

3.2.5 Kein Einfluss der Hochfett Diät auf GRK 5 im Hirnstamm

In vitro konnte nachgewiesen werden, dass die Serin / Threonin Kinase GRK 5 α Syn phosphorylieren kann (Pronin et al., 2000). Untersucht werden sollte, ob eine veränderte Menge an GRK 5 im Hirnstamm des verwendeten h[A30P] α Syn Mausmodells gefunden werden kann und ob die HFD das Proteinniveau beeinflusst.

Hierfür wurden Sagittalschnitte von 16 Monate alten α Syn SD (n = 5) und α Syn HFD (n = 5) sowie 20 Monate alten α Syn SD (n = 8) und WT HFD Mäusen (n = 5) mit einem Antikörper gegen GRK 5 (ab64943, Abcam) immunohistochemisch gefärbt. Wie anhand Abb. 3.18 zu erkennen, konnten im Alter von 16 Monaten sowohl bei α Syn SD (A-B), als auch bei α Syn HFD Mäusen (C-D) nur vereinzelte schwache GRK 5-positive Signale nachgewiesen werden. Im Alter von 20 Monaten zeigten die α Syn SD Mäuse jedoch vielfach positive GRK 5 Färbungen (E-F), während WT HFD Mäuse (G-H) auch in diesem Alter nur vereinzelte GRK 5 positive Signale aufwiesen. Densitometrische Auswertung der gefärbten Schnitte zeigte eine signifikant erhöhte gefärbte Fläche bei 20 Monate alten α Syn SD Mäusen, sowohl im Vergleich mit 16 Monate alten α Syn HFD sowie α Syn SD Mäusen, als auch im Vergleich mit 20 Monate alten WT HFD Mäusen. Zwischen den anderen Gruppen konnten dagegen keine Unterschiede nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurden die Proteinmengen von GRK 5 sowie als Ladekontrolle von GAPDH im Hirnstamm 17 Monate alter α Syn SD (n = 6) und α Syn HFD Mäuse (n = 6) sowie 20 Monate alter α Syn SD (n = 6) und WT HFD Mäuse (n = 5) im Immunoblot detektiert und quantifiziert (Abb. 3.19 A / B). Auch hier zeigte sich eine signifikant erhöhte GRK 5 Proteinmenge bei den α Syn SD Mäusen im Alter von 20 Monaten, sowohl im Vergleich mit 17 Monate alten α Syn HFD und α Syn SD Mäusen, als auch im Vergleich mit 20 Monate alten WT HFD Mäusen. Zwischen den anderen Gruppen konnten dagegen auch im Immunoblot keine Unterschiede gefunden werden.

Ergebnisse

Diese Ergebnisse zeigen, dass im untersuchten h[A30P] α Syn Mausmodell die GRK 5 Proteinmenge im hohen Alter signifikant ansteigt. Da bei WT HFD Mäusen keine altersabhängige Erhöhung der Proteinmenge gefunden werden konnte, scheint es sich um einen Genotyp-spezifischen Effekt zu handeln, zudem konnte kein Einfluss der HFD festgestellt werden.

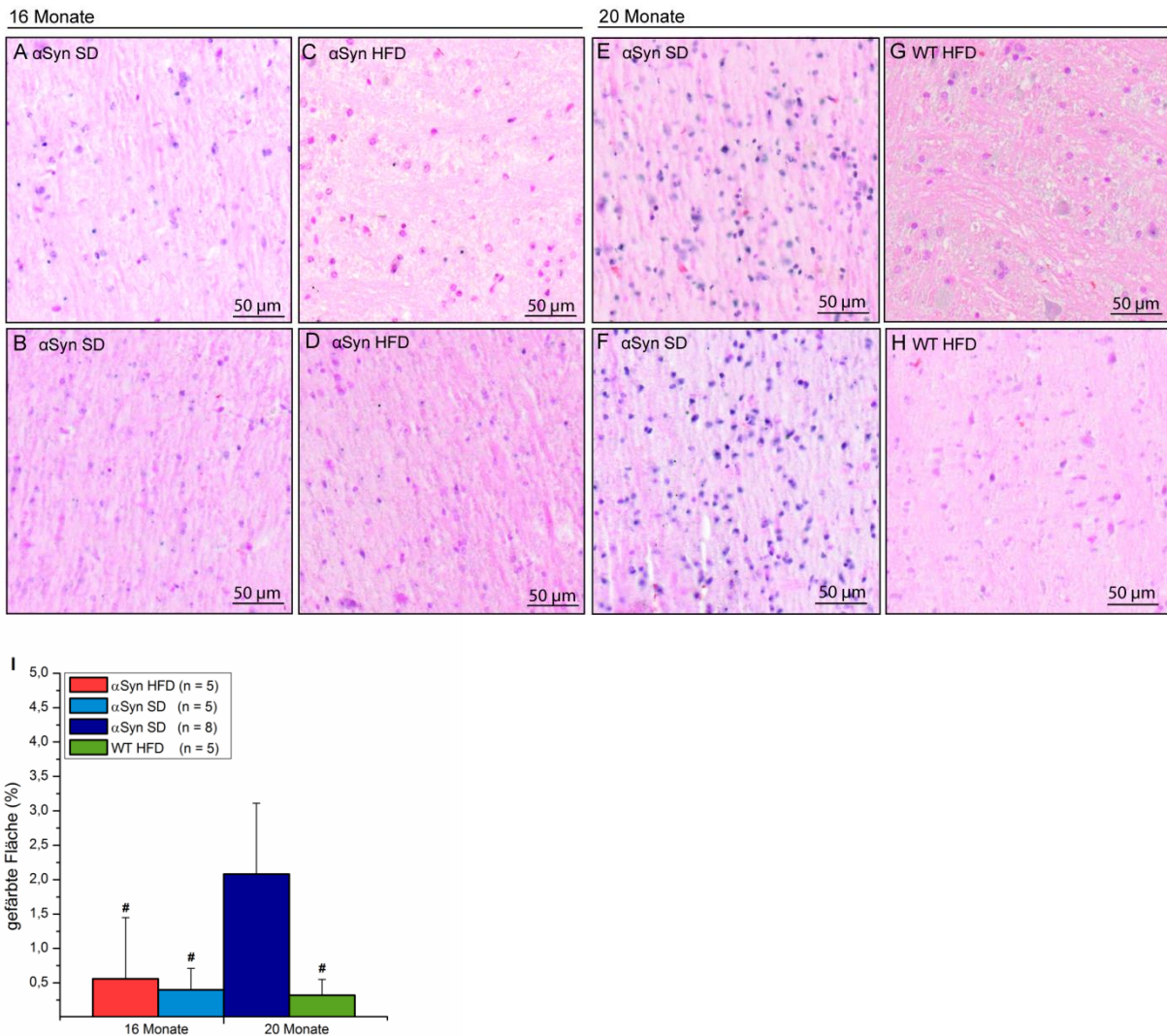


Abb. 3.18: Erhöhte GRK 5 Proteinmenge im Hirnstamm 20 Monate alter h[A30P] α Syn transgener Mäuse mit SD. Sagittalschnitte 16 Monate alter α Syn SD (n = 5) und α Syn HFD (n = 5) sowie 20 Monate alter α Syn SD (n = 8) und WT HFD Mäuse (n = 5) wurden immunohistochemisch mit einem GRK 5 spezifischen Antikörper gefärbt. Im Alter 16 Monaten konnten sowohl bei α Syn SD (A-B), als auch bei α Syn HFD Mäusen (C-D) nur vereinzelte GRK 5-positive Färbungen gefunden werden. 20 Monate alte α Syn SD Mäuse zeigten dagegen vielfach GRK 5-positive Signale (E-F), während bei 20 Monate alten WT HFD Mäusen (G-H) ebenfalls nur vereinzelt positive Signale nachzuweisen waren. Densitometrische Auswertung (I) bestätigte die signifikant erhöhte gefärbte Fläche bei 20 Monate alten α Syn SD Mäusen. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm StAbw, signifikante Unterschiede wurden mittels beidseitigem T-Test berechnet (Vergleich zu α Syn SD 20 Monate: #P < 0,05).

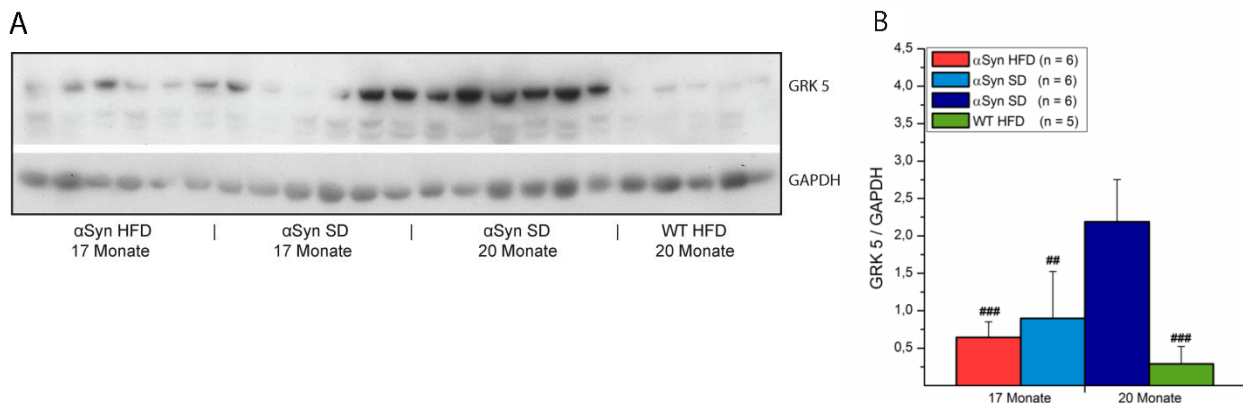


Abb. 3.19: Erhöhte GRK 5 Proteinmenge im Hirnstamm 20 Monate alter h[A30P]αSyn transgener Mäuse mit SD im Western Blot. Die Proteinmengen an GRK 5 sowie als Ladekontrolle an GAPDH 17 Monate alter αSyn HFD (n = 6) und αSyn SD Mäuse (n = 6) sowie 20 Monate alter αSyn SD (n = 6) und WT HFD Mäuse(n = 5) wurden im Immunoblot bestimmt (A). Quantifizieren der Bandenstärke bestätigte eine signifikant erhöhte GRK 5 Menge bei 20 Monate alten αSyn SD Mäusen (B). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte ± StAbw, signifikante Unterschiede wurden mittels beidseitigem T-Test berechnet (Vergleich zu αSyn SD 20 Monate: ##P < 0.01; ###P < 0.001).

3.2.6 Zusammenfassung des Einflusses der Hochfett Diät auf histologische und proteinbiochemische Parameter

Mit Hilfe der histologischen und proteinbiochemischen Untersuchungen konnte kein Einfluss der HFD auf das h[A30P]αSyn Proteinlevel im Hirnstamm der transgenen Mäuse gefunden werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine verfrühte Phosphorylierung von αSyn am S129, dem neuropathologischen Kennzeichen der PK. Ebenso konnten verfrüht Gallyas-Silber positive Ablagerungen sowie Thioflavin-S positive amyloidäre Strukturen im Hirnstamm h[A30P]αSyn transgener Mäusen nach Fütterung der HFD nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich ebenfalls vorzeitig eine starke Astroglieose im Hirnstamm h[A30P]αSyn transgener Mäuse mit HFD. Im Gegensatz dazu konnte in anderen untersuchten Hirnregionen kein Einfluss der HFD auf die genannten Parameter gefunden werden.

Weiterhin zeigten sich im Hirnstamm h[A30P]αSyn transgener Mäuse nach Fütterung der HFD ebenfalls vorzeitig verminderte Akt Phosphorylierungen am T308 sowie am S473. Ein Einfluss der HFD auf das GRK 5 Proteinlevel konnte dagegen nicht gefunden werden, allerdings konnte eine Erhöhung der GRK 5 Proteinmenge im hohen Alter bei h[A30P]αSyn transgenen Mäusen, unabhängig von der Diät, gezeigt werden.

4 Diskussion

4.1 Die Hochfett Diät beeinflusst *in vivo* Parameter bei h[A30P] α Syn transgenen Mäusen

Die untersuchten h[A30P] α Syn transgenen Mäuse bilden im Alter langsam auftretende motorische und kognitive Defizite aus, die mit der Entwicklung der Synukleinopathie des Gehirns korrelieren. Die motorischen Beeinträchtigungen sind dabei wahrscheinlich überwiegend auf die Degeneration der Motoneuronen zurückzuführen, wobei die Synukleinopathie des Hirnstamms eine entscheidende Rolle spielt. Für die kognitiven Defizite wird vor allem die Synukleinopathie der Amygdala und des Hippocampus verantwortlich gemacht (Neumann et al., 2002; Freichel et al., 2007). Defizite dieser Art können ebenso auch bei anderen Mausmodellen, die α Syn unter dem Thy1-Promotor exprimieren, beobachtet werden (van der Putten et al., 2000; Fleming und Chesselet, 2006; Kahle, 2008).

Unklar war bislang die Wirkung einer HFD auf die motorischen und kognitiven Funktionen eines Mausmodells für Synukleinopathie. Andere Nagermodelle zeigen, dass Übergewicht und Diabetes zu motorischen und kognitiven Beeinträchtigungen führen (Winocur et al., 2005; Granholm et al., 2008; Moroz et al., 2008) und die mit Hilfe einer HFD induzierten Stoffwechselstörungen Veränderungen in der Kognition bewirken können (Kumari et al., 2000; Craft, 2005; Razay et al., 2007). Auch beim Menschen zeigt sich ein möglicher Zusammenhang zwischen T2DM und Beeinträchtigungen in kognitiven Funktionen (Gregg et al., 2000; Knopman et al., 2001; Arvanitakis et al., 2007) und Patienten mit T2DM weisen ein erhöhtes Risiko für Demenz auf (MacKnight et al., 2002; Allen et al., 2004; Awad et al., 2004). T2DM kann außerdem die motorischen Symptome der PK verstärken (Arvanitakis et al., 2004b; Papapetropoulos et al., 2004; Bosco et al., 2012; Cereda et al., 2012). Diese motorischen Defizite sind aber vor allem auf den Einfluss von Übergewicht und Diabetes auf die dopaminergen Neuronen der SN zurückzuführen, weshalb über die Wirkung einer HFD auf den spezifischen Phänotyp der h[A30P] α Syn transgenen Mäuse bisher nur spekuliert werden konnte. Jedoch erscheint ein Einfluss der HFD und damit in Verbindung stehender metabolischer Störungen auf Prozesse des Gehirns wahrscheinlich, weshalb auch Effekte auf die Entwicklung der Synukleinopathie sowie der damit korrelierenden Defizite des Mausmodells vermutet werden konnte.

4.1.1 Die Hochfett Diät induziert ein erhöhtes Körpergewicht und einen gestörten Glukosemetabolismus

Bei Mäusen kann mit Hilfe einer HFD Übergewicht induziert werden (Bourgeois et al., 1983; Takahashi et al., 1999), wobei die dabei entstehenden metabolischen Veränderungen vergleichbar mit denen beim Menschen sind (Woods et al., 2003). Bekannt ist zudem, dass Übergewicht zu einer erhöhten Menge an FFA im Plasma führen (Opie und Walfish, 1963) und eine chronische niedrigstufige Inflammation induzieren kann (Wellen und Hotamisligil, 2005). Hieraus können eine gestörte Glukosetoleranz sowie Insulinresistenz entstehen (Boden et al., 1994; Qatanani und Lazar, 2007). Eine gestörte Glukosetoleranz kann mit Hilfe eines GTTs überprüft werden, der Auskunft über die Effizienz eines Organismus einen Glukoseüberschuss aus dem Plasma in die Zellen aufzunehmen gibt und als wichtigstes Kriterium bei der Diagnose eines T2DM gilt (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003).

Bislang unklar war die Wirkung einer HFD auf den Metabolismus bei Mausmodellen für Synukleinopathien. Für [A53T] α Syn transgene Mäuse konnte beispielsweise eine Resistenz gegenüber Diät induziertem Übergewicht gezeigt werden (Griffioen et al., 2013; Rothman et al., 2014). Im Gegensatz dazu wurde im hier durchgeführten Versuch durch Fütterung einer HFD sowohl bei h[A30P] α Syn transgenen, als auch bei WT Mäusen, ein erhöhtes Körpergewicht induziert (Abb. 3.2). Dies war bereits wenige Wochen nach Beginn der Fütterung messbar und blieb während der gesamten Versuchsdauer bestehen. Ebenso konnte sowohl bei WT, als auch bei h[A30P] α Syn transgenen Mäusen durch Fütterung der HFD eine signifikant schlechtere Glukosetoleranz im Vergleich mit den mit SD gefütterten Tieren induziert werden (Abb. 3.3). So zeigten alle Mäuse mit HFD einen signifikant erhöhten Blutglukosespiegel nach Glukoseinjektion, im Alter von 43 Wochen waren zusätzlich auch die Nüchtern-Blutglukosewerte erhöht. Zwischen mit HFD gefütterten transgenen und WT Mäusen konnten dagegen keine Unterschiede gemessen werden, weshalb das Transgen die Wirkung der HFD weder auf das Körpergewicht noch auf die Glukosetoleranz zu beeinflussen scheint.

Übergewicht gilt als einer der wichtigsten Ursachen für Insulinresistenz und T2DM (Kolterman et al., 1980). Die Gründe für Übergewicht sind in der Regel ein metabolisches Ungleichgewicht, welches durch eine positive Differenz zwischen Nahrungsaufnahme und Energieausgabe entsteht. Neben der Menge der aufgenommenen Nahrung spielt vor allem ihre Zusammensetzung eine wichtige Rolle. Besonders die Aufnahme hoher Mengen gesättigter Fettsäuren, wie sie auch in der verwendeten HFD auftreten, scheint die Entstehung von

Übergewicht zu fördern (Melanson et al., 2009). Eine mögliche Assoziation zwischen Übergewicht, DM und der PK bleibt jedoch weiter kontrovers. Allerdings bringen einige Studien sowohl die Fettsäureaufnahme mit der Diät (Logroscino et al., 1996; Anderson et al., 1999), als auch Diabetes und damit eine gestörte Glukosetoleranz (Hu, 2003; Schernhammer et al., 2011) mit der PK in Verbindung. Bei den untersuchten h[A30P] α Syn transgenen Mäusen konnte ein Einfluss der HFD auf metabolische Parameter nachgewiesen und sowohl erhöhtes Körpergewicht, als auch eine gestörte Glukosetoleranz induziert werden. Andere Nagermodelle zeigen, dass Übergewicht und Diabetes Insulinresistenz im Gehirn induzieren und zu kognitiven Beeinträchtigungen führen können (Winocur und Greenwood, 2005; Winocur et al., 2005; Moroz et al., 2008). Das in dem verwendeten Mausmodell überexprimierte α Syn könnte dabei durch seine Fähigkeit Fettsäuren zu binden eine wesentliche Rolle spielen (Sharon et al., 2001; Lucke et al., 2006; Salem et al., 2007). Es scheint somit möglich, dass die HFD über die Beeinträchtigung des Stoffwechsels der h[A30P] α Syn transgenen Mäuse und die Induktion metabolischer Dysfunktionen die Entwicklung der Synukleinopathie des Mausmodells beeinflussen kann.

4.1.2 Verkürzte Lebensspanne nach Fütterung der Hochfett Diät

Bekannt ist, dass Mäuse bei Fütterung einer HFD eine reduzierte Lebenserwartung aufweisen können (Muller et al., 2013). Zudem kann eine hochkalorische Diät die generellen Gesundheit bei Mäusen verschlechtern und die Überlebensrate vermindern (Baur et al., 2006). In dieser Arbeit wiesen die h[A30P] α Syn transgenen Mäuse ebenfalls eine signifikant verminderte Lebensspanne nach Fütterung der HFD auf. Interessanterweise blieb auch nach Ausschluss aller Mäuse, deren Ableben nicht eindeutig auf den motorischen Phänotyp zurückzuführen war, die Lebensspanne der Mäuse mit HFD im Vergleich mit den Mäusen mit SD weiterhin signifikant verkürzt (Abb. 3.4).

Da ein Teil der Mäuse mit HFD aus anderen Gründen als dem Phänotyp und damit nicht eindeutig durch das vorgezogene Auftreten der Synukleinopathie verstarben, sind wahrscheinlich einerseits die metabolischen Konsequenzen des Übergewichts und der Fehlernährung für das verfrühte Ableben verantwortlich. Dies korreliert mit Ergebnissen verschiedener Studien, die eine signifikant verminderte Lebensspanne nicht transgener Mäuse nach Fütterung einer HFD zeigen (Silberberg und Silberberg, 1954; Keipert et al., 2011; List et al., 2013; Wagener et al., 2013). Auch beim Menschen sind Adipositas und Übergewicht mit verschiedenen Begleiterkrankungen, wie T2DM und neurologischen Beeinträchtigungen, assoziiert, die zu einer verminderten Lebenserwartung führen können (Seidell, 2000; Field et

al., 2001; Li et al., 2005). Übergewicht (BMI (body mass index) 25 – 30) allein scheint dagegen nicht zu einer sinkenden Lebenserwartung zu führen (Stevens et al., 1999; Fontaine et al., 2003; Reuser et al., 2008), während der Einfluss von Adipositas (BMI > 30) umstritten bleibt. So gehen einige Studien von einer verminderten Lebenserwartung durch Adipositas aus (Allison et al., 1999; Peeters et al., 2003; Mokdad et al., 2005; Moore et al., 2008), während andere nur einen geringen oder gar keinen Einfluss postulieren (Stevens et al., 1999; Flegal et al., 2005; Finkelstein et al., 2010). Es kann jedoch angenommen werden, dass die Ernährung und damit in Verbindung stehendes Übergewicht die Lebenserwartung sowohl beim Menschen, als auch bei Mäusen beeinträchtigen kann. Der dahinter stehende Mechanismus bleibt allerdings ungeklärt. Möglicherweise spielt jedoch beeinträchtigtes GH (growth hormone) – IGF Signaling eine Rolle (Bonafe et al., 2003; Berryman et al., 2008; List et al., 2013). So scheint eine Reduktion des GH – IGF Signalings die Lebensdauer sowohl im Tiermodell, als auch beim Menschen zu verlängern (Paolisso et al., 2000; Suh et al., 2008) und weibliche Mäuse mit einem heterozygoten KO des IGF-Rezeptors weisen eine erhöhte Lebensspanne auf (Holzenberger, 2004). Weiterhin scheinen auch die IRS-Proteine eine Rolle zu spielen, sodass beispielsweise die Lebensspanne weiblicher IRS-1 KO Mäuse signifikant verlängert ist (Selman et al., 2008). Die Plasmakonzentrationen von Insulin sowie die Insulinsensitivität sind zudem beim Menschen invers mit der Lebensdauer korreliert (Paolisso et al., 2000; Roth et al., 2002) und die langlebigen GH-Rezeptor KO Mäuse weisen besonders niedrige Plasmainsulinkonzentrationen und eine verbesserte Insulinsensitivität auf (Dominici et al., 2002; Liu et al., 2004). Es ist somit wahrscheinlich, dass die mit der HFD induzierten metabolischen Dysfunktionen zu einer verminderten Lebensspanne im untersuchten h[A30P]αSyn transgenen Mausmodell führten. Der zugrunde liegende Mechanismus wurde nicht genauer untersucht, möglicherweise spielen aber Defizite im IGF sowie im IRS Signaling eine Rolle.

Interessanterweise verstarben die restlichen h[A30P]αSyn transgenen Mäuse mit HFD aufgrund des signifikant verfrüht einsetzenden motorischen Phänotyps. Dies korreliert mit der ebenfalls verfrüht einsetzenden Synukleinopathie des Hirnstamms (siehe 4.2.1), deren Auftreten mit dem motorischen Endstadium der Mäuse in Verbindung steht (Freichel et al., 2007). Somit scheint die HFD auch die Entwicklung der Synukleinopathie zu beeinflussen und so zu einem verfrühten Einsetzen des phänotypischen Endstadiums zu führen. Unklar ist jedoch, wie die HFD das verfrühte Einsetzen der Synukleinopathie induzierte. Genauere Untersuchungen, die den Einfluss der HFD auf die Entwicklung der Synukleinopathie und in der Folge auf die Lebensspanne der Mäuse betreffen, sind deshalb notwendig.

4.1.3 Verfrühte Beeinträchtigungen im emotionalen Lernen durch die Hochfett Diät

Die h[A30P] α Syn transgenen Mäuse zeigen altersabhängige, kognitive Beeinträchtigungen, welche sowohl das emotional-assoziative, als auch das emotionale Kontext Lernen betreffen (Freichel et al., 2007; Schell et al., 2009). In der durchgeführten Arbeit konnte die bekannte Beeinträchtigung der transgenen Mäuse im emotional-assoziativen Lernen der Angstkonditionierung im Alter von 12 Monaten bestätigt werden. Diese Defizite werden vor allem mit Störungen in der Funktion der Amygdala in Verbindung gebracht (LeDoux, 2000; Holahan und White, 2004). So zeigen auch die verwendeten h[A30P] α Syn transgenen Mäuse eine im Alter zunehmende Synukleinopathie in der Amygdala (Schell et al., 2009). Interessanterweise konnten diese Beeinträchtigungen im emotional-assoziativen Lernen bei transgenen Mäusen mit HFD jedoch signifikant vorzeitig, im Alter von nur 9 Monaten, nachgewiesen werden, was auf eine verfrühte Schädigung der Amygdala hinweist. Zusätzlich zeigten diese Mäuse im Alter von 12 Monaten Störungen im Kontext-Lernen der Angstkonditionierung, die bei transgenen Mäusen mit SD nicht auftraten (Abb. 3.5). Die Ergebnisse des Kontext Tests sind jedoch möglicherweise auch auf die verminderte Laufdistanz der Kontrollmäuse mit HFD zurückzuführen und deshalb nur bedingt aussagekräftig. Störungen im Kontext-Lernen werden dabei einerseits sowohl auf Defizite der Amygdala, andererseits aber besonders auf Beeinträchtigungen des Hippocampus zurückgeführt (Killcross et al., 1997; Goosens und Maren, 2001). Bei den verwendeten h[A30P] α Syn transgenen Mäusen konnte bereits eine im hohen Alter verstärkte synaptische Ansammlung von nicht phosphoryliertem α Syn in der CA1 und der CA3 Region des Hippocampus nachgewiesen werden (Schell et al., 2009). Diese Regionen spielen eine wichtige Rolle bei der episodischen Erinnerung (Langston et al., 2010) und könnten somit zu Beeinträchtigungen im Kontext-Lernen der Angstkonditionierung beitragen. Ebenso konnte eine verminderte Induktion von cFOS, einem Marker für synaptische Plastizität, sowie von PLK 2 in Amygdala und Hippocampus bei alten h[A30P] α Syn transgenen Mäusen nachgewiesen werden, was ebenfalls die Defizite dieser Mäuse in der Angstkonditionierung erklären könnte (Schell et al., 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurden jedoch weder die Synukleinopathie der Amygdala, noch des Hippocampus genauer untersucht, weshalb über die Ursachen der vorzeitigen kognitiven Beeinträchtigungen der h[A30P] α Syn transgenen Mäuse nach Fütterung der HFD nur spekuliert werden kann. Wahrscheinlich ist aber eine verfrühte Induktion der Synukleinopathie in diesen Gehirnregionen. Denkbar wären ebenso Interaktionen von α Syn mit FFA, die neuropathologisch nicht nachweisbar sind und möglicherweise zu Störungen in der Signaltransduktion führen könnten. So kann α Syn FFA

binden und auch direkt mit Lipiden interagieren (Sharon et al., 2001; Lucke et al., 2006; Salem et al., 2007; Auluck et al., 2010). Zudem bildet sowohl WT, als auch A30P mutiertes α Syn in Anwesenheit von PUFAs Dimere und Oligomere aus (Perrin et al., 2001).

Die untersuchten WT Mäuse mit HFD zeigten ebenfalls eine Verschlechterung der emotionalen Lernfähigkeit während des Alterungsprozesses, wiesen jedoch durchgehend funktionales emotional-assoziatives sowie emotionales Kontext-Lernen auf. Dies korreliert mit Ergebnissen, nach denen WT Mäuse nach Fütterung einer HFD zwar ein vermindertes Schockverhalten im Kontext Test der Angstkonditionierung zeigen (Hwang et al., 2010), jedoch insgesamt ein intaktes Lernen aufweisen (Pistell et al., 2010).

Beim Menschen konnte ein Zusammenhang zwischen T2DM und Beeinträchtigungen in kognitiven Funktionen gefunden werden (Gregg et al., 2000; Knopman et al., 2001; Arvanitakis et al., 2007), wobei sich sowohl Störungen im verbalen, als auch im Arbeitsgedächtnis zeigen (Perlmutter et al., 1984; Elias et al., 2003; Messier, 2005; Munshi et al., 2006). Ebenso wurde bei Patienten mit T2DM ein erhöhtes Risiko für Demenz nachgewiesen (MacKnight et al., 2002; Allen et al., 2004; Awad et al., 2004). Populationsbasierte Studien bringen zudem Hyperglykämie mit verminderten kognitiven Fähigkeiten in Verbindung (Franceschi et al., 1984; Robertson-Tchabo et al., 1986; Messier et al., 1999). Unklar war bisher die Wirkung einer HFD auf die kognitiven Funktionen in einem Mausmodell für Synukleinopathie. Allerdings konnte bei Nagern bereits ein Zusammenhang zwischen Übergewicht und kognitiven Beeinträchtigungen nachgewiesen werden (Winocur und Greenwood, 2005; Granholm et al., 2008; White et al., 2009). Zudem fördern die durch die HFD induzierten metabolischen Dysfunktionen Veränderungen in der Kognition sowie Demenz (Kumari et al., 2000; Craft, 2005; Razay et al., 2007). Die gefundenen Ergebnisse zeigen, dass eine HFD das emotionale Lernen bei h[A30P] α Syn Mäusen beeinflussen kann und zu verfrühten kognitiven Beeinträchtigungen führt. Genauso wie auch schon die verminderte Lebensspanne lässt dies vermuten, dass die HFD die Entwicklung der Synukleinopathie beeinflussen kann. Der zugrunde liegende Mechanismus bleibt dabei jedoch weiterhin ungeklärt. Da für die Mäuse mit HFD bereits ein erhöhtes Körpergewicht und eine gestörte Glukosetoleranz nachgewiesen werden konnte, erscheint ein Einfluss dieses metabolischen Ungleichgewichts auch auf kognitive Funktionen wahrscheinlich. Ebenso könnte oxidativer Stress eine wichtige Rolle zu spielen, da dieser sowohl mit Übergewicht (Mattson et al., 2003; Zhang et al., 2005; Souza et al., 2007), als auch mit neurodegenerativen Erkrankungen und kognitivem Verfall in Verbindung steht (Joseph et al., 1998; Ansari et al., 2008; Kamat et al., 2008). Weitere Untersuchungen, die den genauen mechanistischen

Zusammenhang zwischen dem durch HFD induzierten metabolischen Ungleichgewicht und den kognitiven Beeinträchtigungen behandeln, erscheinen jedoch notwendig.

4.1.4 Veränderungen in motorischen Parametern durch die Hochfett Diät

Eine HFD wirkt nicht nur auf den Energiemetabolismus, sondern ebenso auch auf Funktionen im Gehirn wie im Hypothalamus und in der SN (Choi et al., 2005; Davis et al., 2008b; Granholm et al., 2008; Morris et al., 2010; Bousquet et al., 2012). Die h[A30P] α Syn transgenen Mäuse zeigen vor dem Einsetzen des letztendlich letalen, motorischen Phänotyps leichtere motorische Beeinträchtigungen (Neumann et al., 2002; Freichel et al., 2007). So konnte beispielsweise ab einem Alter von etwa 16 Monaten eine verminderte Leistung auf dem Rota Rod gemessen werden (Freichel et al., 2007). In der durchgeführten Arbeit zeigte sich bei allen Mäusen mit HFD eine signifikant schlechtere Laufleistung auf dem Rota Rod, was jedoch wahrscheinlich auf das erhöhte Körpergewicht zurückzuführen ist (Abb. 3.6). Interessanterweise blieben aber die Laufzeiten der transgenen Mäuse mit SD sowie der WT Mäuse mit HFD während der gesamten Testdauer konstant, wohingegen die Laufzeit der transgenen Mäuse mit HFD kontinuierlich absank und mit 56 Wochen signifikant unter der Anfangszeit lag. Somit scheint die HFD die bekannten Beeinträchtigungen im Rota Rod verfrüht zu induzieren, wobei allerdings ein Einfluss des Körpergewichts nicht ausgeschlossen werden kann. Bei genauerer Untersuchung der Gangparameter im Cat Walk zeigte sich außerdem, dass die transgenen Mäuse mit HFD aufgrund der motorischen Symptomatik den Laufunnel zu einem signifikant früheren Zeitpunkt nicht mehr durchlaufen konnten als die transgenen Mäuse mit SD (Abb. 3.8). Bei allen anderen untersuchten Schrittparametern, wie Schrittlänge oder Abdruckintensität, konnte dagegen kein Unterschied gefunden werden (Abb. 3.9). Diese Ergebnisse deuten ebenfalls darauf hin, dass der bekannte motorische Phänotyp der h[A30P] α Syn transgenen Mäusen verfrüht auftritt, wobei sich jedoch keine Veränderungen in der Ausprägung zeigen. Zusätzlich konnte im Open Field eine im Vergleich mit WT Mäusen mit HFD signifikant erhöhte Laufdistanz der transgenen Mäuse, unabhängig von der Diät, gemessen werden (Abb. 3.7). Dies stimmt mit zuvor gefundenen Ergebnissen überein, nach denen die h[A30P] α Syn transgenen Mäuse eine Hyperaktivität aufweisen (Freichel et al., 2007). Bei virtueller Einteilung des Open Fields in verschiedene Zonen konnte im Alter von 42 Wochen außerdem eine im Vergleich mit den WT HFD Mäusen signifikant erhöhte Verweildauer der transgenen Mäuse in den inneren Zonen gemessen werden. Dies lässt auf ein erhöhtes Erkundungs- und vermindertes

Vermeidungsverhalten der transgenen Mäuse in diesem Alter, unabhängig von der Diät, schließen.

Zusammengefasst konnte mit Hilfe der durchgeführten Versuche eine verfrühte motorische Beeinträchtigung der h[A30P] α Syn transgenen Mäuse mit HFD nachgewiesen werden, was, wie auch die vorzeitigen kognitiven Defizite, auf einen Einfluss der HFD auf die Entwicklung der Synukleinopathie hinweist. Veränderungen des bekannten motorischen Phänotyps konnten nicht nachgewiesen werden, während die Hyperaktivität der h[A30P] α Syn Mäuse bestätigt werden konnte (Neumann et al., 2002; Freichel et al., 2007).

Verschiedene Studien zeigen einen motorischen Phänotyp bei Mausmodellen für Synukleinopathien, der mit der Ausbildung von spezifischen Ablagerungen sowie somatodentritischen Akkumulationen von α Syn im Gehirn einhergeht (van der Putten et al., 2000; Neumann et al., 2002; Fleming und Chesselet, 2006; Freichel et al., 2007; Kahle, 2008). Die h[A30P] α Syn transgenen Mäuse entwickeln während des Endstadiums eine schwere Synukleinopathie im Hirnstamm, die mit dem motorischen Phänotyp in Verbindung steht (Neumann et al., 2002; Freichel et al., 2007). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Synukleinopathie des Hirnstamms bei transgenen Mäusen mit HFD signifikant vorzeitig auftritt, was mit den verfrühten motorischen Beeinträchtigungen dieser Tiere korreliert. Es fehlen jedoch Untersuchungen an WT Mäusen mit SD, die genauere Informationen über den Einfluss der HFD auf motorische Parameter geben könnten. Zudem wurden die Versuche stark vom Körpergewicht der Mäuse beeinflusst, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass die gefundenen Effekte mit dem erhöhten Körpergewicht der Mäuse mit HFD zusammenhängen und nicht ausschließlich durch die verfrühte Ausprägung der Synukleinopathie bedingt wurden. Es konnte allerdings bereits gezeigt werden, dass eine HFD unter anderem den dopaminergen Signalweg im Gehirn beeinflussen und so zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Parkinson induzierenden Toxinen führen kann (Choi et al., 2005; Davis et al., 2008b; Granholm et al., 2008; Morris et al., 2010; Bousquet et al., 2012). Zudem gehören motorische Beeinträchtigungen wie Rigor, Akinesie, Bradykinesie sowie Gang- und Gleichgewichtsstörungen zu den Kardinalsymptomen der PK (Jankovic, 2008). Möglicherweise spielen bei der Ausbildung dieser Symptome auch verschiedene mit Übergewicht assoziierte Faktoren eine Rolle. So bringen Humanstudien vaskuläre Risikofaktoren mit verstärkten Parkinson-Symptomen in Verbindung (Ambrose et al., 2006; Louis und Luchsinger, 2006). Weiterhin kann auch T2DM die motorischen Symptome der PK verstärken (Arvanitakis et al., 2004b; Papapetropoulos et al., 2004; Bosco et al., 2012; Cereda et al., 2012). Es ist allerdings anzumerken, dass diese Effekte vor allem

mit dem Untergang der dopaminergen Neuronen der SN in Verbindung stehen. Im Gegensatz dazu sind die motorischen Beeinträchtigungen des h[A30P] α Syn transgenen Mausmodells überwiegend auf die Degeneration der Motoneuronen zurückzuführen (Neumann et al., 2002; Freichel et al., 2007). Es scheint jedoch möglich, dass die HFD über die vorzeitige Induktion der Synukleinopathie des Hirnstamms (siehe 4.2.1), der wesentlich in die Ausbildung der motorischen Symptome des h[A30P] α Syn transgenen Mausmodells involviert ist, den motorischen Phänotyp verfrüht induziert. Genauere Untersuchungen über die Wirkungsweise der HFD auf die Motoneuronen des untersuchten Mausmodells sind jedoch notwendig, um eindeutige Aussagen über die Effekte auf die motorischen Symptome treffen zu können.

4.2 Die Hochfett Diät beeinflusst die Entwicklung histologischer und proteinbiochemischer Parameter im Hirnstamm

Übergewicht und Insulinresistenz beeinflussen nicht nur periphere Organe, sondern wirken auch auf Prozesse des Gehirns. Sowohl FFA (Hamilton und Brunaldi, 2007; Mitchell und Hatch, 2011), als auch Glukose (Lund-Andersen, 1979; Pardridge et al., 1990) sowie Insulin (Baura et al., 1993; Banks et al., 1997a; Banks et al., 1997b) sind in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu überqueren. So geht eine periphere Insulinresistenz in der Regel mit einer zerebralen Insulinresistenz einher, wobei möglicherweise das ZNS sogar als grundlegende Störungsebene bei der Entstehung einer Insulinresistenz sowie in der Folge eines T2DM betrachtet werden kann (Elmqvist und Marcus, 2003). Typische Folgen eines T2DM sind eine chronische Inflammation (de Luca und Olefsky, 2008) sowie erhöhter oxidativer Stress (Rosen et al., 2001; Mastrocola et al., 2005). Da α Syn unter anderem FFA binden kann (Lucke et al., 2006; Salem et al., 2007), kann vermutet werden, dass sich erhöhte Fettsäurespiegel des Plasmas auch auf die Entstehung und den Verlauf einer Synukleinopathie auswirken. Zudem konnte mit Hilfe der vorausgegangenen Verhaltensversuche eine Wirkung der HFD auf metabolische, motorische und kognitive Parameter nachgewiesen werden, was auf einen Einfluss der Diät auf die Entwicklung der Synukleinopathie hindeutet.

Der Hirnstamm spielt bei der Entstehung einer Synukleinopathie wie der PK eine wichtige Rolle. So gilt der Verlust der dopaminergen Neuronen des Hirnstamms als hauptverantwortlich für die motorischen Symptome der PK (Surmeier und Sulzer, 2013), zudem ist der Hirnstamm früh von der Lewy-Pathologie betroffen (Beach et al., 2009). Dabei sind die Neurone des Hirnstamms unter anderem auch in die Kontrolle der Energiehomöostase involviert (Schneeberger et al., 2014). Im verwendeten h[A30P] α Syn

transgenen Mausmodell tritt die Synukleinopathie des Hirnstamms erst im hohen Alter auf und geht dabei mit dem phänotypischen Endstadium der Tiere einher (Neumann et al., 2002; Freichel et al., 2007).

4.2.1 Verfrühte Ausprägung der Synukleinopathie nach Fütterung der Hochfett Diät

Die untersuchten h[A30P] α Syn transgenen Mäuse entwickeln im Alter eine hirnregionsspezifische Synukleinopathie, die unter anderem mit einer zunehmenden S129- α Syn Phosphorylierung, mit neuropathologischer Silberfärbung sowie Thioflavin-S positiver Färbung einher geht (Neumann et al., 2002; Freichel et al., 2007; Schell et al., 2009). Diese Indikatoren der Synukleinopathie wurden auch im Rahmen dieser Arbeit bei h[A30P] α Syn transgenen Mäusen mit SD im Alter von etwa 20 Monaten im Hirnstamm gefunden. Bei transgenen Mäusen mit HFD konnten diese Parameter jedoch signifikant vorzeitig nachgewiesen werden. So zeigten sich bereits im Alter von 16 Monaten eine starke pathologische S129- α Syn Phosphorylierung (Abb. 3.11), Gallyas-Silber positive Strukturen (Abb. 3.13) sowie die Amyloid-artige Pathologie anhand von Thioflavin-S positiven Ablagerungen (Abb.3.14). Unterschiede in Ausprägung und Verteilung der einzelnen Färbungen konnten zwischen den transgenen Mäusen mit SD und mit HFD dagegen nicht festgestellt werden, sodass von einer rein zeitlichen Verschiebung der Synukleinopathie auszugehen ist. Zusätzlich konnten bei Untersuchung der Gesamtproteinmenge sowie der Verteilung von humanem α Syn im Hirnstamm h[A30P] α Syn transgener Mäuse keine Veränderungen nach Fütterung der HFD gefunden werden. Dementsprechend scheint die Diät Proteinmenge und Verteilung des Transgens nicht zu beeinflussen (Abb. 3.10). Bei WT Mäusen mit HFD konnten auch im Alter von 20 Monaten keine Indikatoren der Synukleinopathie nachgewiesen werden. Ebenso konnte auch in Hippocampus, Cortex und Cerebellum kein Einfluss der HFD auf die untersuchten Marker der Synukleinopathie gefunden werden.

Die Wirkung einer HFD auf die Entwicklung der Synukleinopathie des Hirnstamms wurde bisher kaum untersucht. Einerseits kann eine HFD Insulinresistenz nicht nur in peripheren Organen, sondern auch im Gehirn induzieren (Winzell und Ahren, 2004; Obrosova et al., 2007; Metlakunta et al., 2008). Übergewicht kann zudem neuronale Dysfunktion sowie möglicherweise auch Neurodegeneration verstärken (Bruce-Keller et al., 2009) und eine HFD kann die Entwicklung der Neurodegeneration bei Nagern beeinflussen. So verschlimmerte die metabolische Inflammation bei übergewichtigen und diabetischen Mäusen die Degeneration der dopaminergen Neuronen (Wang et al., 2014). Ebenso konnte ein negativer Einfluss einer

HFD auf die Dopamin produzierenden Neuronen der SN nachgewiesen werden (Choi et al., 2005; Morris et al., 2010; Bousquet et al., 2012). Andererseits konnte in einem [A53T] α Syn Mausmodell kein Einfluss einer HFD auf metabolische Parameter sowie auf die Entstehung der Synukleinopathie nachgewiesen werden (Rothman et al., 2014). Im Gegensatz dazu wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit eine verfrühte Ausbildung der Synukleinopathie im Hirnstamm bei h[A30P] α Syn transgenen Mäusen nach Fütterung einer HFD nachgewiesen. Dies korreliert mit den ebenfalls vorzeitigen motorischen und kognitiven Beeinträchtigungen dieser Mäuse. So ist bekannt, dass die hirnregionsspezifischen Veränderungen der Synukleinopathie mit den Verhaltensdefiziten der h[A30P] α Syn transgenen Mäusen einhergehen (Freichel et al., 2007). Da jedoch in keinem Fall Veränderungen in der Ausprägung der Synukleinopathie des Hirnstamms gefunden werden konnten, scheint die HFD zu einer rein zeitlichen Verschiebung zu führen.

Der Mechanismus, über welchen die HFD die Entwicklung der Synukleinopathie beschleunigt, bleibt jedoch weiter ungeklärt. Möglicherweise hängt die verfrühte Induktion der Synukleinopathie nach Fütterung der HFD aber mit der Fähigkeit von α Syn FFA zu binden zusammen (Sharon et al., 2001; Lucke et al., 2006; Salem et al., 2007). Ebenso konnte gezeigt werden, dass α Syn sowohl physiologisch, als auch pathologisch direkt mit Lipiden interagieren kann (Auluck et al., 2010). Zudem bildet sowohl WT, als auch A30P mutiertes α Syn in Anwesenheit von PUFAs Dimere und Oligomere aus (Perrin et al., 2001) und biochemische Analysen von Gehirnen zeigen verminderte PUFA Konzentrationen bei Parkinson Patienten (Dexter et al., 1994). Einen weiteren Hinweis für den Zusammenhang zwischen Störungen des Fettstoffwechsels und der PK geben Individuen mit heterozygoten GBA Mutationen. Diese entwickeln in Regel keinen Morbus Gaucher, einer lysosomalen Speicherkrankheit, die auf Defekten des Enzyms Glucocerebrosidase beruht, und weisen auch keine dafür typischen neuronalen Akkumulationen von Glucosylceramiden auf. Im Gegensatz dazu zeigen sie jedoch ein stark erhöhtes Risiko für die PK (Wong et al., 2004; Neumann et al., 2009).

4.2.2 Vorzeitige Astrogliose nach Fütterung der Hochfett Diät

Bei der PK kann eine Überaktivierung der Gliazellen des Gehirns beobachtet werden, welche verstärkt ROS, NO (nitric oxide) und proinflammatorischen Zytokinen freisetzen und damit eine gesteigerte Neurotoxizität und erhöhte Gewebeschädigung induzieren (Deshpande et al., 2005; Mizuno et al., 2005; Fellner und Stefanova, 2013). Eine typische Folge von Diabetes ist die Erhöhung des oxidativen Stresses, welcher Gewebeschäden verursachen kann

(Rosen et al., 2001; Mastrocola et al., 2005). Veränderungen in der Funktion der Astrozyten können zu den durch Diabetes entstehenden oxidativen Schäden beisteuern (Bhardwaj et al., 1998; Rosen et al., 2001; Mastrocola et al., 2005).

Bei h[A30P] α Syn transgenen Mäuse konnte in denen von der Synukleinopathie schwer betroffenen Gehirnregionen starke Astroglie nachgewiesen werden (Neumann et al., 2002). Auch in dieser Arbeit wurde im Hirnstamm 20 Monate alter h[A30P] α Syn transgener Mäuse massive Astroglie detektiert. Bei transgenen Mäusen mit HFD trat diese jedoch signifikant vorzeitig im Alter von 16 Monaten auf. Unterschiede in Qualität und Ausbreitung der Astroglie konnten dagegen nicht gefunden werden, was eine rein zeitliche Verschiebung vermuten lässt. Bei WT Mäuse mit HFD konnte im Gegensatz dazu auch im Alter von 20 Monaten keine Astroglie nachgewiesen werden (Abb. 3.15). In Cortex, Cerebellum und Hippocampus zeigte sich ebenfalls kein Einfluss der HFD auf die Entwicklung der Astroglie.

Astroglie spielt bei der Initiation und Progression der PK eine wichtige und möglicherweise sogar dominante Rolle (Halliday und Stevens, 2011). Hierbei scheint besonders α Syn von Bedeutung. So konnten bei der PK α Syn positive Einschlüsse auch in Astrozyten nachgewiesen werden (Wakabayashi et al., 2000; Braak et al., 2007), zudem ist α Syn in der Lage Mikroglia und Astrozyten wahrscheinlich über einen TLR 4 abhängigen Signalweg zu stimulieren (Klegeris et al., 2006; Fellner et al., 2013). Ebenso führt die Lewy Pathologie nicht notwendigerweise zum Zelltod und einige Neurone sterben ohne eine nachweisbare Akkumulation von α Syn (Forno, 1996; Tompkins und Hill, 1997), sodass andere Faktoren wie die Aktivierung von Mikroglia und Astroglia zur neuronalen Degradierung beitragen müssen (Gerhard et al., 2006; Braak et al., 2007; Fellner und Stefanova, 2013). Die selektive Expression von A53T α Syn in den Astrozyten eines induzierbaren Mausmodells führte zu einer schnell fortschreitenden Paralyse, wahrscheinlich bedingt durch die ausgedehnte Astroglie sowie die Degeneration von dopaminergen Neuronen und von Motoneuronen des Rückenmarks (Gu et al., 2010). Ebenso scheint mutiertes α Syn morphologische und funktionelle Veränderungen in astroglialen Mitochondrien herbeizuführen und zu einer beeinträchtigten Sekretion von für die neuronale Differenzierung essentiellen Faktoren zu führen (Schmidt et al., 2011).

Im hier durchgeführten Versuch konnte gezeigt werden, dass die Synukleinopathie zeitlich mit der Induktion einer massiven Astroglie im Hirnstamm transgener Mäuse einhergeht. Im Gegensatz dazu konnte bei WT Mäusen mit HFD keine Astroglie nachgewiesen werden. Andere Studien zeigen zwar einen Einfluss der HFD auf die Entwicklung einer Astroglie

bei WT Mäusen, jedoch scheint dieser Effekt vor allem auf das hypothalamische System begrenzt. So spielen Astrozyten auch bei der metabolischen Kontrolle eine essentielle Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass eine HFD bei Nagern hypothalamische Gliose und Inflammation induzieren kann, die mit sekundären Komplikationen von Übergewicht in Verbindung stehen (Milanski et al., 2009; Horvath et al., 2010; Thaler et al., 2012; Tomassoni et al., 2013). Die in der Studie nachgewiesene vorzeitige exzessive Astroglie im Hirnstamm von mit HFD gefütterten transgenen Mäusen, weist auf eine Beteiligung der Astrozyten bei der Entstehung der pathologischen Synukleinopathie hin. Unklar bleibt jedoch, ob die Astroglie einen Auslöser des pathologischen Phänotyps darstellt und dementsprechend kurz vor der Krankheitsentstehung auftritt, oder mit der Entwicklung der Synukleinopathie einhergeht. Ebenso wurde auch die Rolle der Mikroglia, welche ebenfalls in den Inflamationsprozess und die Abwehr von toxischen Stoffen involviert sind, nicht überprüft. Genauere Untersuchungen über den zeitlichen Verlauf der Astroglie sowie über den Einfluss der Mikroglia scheinen deshalb notwendig, um spezifischere Aussagen über die Rolle der Astrozyten bei der Entwicklung der Synukleinopathie treffen zu können.

4.2.3 Verminderte Akt Phosphorylierung im Hirnstamm h[A30P] α Syn transgener Mäuse

Beeinträchtigt Insulin-Signaling steht im Zentrum der Entwicklung von Insulinresistenz und Diabetes. Die Aktivierung des PI3K - Akt Signalwegs spielt bei den metabolischen Wirkungen von Insulin eine zentrale Rolle (Shepherd et al., 1998). Auch bei der PK können Störungen im Akt-Signalweg beobachtet werden (Burke, 2007; Levy et al., 2009). Akt weist mit T308, welches zur initialen, partiellen Aktivierung benötigt wird, und S473, welches eine vollständige Aktivierung bewirkt, zwei regulatorische Phosphorylierungsstellen auf (Alessi et al., 1996; Alessi et al., 1997). Im durchgeführten Versuch konnte bei h[A30P] α Syn transgenen Mäusen mit HFD im Alter von 17 Monaten eine vorzeitig verminderte T308-Akt Phosphorylierung nachgewiesen werden, welche sich bei transgenen Mäusen mit SD erst im Alter von 20 Monaten zeigte. Ebenso war auch die S473-Akt Phosphorylierung bei transgenen Mäusen mit HFD im Alter von 17 Monaten vermindert. Hier zeigte sich jedoch keine Reduktion bei älteren transgenen Mäusen mit SD, was aber möglicherweise auch auf die starken interindividuellen Unterschiede zwischen den einzelnen Mäusen zurückzuführen ist. Bei WT Mäusen mit HFD konnte dagegen im Alter von 20 Monaten keine signifikant verminderte Akt-Phosphorylierung nachgewiesen werden (Abb. 3.17). Es fehlen jedoch 17

Monate alte WT Mäuse mit HFD sowie WT Mäuse mit SD als Kontrollen, welche genauere Aussagen über den Effekt der HFD auf die Akt-Phosphorylierung erlauben würden.

Der Akt-Signalweg spielt sowohl in den Muskeln, als auch im Fettgewebe eine zentrale Rolle bei der Insulin-stimulierten Glukoseaufnahme (Steinberg und Kemp, 2009). Die Bindung von Insulin an RTK führt zu einer Aktivierung des Akt-Signalwegs und in der Folge zur Translokation von GLUT-4 zur Zellmembran und einer erleichterten Glukoseaufnahme (Mora et al., 2004). Insulinresistenz wird dabei mit Störungen sowohl von Akt vorgelagerten, als auch nachgelagerten Proteinen assoziiert (Yamauchi et al., 1996; Bruning et al., 1998; Previs et al., 2000; Tremblay et al., 2001). Interessanterweise ist auch bei Parkinson Patienten die Signaltransduktion über den Akt Signalweg in der SNpc stark vermindert, wobei sich vor allem eine Reduktion des phosphorylierten Akt zeigt, während die Gesamt-Akt Menge nicht beeinträchtigt ist (Malagelada et al., 2008; Timmons et al., 2009). Medikamente, die bei der PK verwendet werden und das dopaminergene System beeinflussen, wirken über die Aktivierung von Akt neuroprotektiv, was unter anderem über die Hochregulierung von pS473-Akt erzielt wird (Fallon et al., 2006; Weinreb et al., 2006; Sagi et al., 2007; Lim et al., 2008). Ebenso schützt die Expression von durchgehend aktivem Akt vor durch 6-OHDA (6-Hydroxydopamine) induziertem Zelltod (Ries et al., 2006). Dies korreliert mit den Ergebnissen dieser Arbeit, die ebenfalls einen Zusammenhang zwischen einer verminderten Akt Phosphorylierung und der Entstehung einer Synukleinopathie vermuten lassen. So konnte im verwendeten h[A30P] α Syn transgenen Mausmodell eine verminderte Akt-Phosphorylierung speziell von T308-Akt im Hirnstamm gezeigt werden, die zeitlich mit der Entwicklung der Synukleinopathie übereinstimmt. Unklar ist jedoch, ob die verminderte Phosphorylierung einen Auslöser des pathologischen Phänotyps darstellt, oder ob sie als Begleiterscheinung der Synukleinopathie auftritt. Bei WT Mäusen mit HFD konnte keine vergleichbar stark verminderte Akt-Phosphorylierung im Hirnstamm nachgewiesen werden. Dies weist darauf hin, dass die HFD und die damit verbundenen metabolischen Dysfunktionen allein nicht für die Reduktion der Phosphorylierung verantwortlich sind, sondern dass stattdessen die Entwicklung der Synukleinopathie eine spezielle Rolle spielt.

4.2.4 Erhöhte GRK 5 Proteinmenge bei alten h[A30P] α Syn transgenen Mäusen, unabhängig von der Diät

Der größte Teil des α Syns in den LK bei der PK ist am S129 phosphoryliert (Saito et al., 2003; Covy et al., 2009). Auch in verschiedenen α Syn transgenen Mausmodellen wurde am S129 phosphoryliertes α Syn in unterschiedlichen Zelltypen und Gehirnregionen detektiert

(Kahle et al., 2000; Neumann et al., 2002; Wakamatsu et al., 2007; Schell et al., 2009; Paleologou et al., 2010). Mehrere Kinasen können α Syn am S129 phosphorylieren, unter anderem GRK 5 (Pronin et al., 2000; Arawaka et al., 2006; Sakamoto et al., 2009). GRK 5 wird ubiquitär exprimiert und Beeinträchtigungen in der Funktion wurden sowohl mit Alzheimer, als auch mit Herzinsuffizienz in Verbindung gebracht (Dorn, 2009; Suo und Li, 2010). In den durchgeführten Versuchen konnte eine altersabhängige Induktion von GRK 5 bei h[A30P] α Syn transgenen Mäusen im Hirnstamm nachgewiesen werden. So zeigten 20 Monate alte transgene Mäuse eine im Vergleich mit jüngeren transgenen Mäusen sowie mit ebenso alten WT HFD Mäusen signifikant erhöhte GRK 5 Proteinmenge. Gleichzeitig konnte eine vordergründig nukleäre Lokalisation von GRK 5 beobachtet werden (Abb. 3.18)

Für GRKs wurden bereits verschiedene Bindungspartner und Substrate, teilweise auch im Nukleus, nachgewiesen (Ribas et al., 2007; Dorn, 2009). GRK 5 enthält eine NLS (nuclear localization sequence), die DNA binden kann (Johnson et al., 2004). Die nukleäre Lokalisation von GRK 5 wird unter anderem für die Phosphorylierung von HDAC 5 (histone deacetylase 5) benötigt (Martini et al., 2008) und spielt eine Rolle bei der Regulation der NF- κ B Transkriptionsaktivität (Sorriento et al., 2008). In Gehirnen von Parkinson Patienten kolokalisiert GRK 5 in LK mit α Syn (Arawaka et al., 2006). Die genaue Rolle der Kinase bei der Phosphorylierung von α Syn ist jedoch weiterhin unklar. So konnte einerseits die S129 Phosphorylierung von α Syn durch Überexprimierung von GRK 5 demonstriert werden (Pronin et al., 2000), andererseits führte der Knockdown von GRK 5 nicht zu einer verminderten S129 α Syn Phosphorylierung (Sakamoto et al., 2009). Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche lassen keine Aussagen über die Phosphorylierungsaktivität von GRK 5 zu. Die hauptsächlich nukleäre Verteilung des Proteins sowie die Tatsache, dass es in 16 Monate alten transgenen Mäusen mit HFD, die schon eine exzessive S129 α Syn Phosphorylierung aufweisen, nur geringfügig nachgewiesen werden konnte, lässt aber vermuten, dass es sich bei GRK 5 nicht um die primär für die pathologische α Syn Phosphorylierung verantwortliche Kinase handelt. Stattdessen scheint die Kinase im untersuchten h[A30P] α Syn Mausmodell altersabhängig induziert zu werden.

Auch Humanstudien über den Einfluss von spezifischen GRK 5 Haplotypen brachten unklare Ergebnisse über die Bedeutung der Kinase bei der Phosphorylierung von α Syn. So wurde zwar in einer japanischen Population ein spezifischer Haplotyp des GRK 5 Gens mit einem erhöhter Risiko für sporadischen Parkinson assoziiert (Arawaka et al., 2006). Dies konnte jedoch in einer italienischen sowie in einer spanischen Population nicht repliziert werden (Garcia-Gorostiaga et al., 2011; Tarantino et al., 2011). In der größten GWAs

(Genome-wide association study) für die PK konnte GRK 5 ebenfalls nicht mit einem erhöhten Risiko für die PK in Zusammenhang gebracht werden, wobei eine mögliche Assoziation jedoch nicht ausgeschlossen wurde (Nalls et al., 2011).

Unklar bleibt ebenfalls die Rolle der anderen bekannten Kinasen und der Phosphatasen bei der Phosphorylierung von α Syn sowohl bei der PK, als auch im untersuchten Mausmodell. So zeigen beispielsweise PLK 2 KO Mäuse eine verminderte S129- α Syn Phosphorylierung, was vermuten lässt, dass diese Kinase wesentlich an der Phosphorylierung von α Syn beteiligt ist (Inglis et al., 2009; Bergeron et al., 2014). Für die in dieser Arbeit verwendeten h[A30P] α Syn transgenen Mäuse konnte zudem eine ähnliche Lokalisation von PLK 2 und pS129 α Syn nachgewiesen werden, was ebenfalls für eine Rolle dieser Kinase bei der Phosphorylierung von α Syn spricht (Schell et al., 2012). Ebenso konnte gezeigt werden, dass α Syn mit der Phosphatase PP2A interagieren kann (Peng et al., 2005; Lou et al., 2010), sodass vermutet werden kann, dass PP2A auch im verwendeten Mausmodell an der Dephosphorylierung von α Syn beteiligt sein könnte. Dies lässt weitere Versuche, die die Induktion der CKs, PLKs, der anderen GRKs sowie von PP2A auch unter dem Einfluss der HFD untersuchen, äußerst interessant erscheinen. Ebenso könnten Koloalisationsversuche von GRK 5 und pS129 α Syn genauere Auskünfte über den Einfluss der Kinase bei der Phosphorylierung des Proteins im verwendeten Mausmodell geben.

4.3 Zusammenfassende Diskussion

Zusammenfassend konnte bei h[A30P] α Syn transgenen Mäusen ein Einfluss der HFD auf metabolische Parameter nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich ein verfrühtes Einsetzen der motorischen und kognitiven Beeinträchtigungen sowie eine vorzeitige Synukleinopathie des Hirnstamms, die mit massiver Astrogliose einherging (Abb. 4.1). Ebenso konnte eine vorzeitige Reduktion an phosphoryliertem Akt nachgewiesen werden. Die α Syn transgenen Mäuse zeigten zudem, unabhängig von der Diät, im hohen Alter eine erhöhte GRK 5 Proteinmenge im Hirnstamm, die vor allem im Nukleus lokalisiert war.

Unklar bleibt jedoch weiterhin der Mechanismus, über welchen die HFD die vorzeitige Entwicklung der Synukleinopathie induzierte. Verschiedene Faktoren könnten hierbei eine Rolle spielen, die jedoch im Rahmen dieser Studie nicht untersucht wurden. So konnte einerseits bereits gezeigt werden, dass eine HFD die Integrität der Blut-Gehirn-Schranke vermindert (Kanoski et al., 2010; Davidson et al., 2012; Freeman und Granholm, 2012). Zudem können FFA, genauso wie Insulin und Glukose, die Blut-Hirn-Schranke überqueren, sodass sich erhöhte Konzentrationen im Blut auch auf Funktionen des Gehirns auswirken

können (Lund-Andersen, 1979; Pardiidge et al., 1990; Baura et al., 1993; Banks et al., 1997a; Banks et al., 1997b; Hamilton und Brunaldi, 2007; Mitchell und Hatch, 2011). Somit korreliert eine periphere Insulinresistenz oft mit einer Insulinresistenz des Gehirns (Elmqvist und Marcus, 2003). Andererseits kann eine HFD oxidativen Stress sowie Inflammation im Gehirn induzieren (White et al., 2009; Pistell et al., 2010) sowie die Astrogliose im Hippocampus verstärken (Milanski et al., 2009; Horvath et al., 2010; Thaler et al., 2012; Tomassoni et al., 2013). Astrozyten sind dabei auch an der Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt (Tsacopoulos und Magistretti, 1996; Zonta et al., 2003). Zusätzlich kann eine HFD die Menge an BDNF im Gehirn vermindern und somit zu sinkender synaptischen Plastizität, neuronaler Erregbarkeit und Neurogenese führen (Molteni et al., 2002; Stranahan et al., 2008; Kanoski et al., 2010). Möglicherweise führt eine Kombination dieser Faktoren zu erhöhtem Stress des Gehirns und so zu der verfrühten Induktion der Synukleinopathie. α Syn kann zudem auch FFA binden (Lucke et al., 2006; Salem et al., 2007) und die Aggregation von α Syn scheint durch verschiedene Fettsäuren stimuliert zu werden (Jo et al., 2000; Perrin et al., 2001; Broersen et al., 2006; De Franceschi et al., 2011).

Weitere Untersuchungen erscheinen jedoch notwendig, um genauere Einblicke in die mechanistischen Hintergründe der durch die HFD verfrüht induzierten Synukleinopathie im h[A30P] α Syn transgenen Mausmodell zu erhalten.

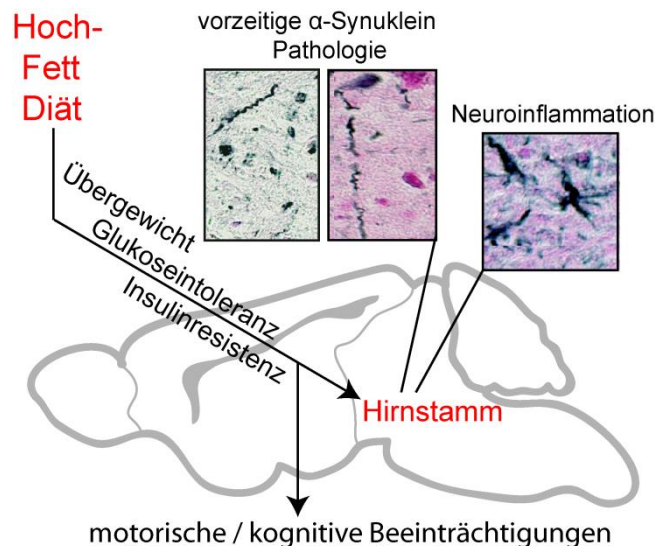


Abb. 4.1: Übersicht der Auswirkungen der HFD im untersuchten h[A30P] α Syn transgenen Mausmodell. Mit Hilfe der HFD konnten Übergewicht und beeinträchtigte Glukosetoleranz induziert werden. Ebenso zeigten sich vorzeitige motorische und kognitive Beeinträchtigungen sowie eine verfrüht Neuroinflammation und Synukleinopathie im Hirnstamm.

5 Perspektiven

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine HFD ein metabolisches Ungleichgewicht bei h[A30P] α Syn transgenen Mäusen induzieren kann. Die HFD führte außerdem zu einem verfrühten Einsetzen des bekannten Phänotyps, der mit einer vorzeitigen Ausbildung von Synukleinopathie und Astroglie im Hirnstamm einherging. Ebenso konnte eine verminderte Akt Phosphorylierung nach Fütterung der HFD im Hirnstamm nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde im Hirnstamm h[A30P] α Syn transgener Mäuse eine erhöhte GRK 5 Proteinmenge gefunden, deren Induktion allerdings unabhängig von der Diät war. Weiterhin bleiben jedoch viele interessante Fragen über die Wirkung der HFD im h[A30P] α Syn transgenen Mausmodell offen, auf die im Rahmen dieser Arbeit keine Antwort gefunden werden konnte. Diese könnten im Anschluss untersucht werden und sollen nun zum Teil diskutiert werden.

Innerhalb dieser Studie konnte ein Einfluss der HFD auf den Stoffwechsel der h[A30P] α Syn transgenen Mäuse gezeigt werden, wobei jedoch nur wenige metabolische Parameter betrachtet wurden. Da angenommen werden kann, dass Veränderungen im Metabolismus zumindest teilweise für die verfrühte Induktion der Synukleinopathie des transgenen Mausmodells verantwortlich sind, erscheinen genauere Untersuchungen solcher Parameter äußerst interessant. So könnten die Plasmaspiegel an Insulin, Leptin und FFA im Verlaufe des Alterns bestimmt werden und so ein genaueres Bild über den Einfluss der HFD auf den Stoffwechsel der h[A30P] α Syn transgenen Mäuse gewonnen werden. Zudem könnten Insulin Toleranztests Aussagen über die Entwicklung der Insulinsensitivität der Mäuse geben. Interessant wäre außerdem mehr über eine mögliche Insulinresistenz des Gehirns zu erfahren. So können Glukose, Insulin und FFA die Blut-Hirn-Schranke überqueren (Lund-Andersen, 1979; Pardridge et al., 1990; Baura et al., 1993; Banks et al., 1997a; Banks et al., 1997b; Hamilton und Brunaldi, 2007; Mitchell und Hatch, 2011) und im Rahmen dieser Arbeit konnte eine vorzeitig verminderte Akt Phosphorylierung im Hirnstamm transgener Mäuse mit HFD gezeigt werden. Der IRS – PI3K – Akt Signalweg spielt auch bei mit Insulinresistenz verbundenen Störungen der Insulin-Signaltransduktion eine entscheidende Rolle. Dementsprechend erscheint die Bestimmung der Konzentrationen der phosphorylierten IRS und IGF Proteine sowie von PI3K, die möglicherweise Rückschlüsse auf den Auslöser der vorzeitig verminderten Akt Phosphorylierung erlauben würden, sehr interessant.

Innerhalb dieser Arbeit wurde der Fokus zudem hauptsächlich auf den Einfluss der HFD auf die Synukleinopathie des Hirnstamms gelegt. Interessant wären deshalb weiterführende

Untersuchungen über die Auswirkungen auf andere Hirnregionen. So konnte nach Fütterung der HFD eine verfrühte Beeinträchtigung der h[A30P] α Syn transgenen Mäuse in der Angstkonditionierung nachgewiesen werden. Defizite dieser Art werden vor allem auf Funktionsstörungen von Amygdala und Hippocampus zurückgeführt (Killcross et al., 1997; LeDoux, 2000; Goosens und Maren, 2001; Holahan und White, 2004). Zudem konnten für h[A30P] α Syn transgene Mäuse mit SD im hohen Alter sowohl eine fortschreitende Synukleinopathie der Amygdala, als auch synaptische Ansammlungen von α Syn in den CA1 und CA3 Regionen des Hippocampus nachgewiesen werden. Weiterhin zeigen diese Mäuse eine verminderte Induktion von cFOS, einem Marker für synaptische Plastizität, sowie von PLK 2 in Amygdala und Hippocampus (Schell et al., 2012). Es stellt sich somit die Frage ob die vorzeitigen Defizite der mit HFD gefütterten transgenen Mäuse in der Angstkonditionierung auf eine verfrühte Induktion der oben genannten Parameter zurückzuführen sind, weshalb genauere Untersuchungen der Synukleinopathie von Amygdala und Hippocampus durchgeführt werden könnten. Denkbar wären aber auch andere Ursachen, die beispielsweise mit der erhöhten Menge an FFA sowie dem möglicherweise veränderten Fettsäureprofil der Gehirne h[A30P] α Syn transgener Mäuse nach Fütterung der HFD zusammenhängen könnten. Hierbei könnte die Fähigkeit von α Syn FFA und Lipide zu binden eine Rolle spielen (Sharon et al., 2001; Lucke et al., 2006; Salem et al., 2007; Auluck et al., 2010), zudem bildet A30P mutiertes α Syn in Anwesenheit von PUFAs Dimere und Oligomere aus (Perrin et al., 2001). Diese Mechanismen sind momentan jedoch in *in vivo* Modellen kaum nachweisbar, eine Erforschung erscheint dennoch äußerst spannend.

Das größte Defizit der durchgeführten Studie stellt jedoch der Mangel an Einblicken in mechanistische Hintergründe dar. So wurden im Rahmen dieser Arbeit vor allem deskriptive Aussagen getroffen, über die genaue Wirkungsweise der HFD kann jedoch nur spekuliert werden. Dementsprechend scheinen Untersuchungen, die genauere Interpretationen von mechanistischen Zusammenhängen zulassen, von besonderem Interesse.

So kann eine HFD bei Nagern beispielsweise die Morphologie des Hippocampus verändern (Granholm et al., 2008) und sowohl den mesolimbischen, als auch den nigrostriatalen Dopamin-Signalweg beeinflussen (Fulton et al., 2006; Palmiter, 2007; Davis et al., 2008b; Geiger et al., 2009). Zudem konnte durch Fütterung einer HFD ein verstärkter Verlust der Dopamin produzierenden Neurone der SN induziert werden (Choi et al., 2005; Morris et al., 2010; Bousquet et al., 2012). Diese Veränderungen standen dabei mit Beeinträchtigungen der Kognition in Verbindung. Ebenso konnten auch verminderte Konzentrationen an BDNF nach Fütterung einer HFD nachgewiesen werden, die ebenfalls mit

Defiziten der Kognition assoziiert waren (Wu et al., 2004; Stranahan et al., 2008; Pistell et al., 2010). Es scheint somit möglich, dass die HFD auch im h[A30P] α Syn transgenen Mausmodell die Dopamin-Signaltransduktion sowie die BDNF Konzentrationen beeinflusste, was aber im Rahmen der durchgeführten Arbeit nicht genauer untersucht wurde. Besonders BDNF wird jedoch bei der Erhaltung der Lernfähigkeit und der Gedächtnisfunktion speziell im alternden Gehirn eine wichtige Rolle zugeschrieben (Croll et al., 1998; Kovalchuk et al., 2002), was möglicherweise mit den vorzeitigen Beeinträchtigungen der transgenen Mäuse mit HFD in der Angstkonditionierung korrelieren könnte. Dementsprechend wären beispielsweise Messungen der BDNF-Konzentrationen in Hirnstamm und Hippocampus der h[A30P] α Syn transgenen Mäuse nach Fütterung der HFD denkbar, die weitere aufschlussreiche Ergebnisse liefern könnten.

Ebenso wird angenommen, dass oxidativer Stress und Inflammation Schlüsselrollen bei den durch eine HFD induzierten kognitiven Beeinträchtigungen spielen. Auch bei den untersuchten h[A30P] α Syn transgenen Mäusen konnte nach Fütterung der HFD eine vorzeitige Astroglie im Hirnstamm, die mit dem verfrühten Einsetzen des motorischen und kognitiven Phänotyps einherging, nachgewiesen werden. In anderen Mausmodellen korrelierten kognitive Beeinträchtigungen nach Fütterung einer HFD ebenfalls mit erhöhtem oxidativen Stress und Inflammation des Gehirns (Zhang et al., 2005; Souza et al., 2007; Pistell et al., 2010). Eine genauere Untersuchung der Rolle der Astrozyten sowie anderer Inflammationsprozesse bei der Entstehung der Synukleinopathie, speziell unter dem Einfluss der HFD, erscheint deshalb sehr interessant. So stellt sich beispielsweise die Frage, ob die Aktivierung der Astrozyten mit der Entwicklung der Synukleinopathie des Hirnstamms einhergeht oder möglicherweise sogar kurz zuvor initiiert wird. Hierfür wären Färbungen direkt vor Einsetzen der Synukleinopathie notwendig. Ebenfalls interessant wären Färbungen der Mikroglia, die Aufschluss über ihre Rolle bei der Entstehung der Synukleinopathie, gerade im Kontext der HFD, geben könnten. Ein weiterer Untersuchungsfokus könnte zusätzlich auf den Hypothalamus gelegt werden. So konnte gezeigt werden, dass eine HFD bei Nagern hypothalamische Gliose und Inflammation induzieren kann, zudem spielen Astrozyten auch bei der metabolischen Kontrolle eine wichtige Rolle (Milanski et al., 2009; Horvath et al., 2010; Thaler et al., 2012; Tomassoni et al., 2013). Langfristig erscheint auch die Generierung doppeltransgener Mäusen, die sowohl h[A30P] α Syn überexprimieren, als auch einen TLR 4 KO aufweisen, interessant. TLR 4 spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation des Immunsystems, zudem kann der TLR 4 Signalweg durch FFA sowie eine HFD aktiviert werden und Störungen im TLR 4 Signaling werden sowohl mit Übergewicht,

als auch mit Diabetes in Verbindung gebracht (Shi et al., 2006; Tsukumo et al., 2007; Milanski et al., 2009; Trotta et al., 2014). Diese doppeltransgenen Mäuse könnten somit genauere Einblicke in die Beteiligung von Astrozyten und Inflammation bei der Entstehung der Synukleinopathie, unter anderem im Kontext einer HFD, liefern.

Ein weiteres spannendes und *in vivo* noch wenig erforschtes Themengebiet stellt die Untersuchung der Kinasen dar, die für die pathologische S129- α Syn Phosphorylierung im h[A30P] α Syn transgenen Mausmodell verantwortlichen sind. So konnten im Rahmen der durchgeführten Studie eine altersabhängige Induktion und eine primär nukleäre Verteilung von GRK 5 gezeigt werden. Es fehlen jedoch Kolokalisationsversuche mit pS129- α Syn, die genauere Aussagen über die Rolle der Kinase bei der Phosphorylierung zulassen würden. Ebenso stellt sich die Frage, warum keine erhöhte GRK 5 Proteinmenge bei jüngeren h[A30P] α Syn transgenen Mäusen mit HFD, die ebenfalls eine starke S129- α Syn Phosphorylierung zeigen, nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass GRK 5 nicht primär für die pathologische Phosphorylierung von α Syn im untersuchten Mausmodell verantwortlich ist oder zumindest nicht durch die Fütterung der HFD beeinflusst wird. Dementsprechend könnten die anderen GRKs sowie die PLKs und CKs, denen ebenfalls eine Rolle bei der Phosphorylierung von α Syn zugeschrieben wird werden (Dzamko et al., 2014), im Anschluss an diese Arbeit genauer untersucht werden. So wird zum Beispiel vermutet, dass PLK 2 auch im untersuchten Mausmodell α Syn phosphorylieren kann und außerdem zu den Beeinträchtigungen der h[A30P] α Syn transgenen Mäuse in der Angstkonditionierung beiträgt (Schell et al., 2012). Es stellt sich die Frage ob diese Kinase auch für die vorzeitigen Defizite der transgenen Mäuse nach Fütterung der HFD verantwortlich ist. Ebenfalls nicht geklärt ist die Rolle der Phosphatasen, wie beispielsweise PP2A bei der Dephosphorylierung von α Syn am S129 (Peng et al., 2005; Lou et al., 2010), speziell auch im h[A30P] α Syn transgenen Mausmodell. Dementsprechend könnten Färbungen dieser Kinasen und Phosphatasen sowie Kolokalisationsversuche mit pS129- α Syn durchgeführt werden. Langfristig könnten auch doppeltransgene Mäuse, die sowohl h[A30P] α Syn überexprimieren, als auch einen KO für die einzelnen Kinasen aufweisen, genauere Einblicke in die Rolle der Enzyme bei der S129 Phosphorylierung von α Syn bringen.

6 Materialien

6.1 Chemikalien

Chemikalie	Herkunft
Acrylamid (40%) 19:1	Applichem (Darmstadt)
Alkalische Phosphatase (SAP)	Fermentas (St Leon-Rot)
Ammoniumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumperoxidisulfat	Roth (Karlsruhe)
Azetsäure	Merck (Darmstadt)
Blocklösung	Roche (Mannheim)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
Complete Proteaseinhibitorcocktail	Roche (Mannheim)
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma (München)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma (München)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol, reinst	Merck (Darmstadt)
Ethanol, vergällt	Apotheke des UKT
Ethidiumbromid (1% in ddH ₂ O)	Merck (Darmstadt)
Formaldehyd	Roth (Karlsruhe)
Glukose	Roth (Karlsruhe)
Glucosteril 50%	Fresenius Kabi GmbH (Bad-Homburg)
Glycerol	Applichem (Darmstadt)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Hoechst 33342	Invitrogen (Karlsruhe)
Hydrochloresäure (HCl)	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCl)	Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth (Karlsruhe)
Kaliumiodid	Roth (Karlsruhe)
Lipopolysaccharide	Sigma (München)
Magermilchpulver	Sucofin (Zeven)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Magnesiumsulfat	Merck (Darmstadt)
β-Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Natriumazid (NaN ₃)	Roth (Karlsruhe)
Natriumcarbonat	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl)	Applichem (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (Darmstadt)
Natriumnitrit	Merck (Darmstadt)
Natriumpyrophosphat (NaPPi)	Fluka (Schweiz)
Natriumthiosulfat	Roth (Karlsruhe)
Nuclear Fast Red	Vector Laboratories (USA)
Paraformaldehyd	Sigma (München)

Materialien

Periodsäure	Roth (Karlsruhe)
Proteinmarker	Biorad (München)
Saccharose	Roth (Karlsruhe)
Sekundärantikörper	Jackson Immunoresearch (Suffolk, GB)
Silbernitrat	Roth (Karlsruhe)
Silberiodid	Roth (Karlsruhe)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe)
Thioflavin-S	Sigma (München)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Applichem (Darmstadt)
Tris-Base	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Applichem (Darmstadt)
Wolframsäure	Fluka (Schweiz)
Tween-20	Applichem (Darmstadt)
Wasserstoffperoxid	Roth (Karlsruhe)
Xylen	Roth (Karlsruhe)
Xylencyanal	Merck (Darmstadt)
Ziegenserum	Sigma (München)

6.2 Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
Alkalines Silberiodid (Gallyas Silber Färbung)	4 g NaOH in 50 ml ddH ₂ O + 10 g Kaliumiodid + 3,5 ml 1% Silbernitrat + ddH ₂ O auf 100 ml
Ammoniumperoxidisulfat (APS), 10%	10% (w/v) Ammoniumperoxidisulfat in ddH ₂ O
Antikörperlösung	5 % Roche Blocking Solution 0,02 % Natriumazid in TBS
Blocklösung	5% (w/v) Magermilchpulver in TBST
BSA, 1%	1% (w/v) Rinderserumalbumin in PBS
Entwicklerlösung (Gallyas Silber Färbung)	Bestandslösung 1: 5% Natriumcarbonat Bestandslösung 2: 0,2 g Ammoniumnitrat + 0,2 g Silbernitrat + 1 g Wolframsäure in 100 ml H ₂ O Bestandslösung 3: 50 ml Bestandslösung 2 + 0,345 ml 37% Formaldehyd Arbeitslösung: B : A : C = 3 : 10 : 7
EtOH, 95%	95% (w/v) Ethanol in ddH ₂ O
EtOH, 75%	75% (w/v) Ethanol in ddH ₂ O
EtOH, 70%	70% (w/v) Ethanol in ddH ₂ O
H ₂ O ₂ , 0,3%	30% (w/v) H ₂ O ₂ in TBS
6x Laemmli-Puffer (SDS-Page)	375 mM Tris-HCl pH 6,8 9 % SDS 50 % Glycerol 9 % β-Mercaptoethanol 0,01 % Bromphenolblau in ddH ₂ O

Laufpuffer (SDS-Page)	25 mM Tris 193 mM Glycin 3,5 mM SDS in ddH ₂ O
Paraformaldehyd (PFA), 4%	4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS
PBS (pH 7,4) (Phosphate buffered saline)	2,2 mM KH ₂ PO ₄ 7,8 mM Na ₂ HPO ₄ 150 mM NaCl in ddH ₂ O
RIPA-Puffer (Proteinisolation)	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,1% SDS 0,5% C ₂₄ H ₃₉ O ₄ Na 1% Triton-X Complete Proteaseinhibitorcocktail
Sammelgelpuffer (SDS-Page)	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4% SDS in ddH ₂ O
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris pH 7,6 2% SDS 100 mM β-Mercaptoethanol in ddH ₂ O
TBS (Tris buffered saline)	50 mM Tris pH 7,4 150 mM NaCl in ddH ₂ O
TBST	50 mM Tris pH 7,4 150 mM NaCl 0,5% Tween-20 in ddH ₂ O
Transferpuffer (Western Blot)	25 mM Tris 192 mM Glycin in ddH ₂ O
Trenngelpuffer (SDS-Page)	1,5 M Tris-HCl pH 8,8 0,4% SDS in ddH ₂ O
Zitratpuffer (Immunhistochemie)	Lösung A: 0,1 M C ₆ H ₈ O ₇ in dd H ₂ O Lösung B: 0,1 M C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ in dd H ₂ O Arbeitslösung: 18 ml Lösung A + 82 ml Lösung B + 900 ml H ₂ O, pH > 6,0

6.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Herkunft
BD Microlance TM 3 161/2 G Kanülen	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Blot – Papier	Schleicher & Schüll (Dassel)
Deckgläschen SuperFrost Plus	Fisher Scientific (Schwerte)
Einmalpipetten	Corning (Kaiserslautern)
Einmalspritze 1 ml, 10 000 IU, Solo, Luer	Braun Melsungen AG (Melsungen)
Hochfett-Futter (45kcal% Fett) TD.06415	Harlan Laboratories (Niederlande)
Hyperfilm ECL (high performance chemiluminiscence)	GE Healthcare (Freiburg)
Objekträger	Langenbrinck (Emmendingen)
Pertex	Merck (Darmstadt)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nürnbrecht)
	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Plastik-Reaktionsgefäße (15 ml / 50 ml)	Greiner (Frickenhausen)
PVDF-Membran	Millipore (Schwalbach)
Reaktionsgefäße (1,5 ml / 2 ml)	Greiner (Frickenhausen)
Skalpell	Braun (Melsungen)
Super PAP Stift	Daido Sangyo (Japan)

6.4 Kits

Kit	Herkunft
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce (USA)
Vector Blue Alkaline Phosphatase Substrate Kit	Vector Laboratories (USA)
VECTOR SG Peroxidase Substrate Kit	Vector Laboratories (USA)
Vectastain Elite ABC Kit	Vector Laboratories (USA)
Vectastain ABC-AP Kit	Vector Laboratories (USA)

6.5 Geräte

Geräte	Herkunft
Angstkonditionierung	TSE Systems (Bad Homburg)
Autoklav VX-150	Systec (Wettenberg)
Blutglukose-Messgerät Accu-Ceck Sensor	Roche (Mannheim)
Blotkammer	Biorad (München)
CatWalk XT	Noldus (USA)
Homogenisatorgefäß nach Dounce	Kleinfled Labortechnik GmbH (Gehrden)
Gelkammer: SDS-PAGE (PerfectBlue Twin)	Peqlab (Erlangen)
Inkubator	Binder (Tuttlingen)
Küchenwaage 65105	Söhnle (Nassau)
Mikrotiterplattenphotometer (Modell 680)	Biorad (München)
Mikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss AG (Jena)
Mikrotom Microm HM355S	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Open Field	Eigenbau
Pipettierhilfe (Pipetboy)	Inegra Bioscience (Fernwald)

Präparierbesteck	FST Industries (Berlin)
Rota Rod	Roth (Karlsruhe)
Rührer (RH basic)	TSE Systems (Bad Homburg)
Schüttler (SSL3)	Roth (Karlsruhe)
	IKA (Staufen)

7 Literaturverzeichnis

- Abbott RD, Ross GW, White LR, Sanderson WT, Burchfiel CM, Kashon M, Sharp DS, Masaki KH, Curb JD, Petrovitch H (2003) Environmental, life-style, and physical precursors of clinical Parkinson's disease: recent findings from the Honolulu-Asia Aging Study. *Journal of neurology* 250 Suppl 3:III30-39.
- Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, 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.
- Aharon-Peretz J, Rosenbaum H, Gershoni-Baruch R (2004) Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *The New England journal of medicine* 351:1972-1977.
- Aizenman Y, Weichsel ME, Jr., de Vellis J (1986) Changes in insulin and transferrin requirements of pure brain neuronal cultures during embryonic development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83:2263-2266.
- Alegre-Abarrategui J, Christian H, Lufino MM, Mutihac R, Venda LL, Ansorge O, Wade-Martins R (2009) LRRK2 regulates autophagic activity and localizes to specific membrane microdomains in a novel human genomic reporter cellular model. *Human molecular genetics* 18:4022-4034.
- Alerte TN, Akinfolarin AA, Friedrich EE, Mader SA, Hong CS, Perez RG (2008) Alpha-synuclein aggregation alters tyrosine hydroxylase phosphorylation and immunoreactivity: lessons from viral transduction of knockout mice. *Neuroscience letters* 435:24-29.
- Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO journal* 15:6541-6551.
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Current biology* : CB 7:261-269.
- Allen KV, Frier BM, Strachan MW (2004) The relationship between type 2 diabetes and cognitive dysfunction: longitudinal studies and their methodological limitations. *European journal of pharmacology* 490:169-175.
- Allison DB, Fontaine KR, Manson JE, Stevens J, VanItallie TB (1999) Annual deaths attributable to obesity in the United States. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 282:1530-1538.
- Ambrose A, Levalley A, Verghese J (2006) A comparison of community-residing older adults with frontal and parkinsonian gaits. *Journal of the neurological sciences* 248:215-218.
- Anderson C, Checkoway H, Franklin GM, Beresford S, Smith-Weller T, Swanson PD (1999) Dietary factors in Parkinson's disease: the role of food groups and specific foods. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 14:21-27.
- Anderson JP, Walker DE, Goldstein JM, de Laat R, Banducci K, Caccavello RJ, Barbour R, Huang J, Kling K, Lee M, Diep L, Keim PS, Shen X, Chataway T, Schlossmacher MG, Seubert P, Schenk D, Sinha S, Gai WP, Chilcote TJ (2006) Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. *The Journal of biological chemistry* 281:29739-29752.
- Anderson JW, Kendall CW, Jenkins DJ (2003) Importance of weight management in type 2 diabetes: review with meta-analysis of clinical studies. *Journal of the American College of Nutrition* 22:331-339.
- Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq JM, Hemmings BA (1997) Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *The Journal of biological chemistry* 272:31515-31524.
- Ang LC, Bhaumick B, Juurlink BH (1993) Neurite promoting activity of insulin, insulin-like growth factor I and nerve growth factor on spinal motoneurons is astrocyte dependent. *Brain research Developmental brain research* 74:83-88.

- Ansari MA, Roberts KN, Scheff SW (2008) Oxidative stress and modification of synaptic proteins in hippocampus after traumatic brain injury. *Free radical biology & medicine* 45:443-452.
- Apetri MM, Maiti NC, Zagorski MG, Carey PR, Anderson VE (2006) Secondary structure of alpha-synuclein oligomers: characterization by raman and atomic force microscopy. *Journal of molecular biology* 355:63-71.
- Appel-Cresswell S, Vilarino-Guell C, Encarnacion M, Sherman H, Yu I, Shah B, Weir D, Thompson C, Szu-Tu C, Trinh J, Aasly JO, Rajput A, Rajput AH, Jon Stoessl A, Farrer MJ (2013) Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 28:811-813.
- Arawaka S, Wada M, Goto S, Karube H, Sakamoto M, Ren CH, Koyama S, Nagasawa H, Kimura H, Kawanami T, Kurita K, Tajima K, Daimon M, Baba M, Kido T, Saino S, Goto K, Asao H, Kitanaka C, Takashita E, Hongo S, Nakamura T, Kayama T, Suzuki Y, Kobayashi K, Katagiri T, Kurokawa K, Kurimura M, Toyoshima I, Niizato K, Tsuchiya K, Iwatsubo T, Muramatsu M, Matsumine H, Kato T (2006) The role of G-protein-coupled receptor kinase 5 in pathogenesis of sporadic Parkinson's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:9227-9238.
- Arvanitakis Z, Wilson RS, Bienias JL, Bennett DA (2007) Diabetes and parkinsonian signs in older persons. *Alzheimer disease and associated disorders* 21:144-149.
- Arvanitakis Z, Wilson RS, Bienias JL, Evans DA, Bennett DA (2004a) Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. *Archives of neurology* 61:661-666.
- Arvanitakis Z, Wilson RS, Schneider JA, Bienias JL, Evans DA, Bennett DA (2004b) Diabetes mellitus and progression of rigidity and gait disturbance in older persons. *Neurology* 63:996-1001.
- Auluck PK, Caraveo G, Lindquist S (2010) alpha-Synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annual review of cell and developmental biology* 26:211-233.
- Awad N, Gagnon M, Messier C (2004) The relationship between impaired glucose tolerance, type 2 diabetes, and cognitive function. *Journal of clinical and experimental neuropsychology* 26:1044-1080.
- Baba M, Nakajo S, Tu PH, Tomita T, Nakaya K, Lee VM, Trojanowski JQ, Iwatsubo T (1998) Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *The American journal of pathology* 152:879-884.
- Banks WA, Jaspan JB, Huang W, Kastin AJ (1997a) Transport of insulin across the blood-brain barrier: saturability at euglycemic doses of insulin. *Peptides* 18:1423-1429.
- Banks WA, Jaspan JB, Kastin AJ (1997b) Selective, physiological transport of insulin across the blood-brain barrier: novel demonstration by species-specific radioimmunoassays. *Peptides* 18:1257-1262.
- Barber AJ, Nakamura M, Wolpert EB, Reiter CE, Seigel GM, Antonetti DA, Gardner TW (2001) Insulin rescues retinal neurons from apoptosis by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-mediated mechanism that reduces the activation of caspase-3. *The Journal of biological chemistry* 276:32814-32821.
- Barbour R, Kling K, Anderson JP, Banducci K, Cole T, Diep L, Fox M, Goldstein JM, Soriano F, Seubert P, Chilcote TJ (2008) Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood. *Neuro-degenerative diseases* 5:55-59.
- Bartels T, Choi JG, Selkoe DJ (2011) alpha-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* 477:107-110.
- Bartolome A, Guillen C, Benito M (2012) Autophagy plays a protective role in endoplasmic reticulum stress-mediated pancreatic beta cell death. *Autophagy* 8:1757-1768.
- Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444:337-342.
- Baura GD, Foster DM, Porte D, Jr., Kahn SE, Bergman RN, Cobelli C, Schwartz MW (1993) Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A

- mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *The Journal of clinical investigation* 92:1824-1830.
- Beach TG, Adler CH, Lue L, Sue LI, Bachalakuri J, Henry-Watson J, Sasse J, Boyer S, Shirohi S, Brooks R, Eschbacher J, White CL, 3rd, Akiyama H, Caviness J, Shill HA, Connor DJ, Sabbagh MN, Walker DG (2009) Unified staging system for Lewy body disorders: correlation with nigrostriatal degeneration, cognitive impairment and motor dysfunction. *Acta neuropathologica* 117:613-634.
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR, Caron MG (2007) The Akt-GSK-3 signaling cascade in the actions of dopamine. *Trends in pharmacological sciences* 28:166-172.
- Becker C, Brobert GP, Johansson S, Jick SS, Meier CR (2008) Diabetes in patients with idiopathic Parkinson's disease. *Diabetes care* 31:1808-1812.
- Beraud D, Twomey M, Bloom B, Mittereder A, Ton V, Neitzke K, Chasovskikh S, Mhyre TR, Maguire-Zeiss KA (2011) alpha-Synuclein Alters Toll-Like Receptor Expression. *Frontiers in neuroscience* 5:80.
- Berg D, Schweitzer KJ, Leitner P, Zimprich A, Lichtner P, Belcredi P, Brussel T, Schulte C, Maass S, Nagele T, Wszolek ZK, Gasser T (2005) Type and frequency of mutations in the LRRK2 gene in familial and sporadic Parkinson's disease*. *Brain : a journal of neurology* 128:3000-3011.
- Bergeron M, Motter R, Tanaka P, Fauss D, Babcock M, Chiou SS, Nelson S, San Pablo F, Anderson JP (2014) In vivo modulation of polo-like kinases supports a key role for PLK2 in Ser129 alpha-synuclein phosphorylation in mouse brain. *Neuroscience* 256:72-82.
- 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. *Journal of the neurological sciences* 20:415-455.
- Berryman DE, Christiansen JS, Johannsson G, Thorner MO, Kopchick JJ (2008) Role of the GH/IGF-1 axis in lifespan and healthspan: lessons from animal models. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 18:455-471.
- Beyer K, Ariza A (2013) alpha-Synuclein posttranslational modification and alternative splicing as a trigger for neurodegeneration. *Molecular neurobiology* 47:509-524.
- Bhak G, Lee JH, Hahn JS, Paik SR (2009) Granular assembly of alpha-synuclein leading to the accelerated amyloid fibril formation with shear stress. *PloS one* 4:e4177.
- Bhardwaj SK, Sharma P, Kaur G (1998) Alterations in free radical scavenger system profile of type I diabetic rat brain. *Molecular and chemical neuropathology / sponsored by the International Society for Neurochemistry and the World Federation of Neurology and research groups on neurochemistry and cerebrospinal fluid* 35:187-202.
- Biere AL, Wood SJ, Wypych J, Steavenson S, Jiang Y, Anafi D, Jacobsen FW, Jarosinski MA, Wu GM, Louis JC, Martin F, Narhi LO, Citron M (2000) Parkinson's disease-associated alpha-synuclein is more fibrillogenic than beta- and gamma-synuclein and cannot cross-seed its homologs. *The Journal of biological chemistry* 275:34574-34579.
- Bisaglia M, Mammi S, Bubacco L (2009) Structural insights on physiological functions and pathological effects of alpha-synuclein. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23:329-340.
- Blevins JE, Baskin DG (2010) Hypothalamic-brainstem circuits controlling eating. *Forum of nutrition* 63:133-140.
- Block ML, Hong JS (2007) Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity. *Biochemical Society transactions* 35:1127-1132.
- Blok WL, Katan MB, van der Meer JW (1996) Modulation of inflammation and cytokine production by dietary (n-3) fatty acids. *The Journal of nutrition* 126:1515-1533.
- Boden G, Chen X, Ruiz J, White JV, Rossetti L (1994) Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *The Journal of clinical investigation* 93:2438-2446.
- Bodner CR, Maltsev AS, Dobson CM, Bax A (2010) Differential phospholipid binding of alpha-synuclein variants implicated in Parkinson's disease revealed by solution NMR spectroscopy. *Biochemistry* 49:862-871.
- Bonafe M, Barbieri M, Marchegiani F, Olivieri F, Ragno E, Giampieri C, Mugianesi E, Centurelli M, Franceschi C, Paolisso G (2003) Polymorphic variants of insulin-like growth factor I (IGF-I)

- receptor and phosphoinositide 3-kinase genes affect IGF-I plasma levels and human longevity: cues for an evolutionarily conserved mechanism of life span control. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88:3299-3304.
- Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P (2003) Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science (New York, NY)* 299:256-259.
- Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseume E, Chauvin MA, Morio B, Vidal H, Rieusset J (2008) Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *The Journal of clinical investigation* 118:789-800.
- Bosco D, Plastino M, Cristiano D, Colica C, Ermio C, De Bartolo M, Mungari P, Fonte G, Consoli D, Consoli A, Fava A (2012) Dementia is associated with insulin resistance in patients with Parkinson's disease. *Journal of the neurological sciences* 315:39-43.
- Bourgeois F, Alexiu A, Lemonnier D (1983) Dietary-induced obesity: effect of dietary fats on adipose tissue cellularity in mice. *The British journal of nutrition* 49:17-26.
- Bousquet M, St-Amour I, Vandal M, Julien P, Cicchetti F, Calon F (2012) High-fat diet exacerbates MPTP-induced dopaminergic degeneration in mice. *Neurobiology of disease* 45:529-538.
- Braak H, Del Tredici K, Bratzke H, Hamm-Clement J, Sandmann-Keil D, Rub U (2002) Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *Journal of neurology* 249 Suppl 3:III/1-5.
- Braak H, Sastre M, Del Tredici K (2007) Development of alpha-synuclein immunoreactive astrocytes in the forebrain parallels stages of intraneuronal pathology in sporadic Parkinson's disease. *Acta neuropathologica* 114:231-241.
- Broersen K, van den Brink D, Fraser G, Goedert M, Davletov B (2006) Alpha-synuclein adopts an alpha-helical conformation in the presence of polyunsaturated fatty acids to hinder micelle formation. *Biochemistry* 45:15610-15616.
- Brogard J, Sieracki E, Gao T, Newton AC (2007) PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Molecular cell* 25:917-931.
- Bruce-Keller AJ, Keller JN, Morrison CD (2009) Obesity and vulnerability of the CNS. *Biochimica et biophysica acta* 1792:395-400.
- Bruning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Horsch D, Accili D, Goodyear LJ, Kahn CR (1998) A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Molecular cell* 2:559-569.
- Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM (2002) Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 61:1013-1021.
- Burke RE (2007) Inhibition of mitogen-activated protein kinase and stimulation of Akt kinase signaling pathways: Two approaches with therapeutic potential in the treatment of neurodegenerative disease. *Pharmacology & therapeutics* 114:261-277.
- Burre J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Sudhof TC (2010) Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science (New York, NY)* 329:1663-1667.
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC (2003) Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52:102-110.
- Cabin DE, Shimazu K, Murphy D, Cole NB, Gottschalk W, McIlwain KL, Orrison B, Chen A, Ellis CE, Paylor R, Lu B, Nussbaum RL (2002) Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:8797-8807.
- Cai D (2013) Neuroinflammation and neurodegeneration in overnutrition-induced diseases. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 24:40-47.
- Campbell BC, McLean CA, Culvenor JG, Gai WP, Blumbergs PC, Jakala P, Beyreuther K, Masters CL, Li QX (2001) The solubility of alpha-synuclein in multiple system atrophy differs from

- that of dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* 76:87-96.
- Carpentier PA, Begolka WS, Olson JK, Elhofy A, Karpus WJ, Miller SD (2005) Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. *Glia* 49:360-374.
- Caughey B, Lansbury PT (2003) Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annual review of neuroscience* 26:267-298.
- Cereda E, Barichella M, Cassani E, Caccialanza R, Pezzoli G (2012) Clinical features of Parkinson disease when onset of diabetes came first: A case-control study. *Neurology* 78:1507-1511.
- Chandra S, Chen X, Rizo J, Jahn R, Sudhof TC (2003) A broken alpha-helix in folded alpha-Synuclein. *The Journal of biological chemistry* 278:15313-15318.
- Chandra S, Gallardo G, Fernandez-Chacon R, Schluter OM, Sudhof TC (2005) Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell* 123:383-396.
- Charles M, Ejksjaer N, Witte DR, Borch-Johnsen K, Lauritzen T, Sandbaek A (2011) Prevalence of neuropathy and peripheral arterial disease and the impact of treatment in people with screen-detected type 2 diabetes: the ADDITION-Denmark study. *Diabetes care* 34:2244-2249.
- Chartier-Harlin MC, Dachsel JC, Vilarino-Guell C, Lincoln SJ, LePrete F, Hulihan MM, Kachergus J, Milnerwood AJ, Tapia L, Song MS, Le Rhun E, Mutez E, Larvor L, Duflot A, Vanbesien-Mailliot C, Kreisler A, Ross OA, Nishioka K, Soto-Ortolaza AI, Cobb SA, Melrose HL, Behrouz B, Keeling BH, Bacon JA, Hentati E, Williams L, Yanagiya A, Sonenberg N, Lockhart PJ, Zubair AC, Uitti RJ, Aasly JO, Krygowska-Wajs A, Opala G, Wszolek ZK, Frigerio R, Maraganore DM, Gosal D, Lynch T, Hutchinson M, Bentivoglio AR, Valente EM, Nichols WC, Pankratz N, Foroud T, Gibson RA, Hentati F, Dickson DW, Destee A, Farrer MJ (2011) Translation initiator EIF4G1 mutations in familial Parkinson disease. *American journal of human genetics* 89:398-406.
- Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, Waucquier N, Defebvre L, Amouyel P, Farrer M, Destee A (2004) Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364:1167-1169.
- Chen CT, Green JT, Orr SK, Bazinet RP (2008a) Regulation of brain polyunsaturated fatty acid uptake and turnover. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 79:85-91.
- Chen H, O'Reilly EJ, Schwarzschild MA, Ascherio A (2008b) Peripheral inflammatory biomarkers and risk of Parkinson's disease. *American journal of epidemiology* 167:90-95.
- Chen H, Zhang SM, Hernan MA, Willett WC, Ascherio A (2003) Dietary intakes of fat and risk of Parkinson's disease. *American journal of epidemiology* 157:1007-1014.
- Chen L, Periquet M, Wang X, Negro A, McLean PJ, Hyman BT, Feany MB (2009) Tyrosine and serine phosphorylation of alpha-synuclein have opposing effects on neurotoxicity and soluble oligomer formation. *The Journal of clinical investigation* 119:3257-3265.
- Chesselet MF (2008) In vivo alpha-synuclein overexpression in rodents: a useful model of Parkinson's disease? *Experimental neurology* 209:22-27.
- Choi BK, Choi MG, Kim JY, Yang Y, Lai Y, Kweon DH, Lee NK, Shin YK (2013) Large alpha-synuclein oligomers inhibit neuronal SNARE-mediated vesicle docking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:4087-4092.
- Choi JY, Jang EH, Park CS, Kang JH (2005) Enhanced susceptibility to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity in high-fat diet-induced obesity. *Free radical biology & medicine* 38:806-816.
- Ciechanover A (2005) Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nature reviews Molecular cell biology* 6:79-87.
- Cole NB, Murphy DD, Grider T, Rueter S, Brasaemle D, Nussbaum RL (2002) Lipid droplet binding and oligomerization properties of the Parkinson's disease protein alpha-synuclein. *The Journal of biological chemistry* 277:6344-6352.
- Colin E, Regulier E, Perrin V, Durr A, Brice A, Aebischer P, Deglon N, Humbert S, Saudou F (2005) Akt is altered in an animal model of Huntington's disease and in patients. *The European journal of neuroscience* 21:1478-1488.

- Connell E, Darios F, Broersen K, Gatsby N, Peak-Chew SY, Rickman C, Davletov B (2007) Mechanism of arachidonic acid action on syntaxin-Munc18. *EMBO reports* 8:414-419.
- Conway KA, Harper JD, Lansbury PT (1998) Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nature medicine* 4:1318-1320.
- Conway KA, Harper JD, Lansbury PT, Jr. (2000a) Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry* 39:2552-2563.
- Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Williamson RE, Lansbury PT, Jr. (2000b) 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:571-576.
- Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R (1969) Modification of Parkinsonism--chronic treatment with L-dopa. *The New England journal of medicine* 280:337-345.
- Covy JP, Yuan W, Waxman EA, Hurtig HI, Van Deerlin VM, Giasson BI (2009) Clinical and pathological characteristics of patients with leucine-rich repeat kinase-2 mutations. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 24:32-39.
- Craft S (2005) Insulin resistance and cognitive impairment: a view through the prism of epidemiology. *Archives of neurology* 62:1043-1044.
- Croll SD, Ip NY, Lindsay RM, Wiegand SJ (1998) Expression of BDNF and trkB as a function of age and cognitive performance. *Brain research* 812:200-208.
- Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D (2004) Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science (New York, NY)* 305:1292-1295.
- Czlonkowska A, Kohutnicka M, Kurkowska-Jastrzebska I, Czlonkowski A (1996) Microglial reaction in MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) induced Parkinson's disease mice model. *Neurodegeneration : a journal for neurodegenerative disorders, neuroprotection, and neuroregeneration* 5:137-143.
- D'Amelio M, Ragonese P, Callari G, Di Benedetto N, Palmeri B, Terruso V, Salemi G, Famoso G, Aridon P, Savettieri G (2009) Diabetes preceding Parkinson's disease onset. A case-control study. *Parkinsonism & related disorders* 15:660-664.
- D'Ercole AJ (1993) Expression of insulin-like growth factor-I in transgenic mice. *Annals of the New York Academy of Sciences* 692:149-160.
- Dalfo E, Barrachina M, Rosa JL, Ambrosio S, Ferrer I (2004) Abnormal alpha-synuclein interactions with rab3a and rabphilin in diffuse Lewy body disease. *Neurobiology of disease* 16:92-97.
- Damier P, Hirsch EC, Zhang P, Agid Y, Javoy-Agid F (1993) Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience* 52:1-6.
- Danguir J, Elghozi JL, Laude D (1984) Increased dopamine and serotonin metabolites in CSF during severe insulin-induced hypoglycemia in freely moving rats. *Neurochemistry international* 6:71-75.
- Darios F, Connell E, Davletov B (2007) Phospholipases and fatty acid signalling in exocytosis. *The Journal of physiology* 585:699-704.
- Darios F, Davletov B (2006) Omega-3 and omega-6 fatty acids stimulate cell membrane expansion by acting on syntaxin 3. *Nature* 440:813-817.
- Dauer W, Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889-909.
- Davidson MB (1979) The effect of aging on carbohydrate metabolism: a review of the English literature and a practical approach to the diagnosis of diabetes mellitus in the elderly. *Metabolism: clinical and experimental* 28:688-705.
- Davidson TL, Monnot A, Neal AU, Martin AA, Horton JJ, Zheng W (2012) The effects of a high-energy diet on hippocampal-dependent discrimination performance and blood-brain barrier integrity differ for diet-induced obese and diet-resistant rats. *Physiology & behavior* 107:26-33.
- Davidson WS, Jonas A, Clayton DF, George JM (1998) Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *The Journal of biological chemistry* 273:9443-9449.

- Davis JE, Gabler NK, Walker-Daniels J, Spurlock ME (2008a) Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obesity (Silver Spring, Md)* 16:1248-1255.
- Davis JF, Tracy AL, Schurdak JD, Tschop MH, Lipton JW, Clegg DJ, Benoit SC (2008b) Exposure to elevated levels of dietary fat attenuates psychostimulant reward and mesolimbic dopamine turnover in the rat. *Behavioral neuroscience* 122:1257-1263.
- De Franceschi G, Frare E, Pivato M, Relini A, Penco A, Greggio E, Bubacco L, Fontana A, de Laureto PP (2011) Structural and morphological characterization of aggregated species of alpha-synuclein induced by docosahexaenoic acid. *The Journal of biological chemistry* 286:22262-22274.
- de la Monte SM, Longato L, Tong M, Wands JR (2009) Insulin resistance and neurodegeneration: roles of obesity, type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis. *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)* 10:1049-1060.
- de Lau LM, Bornebroek M, Witteman JC, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM (2005) Dietary fatty acids and the risk of Parkinson disease: the Rotterdam study. *Neurology* 64:2040-2045.
- de Lau LM, Breteler MM (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet neurology* 5:525-535.
- de Luca C, Olefsky JM (2008) Inflammation and insulin resistance. *FEBS letters* 582:97-105.
- Decode Study Group (2003) Age- and sex-specific prevalences of diabetes and impaired glucose regulation in 13 European cohorts. *Diabetes care* 26:61-69.
- Del Tredici K, Rub U, De Vos RA, Bohl JR, Braak H (2002) Where does parkinson disease pathology begin in the brain? *Journal of neuropathology and experimental neurology* 61:413-426.
- den Hartog Jager WA (1969) Cytopathology of the cerebrospinal fluid examined with the sedimentation technique after Sayk. *Journal of the neurological sciences* 9:155-177.
- Deshpande M, Zheng J, Borgmann K, Persidsky R, Wu L, Schellpeper C, Ghorpade A (2005) Role of activated astrocytes in neuronal damage: potential links to HIV-1-associated dementia. *Neurotoxicity research* 7:183-192.
- Deutsche Diabetes Union H (2008) Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2008. Kirchheim&Co Gmbh Mainz.
- Dev KK, Hofele K, Barbieri S, Buchman VL, van der Putten H (2003) Part II: alpha-synuclein and its molecular pathophysiological role in neurodegenerative disease. *Neuropharmacology* 45:14-44.
- DeWitt DC, Rhoades E (2013) alpha-Synuclein can inhibit SNARE-mediated vesicle fusion through direct interactions with lipid bilayers. *Biochemistry* 52:2385-2387.
- Dexter DT, Holley AE, Flitter WD, Slater TF, Wells FR, Daniel SE, Lees AJ, Jenner P, Marsden CD (1994) Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: an HPLC and ESR study. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 9:92-97.
- Di Carlo M, Picone P, Carrotta R, Giacomazza D, San Biagio PL (2010) Insulin promotes survival of amyloid-beta oligomers neuroblastoma damaged cells via caspase 9 inhibition and Hsp70 upregulation. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010:147835.
- Di Fonzo A, Dekker MC, Montagna P, Baruzzi A, Yonova EH, Correia Guedes L, Szczerbinska A, Zhao T, Dubbel-Hulsman LO, Wouters CH, de Graaff E, Oyen WJ, Simons EJ, Breedveld GJ, Oostra BA, Horstink MW, Bonifati V (2009) FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology* 72:240-245.
- Di Fonzo A, Rohe CF, Ferreira J, Chien HF, Vacca L, Stocchi F, Guedes L, Fabrizio E, Manfredi M, Vanacore N, Goldwurm S, Breedveld G, Sampaio C, Meco G, Barbosa E, Oostra BA, Bonifati V (2005) A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. *Lancet* 365:412-415.
- Di Napoli M, Shah IM, Stewart DA (2007) Molecular pathways and genetic aspects of Parkinson's disease: from bench to bedside. *Expert review of neurotherapeutics* 7:1693-1729.
- Ding TT, Lee SJ, Rochet JC, Lansbury PT, Jr. (2002) Annular alpha-synuclein protofibrils are produced when spherical protofibrils are incubated in solution or bound to brain-derived membranes. *Biochemistry* 41:10209-10217.
- Diogenes MJ, Dias RB, Rombo DM, Vicente Miranda H, Maiolino F, Guerreiro P, Nasstrom T, Franquelim HG, Oliveira LM, Castanho MA, Lannfelt L, Bergstrom J, Ingelsson M, Quintas

- A, Sebastiao AM, Lopes LV, Outeiro TF (2012) Extracellular alpha-synuclein oligomers modulate synaptic transmission and impair LTP via NMDA-receptor activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:11750-11762.
- Dominici FP, Hauck S, Argentino DP, Bartke A, Turyn D (2002) Increased insulin sensitivity and upregulation of insulin receptor, insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 in liver of Ames dwarf mice. *The Journal of endocrinology* 173:81-94.
- Donath MY, Halban PA (2004) Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia* 47:581-589.
- Dorn GW, 2nd (2009) GRK mythology: G-protein receptor kinases in cardiovascular disease. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 87:455-463.
- Dou JT, Chen M, Dufour F, Alkon DL, Zhao WQ (2005) Insulin receptor signaling in long-term memory consolidation following spatial learning. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY)* 12:646-655.
- Driver JA, Smith A, Buring JE, Gaziano JM, Kurth T, Logroscino G (2008) Prospective cohort study of type 2 diabetes and the risk of Parkinson's disease. *Diabetes care* 31:2003-2005.
- Duarte AI, Santos MS, Seica R, de Oliveira CR (2003) Insulin affects synaptosomal GABA and glutamate transport under oxidative stress conditions. *Brain research* 977:23-30.
- Duarte AI, Santos MS, Seica R, Oliveira CR (2004) Oxidative stress affects synaptosomal gamma-aminobutyric acid and glutamate transport in diabetic rats: the role of insulin. *Diabetes* 53:2110-2116.
- Dufek M, Hamanova M, Lokaj J, Goldemund D, Rektorova I, Michalkova Z, Sheardova K, Rektor I (2009) Serum inflammatory biomarkers in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* 15:318-320.
- Dzamko N, Zhou J, Huang Y, Halliday GM (2014) Parkinson's disease-implicated kinases in the brain; insights into disease pathogenesis. *Frontiers in molecular neuroscience* 7:57.
- Ebato C, Uchida T, Arakawa M, Komatsu M, Ueno T, Komiya K, Azuma K, Hirose T, Tanaka K, Kominami E, Kawamori R, Fujitani Y, Watada H (2008) Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell metabolism* 8:325-332.
- Ehringer H, Hornykiewicz O (1960) [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klinische Wochenschrift* 38:1236-1239.
- Elias MF, Elias PK, Sullivan LM, Wolf PA, D'Agostino RB (2003) Lower cognitive function in the presence of obesity and hypertension: the Framingham heart study. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 27:260-268.
- Elias PK, Elias MF, D'Agostino RB, Cupples LA, Wilson PW, Silbershatz H, Wolf PA (1997) NIDDM and blood pressure as risk factors for poor cognitive performance. *The Framingham Study. Diabetes care* 20:1388-1395.
- Eliezer D, Kutluay E, Bussell R, Jr., Browne G (2001) Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. *Journal of molecular biology* 307:1061-1073.
- Ellis CE, Schwartzberg PL, Grider TL, Fink DW, Nussbaum RL (2001) alpha-synuclein is phosphorylated by members of the Src family of protein-tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry* 276:3879-3884.
- Elmqvist JK, Marcus JN (2003) Rethinking the central causes of diabetes. *Nature medicine* 9:645-647.
- Emmer KL, Waxman EA, Covy JP, Giasson BI (2011) E46K human alpha-synuclein transgenic mice develop Lewy-like and tau pathology associated with age-dependent, detrimental motor impairment. *The Journal of biological chemistry* 286:35104-35118.
- Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (2003) Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care* 26 Suppl 1:S5-20.
- Fallon L, Belanger CM, Corera AT, Kontogiannina M, Regan-Klapisz E, Moreau F, Voortman J, Haber M, Rouleau G, Thorarinsdottir T, Brice A, van Bergen En Henegouwen PM, Fon EA (2006) A regulated interaction with the UIM protein Eps15 implicates parkin in EGF receptor trafficking and PI(3)K-Akt signalling. *Nature cell biology* 8:834-842.

- Fares MB, Bouziad NA, Dikiy I, Mbefo MK, Jovicic A, Kiely A, Holton JL, Lee SJ, Gitler AD, Eliezer D, Lashuel HA (2014) The Novel Parkinson's Disease Linked Mutation G51D Attenuates In Vitro Aggregation and Membrane Binding of alpha-Synuclein, and Enhances its Secretion and Nuclear Localization in Cells. *Human molecular genetics*.
- Farooqui AA, Horrocks LA (1998) Lipid peroxides in the free radical pathophysiology of brain diseases. *Cellular and molecular neurobiology* 18:599-608.
- Farrar C, Houser CR, Clarke S (2005) Activation of the PI3K/Akt signal transduction pathway and increased levels of insulin receptor in protein repair-deficient mice. *Aging cell* 4:1-12.
- Fellner L, Irschick R, Schanda K, Reindl M, Klimaschewski L, Poewe W, Wenning GK, Stefanova N (2013) Toll-like receptor 4 is required for alpha-synuclein dependent activation of microglia and astroglia. *Glia* 61:349-360.
- Fellner L, Stefanova N (2013) The role of glia in alpha-synucleinopathies. *Molecular neurobiology* 47:575-586.
- Feng J, Park J, Cron P, Hess D, Hemmings BA (2004) Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry* 279:41189-41196.
- Ferrucci M, Pasquali L, Ruggieri S, Paparelli A, Fornai F (2008) Alpha-synuclein and autophagy as common steps in neurodegeneration. *Parkinsonism & related disorders* 14 Suppl 2:S180-184.
- Fessler MB, Rudel LL, Brown JM (2009) Toll-like receptor signaling links dietary fatty acids to the metabolic syndrome. *Current opinion in lipidology* 20:379-385.
- Field AE, Coakley EH, Must A, Spadano JL, Laird N, Dietz WH, Rimm E, Colditz GA (2001) Impact of overweight on the risk of developing common chronic diseases during a 10-year period. *Archives of internal medicine* 161:1581-1586.
- Finkelstein EA, Brown DS, Wrage LA, Allaire BT, Hoerger TJ (2010) Individual and aggregate years-of-life-lost associated with overweight and obesity. *Obesity (Silver Spring, Md)* 18:333-339.
- Flegal KM, Ezzati TM, Harris MI, Haynes SG, Juarez RZ, Knowler WC, Perez-Stable EJ, Stern MP (1991) Prevalence of diabetes in Mexican Americans, Cubans, and Puerto Ricans from the Hispanic Health and Nutrition Examination Survey, 1982-1984. *Diabetes care* 14:628-638.
- Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, Gail MH (2005) Excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 293:1861-1867.
- Fleming SM, Chesselet MF (2006) Behavioral phenotypes and pharmacology in genetic mouse models of Parkinsonism. *Behavioural pharmacology* 17:383-391.
- Florez JC, Hirschhorn J, Altshuler D (2003) The inherited basis of diabetes mellitus: implications for the genetic analysis of complex traits. *Annual review of genomics and human genetics* 4:257-291.
- Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB (2003) Years of life lost due to obesity. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 289:187-193.
- Forno LS (1996) Neuropathology of Parkinson's disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 55:259-272.
- Fortin DL, Nemani VM, Voglmaier SM, Anthony MD, Ryan TA, Edwards RH (2005) Neural activity controls the synaptic accumulation of alpha-synuclein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:10913-10921.
- Fortin DL, Troyer MD, Nakamura K, Kubo S, Anthony MD, Edwards RH (2004) Lipid rafts mediate the synaptic localization of alpha-synuclein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:6715-6723.
- Franceschi M, Cecchetto R, Minicucci F, Smizne S, Baio G, Canal N (1984) Cognitive processes in insulin-dependent diabetes. *Diabetes care* 7:228-231.
- Freeman LR, Granholm AC (2012) Vascular changes in rat hippocampus following a high saturated fat and cholesterol diet. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32:643-653.
- Freichel C, Neumann M, Ballard T, Muller V, Woolley M, Ozmen L, Borroni E, Kretschmar HA, Haass C, Spooen W, Kahle PJ (2007) Age-dependent cognitive decline and amygdala pathology in alpha-synuclein transgenic mice. *Neurobiology of aging* 28:1421-1435.

- Freude S, Schilbach K, Schubert M (2009) The role of IGF-1 receptor and insulin receptor signaling for the pathogenesis of Alzheimer's disease: from model organisms to human disease. *Current Alzheimer research* 6:213-223.
- Fuchs J, Nilsson C, Kachergus J, Munz M, Larsson EM, Schule B, Langston JW, Middleton FA, Ross OA, Hulihan M, Gasser T, Farrer MJ (2007) Phenotypic variation in a large Swedish pedigree due to SNCA duplication and triplication. *Neurology* 68:916-922.
- Fuchs J, Tichopad A, Golub Y, Munz M, Schweitzer KJ, Wolf B, Berg D, Mueller JC, Gasser T (2008) Genetic variability in the SNCA gene influences alpha-synuclein levels in the blood and brain. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22:1327-1334.
- Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K, Iwatsubo T (2002) alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nature cell biology* 4:160-164.
- Fukaya T, Gondaira T, Kashiyae Y, Kotani S, Ishikura Y, Fujikawa S, Kiso Y, Sakakibara M (2007) Arachidonic acid preserves hippocampal neuron membrane fluidity in senescent rats. *Neurobiology of aging* 28:1179-1186.
- Fulton S, Pissios P, Manchon RP, Stiles L, Frank L, Pothos EN, Maratos-Flier E, Flier JS (2006) Leptin regulation of the mesoaccumbens dopamine pathway. *Neuron* 51:811-822.
- Gai WP, Blumbergs PC, Geffen LB, Blessing WW (1992) Age-related loss of dorsal vagal neurons in Parkinson's disease. *Neurology* 42:2106-2111.
- Gai WP, Halliday GM, Blumbergs PC, Geffen LB, Blessing WW (1991) Substance P-containing neurons in the mesopontine tegmentum are severely affected in Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology* 114 (Pt 5):2253-2267.
- Gai WP, Yuan HX, Li XQ, Power JT, Blumbergs PC, Jensen PH (2000) In situ and in vitro study of colocalization and segregation of alpha-synuclein, ubiquitin, and lipids in Lewy bodies. *Experimental neurology* 166:324-333.
- Gammeltoft S, Fehlmann M, Van Obberghen E (1985) Insulin receptors in the mammalian central nervous system: binding characteristics and subunit structure. *Biochimie* 67:1147-1153.
- Gao HM, Kotzbauer PT, Uryu K, Leight S, Trojanowski JQ, Lee VM (2008) Neuroinflammation and oxidation/nitration of alpha-synuclein linked to dopaminergic neurodegeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:7687-7698.
- Gao Q, Horvath TL (2007) Neurobiology of feeding and energy expenditure. *Annual review of neuroscience* 30:367-398.
- Garcia-Gorostiaga I, Sierra M, Sanchez-Juan P, Ruiz-Martinez J, Gorostidi A, Gonzalez-Aramburu I, Marti-Masso JF, Berciano J, Combarros O, Infante J (2011) Genetic variation in alpha-synuclein kinases (CK-2beta and GRK-5) and risk of Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* 17:496-497.
- Garcia BG, Wei Y, Moron JA, Lin RZ, Javitch JA, Galli A (2005) Akt is essential for insulin modulation of amphetamine-induced human dopamine transporter cell-surface redistribution. *Molecular pharmacology* 68:102-109.
- Gasa R, Gomis R, Casamitjana R, Novials A (2001) High glucose concentration favors the selective secretion of islet amyloid polypeptide through a constitutive secretory pathway in human pancreatic islets. *Pancreas* 22:307-310.
- Gasser T, Muller-Myhsok B, Wszolek ZK, Oehlmann R, Calne DB, Bonifati V, Bereznoi B, Fabrizio E, Vieregge P, Horstmann RD (1998) A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nature genetics* 18:262-265.
- Geiger BM, Haburcak M, Avena NM, Moyer MC, Hoebel BG, Pothos EN (2009) Deficits of mesolimbic dopamine neurotransmission in rat dietary obesity. *Neuroscience* 159:1193-1199.
- Geng X, Lou H, Wang J, Li L, Swanson AL, Sun M, Beers-Stolz D, Watkins S, Perez RG, Drain P (2011) alpha-Synuclein binds the K(ATP) channel at insulin-secretory granules and inhibits insulin secretion. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 300:E276-286.
- George JM (2002) The synucleins. *Genome biology* 3:REVIEWS3002.

- Gerhard A, Pavese N, Hotton G, Turkheimer F, Es M, Hammers A, Eggert K, Oertel W, Banati RB, Brooks DJ (2006) In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiology of disease* 21:404-412.
- Gesta S, Tseng YH, Kahn CR (2007) Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131:242-256.
- Ghosh D, Mondal M, Mohite GM, Singh PK, Ranjan P, Anoop A, Ghosh S, Jha NN, Kumar A, Maji SK (2013) The Parkinson's disease-associated H50Q mutation accelerates alpha-Synuclein aggregation in vitro. *Biochemistry* 52:6925-6927.
- Giasson BI, Duda JE, Quinn SM, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VM (2002) Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. *Neuron* 34:521-533.
- Giasson BI, Murray IV, Trojanowski JQ, Lee VM (2001) A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *The Journal of biological chemistry* 276:2380-2386.
- Gitler AD, Bevis BJ, Shorter J, Strathearn KE, Hamamichi S, Su LJ, Caldwell KA, Caldwell GA, Rochet JC, McCaffery JM, Barlowe C, Lindquist S (2008) The Parkinson's disease protein alpha-synuclein disrupts cellular Rab homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:145-150.
- Gloyn AL (2003) The search for type 2 diabetes genes. *Ageing research reviews* 2:111-127.
- Goker-Alpan O, Stubblefield BK, Giasson BI, Sidransky E (2010) Glucocerebrosidase is present in alpha-synuclein inclusions in Lewy body disorders. *Acta neuropathologica* 120:641-649.
- Goldberg MS, Lansbury PT, Jr. (2000) Is there a cause-and-effect relationship between alpha-synuclein fibrillization and Parkinson's disease? *Nature cell biology* 2:E115-119.
- Golovko MY, Rosenberger TA, Feddersen S, Faergeman NJ, Murphy EJ (2007) Alpha-synuclein gene ablation increases docosahexaenoic acid incorporation and turnover in brain phospholipids. *Journal of neurochemistry* 101:201-211.
- Gomez-Isla T, Irizarry MC, Mariash A, Cheung B, Soto O, Schrupp S, Sondel J, Kotilinek L, Day J, Schwarzschild MA, Cha JH, Newell K, Miller DW, Ueda K, Young AB, Hyman BT, Ashe KH (2003) Motor dysfunction and gliosis with preserved dopaminergic markers in human alpha-synuclein A30P transgenic mice. *Neurobiology of aging* 24:245-258.
- Gomez-Tortosa E, Newell K, Irizarry MC, Sanders JL, Hyman BT (2000) alpha-Synuclein immunoreactivity in dementia with Lewy bodies: morphological staging and comparison with ubiquitin immunostaining. *Acta neuropathologica* 99:352-357.
- Goosens KA, Maren S (2001) Contextual and auditory fear conditioning are mediated by the lateral, basal, and central amygdaloid nuclei in rats. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY)* 8:148-155.
- Graham TE, Yang Q, Bluher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, Wason CJ, Oberbach A, Jansson PA, Smith U, Kahn BB (2006) Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *The New England journal of medicine* 354:2552-2563.
- Granholt AC, Bimonte-Nelson HA, Moore AB, Nelson ME, Freeman LR, Sambamurti K (2008) Effects of a saturated fat and high cholesterol diet on memory and hippocampal morphology in the middle-aged rat. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 14:133-145.
- Greenfield JG, Bosanquet FD (1953) The brain-stem lesions in Parkinsonism. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 16:213-226.
- Greenwood CE, Winocur G (1996) Cognitive impairment in rats fed high-fat diets: a specific effect of saturated fatty-acid intake. *Behavioral neuroscience* 110:451-459.
- Gregg EW, Yaffe K, Cauley JA, Rolka DB, Blackwell TL, Narayan KM, Cummings SR (2000) Is diabetes associated with cognitive impairment and cognitive decline among older women? Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Archives of internal medicine* 160:174-180.
- Griffin RJ, Moloney A, Kelliher M, Johnston JA, Ravid R, Dockery P, O'Connor R, O'Neill C (2005) Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. *Journal of neurochemistry* 93:105-117.

- Griffioen KJ, Rothman SM, Ladenheim B, Wan R, Vranis N, Hutchison E, Okun E, Cadet JL, Mattson MP (2013) Dietary energy intake modifies brainstem autonomic dysfunction caused by mutant alpha-synuclein. *Neurobiology of aging* 34:928-935.
- Grill HJ, Ginsberg AB, Seeley RJ, Kaplan JM (1998) Brainstem application of melanocortin receptor ligands produces long-lasting effects on feeding and body weight. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18:10128-10135.
- Grinberg LT, Rueb U, Alho AT, Heinsen H (2010) Brainstem pathology and non-motor symptoms in PD. *Journal of the neurological sciences* 289:81-88.
- Groop L, Forsblom C, Lehtovirta M, Tuomi T, Karanko S, Nissen M, Ehrnstrom BO, Forsen B, Isomaa B, Snickars B, Taskinen MR (1996) Metabolic consequences of a family history of NIDDM (the Botnia study): evidence for sex-specific parental effects. *Diabetes* 45:1585-1593.
- Gu XL, Long CX, Sun L, Xie C, Lin X, Cai H (2010) Astrocytic expression of Parkinson's disease-related A53T alpha-synuclein causes neurodegeneration in mice. *Molecular brain* 3:12.
- Guerrero E, Vasudevaraju P, Hegde ML, Britton GB, Rao KS (2013) Recent advances in alpha-synuclein functions, advanced glycation, and toxicity: implications for Parkinson's disease. *Molecular neurobiology* 47:525-536.
- Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, Brown M, Fitzgerald KJ, Sabatini DM (2006) Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Developmental cell* 11:859-871.
- Haas RH, Nasirian F, Nakano K, Ward D, Pay M, Hill R, Shults CW (1995) Low platelet mitochondrial complex I and complex II/III activity in early untreated Parkinson's disease. *Annals of neurology* 37:714-722.
- Haj-ali V, Mohaddes G, Babri SH (2009) Intracerebroventricular insulin improves spatial learning and memory in male Wistar rats. *Behavioral neuroscience* 123:1309-1314.
- Halliday GM, Li YW, Blumbergs PC, Joh TH, Cotton RG, Howe PR, Blessing WW, Geffen LB (1990) Neuropathology of immunohistochemically identified brainstem neurons in Parkinson's disease. *Annals of neurology* 27:373-385.
- Halliday GM, Stevens CH (2011) Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 26:6-17.
- Hamilton JA, Brunaldi K (2007) A model for fatty acid transport into the brain. *Journal of molecular neuroscience : MN* 33:12-17.
- Hamza TH, Zabetian CP, Tenesa A, Laederach A, Montimurro J, Yearout D, Kay DM, Doheny KF, Paschall J, Pugh E, Kusel VI, Collura R, Roberts J, Griffith A, Samii A, Scott WK, Nutt J, Factor SA, Payami H (2010) Common genetic variation in the HLA region is associated with late-onset sporadic Parkinson's disease. *Nature genetics* 42:781-785.
- Hansen L (2003) Candidate genes and late-onset type 2 diabetes mellitus. Susceptibility genes or common polymorphisms? *Danish medical bulletin* 50:320-346.
- Hao LY, Giasson BI, Bonini NM (2010) DJ-1 is critical for mitochondrial function and rescues PINK1 loss of function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:9747-9752.
- Havel PJ (2001) Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)* 226:963-977.
- He Y, Appel S, Le W (2001) Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain research* 909:187-193.
- Hellenbrand W, Boeing H, Robra BP, Seidler A, Vieregge P, Nischan P, Joerg J, Oertel WH, Schneider E, Ulm G (1996) Diet and Parkinson's disease. II: A possible role for the past intake of specific nutrients. Results from a self-administered food-frequency questionnaire in a case-control study. *Neurology* 47:644-650.
- Hemmings BA, Restuccia DF (2012) PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4:a011189.
- Heneka MT, Rodriguez JJ, Verkhratsky A (2010) Neuroglia in neurodegeneration. *Brain research reviews* 63:189-211.

- Heni M, Hennige AM, Peter A, Siegel-Axel D, Ordelheide AM, Krebs N, Machicao F, Fritsche A, Haring HU, Staiger H (2011) Insulin promotes glycogen storage and cell proliferation in primary human astrocytes. *PloS one* 6:e21594.
- Hershey T, Craft S, Bhargava N, White NH (1997) Memory and insulin dependent diabetes mellitus (IDDM): effects of childhood onset and severe hypoglycemia. *Journal of the International Neuropsychological Society : JINS* 3:509-520.
- Hicks AA, Petursson H, Jonsson T, Stefansson H, Johannsdottir HS, Sainz J, Frigge ML, Kong A, Gulcher JR, Stefansson K, Sveinbjornsdottir S (2002) A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Annals of neurology* 52:549-555.
- Hill JM, Lesniak MA, Pert CB, Roth J (1986) Autoradiographic localization of insulin receptors in rat brain: prominence in olfactory and limbic areas. *Neuroscience* 17:1127-1138.
- Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420:333-336.
- Hirsch EC, Graybiel AM, Duyckaerts C, Javoy-Agid F (1987) Neuronal loss in the pedunculopontine tegmental nucleus in Parkinson disease and in progressive supranuclear palsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84:5976-5980.
- Hirsch EC, Hunot S (2009) Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet neurology* 8:382-397.
- Hoffman-Zacharska D, Kozirowski D, Ross OA, Milewski M, Poznanski J, Jurek M, Wszolek ZK, Soto-Ortolaza A, Slawek J, Janik P, Jamrozik Z, Potulska-Chromik A, Jasinska-Myga B, Opala G, Krygowska-Wajs A, Czyzewski K, Dickson DW, Bal J, Friedman A (2013) Novel A18T and pA29S substitutions in alpha-synuclein may be associated with sporadic Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* 19:1057-1060.
- Holahan MR, White NM (2004) Amygdala inactivation blocks expression of conditioned memory modulation and the promotion of avoidance and freezing. *Behavioral neuroscience* 118:24-35.
- Holzenberger M (2004) The GH/IGF-I axis and longevity. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 151 Suppl 1:S23-27.
- Hong DP, Han S, Fink AL, Uversky VN (2011) Characterization of the non-fibrillar alpha-synuclein oligomers. *Protein and peptide letters* 18:230-240.
- Hornykiewicz O (2008) Basic research on dopamine in Parkinson's disease and the discovery of the nigrostriatal dopamine pathway: the view of an eyewitness. *Neuro-degenerative diseases* 5:114-117.
- Horvath TL, Peyron C, Diano S, Ivanov A, Aston-Jones G, Kilduff TS, van Den Pol AN (1999) Hypocretin (orexin) activation and synaptic innervation of the locus coeruleus noradrenergic system. *The Journal of comparative neurology* 415:145-159.
- Horvath TL, Sarman B, Garcia-Caceres C, Enriori PJ, Sotonyi P, Shanabrough M, Borok E, Argente J, Chowen JA, Perez-Tilve D, Pfluger PT, Bronneke HS, Levin BE, Diano S, Cowley MA, Tschop MH (2010) Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:14875-14880.
- Hotamisligil GS (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444:860-867.
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM (1995) Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 95:2409-2415.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science (New York, NY)* 259:87-91.
- Howlett KF, Sakamoto K, Garnham A, Cameron-Smith D, Hargreaves M (2007) Resistance exercise and insulin regulate AS160 and interaction with 14-3-3 in human skeletal muscle. *Diabetes* 56:1608-1614.
- Hu FB (2003) Sedentary lifestyle and risk of obesity and type 2 diabetes. *Lipids* 38:103-108.
- Hu G, Jousilahti P, Bidel S, Antikainen R, Tuomilehto J (2007) Type 2 diabetes and the risk of Parkinson's disease. *Diabetes care* 30:842-847.
- Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debre P, Agid Y, Dugas B, Hirsch EC (1999) FcepsilonR2/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro,

- production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:3440-3447.
- Hwang LL, Wang CH, Li TL, Chang SD, Lin LC, Chen CP, Chen CT, Liang KC, Ho IK, Yang WS, Chiou LC (2010) Sex differences in high-fat diet-induced obesity, metabolic alterations and learning, and synaptic plasticity deficits in mice. *Obesity (Silver Spring, Md)* 18:463-469.
- Ibanez P, Lesage S, Janin S, Lohmann E, Durif F, Destee A, Bonnet AM, Brefel-Courbon C, Heath S, Zelenika D, Agid Y, Durr A, Brice A (2009) Alpha-synuclein gene rearrangements in dominantly inherited parkinsonism: frequency, phenotype, and mechanisms. *Archives of neurology* 66:102-108.
- Inglis KJ, Chereau D, Brigham EF, Chiou SS, Schobel S, Frigon NL, Yu M, Caccavello RJ, Nelson S, Motter R, Wright S, Chian D, Santiago P, Soriano F, Ramos C, Powell K, Goldstein JM, Babcock M, Yednock T, Bard F, Basi GS, Sham H, Chilcote TJ, McConlogue L, Griswold-Prenner I, Anderson JP (2009) Polo-like kinase 2 (PLK2) phosphorylates alpha-synuclein at serine 129 in central nervous system. *The Journal of biological chemistry* 284:2598-2602.
- Ishii A, Nonaka T, Taniguchi S, Saito T, Arai T, Mann D, Iwatsubo T, Hisanaga S, Goedert M, Hasegawa M (2007) Casein kinase 2 is the major enzyme in brain that phosphorylates Ser129 of human alpha-synuclein: Implication for alpha-synucleinopathies. *FEBS letters* 581:4711-4717.
- Issa AM, Mojica WA, Morton SC, Traina S, Newberry SJ, Hilton LG, Garland RH, Maclean CH (2006) The efficacy of omega-3 fatty acids on cognitive function in aging and dementia: a systematic review. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 21:88-96.
- Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, Ge N, Flanagan L, de Silva HA, Kittel A, Saitoh T (1995) The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* 14:467-475.
- Jain D, Jain R, Eberhard D, Eglinger J, Bugliani M, Piemonti L, Marchetti P, Lammert E (2012) Age- and diet-dependent requirement of DJ-1 for glucose homeostasis in mice with implications for human type 2 diabetes. *Journal of molecular cell biology* 4:221-230.
- Jankovic J (2008) Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 79:368-376.
- Jellinger K (1988) The pedunculopontine nucleus in Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 51:540-543.
- Jellinger KA (2012) Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: evaluation and changes of concepts. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 27:8-30.
- Jialal I, Kaur H, Devaraj S (2014) Toll-like receptor status in obesity and metabolic syndrome: a translational perspective. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 99:39-48.
- Jin W, Patti ME (2009) Genetic determinants and molecular pathways in the pathogenesis of Type 2 diabetes. *Clinical science (London, England : 1979)* 116:99-111.
- Jo E, McLaurin J, Yip CM, St George-Hyslop P, Fraser PE (2000) alpha-Synuclein membrane interactions and lipid specificity. *The Journal of biological chemistry* 275:34328-34334.
- Johnson CC, Gorell JM, Rybicki BA, Sanders K, Peterson EL (1999) Adult nutrient intake as a risk factor for Parkinson's disease. *International journal of epidemiology* 28:1102-1109.
- Johnson LR, Scott MG, Pitcher JA (2004) G protein-coupled receptor kinase 5 contains a DNA-binding nuclear localization sequence. *Molecular and cellular biology* 24:10169-10179.
- Joseph JA, Denisova N, Fisher D, Bickford P, Prior R, Cao G (1998) Age-related neurodegeneration and oxidative stress: putative nutritional intervention. *Neurologic clinics* 16:747-755.
- Jovanovic JN, Czernik AJ, Fienberg AA, Greengard P, Sihra TS (2000) Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nature neuroscience* 3:323-329.
- Kahle PJ (2008) alpha-Synucleinopathy models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta neuropathologica* 115:87-95.
- Kahle PJ, Neumann M, Ozmen L, Muller V, Jacobsen H, Schindzielorz A, Okochi M, Leimer U, van Der Putten H, Probst A, Kremmer E, Kretzschmar HA, Haass C (2000) Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha-synuclein in human and transgenic mouse brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:6365-6373.

- Kamat CD, Gadal S, Mhatre M, Williamson KS, Pye QN, Hensley K (2008) Antioxidants in central nervous system diseases: preclinical promise and translational challenges. *Journal of Alzheimer's disease* : JAD 15:473-493.
- Kamel F, Goldman SM, Umbach DM, Chen H, Richardson G, Barber MR, Meng C, Marras C, Korell M, Kasten M, Hoppin JA, Comyns K, Chade A, Blair A, Bhudhikanok GS, Webster Ross G, William Langston J, Sandler DP, Tanner CM (2014) Dietary fat intake, pesticide use, and Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* 20:82-87.
- Kanoski SE, Zhang Y, Zheng W, Davidson TL (2010) The effects of a high-energy diet on hippocampal function and blood-brain barrier integrity in the rat. *Journal of Alzheimer's disease* : JAD 21:207-219.
- Karlsson HK, Zierath JR, Kane S, Krook A, Lienhard GE, Wallberg-Henriksson H (2005) Insulin-stimulated phosphorylation of the Akt substrate AS160 is impaired in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 54:1692-1697.
- Karpinar DP, Baliya MB, Kugler S, Opazo F, Rezaei-Ghaleh N, Wender N, Kim HY, Taschenberger G, Falkenburger BH, Heise H, Kumar A, Riedel D, Fichtner L, Voigt A, Braus GH, Giller K, Becker S, Herzig A, Baldus M, Jackle H, Eimer S, Schulz JB, Griesinger C, Zweckstetter M (2009) Pre-fibrillar alpha-synuclein variants with impaired beta-structure increase neurotoxicity in Parkinson's disease models. *The EMBO journal* 28:3256-3268.
- Kasuga M (2006) Insulin resistance and pancreatic beta cell failure. *The Journal of clinical investigation* 116:1756-1760.
- Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* 11:373-384.
- Keipert S, Voigt A, Klaus S (2011) Dietary effects on body composition, glucose metabolism, and longevity are modulated by skeletal muscle mitochondrial uncoupling in mice. *Aging cell* 10:122-136.
- Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB (2002) Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51:2944-2950.
- Killcross S, Robbins TW, Everitt BJ (1997) Different types of fear-conditioned behaviour mediated by separate nuclei within amygdala. *Nature* 388:377-380.
- Kim EJ, Sung JY, Lee HJ, Rhim H, Hasegawa M, Iwatsubo T, Min do S, Kim J, Paik SR, Chung KC (2006) Dyrk1A phosphorylates alpha-synuclein and enhances intracellular inclusion formation. *The Journal of biological chemistry* 281:33250-33257.
- Kim F, Pham M, Luttrell I, Bannerman DD, Tupper J, Thaler J, Hawn TR, Raines EW, Schwartz MW (2007) Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circulation research* 100:1589-1596.
- Kim HY, Akbar M, Kim KY (2001) Inhibition of neuronal apoptosis by polyunsaturated fatty acids. *Journal of molecular neuroscience* : MN 16:223-227; discussion 279-284.
- Kim RH, Peters M, Jang Y, Shi W, Pintilie M, Fletcher GC, DeLuca C, Liepa J, Zhou L, Snow B, Binari RC, Manoukian AS, Bray MR, Liu FF, Tsao MS, Mak TW (2005) DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer cell* 7:263-273.
- Kim TD, Paik SR, Yang CH, Kim J (2000) Structural changes in alpha-synuclein affect its chaperone-like activity in vitro. *Protein science : a publication of the Protein Society* 9:2489-2496.
- Kirik D, Bjorklund A (2003) Modeling CNS neurodegeneration by overexpression of disease-causing proteins using viral vectors. *Trends in neurosciences* 26:386-392.
- 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.
- Klegeris A, Giasson BI, Zhang H, Maguire J, Pelech S, McGeer PL (2006) Alpha-synuclein and its disease-causing mutants induce ICAM-1 and IL-6 in human astrocytes and astrocytoma cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20:2000-2008.
- Klein C, Westenberger A (2012) Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2:a008888.

- Kleinridders A, Schenten D, Konner AC, Belgardt BF, Mauer J, Okamura T, Wunderlich FT, Medzhitov R, Bruning JC (2009) MyD88 signaling in the CNS is required for development of fatty acid-induced leptin resistance and diet-induced obesity. *Cell metabolism* 10:249-259.
- Knopman D, Boland LL, Mosley T, Howard G, Liao D, Szklo M, McGovern P, Folsom AR (2001) Cardiovascular risk factors and cognitive decline in middle-aged adults. *Neurology* 56:42-48.
- Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA (1996) Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *The Journal of biological chemistry* 271:31372-31378.
- Kolterman OG, Insel J, Saekow M, Olefsky JM (1980) Mechanisms of insulin resistance in human obesity: evidence for receptor and postreceptor defects. *The Journal of clinical investigation* 65:1272-1284.
- Kotani S, Nakazawa H, Tokimasa T, Akimoto K, Kawashima H, Toyoda-Ono Y, Kiso Y, Okaichi H, Sakakibara M (2003) Synaptic plasticity preserved with arachidonic acid diet in aged rats. *Neuroscience research* 46:453-461.
- Kovacs P, Hajnal A (2009) In vivo electrophysiological effects of insulin in the rat brain. *Neuropeptides* 43:283-293.
- Kovalchuk Y, Hanse E, Kafitz KW, Konnerth A (2002) Postsynaptic Induction of BDNF-Mediated Long-Term Potentiation. *Science (New York, NY)* 295:1729-1734.
- Kriebehl G, Ruckerbauer S, Burbulla LF, Kieper N, Maurer B, Waak J, Wolburg H, Gizatullina Z, Gellerich FN, Voitalla D, Riess O, Kahle PJ, Proikas-Cezanne T, Kruger R (2010) Reduced basal autophagy and impaired mitochondrial dynamics due to loss of Parkinson's disease-associated protein DJ-1. *PLoS one* 5:e9367.
- Krolewski AS, Warram JH, Freire MB (1996) Epidemiology of late diabetic complications. A basis for the development and evaluation of preventive programs. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 25:217-242.
- Kruger R, Kuhn W, Muller T, Voitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Eppelen JT, Schols L, Riess O (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nature genetics* 18:106-108.
- Kumari M, Brunner E, Fuhrer R (2000) Minireview: mechanisms by which the metabolic syndrome and diabetes impair memory. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 55:B228-232.
- Kuusisto E, Parkkinen L, Alafuzoff I (2003) Morphogenesis of Lewy bodies: dissimilar incorporation of alpha-synuclein, ubiquitin, and p62. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 62:1241-1253.
- Langston RF, Stevenson CH, Wilson CL, Saunders I, Wood ER (2010) The role of hippocampal subregions in memory for stimulus associations. *Behavioural brain research* 215:275-291.
- Lashuel HA, Petre BM, Wall J, Simon M, Nowak RJ, Walz T, Lansbury PT, Jr. (2002) Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. *Journal of molecular biology* 322:1089-1102.
- Lautier C, Goldwurm S, Durr A, Giovannone B, Tsiras WG, Pezzoli G, Brice A, Smith RJ (2008) Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease. *American journal of human genetics* 82:822-833.
- Lavedan C (1998) The synuclein family. *Genome research* 8:871-880.
- LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annual review of neuroscience* 23:155-184.
- Lee G, Tanaka M, Park K, Lee SS, Kim YM, Junn E, Lee SH, Mouradian MM (2004) Casein kinase II-mediated phosphorylation regulates alpha-synuclein/synphilin-1 interaction and inclusion body formation. *The Journal of biological chemistry* 279:6834-6839.
- Lee HJ, Choi C, Lee SJ (2002a) Membrane-bound alpha-synuclein has a high aggregation propensity and the ability to seed the aggregation of the cytosolic form. *The Journal of biological chemistry* 277:671-678.
- Lee JK, Tran T, Tansey MG (2009) Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 4:419-429.
- Lee MK, Stirling W, Xu Y, Xu X, Qui D, Mandir AS, Dawson TM, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL (2002b) Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 -->

- Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:8968-8973.
- Leibson CL, Maraganore DM, Bower JH, Ransom JE, O'Brien P C, Rocca WA (2006) Comorbid conditions associated with Parkinson's disease: a population-based study. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 21:446-455.
- Leopold P (2004) Neuronal differentiation: TOR and insulin receptor pathways set the tempo. *Cell* 119:4-5.
- Leroy E, Boyer R, Polymeropoulos MH (1998) Intron-exon structure of ubiquitin c-terminal hydrolase-L1. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* 5:397-400.
- Lesage S, Anheim M, Letournel F, Bousset L, Honore A, Rozas N, Pieri L, Masioni K, Durr A, Melki R, Verny C, Brice A (2013) G51D alpha-synuclein mutation causes a novel Parkinsonian-pyramidal syndrome. *Annals of neurology* 73:459-471.
- Lesage S, Brice A (2009) Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Human molecular genetics* 18:R48-59.
- Levine JA, Lanningham-Foster LM, McCrady SK, Krizan AC, Olson LR, Kane PH, Jensen MD, Clark MM (2005) Interindividual variation in posture allocation: possible role in human obesity. *Science (New York, NY)* 307:584-586.
- Levy OA, Malagelada C, Greene LA (2009) Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 14:478-500.
- Li J, Tang Y, Cai D (2012) IKKbeta/NF-kappaB disrupts adult hypothalamic neural stem cells to mediate a neurodegenerative mechanism of dietary obesity and pre-diabetes. *Nature cell biology* 14:999-1012.
- Li QX, Campbell BC, McLean CA, Thyagarajan D, Gai WP, Kapsa RM, Beyreuther K, Masters CL, Culvenor JG (2002) Platelet alpha- and gamma-synucleins in Parkinson's disease and normal control subjects. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 4:309-315.
- Li Z, Bowerman S, Heber D (2005) Health ramifications of the obesity epidemic. *The Surgical clinics of North America* 85:681-701, v.
- Lim JH, Kim KM, Kim SW, Hwang O, Choi HJ (2008) Bromocriptine activates NQO1 via Nrf2-PI3K/Akt signaling: novel cytoprotective mechanism against oxidative damage. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 57:325-331.
- List EO, Berryman DE, Wright-Piekarski J, Jara A, Funk K, Kopchick JJ (2013) The effects of weight cycling on lifespan in male C57BL/6J mice. *International journal of obesity (2005)* 37:1088-1094.
- Liu JL, Coschigano KT, Robertson K, Lipsett M, Guo Y, Kopchick JJ, Kumar U, Liu YL (2004) Disruption of growth hormone receptor gene causes diminished pancreatic islet size and increased insulin sensitivity in mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 287:E405-413.
- Logroscino G, Marder K, Cote L, Tang MX, Shea S, Mayeux R (1996) Dietary lipids and antioxidants in Parkinson's disease: a population-based, case-control study. *Annals of neurology* 39:89-94.
- Lou H, Montoya SE, Alerte TN, Wang J, Wu J, Peng X, Hong CS, Friedrich EE, Mader SA, Pedersen CJ, Marcus BS, McCormack AL, Di Monte DA, Daubner SC, Perez RG (2010) Serine 129 phosphorylation reduces the ability of alpha-synuclein to regulate tyrosine hydroxylase and protein phosphatase 2A in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry* 285:17648-17661.
- Louis ED, Luchsinger JA (2006) History of vascular disease and mild parkinsonian signs in community-dwelling elderly individuals. *Archives of neurology* 63:717-722.
- Lowe J, Blanchard A, Morrell K, Lennox G, Reynolds L, Billett M, Landon M, Mayer RJ (1988) Ubiquitin is a common factor in intermediate filament inclusion bodies of diverse type in man, including those of Parkinson's disease, Pick's disease, and Alzheimer's disease, as well as Rosenthal fibres in cerebellar astrocytomas, cytoplasmic bodies in muscle, and mallory bodies in alcoholic liver disease. *The Journal of pathology* 155:9-15.

- Lozovsky D, Saller CF, Kopin IJ (1981) Dopamine receptor binding is increased in diabetic rats. *Science (New York, NY)* 214:1031-1033.
- Lozovsky DB, Kopin IJ, Saller CF (1985) Modulation of dopamine receptor supersensitivity by chronic insulin: implication in schizophrenia. *Brain research* 343:190-193.
- Lucke C, Gantz DL, Klimtchuk E, Hamilton JA (2006) Interactions between fatty acids and alpha-synuclein. *Journal of lipid research* 47:1714-1724.
- Lukiw WJ, Cui JG, Marcheselli VL, Bodker M, Botkjaer A, Gotlinger K, Serhan CN, Bazan NG (2005) A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *The Journal of clinical investigation* 115:2774-2783.
- Lund-Andersen H (1979) Transport of glucose from blood to brain. *Physiological reviews* 59:305-352.
- MacKnight C, Rockwood K, Awalt E, McDowell I (2002) Diabetes mellitus and the risk of dementia, Alzheimer's disease and vascular cognitive impairment in the Canadian Study of Health and Aging. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 14:77-83.
- Maetzler W, Berg D, Synofzik M, Brockmann K, Godau J, Melms A, Gasser T, Hornig S, Langkamp M (2011) Autoantibodies against amyloid and glial-derived antigens are increased in serum and cerebrospinal fluid of Lewy body-associated dementias. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 26:171-179.
- Mahul-Mellier AL, Fauvet B, Gysbers A, Dikiy I, Oueslati A, Georgeon S, Lamontanara AJ, Bisquertt A, Eliezer D, Masliah E, Halliday G, Hantschel O, Lashuel HA (2014) c-Abl phosphorylates alpha-synuclein and regulates its degradation: implication for alpha-synuclein clearance and contribution to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Human molecular genetics* 23:2858-2879.
- Malagelada C, Jin ZH, Greene LA (2008) RTP801 is induced in Parkinson's disease and mediates neuron death by inhibiting Akt phosphorylation/activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:14363-14371.
- Manning BD, Cantley LC (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129:1261-1274.
- Manson JE, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Krolewski AS, Rosner B, Hennekens CH, Speizer FE (1991) Physical activity and incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. *Lancet* 338:774-778.
- Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH (1988) Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 8:2804-2815.
- Martini JS, Raake P, Vinge LE, DeGeorge BR, Jr., Chuprun JK, Harris DM, Gao E, Eckhart AD, Pitcher JA, Koch WJ (2008) Uncovering G protein-coupled receptor kinase-5 as a histone deacetylase kinase in the nucleus of cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:12457-12462.
- Maskri L, Zhu X, Fritzen S, Kuhn K, Ullmer C, Engels P, Andriske M, Stichel CC, Lubbert H (2004) Influence of different promoters on the expression pattern of mutated human alpha-synuclein in transgenic mice. *Neuro-degenerative diseases* 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 (New York, NY)* 287:1265-1269.
- Mastrocola R, Restivo F, Vercellinato I, Danni O, Brignardello E, Aragno M, Boccuzzi G (2005) Oxidative and nitrosative stress in brain mitochondria of diabetic rats. *The Journal of endocrinology* 187:37-44.
- Mata IF, Shi M, Agarwal P, Chung KA, Edwards KL, Factor SA, Galasko DR, Ghingina C, Griffith A, Higgins DS, Kay DM, Kim H, Leverenz JB, Quinn JF, Roberts JW, Samii A, Snapinn KW, Tsuang DW, Yearout D, Zhang J, Payami H, Zabetian CP (2010) SNCA variant associated with Parkinson disease and plasma alpha-synuclein level. *Archives of neurology* 67:1350-1356.
- Matsuoka Y, Vila M, Lincoln S, McCormack A, Picciano M, LaFrancois J, Yu X, Dickson D, Langston WJ, McGowan E, Farrer M, Hardy J, Duff K, Przedborski S, Di Monte DA (2001) Lack of nigral pathology in transgenic mice expressing human alpha-synuclein driven by the tyrosine hydroxylase promoter. *Neurobiology of disease* 8:535-539.

- Mattson MP, Duan W, Guo Z (2003) Meal size and frequency affect neuronal plasticity and vulnerability to disease: cellular and molecular mechanisms. *Journal of neurochemistry* 84:417-431.
- Mazzulli JR, Xu YH, Sun Y, Knight AL, McLean PJ, Caldwell GA, Sidransky E, Grabowski GA, Krainc D (2011) Gaucher disease glucocerebrosidase and alpha-synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell* 146:37-52.
- Mbefo MK, Paleologou KE, Boucharaba A, Oueslati A, Schell H, Fournier M, Olschewski D, Yin G, Zweckstetter M, Masliah E, Kahle PJ, Hirling H, Lashuel HA (2010) Phosphorylation of synucleins by members of the Polo-like kinase family. *The Journal of biological chemistry* 285:2807-2822.
- McCoy MK, Cookson MR (2012) Mitochondrial quality control and dynamics in Parkinson's disease. *Antioxidants & redox signaling* 16:869-882.
- McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG (1988) Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38:1285-1291.
- McGowan MK, Andrews KM, Grossman SP (1992) Chronic intrahypothalamic infusions of insulin or insulin antibodies alter body weight and food intake in the rat. *Physiology & behavior* 51:753-766.
- McNay DE, Briancon N, Kokoeva MV, Maratos-Flier E, Flier JS (2012) Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice. *The Journal of clinical investigation* 122:142-152.
- McNay EC, Ong CT, McCrimmon RJ, Cresswell J, Bogan JS, Sherwin RS (2010) Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. *Neurobiology of learning and memory* 93:546-553.
- Melanson EL, Astrup A, Donahoo WT (2009) The relationship between dietary fat and fatty acid intake and body weight, diabetes, and the metabolic syndrome. *Annals of nutrition & metabolism* 55:229-243.
- Mena MA, Garcia de Yébenes J (2008) Glial cells as players in parkinsonism: the "good," the "bad," and the "mysterious" glia. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 14:544-560.
- Meng Q, Cai D (2011) Defective hypothalamic autophagy directs the central pathogenesis of obesity via the I κ B kinase beta (IKK β)/NF- κ B pathway. *The Journal of biological chemistry* 286:32324-32332.
- Messier C (2005) Impact of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes on cognitive aging. *Neurobiology of aging* 26 Suppl 1:26-30.
- Messier C, Desrochers A, Gagnon M (1999) Effect of glucose, glucose regulation, and word imagery value on human memory. *Behavioral neuroscience* 113:431-438.
- Metlakunta AS, Sahu M, Sahu A (2008) Hypothalamic phosphatidylinositol 3-kinase pathway of leptin signaling is impaired during the development of diet-induced obesity in FVB/N mice. *Endocrinology* 149:1121-1128.
- Michell AW, Luheshi LM, Barker RA (2005) Skin and platelet alpha-synuclein as peripheral biomarkers of Parkinson's disease. *Neuroscience letters* 381:294-298.
- Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, Tsukumo DM, Anhe G, Amaral ME, Takahashi HK, Curi R, Oliveira HC, Carvalheira JB, Bordin S, Saad MJ, Velloso LA (2009) Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:359-370.
- Mitchell RW, Hatch GM (2011) Fatty acid transport into the brain: of fatty acid fables and lipid tails. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 85:293-302.
- Mitsui J, Mizuta I, Toyoda A, Ashida R, Takahashi Y, Goto J, Fukuda Y, Date H, Iwata A, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Toda T, Tsuji S (2009) Mutations for Gaucher disease confer high susceptibility to Parkinson disease. *Archives of neurology* 66:571-576.
- Miyake Y, Tanaka K, Fukushima W, Sasaki S, Kiyohara C, Tsuboi Y, Yamada T, Oeda T, Miki T, Kawamura N, Sakae N, Fukuyama H, Hirota Y, Nagai M (2010) Case-control study of risk of Parkinson's disease in relation to hypertension, hypercholesterolemia, and diabetes in Japan. *Journal of the neurological sciences* 293:82-86.

- Mizuno T, Kuno R, Nitta A, Nabeshima T, Zhang G, Kawanokuchi J, Wang J, Jin S, Takeuchi H, Suzumura A (2005) Protective effects of nicergoline against neuronal cell death induced by activated microglia and astrocytes. *Brain research* 1066:78-85.
- Mogi M, Harada M, Kondo T, Riederer P, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T (1994) Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neuroscience letters* 180:147-150.
- Mokdad AH, Marks JS, Stroup DF, Gerberding JL (2005) Correction: actual causes of death in the United States, 2000. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 293:293-294.
- Molteni R, Barnard RJ, Ying Z, Roberts CK, Gomez-Pinilla F (2002) A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neuroscience* 112:803-814.
- Montane J, Cadavez L, Novials A (2014) Stress and the inflammatory process: a major cause of pancreatic cell death in type 2 diabetes. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy* 7:25-34.
- Moore SC, Mayne ST, Graubard BI, Schatzkin A, Albanes D, Schairer C, Hoover RN, Leitzmann MF (2008) Past body mass index and risk of mortality among women. *International journal of obesity (2005)* 32:730-739.
- Moosavi M, Maghsoudi N, Zahedi-Asl S, Naghdi N, Yousefpour M, Trounce IA (2008) The role of PI3/Akt pathway in the protective effect of insulin against corticosterone cell death induction in hippocampal cell culture. *Neuroendocrinology* 88:293-298.
- Mora A, Komander D, van Aalten DM, Alessi DR (2004) PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Seminars in cell & developmental biology* 15:161-170.
- Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman EA, Pauli JR, Romanatto T, Carvalheira JB, Oliveira AL, Saad MJ, Velloso LA (2009) High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PloS one* 4:e5045.
- More SV, Kumar H, Kim IS, Song SY, Choi DK (2013) Cellular and molecular mediators of neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Mediators of inflammation* 2013:952375.
- Moroz N, Tong M, Longato L, Xu H, de la Monte SM (2008) Limited Alzheimer-type neurodegeneration in experimental obesity and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 15:29-44.
- Morris JK, Bomhoff GL, Stanford JA, Geiger PC (2010) Neurodegeneration in an animal model of Parkinson's disease is exacerbated by a high-fat diet. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 299:R1082-1090.
- Morrish NJ, Wang SL, Stevens LK, Fuller JH, Keen H (2001) Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia* 44 Suppl 2:S14-21.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443:289-295.
- Mosley RL, Hutter-Saunders JA, Stone DK, Gendelman HE (2012) Inflammation and adaptive immunity in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2:a009381.
- Muller AP, Dietrich Mde O, Martimbianco de Assis A, Souza DO, Portela LV (2013) High saturated fat and low carbohydrate diet decreases lifespan independent of body weight in mice. *Longevity & healthspan* 2:10.
- Munshi M, Grande L, Hayes M, Ayres D, Suhl E, Capelson R, Lin S, Milberg W, Weinger K (2006) Cognitive dysfunction is associated with poor diabetes control in older adults. *Diabetes care* 29:1794-1799.
- Murphy DD, Rueter SM, Trojanowski JQ, Lee VM (2000) Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:3214-3220.
- Murray AJ, Knight NS, Cochlin LE, McAleese S, Deacon RM, Rawlins JN, Clarke K (2009) Deterioration of physical performance and cognitive function in rats with short-term high-fat feeding. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23:4353-4360.

- Murray IV, Giasson BI, Quinn SM, Koppaka V, Axelsen PH, Ischiropoulos H, Trojanowski JQ, Lee VM (2003) Role of alpha-synuclein carboxy-terminus on fibril formation in vitro. *Biochemistry* 42:8530-8540.
- Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A (2000) Cytokines in Parkinson's disease. *Journal of neural transmission Supplementum* 143-151.
- Nakai M, Fujita M, Waragai M, Sugama S, Wei J, Akatsu H, Ohtaka-Maruyama C, Okado H, Hashimoto M (2007) Expression of alpha-synuclein, a presynaptic protein implicated in Parkinson's disease, in erythropoietic lineage. *Biochemical and biophysical research communications* 358:104-110.
- Nakajo S, Shioda S, Nakai Y, Nakaya K (1994) Localization of phosphoneuroprotein 14 (PNP 14) and its mRNA expression in rat brain determined by immunocytochemistry and in situ hybridization. *Brain research Molecular brain research* 27:81-86.
- Nakamura T, Yamashita H, Takahashi T, Nakamura S (2001) Activated Fyn phosphorylates alpha-synuclein at tyrosine residue 125. *Biochemical and biophysical research communications* 280:1085-1092.
- Nalls MA, Plagnol V, Hernandez DG, Sharma M, Sheerin UM, Saad M, Simon-Sanchez J, Schulte C, Lesage S, Sveinbjornsdottir S, Stefansson K, Martinez M, Hardy J, Heutink P, Brice A, Gasser T, Singleton AB, Wood NW (2011) Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet* 377:641-649.
- Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of cell biology* 183:795-803.
- Neel JV (1999) Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? 1962. *Bulletin of the World Health Organization* 77:694-703; discussion 692-693.
- Neumann J, Bras J, Deas E, O'Sullivan SS, Parkkinen L, Lachmann RH, Li A, Holton J, Guerreiro R, Paudel R, Segarane B, Singleton A, Lees A, Hardy J, Houlden H, Revesz T, Wood NW (2009) Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology* 132:1783-1794.
- Neumann M, Kahle PJ, Giasson BI, Ozmen L, Borroni E, Spooen W, Müller V, Odoy S, Fujiwara H, Hasegawa M, Iwatsubo T, Trojanowski JQ, Kretschmar HA, Haass C (2002) Misfolded proteinase K-resistant hyperphosphorylated α -synuclein in aged transgenic mice with locomotor deterioration and in human α -synucleinopathies. *Journal of Clinical Investigation* 110:1429-1439.
- Neumann M, Muller V, Kretschmar HA, Haass C, Kahle PJ (2004) Regional distribution of proteinase K-resistant alpha-synuclein correlates with Lewy body disease stage. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 63:1225-1235.
- Nieto M, Gil-Bea FJ, Dalfo E, Cuadrado M, Cabodevilla F, Sanchez B, Catena S, Sesma T, Ribe E, Ferrer I, Ramirez MJ, Gomez-Isla T (2006) Increased sensitivity to MPTP in human alpha-synuclein A30P transgenic mice. *Neurobiology of aging* 27:848-856.
- 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 neuropathologica* 107:292-298.
- Noori-Daloi MR, Kheirollahi M, Mahbod P, Mohammadi F, Astaneh AN, Zarindast MR, Azimi C, Mohammadi MR (2010) Alpha- and beta-synucleins mRNA expression in lymphocytes of schizophrenia patients. *Genetic testing and molecular biomarkers* 14:725-729.
- Novials A, Sarri Y, Casamitjana R, Rivera F, Gomis R (1993) Regulation of islet amyloid polypeptide in human pancreatic islets. *Diabetes* 42:1514-1519.
- Obici S, Zhang BB, Karkanas G, Rossetti L (2002) Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nature medicine* 8:1376-1382.
- Obrosova IG, Ilnytska O, Lyzogubov VV, Pavlov IA, Mashtalir N, Nadler JL, Drel VR (2007) High-fat diet induced neuropathy of pre-diabetes and obesity: effects of "healthy" diet and aldose reductase inhibition. *Diabetes* 56:2598-2608.
- Oh IS, Thaler JP, Ogimoto K, Wisse BE, Morton GJ, Schwartz MW (2010) Central administration of interleukin-4 exacerbates hypothalamic inflammation and weight gain during high-fat feeding. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 299:E47-53.

- Okochi M, Walter J, Koyama A, Nakajo S, Baba M, Iwatsubo T, Meijer L, Kahle PJ, Haass C (2000) Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein. *The Journal of biological chemistry* 275:390-397.
- Olanow CW, McNaught KS (2006) Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 21:1806-1823.
- Olanow CW, Perl DP, DeMartino GN, McNaught KS (2004) Lewy-body formation is an aggresome-related process: a hypothesis. *Lancet neurology* 3:496-503.
- Opie LH, Walfish PG (1963) Plasma free fatty acid concentrations in obesity. *The New England journal of medicine* 268:757-760.
- 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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:5782-5791.
- Paisan-Ruiz C, Bhatia KP, Li A, Hernandez D, Davis M, Wood NW, Hardy J, Houlden H, Singleton A, Schneider SA (2009) Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Annals of neurology* 65:19-23.
- Palacios N, Gao X, McCullough ML, Jacobs EJ, Patel AV, Mayo T, Schwarzschild MA, Ascherio A (2011) Obesity, diabetes, and risk of Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 26:2253-2259.
- Paleologou KE, Oueslati A, Shakked G, Rospigliosi CC, Kim HY, Lamberto GR, Fernandez CO, Schmid A, Chegini F, Gai WP, Chiappe D, Moniatte M, Schneider BL, Aebischer P, Eliezer D, Zweckstetter M, Masliah E, Lashuel HA (2010) Phosphorylation at S87 is enhanced in synucleinopathies, inhibits alpha-synuclein oligomerization, and influences synuclein-membrane interactions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:3184-3198.
- Palmiter RD (2007) Is dopamine a physiologically relevant mediator of feeding behavior? *Trends in neurosciences* 30:375-381.
- Pan T, Kondo S, Le W, Jankovic J (2008) The role of autophagy-lysosome pathway in neurodegeneration associated with Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology* 131:1969-1978.
- Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, Halter C, Murrell J, Rudolph A, Shults CW, Conneally PM, Foroud T (2003) Genome-wide linkage analysis and evidence of gene-by-gene interactions in a sample of 362 multiplex Parkinson disease families. *Human molecular genetics* 12:2599-2608.
- Paolisso G, Barbieri M, Bonafe M, Franceschi C (2000) Metabolic age modelling: the lesson from centenarians. *European journal of clinical investigation* 30:888-894.
- Papachroni KK, Ninkina N, Papapanagiotou A, Hadjigeorgiou GM, Xiromerisiou G, Papadimitriou A, Kalofoutis A, Buchman VL (2007) Autoantibodies to alpha-synuclein in inherited Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* 101:749-756.
- Papapetropoulos S, Ellul J, Argyriou AA, Talelli P, Chroni E, Papapetropoulos T (2004) The effect of vascular disease on late onset Parkinson's disease. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 11:231-235.
- Pardridge WM, Boado RJ, Farrell CR (1990) Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. Studies with quantitative western blotting and in situ hybridization. *The Journal of biological chemistry* 265:18035-18040.
- Park SM, Jung HY, Kim TD, Park JH, Yang CH, Kim J (2002) Distinct roles of the N-terminal-binding domain and the C-terminal-solubilizing domain of alpha-synuclein, a molecular chaperone. *The Journal of biological chemistry* 277:28512-28520.
- Parker WD, Jr., Parks JK, Swerdlow RH (2008) Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex. *Brain research* 1189:215-218.
- Peeters A, Barendregt JJ, Willekens F, Mackenbach JP, Al Mamun A, Bonneux L (2003) Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis. *Annals of internal medicine* 138:24-32.
- Peila R, Rodriguez BL, Launer LJ (2002) Type 2 diabetes, APOE gene, and the risk for dementia and related pathologies: The Honolulu-Asia Aging Study. *Diabetes* 51:1256-1262.

- Peng X, Tehranian R, Dietrich P, Stefanis L, Perez RG (2005) Alpha-synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells. *Journal of cell science* 118:3523-3530.
- Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmond MJ (2002) A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:3090-3099.
- Perlmutter LC, Hakami MK, Hodgson-Harrington C, Ginsberg J, Katz J, Singer DE, Nathan DM (1984) Decreased cognitive function in aging non-insulin-dependent diabetic patients. *The American journal of medicine* 77:1043-1048.
- Perreault M, Marette A (2001) Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nature medicine* 7:1138-1143.
- Perrin RJ, Woods WS, Clayton DF, George JM (2001) Exposure to long chain polyunsaturated fatty acids triggers rapid multimerization of synucleins. *The Journal of biological chemistry* 276:41958-41962.
- Perry G, Nunomura A, Raina AK, Aliev G, Siedlak SL, Harris PL, Casadesus G, Petersen RB, Bligh-Glover W, Balraj E, Petot GJ, Smith MA (2003) A metabolic basis for Alzheimer disease. *Neurochemical research* 28:1549-1552.
- Pistell PJ, Morrison CD, Gupta S, Knight AG, Keller JN, Ingram DK, Bruce-Keller AJ (2010) Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. *Journal of neuroimmunology* 219:25-32.
- Plum L, Schubert M, Bruning JC (2005) The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 16:59-65.
- Poirier LJ, Sourkes TL (1965) INFLUENCE OF THE SUBSTANTIA NIGRA ON THE CATECHOLAMINE CONTENT OF THE STRIATUM. *Brain : a journal of neurology* 88:181-192.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science (New York, NY)* 276:2045-2047.
- Porte D, Jr., Baskin DG, Schwartz MW (2002) Leptin and insulin action in the central nervous system. *Nutrition reviews* 60:S20-29; discussion S68-84, 85-27.
- Posey KA, Clegg DJ, Printz RL, Byun J, Morton GJ, Vivekanandan-Giri A, Pennathur S, Baskin DG, Heinecke JW, Woods SC, Schwartz MW, Niswender KD (2009) Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 296:E1003-1012.
- Poulsen P, Kyvik KO, Vaag A, Beck-Nielsen H (1999) Heritability of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance--a population-based twin study. *Diabetologia* 42:139-145.
- Powers KM, Smith-Weller T, Franklin GM, Longstreth WT, Jr., Swanson PD, Checkoway H (2003) Parkinson's disease risks associated with dietary iron, manganese, and other nutrient intakes. *Neurology* 60:1761-1766.
- Powers KM, Smith-Weller T, Franklin GM, Longstreth WT, Jr., Swanson PD, Checkoway H (2006) Diabetes, smoking, and other medical conditions in relation to Parkinson's disease risk. *Parkinsonism & related disorders* 12:185-189.
- Prentki M, Nolan CJ (2006) Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *The Journal of clinical investigation* 116:1802-1812.
- Previs SF, Withers DJ, Ren JM, White MF, Shulman GI (2000) Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo. *The Journal of biological chemistry* 275:38990-38994.
- Pronin AN, Morris AJ, Surguchov A, Benovic JL (2000) Synucleins are a novel class of substrates for G protein-coupled receptor kinases. *The Journal of biological chemistry* 275:26515-26522.
- Proukakis C, Dudzik CG, Brier T, MacKay DS, Cooper JM, Millhauser GL, Houlden H, Schapira AH (2013) A novel alpha-synuclein missense mutation in Parkinson disease. *Neurology* 80:1062-1064.

- Qatanani M, Lazar MA (2007) Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes & development* 21:1443-1455.
- Quan W, Hur KY, Lim Y, Oh SH, Lee JC, Kim KH, Kim GH, Kim SW, Kim HL, Lee MK, Kim KW, Kim J, Komatsu M, Lee MS (2012) Autophagy deficiency in beta cells leads to compromised unfolded protein response and progression from obesity to diabetes in mice. *Diabetologia* 55:392-403.
- Ramirez A, Heimbach A, Grundemann J, Stiller B, Hampshire D, Cid LP, Goebel I, Mubaidin AF, Wriekat AL, Roeper J, Al-Din A, Hillmer AM, Karsak M, Liss B, Woods CG, Behrens MI, Kubisch C (2006) Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nature genetics* 38:1184-1191.
- Ramonet D, Daher JP, Lin BM, Stafa K, Kim J, Banerjee R, Westerlund M, Pletnikova O, Glauser L, Yang L, Liu Y, Swing DA, Beal MF, Troncoso JC, McCaffery JM, Jenkins NA, Copeland NG, Galter D, Thomas B, Lee MK, Dawson TM, Dawson VL, Moore DJ (2011) Dopaminergic neuronal loss, reduced neurite complexity and autophagic abnormalities in transgenic mice expressing G2019S mutant LRRK2. *PloS one* 6:e18568.
- Ransohoff RM, Perry VH (2009) Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annual review of immunology* 27:119-145.
- Rathke-Hartlieb S, Kahle PJ, Neumann M, Ozmen L, Haid S, Okochi M, Haass C, Schulz JB (2001) Sensitivity to MPTP is not increased in Parkinson's disease-associated mutant alpha-synuclein transgenic mice. *Journal of neurochemistry* 77:1181-1184.
- Razak F, Anand SS (2004) Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. N Engl J Med* 2004; 350: 664-71. *Vascular medicine (London, England)* 9:223-224.
- Razay G, Vreugdenhil A, Wilcock G (2007) The metabolic syndrome and Alzheimer disease. *Archives of neurology* 64:93-96.
- Reale M, Iarlori C, Thomas A, Gambi D, Perfetti B, Di Nicola M, Onofri M (2009) Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. *Brain, behavior, and immunity* 23:55-63.
- Reaven GM, Thompson LW, Nahum D, Haskins E (1990) Relationship between hyperglycemia and cognitive function in older NIDDM patients. *Diabetes care* 13:16-21.
- Recio-Pinto E, Lang FF, Ishii DN (1984) Insulin and insulin-like growth factor II permit nerve growth factor binding and the neurite formation response in cultured human neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81:2562-2566.
- Recio-Pinto E, Rechler MM, Ishii DN (1986) Effects of insulin, insulin-like growth factor-II, and nerve growth factor on neurite formation and survival in cultured sympathetic and sensory neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 6:1211-1219.
- Reger MA, Watson GS, Frey WH, 2nd, Baker LD, Cholerton B, Keeling ML, Belongia DA, Fishel MA, Plymate SR, Schellenberg GD, Cherrier MM, Craft S (2006) Effects of intranasal insulin on cognition in memory-impaired older adults: modulation by APOE genotype. *Neurobiology of aging* 27:451-458.
- Rensink AA, Otte-Holler I, de Boer R, Bosch RR, ten Donkelaar HJ, de Waal RM, Verbeek MM, Kremer B (2004) Insulin inhibits amyloid beta-induced cell death in cultured human brain pericytes. *Neurobiology of aging* 25:93-103.
- Reuser M, Bonneux L, Willekens F (2008) The burden of mortality of obesity at middle and old age is small. A life table analysis of the US Health and Retirement Survey. *European journal of epidemiology* 23:601-607.
- Ribas C, Penela P, Murga C, Salcedo A, Garcia-Hoz C, Jurado-Pueyo M, Aymerich I, Mayor F, Jr. (2007) The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochimica et biophysica acta* 1768:913-922.
- Ries V, Henchcliffe C, Kareva T, Rzhetskaya M, Bland R, During MJ, Kholodilov N, Burke RE (2006) Oncoprotein Akt/PKB induces trophic effects in murine models of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:18757-18762.

- Rieusset J (2011) Mitochondria and endoplasmic reticulum: mitochondria-endoplasmic reticulum interplay in type 2 diabetes pathophysiology. *The international journal of biochemistry & cell biology* 43:1257-1262.
- Robertson-Tchabo EA, Arenberg D, Tobin JD, Plotz JB (1986) A longitudinal study of cognitive performance in noninsulin dependent (type II) diabetic men. *Experimental gerontology* 21:459-467.
- Robinson LE, Mazurak VC (2013) N-3 polyunsaturated fatty acids: relationship to inflammation in healthy adults and adults exhibiting features of metabolic syndrome. *Lipids* 48:319-332.
- Rockenstein E, Mallory M, Hashimoto M, Song D, Shults CW, Lang I, Masliah E (2002) Differential neuropathological alterations in transgenic mice expressing alpha-synuclein from the platelet-derived growth factor and Thy-1 promoters. *Journal of neuroscience research* 68:568-578.
- Rodrigues RW, Gomide VC, Chadi G (2001) Astroglial and microglial reaction after a partial nigrostriatal degeneration induced by the striatal injection of different doses of 6-hydroxydopamine. *The International journal of neuroscience* 109:91-126.
- Roger LJ, Fellows RE (1980) Stimulation of ornithine decarboxylase activity by insulin in developing rat brain. *Endocrinology* 106:619-625.
- Rosen P, Nawroth PP, King G, Moller W, Tritschler HJ, Packer L (2001) The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes/metabolism research and reviews* 17:189-212.
- Rospigliosi CC, McClendon S, Schmid AW, Ramlall TF, Barre P, Lashuel HA, Eliezer D (2009) E46K Parkinson's-linked mutation enhances C-terminal-to-N-terminal contacts in alpha-synuclein. *Journal of molecular biology* 388:1022-1032.
- Roth GS, Lane MA, Ingram DK, Mattison JA, Elahi D, Tobin JD, Muller D, Metter EJ (2002) Biomarkers of caloric restriction may predict longevity in humans. *Science (New York, NY)* 297:811.
- Rothman SM, Griffioen KJ, Fishbein KW, Spencer RG, Makrogiannis S, Cong WN, Martin B, Mattison MP (2014) Metabolic abnormalities and hypoleptinemia in alpha-synuclein A53T mutant mice. *Neurobiology of aging* 35:1153-1161.
- Roytblat L, Rachinsky M, Fisher A, Greemberg L, Shapira Y, Douvdevani A, Gelman S (2000) Raised interleukin-6 levels in obese patients. *Obesity research* 8:673-675.
- Rubinsztein DC (2006) The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* 443:780-786.
- Ruiperez V, Darios F, Davletov B (2010) Alpha-synuclein, lipids and Parkinson's disease. *Progress in lipid research* 49:420-428.
- Ryu MY, Kim DW, Arima K, Mouradian MM, Kim SU, Lee G (2008) Localization of CKII beta subunits in Lewy bodies of Parkinson's disease. *Journal of the neurological sciences* 266:9-12.
- Sagi Y, Mandel S, Amit T, Youdim MB (2007) Activation of tyrosine kinase receptor signaling pathway by rasagiline facilitates neurorescue and restoration of nigrostriatal dopamine neurons in post-MPTP-induced parkinsonism. *Neurobiology of disease* 25:35-44.
- Sahu A, Kalra SP, Crowley WR, Kalra PS (1988) Evidence that NPY-containing neurons in the brainstem project into selected hypothalamic nuclei: implication in feeding behavior. *Brain research* 457:376-378.
- Saito Y, Kawashima A, Ruberu NN, Fujiwara H, Koyama S, Sawabe M, Arai T, Nagura H, Yamanouchi H, Hasegawa M, Iwatsubo T, Murayama S (2003) Accumulation of phosphorylated alpha-synuclein in aging human brain. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 62:644-654.
- Sakamoto K, Holman GD (2008) Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 295:E29-37.
- Sakamoto M, Arawaka S, Hara S, Sato H, Cui C, Machiya Y, Koyama S, Wada M, Kawanami T, Kurita K, Kato T (2009) Contribution of endogenous G-protein-coupled receptor kinases to Ser129 phosphorylation of alpha-synuclein in HEK293 cells. *Biochemical and biophysical research communications* 384:378-382.

- Sakamoto M, Uchihara T, Hayashi M, Nakamura A, Kikuchi E, Mizutani T, Mizusawa H, Hirai S (2002) Heterogeneity of nigral and cortical Lewy bodies differentiated by amplified triple-labeling for alpha-synuclein, ubiquitin, and thiazin red. *Experimental neurology* 177:88-94.
- Salem SA, Allsop D, Mann DM, Tokuda T, El-Agnaf OM (2007) An investigation into the lipid-binding properties of alpha-, beta- and gamma-synucleins in human brain and cerebrospinal fluid. *Brain research* 1170:103-111.
- Santiago JA, Potashkin JA (2013) Shared dysregulated pathways lead to Parkinson's disease and diabetes. *Trends in molecular medicine* 19:176-186.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, NY)* 307:1098-1101.
- Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, Hirota Y, Ito C, Kubo M, Kawaguchi T, Tsunoda T, Watanabe M, Takeda A, Tomiyama H, Nakashima K, Hasegawa K, Obata F, Yoshikawa T, Kawakami H, Sakoda S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Nakamura Y, Toda T (2009) Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nature genetics* 41:1303-1307.
- Scalzo P, Kummer A, Cardoso F, Teixeira AL (2009) Increased serum levels of soluble tumor necrosis factor-alpha receptor-1 in patients with Parkinson's disease. *Journal of neuroimmunology* 216:122-125.
- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD (1989) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1:1269.
- Schechter R, Abboud M (2001) Neuronal synthesized insulin roles on neural differentiation within fetal rat neuron cell cultures. *Brain research Developmental brain research* 127:41-49.
- Schell H, Boden C, Chagas AM, Kahle PJ (2012) Impaired c-Fos and polo-like kinase 2 induction in the limbic system of fear-conditioned alpha-synuclein transgenic mice. *PloS one* 7:e50245.
- Schell H, Hasegawa T, Neumann M, Kahle PJ (2009) Nuclear and neuritic distribution of serine-129 phosphorylated alpha-synuclein in transgenic mice. *Neuroscience* 160:796-804.
- Schernhammer E, Hansen J, Rugbjerg K, Wermuth L, Ritz B (2011) Diabetes and the risk of developing Parkinson's disease in Denmark. *Diabetes care* 34:1102-1108.
- Schmidt S, Linnartz B, Mendritzki S, Sczepan T, Lubbert M, Stichel CC, Lubbert H (2011) Genetic mouse models for Parkinson's disease display severe pathology in glial cell mitochondria. *Human molecular genetics* 20:1197-1211.
- Schneeberger M, Gomis R, Claret M (2014) Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *The Journal of endocrinology* 220:T25-46.
- Scholz SW, Houlden H, Schulte C, Sharma M, Li A, Berg D, Melchers A, Paudel R, Gibbs JR, Simon-Sanchez J, Paisan-Ruiz C, Bras J, Ding J, Chen H, Traynor BJ, Arepalli S, Zonozi RR, Revesz T, Holton J, Wood N, Lees A, Oertel W, Wullner U, Goldwurm S, Pellecchia MT, Illig T, Riess O, Fernandez HH, Rodriguez RL, Okun MS, Poewe W, Wenning GK, Hardy JA, Singleton AB, Del Sorbo F, Schneider S, Bhatia KP, Gasser T (2009) SNCA variants are associated with increased risk for multiple system atrophy. *Annals of neurology* 65:610-614.
- Schubert M, Brazil DP, Burks DJ, Kushner JA, Ye J, Flint CL, Farhang-Fallah J, Dikkes P, Warot XM, Rio C, Corfas G, White MF (2003) Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:7084-7092.
- Schwartz GJ (2010) Brainstem integrative function in the central nervous system control of food intake. *Forum of nutrition* 63:141-151.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661-671.
- Scigliano G, Musicco M, Soliveri P, Piccolo I, Ronchetti G, Girotti F (2006) Reduced risk factors for vascular disorders in Parkinson disease patients: a case-control study. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 37:1184-1188.
- Seidel K, Schols L, Nuber S, Petrasch-Parwez E, Gierga K, Wszolek Z, Dickson D, Gai WP, Bornemann A, Riess O, Rami A, Den Dunnen WF, Deller T, Rub U, Kruger R (2010) First appraisal of brain pathology owing to A30P mutant alpha-synuclein. *Annals of neurology* 67:684-689.

- Seidell JC (2000) Obesity, insulin resistance and diabetes--a worldwide epidemic. *The British journal of nutrition* 83 Suppl 1:S5-8.
- Seidl SE, Santiago JA, Bilyk H, Potashkin JA (2014) The emerging role of nutrition in Parkinson's disease. *Frontiers in aging neuroscience* 6:36.
- Selman C, Lingard S, Choudhury AI, Batterham RL, Claret M, Clements M, Ramadani F, Okkenhaug K, Schuster E, Blanc E, Piper MD, Al-Qassab H, Speakman JR, Carmignac D, Robinson IC, Thornton JM, Gems D, Partridge L, Withers DJ (2008) Evidence for lifespan extension and delayed age-related biomarkers in insulin receptor substrate 1 null mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22:807-818.
- Sharon R, Bar-Joseph I, Mirick GE, Serhan CN, Selkoe DJ (2003) Altered fatty acid composition of dopaminergic neurons expressing alpha-synuclein and human brains with alpha-synucleinopathies. *The Journal of biological chemistry* 278:49874-49881.
- Sharon R, Goldberg MS, Bar-Josef I, Betensky RA, Shen J, Selkoe DJ (2001) alpha-Synuclein occurs in lipid-rich high molecular weight complexes, binds fatty acids, and shows homology to the fatty acid-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:9110-9115.
- Shaw JE, Chisholm DJ (2003) 1: Epidemiology and prevention of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *The Medical journal of Australia* 179:379-383.
- Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K (1998) Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *The Biochemical journal* 333 (Pt 3):471-490.
- Sherwood CC, Stimpson CD, Raghanti MA, Wildman DE, Uddin M, Grossman LI, Goodman M, Redmond JC, Bonar CJ, Erwin JM, Hof PR (2006) Evolution of increased glia-neuron ratios in the human frontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:13606-13611.
- Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS (2006) TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 116:3015-3025.
- Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB (2006) Inflammation and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 116:1793-1801.
- Shoffner JM, Watts RL, Juncos JL, Torroni A, Wallace DC (1991) Mitochondrial oxidative phosphorylation defects in Parkinson's disease. *Annals of neurology* 30:332-339.
- Shults CW (2006) Lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:1661-1668.
- Sidhu A, Wersinger C, Moussa CE, Vernier P (2004) The role of alpha-synuclein in both neuroprotection and neurodegeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1035:250-270.
- Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER, Bar-Shira A, Berg D, Bras J, Brice A, Chen CM, Clark LN, Condroyer C, De Marco EV, Durr A, Eblan MJ, Fahn S, Farrer MJ, Fung HC, Gan-Or Z, Gasser T, Gershoni-Baruch R, Giladi N, Griffith A, Gurevich T, Januario C, Kropp P, Lang AE, Lee-Chen GJ, Lesage S, Marder K, Mata IF, Mirelman A, Mitsui J, Mizuta I, Nicoletti G, Oliveira C, Ottman R, Orr-Urtreger A, Pereira LV, Quattrone A, Rogaeva E, Rolfs A, Rosenbaum H, Rozenberg R, Samii A, Samaddar T, Schulte C, Sharma M, Singleton A, Spitz M, Tan EK, Tayebi N, Toda T, Troiano AR, Tsuji S, Wittstock M, Wolfsberg TG, Wu YR, Zabetian CP, Zhao Y, Ziegler SG (2009) Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *The New England journal of medicine* 361:1651-1661.
- Silberberg M, Silberberg R (1954) Factors modifying the lifespan of mice. *The American journal of physiology* 177:23-26.
- Silver AJ, Flood JF, Song AM, Morley JE (1989) Evidence for a physiological role for CCK in the regulation of food intake in mice. *The American journal of physiology* 256:R646-652.
- Simon-Sanchez J, Schulte C, Bras JM, Sharma M, Gibbs JR, Berg D, Paisan-Ruiz C, Lichtner P, Scholz SW, Hernandez DG, Kruger R, Federoff M, Klein C, Goate A, Perlmutter J, Bonin M, Nalls MA, Illig T, Gieger C, Houlden H, Steffens M, Okun MS, Racette BA, Cookson MR, Foote KD, Fernandez HH, Traynor BJ, Schreiber S, Arepalli S, Zonozi R, Gwinn K, van der Brug M, Lopez G, Chanock SJ, Schatzkin A, Park Y, Hollenbeck A, Gao J, Huang X, Wood

- NW, Lorenz D, Deuschl G, Chen H, Riess O, Hardy JA, Singleton AB, Gasser T (2009) Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nature genetics* 41:1308-1312.
- Simon KC, Chen H, Schwarzschild M, Ascherio A (2007) Hypertension, hypercholesterolemia, diabetes, and risk of Parkinson disease. *Neurology* 69:1688-1695.
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muentz M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K (2003) alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science (New York, NY)* 302:841.
- Sorriento D, Ciccarelli M, Santulli G, Campanile A, Altobelli GG, Cimini V, Galasso G, Astone D, Piscione F, Pastore L, Trimarco B, Iaccarino G (2008) The G-protein-coupled receptor kinase 5 inhibits NFkappaB transcriptional activity by inducing nuclear accumulation of IkappaB alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:17818-17823.
- Souza CG, Moreira JD, Siqueira IR, Pereira AG, Rieger DK, Souza DO, Souza TM, Portela LV, Perry ML (2007) Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. *Life sciences* 81:198-203.
- Souza JM, Giasson BI, Lee VM, Ischiropoulos H (2000) Chaperone-like activity of synucleins. *FEBS letters* 474:116-119.
- Spencer B, Potkar R, Trejo M, Rockenstein E, Patrick C, Gindi R, Adame A, Wyss-Coray T, Masliah E (2009) Beclin 1 gene transfer activates autophagy and ameliorates the neurodegenerative pathology in alpha-synuclein models of Parkinson's and Lewy body diseases. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:13578-13588.
- Spillantini MG, Goedert M (2000) The alpha-synucleinopathies: Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 920:16-27.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388:839-840.
- Spira PJ, Sharpe DM, Halliday G, Cavanagh J, Nicholson GA (2001) Clinical and pathological features of a Parkinsonian syndrome in a family with an Ala53Thr alpha-synuclein mutation. *Annals of neurology* 49:313-319.
- St Martin JL, Klucken J, Outeiro TF, Nguyen P, Keller-McGandy C, Cantuti-Castelvetri I, Grammatopoulos TN, Standaert DG, Hyman BT, McLean PJ (2007) Dopaminergic neuron loss and up-regulation of chaperone protein mRNA induced by targeted over-expression of alpha-synuclein in mouse substantia nigra. *Journal of neurochemistry* 100:1449-1457.
- Stadler M, Pacini G, Petrie J, Luger A, Anderwald C (2009) Beta cell (dys)function in non-diabetic offspring of diabetic patients. *Diabetologia* 52:2435-2444.
- Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW (1998) Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95:29-39.
- Steinberg GR, Kemp BE (2009) AMPK in Health and Disease. *Physiological reviews* 89:1025-1078.
- Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument-Bromage H, Painter GF, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, McCormick F, Tempst P, Coadwell J, Hawkins PT (1998) Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science (New York, NY)* 279:710-714.
- Stevens J, Cai J, Juhaeri, Thun MJ, Williamson DF, Wood JL (1999) Consequences of the use of different measures of effect to determine the impact of age on the association between obesity and mortality. *American journal of epidemiology* 150:399-407.
- Stockl M, Fischer P, Wanker E, Herrmann A (2008) Alpha-synuclein selectively binds to anionic phospholipids embedded in liquid-disordered domains. *Journal of molecular biology* 375:1394-1404.
- Stone DK, Reynolds AD, Mosley RL, Gendelman HE (2009) Innate and adaptive immunity for the pathobiology of Parkinson's disease. *Antioxidants & redox signaling* 11:2151-2166.
- Straczkowski M, Dzienis-Straczkowska S, Stepien A, Kowalska I, Szelachowska M, Kinalska I (2002) Plasma interleukin-8 concentrations are increased in obese subjects and related to fat mass and

- tumor necrosis factor-alpha system. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87:4602-4606.
- Stranahan AM, Norman ED, Lee K, Cutler RG, Telljohann RS, Egan JM, Mattson MP (2008) Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus* 18:1085-1088.
- Strauss KM, Martins LM, Plun-Favreau H, Marx FP, Kautzmann S, Berg D, Gasser T, Wszolek Z, Muller T, Bornemann A, Wolburg H, Downward J, Riess O, Schulz JB, Kruger R (2005) Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Human molecular genetics* 14:2099-2111.
- Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haefen TW (2008) Type 2 diabetes: pathogenesis and treatment. *Lancet* 371:2153-2156.
- Su X, Maguire-Zeiss KA, Giuliano R, Prifti L, Venkatesh K, Federoff HJ (2008) Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiology of aging* 29:1690-1701.
- Sugama S, Yang L, Cho BP, DeGiorgio LA, Lorenzl S, Albers DS, Beal MF, Volpe BT, Joh TH (2003) Age-related microglial activation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurodegeneration in C57BL/6 mice. *Brain research* 964:288-294.
- Sugita H, Fujimoto M, Yasukawa T, Shimizu N, Sugita M, Yasuhara S, Martyn JA, Kaneki M (2005) Inducible nitric-oxide synthase and NO donor induce insulin receptor substrate-1 degradation in skeletal muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 280:14203-14211.
- Suh Y, Atzmon G, Cho MO, Hwang D, Liu B, Leahy DJ, Barzilai N, Cohen P (2008) Functionally significant insulin-like growth factor I receptor mutations in centenarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:3438-3442.
- Sun Y, Chang YH, Chen HF, Su YH, Su HF, Li CY (2012) Risk of Parkinson disease onset in patients with diabetes: a 9-year population-based cohort study with age and sex stratifications. *Diabetes care* 35:1047-1049.
- Sung JY, Kim J, Paik SR, Park JH, Ahn YS, Chung KC (2001) Induction of neuronal cell death by Rab5A-dependent endocytosis of alpha-synuclein. *The Journal of biological chemistry* 276:27441-27448.
- Suo WZ, Li L (2010) Dysfunction of G protein-coupled receptor kinases in Alzheimer's disease. *TheScientificWorldJournal* 10:1667-1678.
- Surmeier DJ, Sulzer D (2013) The pathology roadmap in Parkinson disease. *Prion* 7:85-91.
- Takadera T, Sakura N, Mohri T, Hashimoto T (1993) Toxic effect of a beta-amyloid peptide (beta 22-35) on the hippocampal neuron and its prevention. *Neuroscience letters* 161:41-44.
- Takahashi M, Ikemoto S, Ezaki O (1999) Effect of the fat/carbohydrate ratio in the diet on obesity and oral glucose tolerance in C57BL/6J mice. *Journal of nutritional science and vitaminology* 45:583-593.
- Tanaka M, Kim YM, Lee G, Junn E, Iwatsubo T, Mouradian MM (2004) Aggresomes formed by alpha-synuclein and synphilin-1 are cytoprotective. *The Journal of biological chemistry* 279:4625-4631.
- Tanaka M, Sawada M, Yoshida S, Hanaoka F, Marunouchi T (1995) Insulin prevents apoptosis of external granular layer neurons in rat cerebellar slice cultures. *Neuroscience letters* 199:37-40.
- Tarantino P, De Marco EV, Annesi G, Rocca FE, Annesi F, Civitelli D, Provenzano G, Scornaienchi V, Greco V, Colica C, Nicoletti G, Quattrone A (2011) Lack of association between G-protein coupled receptor kinase 5 gene and Parkinson's disease. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 156B:104-107.
- Thaler JP, Schwartz MW (2010) Minireview: Inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. *Endocrinology* 151:4109-4115.
- Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, Zhao X, Sarruf DA, Izgur V, Maravilla KR, Nguyen HT, Fischer JD, Matsen ME, Wisse BE, Morton GJ, Horvath TL, Baskin DG, Tschop MH, Schwartz MW (2012) Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *The Journal of clinical investigation* 122:153-162.
- Timmons S, Coakley MF, Moloney AM, C ON (2009) Akt signal transduction dysfunction in Parkinson's disease. *Neuroscience letters* 467:30-35.

- Tomassoni D, Nwankwo IE, Gabrielli MG, Bhatt S, Muhammad AB, Lokhandwala MF, Tayebati SK, Amenta F (2013) Astroglialosis in the brain of obese Zucker rat: a model of metabolic syndrome. *Neuroscience letters* 543:136-141.
- Tompkins MM, Hill WD (1997) Contribution of somal Lewy bodies to neuronal death. *Brain research* 775:24-29.
- Tremblay F, Lavigne C, Jacques H, Marette A (2001) Defective insulin-induced GLUT4 translocation in skeletal muscle of high fat-fed rats is associated with alterations in both Akt/protein kinase B and atypical protein kinase C (zeta/lambda) activities. *Diabetes* 50:1901-1910.
- Trotta T, Porro C, Calvello R, Panaro MA (2014) Biological role of Toll-like receptor-4 in the brain. *Journal of neuroimmunology* 268:1-12.
- Tsacopoulos M, Magistretti PJ (1996) Metabolic coupling between glia and neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:877-885.
- Tsigelny IF, Crews L, Desplats P, Shaked GM, Sharikov Y, Mizuno H, Spencer B, Rockenstein E, Trejo M, Platoshyn O, Yuan JX, Masliah E (2008) Mechanisms of hybrid oligomer formation in the pathogenesis of combined Alzheimer's and Parkinson's diseases. *PloS one* 3:e3135.
- Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, Araujo EP, Vassallo J, Curi R, Velloso LA, Saad MJ (2007) Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56:1986-1998.
- Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, Otero DA, Kondo J, Ihara Y, Saitoh T (1993) Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:11282-11286.
- Ueda K, Saitoh T, Mori H (1994) Tissue-dependent alternative splicing of mRNA for NACP, the precursor of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid. *Biochemical and biophysical research communications* 205:1366-1372.
- Unger RH (2003) Lipid overload and overflow: metabolic trauma and the metabolic syndrome. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 14:398-403.
- Unger RH (2008) Reinventing type 2 diabetes: pathogenesis, treatment, and prevention. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 299:1185-1187.
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, Gonzalez-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW (2004) Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science (New York, NY)* 304:1158-1160.
- van Dam RM (2003) The epidemiology of lifestyle and risk for type 2 diabetes. *European journal of epidemiology* 18:1115-1125.
- van der Putten H, Wiederhold KH, Probst A, Barbieri S, Mistl C, Danner S, Kauffmann S, Hofele K, Spooren WP, Ruegg MA, Lin S, Caroni P, Sommer B, Tolnay M, Bilbe G (2000) Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:6021-6029.
- van Gelder BM, Tijhuis M, Kalmijn S, Kromhout D (2007) Fish consumption, n-3 fatty acids, and subsequent 5-y cognitive decline in elderly men: the Zutphen Elderly Study. *The American journal of clinical nutrition* 85:1142-1147.
- Vilarino-Guell C, Wider C, Ross OA, Dachsel JC, Kachergus JM, Lincoln SJ, Soto-Ortolaza AI, Cobb SA, Wilhoite GJ, Bacon JA, Behrouz B, Melrose HL, Hentati E, Puschmann A, Evans DM, Conibear E, Wasserman WW, Aasly JO, Burkhard PR, Djaldetti R, Ghika J, Hentati F, Krygowska-Wajs A, Lynch T, Melamed E, Rajput A, Rajput AH, Solida A, Wu RM, Uitti RJ, Wszolek ZK, Vingerhoets F, Farrer MJ (2011) VPS35 mutations in Parkinson disease. *American journal of human genetics* 89:162-167.
- Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, de Vries RL, Kim J, May J, Tocilescu MA, Liu W, Ko HS, Magrane J, Moore DJ, Dawson VL, Grailhe R, Dawson TM, Li C, Tieu K, Przedborski S (2010) PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:378-383.
- Vlassara H, Cai W, Crandall J, Goldberg T, Oberstein R, Dardaine V, Peppas M, Rayfield EJ (2002) Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic

- angiopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:15596-15601.
- Wada R, Yagihashi S (2005) Role of advanced glycation end products and their receptors in development of diabetic neuropathy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1043:598-604.
- Wagener A, Muller U, Brockmann GA (2013) The age of attaining highest body weight correlates with lifespan in a genetically obese mouse model. *Nutrition & diabetes* 3:e62.
- Wakabayashi K, Hayashi S, Yoshimoto M, Kudo H, Takahashi H (2000) NACP/alpha-synuclein-positive filamentous inclusions in astrocytes and oligodendrocytes of Parkinson's disease brains. *Acta neuropathologica* 99:14-20.
- Wakamatsu M, Ishii A, Ukai Y, Sakagami J, Iwata S, Ono M, Matsumoto K, Nakamura A, Tada N, Kobayashi K, Iwatsubo T, Yoshimoto M (2007) Accumulation of phosphorylated alpha-synuclein in dopaminergic neurons of transgenic mice that express human alpha-synuclein. *Journal of neuroscience research* 85:1819-1825.
- Wang L, Zhai YQ, Xu LL, Qiao C, Sun XL, Ding JH, Lu M, Hu G (2014) Metabolic inflammation exacerbates dopaminergic neuronal degeneration in response to acute MPTP challenge in type 2 diabetes mice. *Experimental neurology* 251:22-29.
- Wang W, Perovic I, Chittuluru J, Kaganovich A, Nguyen LT, Liao J, Auclair JR, Johnson D, Landru A, Simorellis AK, Ju S, Cookson MR, Asturias FJ, Agar JN, Webb BN, Kang C, Ringe D, Petsko GA, Pochapsky TC, Hoang QQ (2011) A soluble alpha-synuclein construct forms a dynamic tetramer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:17797-17802.
- Wang X, Ge A, Cheng M, Guo F, Zhao M, Zhou X, Liu L, Yang N (2012) Increased hypothalamic inflammation associated with the susceptibility to obesity in rats exposed to high-fat diet. *Experimental diabetes research* 2012:847246.
- Warden MR, Selimbeyoglu A, Mirzabekov JJ, Lo M, Thompson KR, Kim SY, Adhikari A, Tye KM, Frank LM, Deisseroth K (2012) A prefrontal cortex-brainstem neuronal projection that controls response to behavioural challenge. *Nature* 492:428-432.
- Waxman EA, Giasson BI (2011) Characterization of kinases involved in the phosphorylation of aggregated alpha-synuclein. *Journal of neuroscience research* 89:231-247.
- Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC (2003) Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *The Journal of biological chemistry* 278:25009-25013.
- Weinreb O, Amit T, Bar-Am O, Sagi Y, Mandel S, Youdim MB (2006) Involvement of multiple survival signal transduction pathways in the neuroprotective, neurorescue and APP processing activity of rasagiline and its propargyl moiety. *Journal of neural transmission Supplementum* 457-465.
- Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway KA, Lansbury PT, Jr. (1996) NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* 35:13709-13715.
- Weintraub D, Comella CL, Horn S (2008a) Parkinson's disease--Part 1: Pathophysiology, symptoms, burden, diagnosis, and assessment. *The American journal of managed care* 14:S40-48.
- Weintraub D, Comella CL, Horn S (2008b) Parkinson's disease--Part 2: Treatment of motor symptoms. *The American journal of managed care* 14:S49-58.
- Weintraub D, Comella CL, Horn S (2008c) Parkinson's disease--Part 3: Neuropsychiatric symptoms. *The American journal of managed care* 14:S59-69.
- Wellen KE, Hotamisligil GS (2005) Inflammation, stress, and diabetes. *The Journal of clinical investigation* 115:1111-1119.
- White CL, Pistell PJ, Purpera MN, Gupta S, Fernandez-Kim SO, Hise TL, Keller JN, Ingram DK, Morrison CD, Bruce-Keller AJ (2009) Effects of high fat diet on Morris maze performance, oxidative stress, and inflammation in rats: contributions of maternal diet. *Neurobiology of disease* 35:3-13.
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H (2004) Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes care* 27:1047-1053.
- Winkler S, Hagenah J, Lincoln S, Heckman M, Haugarvoll K, Lohmann-Hedrich K, Kostic V, Farrer M, Klein C (2007) alpha-Synuclein and Parkinson disease susceptibility. *Neurology* 69:1745-1750.

- Winner B, Jappelli R, Maji SK, Desplats PA, Boyer L, Aigner S, Hetzer C, Loher T, Vilar M, Campioni S, Tzitzilonis C, Soragni A, Jessberger S, Mira H, Consiglio A, Pham E, Masliah E, Gage FH, Riek R (2011) In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:4194-4199.
- Winocur G, Greenwood CE (2005) Studies of the effects of high fat diets on cognitive function in a rat model. *Neurobiology of aging* 26 Suppl 1:46-49.
- Winocur G, Greenwood CE, Piroli GG, Grillo CA, Reznikov LR, Reagan LP, McEwen BS (2005) Memory impairment in obese Zucker rats: an investigation of cognitive function in an animal model of insulin resistance and obesity. *Behavioral neuroscience* 119:1389-1395.
- Winzell MS, Ahren B (2004) The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 3:S215-219.
- Wong K, Sidransky E, Verma A, Mixon T, Sandberg GD, Wakefield LK, Morrison A, Lwin A, Colegial C, Allman JM, Schiffmann R (2004) Neuropathology provides clues to the pathophysiology of Gaucher disease. *Molecular genetics and metabolism* 82:192-207.
- Wood-Kaczmar A, Gandhi S, Wood NW (2006) Understanding the molecular causes of Parkinson's disease. *Trends in molecular medicine* 12:521-528.
- Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte D, Jr. (1979) Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 282:503-505.
- Woods SC, Porte D, Jr. (1977) Relationship between plasma and cerebrospinal fluid insulin levels of dogs. *The American journal of physiology* 233:E331-334.
- Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P (2003) A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *The Journal of nutrition* 133:1081-1087.
- Wozniak M, Rydzewski B, Baker SP, Raizada MK (1993) The cellular and physiological actions of insulin in the central nervous system. *Neurochemistry international* 22:1-10.
- Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2004) The interplay between oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor modulates the outcome of a saturated fat diet on synaptic plasticity and cognition. *The European journal of neuroscience* 19:1699-1707.
- Wyman MP, Zvelebil M, Laffargue M (2003) Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target? *Trends in pharmacological sciences* 24:366-376.
- Xie J, Mendez JD, Mendez-Valenzuela V, Aguilar-Hernandez MM (2013) Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Cellular signalling* 25:2185-2197.
- Xiromerisiou G, Hadjigeorgiou GM, Papadimitriou A, Katsarogiannis E, Gourbali V, Singleton AB (2008) Association between AKT1 gene and Parkinson's disease: a protective haplotype. *Neuroscience letters* 436:232-234.
- Xu Q, Park Y, Huang X, Hollenbeck A, Blair A, Schatzkin A, Chen H (2011) Diabetes and risk of Parkinson's disease. *Diabetes care* 34:910-915.
- Yamauchi T, Tobe K, Tamemoto H, Ueki K, Kaburagi Y, Yamamoto-Honda R, Takahashi Y, Yoshizawa F, Aizawa S, Akanuma Y, Sonenberg N, Yazaki Y, Kadowaki T (1996) Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. *Molecular and cellular biology* 16:3074-3084.
- Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D (1994) Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *The Journal of biological chemistry* 269:9889-9897.
- Yang Y, Gehrke S, Haque ME, Imai Y, Kosek J, Yang L, Beal MF, Nishimura I, Wakamatsu K, Ito S, Takahashi R, Lu B (2005) Inactivation of Drosophila DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:13670-13675.
- Yavich L, Tanila H, Vepsäläinen S, Jakala P (2004) Role of alpha-synuclein in presynaptic dopamine recruitment. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:11165-11170.
- Yonetani M, Nonaka T, Masuda M, Inukai Y, Oikawa T, Hisanaga S, Hasegawa M (2009) Conversion of wild-type alpha-synuclein into mutant-type fibrils and its propagation in the presence of A30P mutant. *The Journal of biological chemistry* 284:7940-7950.

- Youdim KA, Martin A, Joseph JA (2000) Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 18:383-399.
- Yu SW, Baek SH, Brennan RT, Bradley CJ, Park SK, Lee YS, Jun EJ, Lookingland KJ, Kim EK, Lee H, Goudreau JL, Kim SW (2008) Autophagic death of adult hippocampal neural stem cells following insulin withdrawal. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 26:2602-2610.
- Yu XR, Jia GR, Gao GD, Wang SH, Han Y, Cao W (2006) Neuroprotection of insulin against oxidative stress-induced apoptosis in cultured retinal neurons: involvement of phosphoinositide 3-kinase/Akt signal pathway. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 38:241-248.
- Zabrocki P, Bastiaens I, Delay C, Bammens T, Ghillebert R, Pellens K, De Virgilio C, Van Leuven F, Winderickx J (2008) Phosphorylation, lipid raft interaction and traffic of alpha-synuclein in a yeast model for Parkinson. *Biochimica et biophysica acta* 1783:1767-1780.
- Zarow C, Lyness SA, Mortimer JA, Chui HC (2003) Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. *Archives of neurology* 60:337-341.
- Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Azares B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Munoz DG, de Yébenes JG (2004) The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Annals of neurology* 55:164-173.
- Zhang W, Li R, Li J, Wang W, Tie R, Tian F, Liang X, Xing W, He Y, Yu L, Xi M, Wang S, Zheng Q, Zhang H (2013) Alpha-linolenic acid exerts an endothelial protective effect against high glucose injury via PI3K/Akt pathway. *PloS one* 8:e68489.
- Zhang X, Dong F, Ren J, Driscoll MJ, Culver B (2005) High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex. *Experimental neurology* 191:318-325.
- Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D (2008) Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 135:61-73.
- Zhao W, Chen H, Xu H, Moore E, Meiri N, Quon MJ, Alkon DL (1999) Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *The Journal of biological chemistry* 274:34893-34902.
- Zhou Y, Gu G, Goodlett DR, Zhang T, Pan C, Montine TJ, Montine KS, Aebersold RH, Zhang J (2004) Analysis of alpha-synuclein-associated proteins by quantitative proteomics. *The Journal of biological chemistry* 279:39155-39164.
- Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan M, Uitti RJ, Calne DB, Stoessl AJ, Pfeiffer RF, Patenge N, Carbajal IC, Vieregge P, Asmus F, Muller-Myhsok B, Dickson DW, Meitinger T, Strom TM, Wszolek ZK, Gasser T (2004) Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 44:601-607.
- Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G (2003) Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nature neuroscience* 6:43-50.

8 Anhang

8.1 Publikationen und Mitwirkungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden teilweise veröffentlicht in:

Rotermund C, Truckenmüller FM, Schell H, Kahle PJ (2014) **Diet-induced obesity accelerates the onset of terminal phenotypes in α -synuclein transgenic mice.** J Neurochem. 2014 Jul 3. doi: 10.1111/jnc.12813

Danken für die Mithilfe möchte ich Felicia Truckenmüller, die im Rahmen ihres Praktikums die immunohistochemischen Färbungen für GRK 5 durchgeführt und mikroskopiert hat (siehe 3.2.5).

8.2 Danksagung

Mein Dank gilt zuerst Philipp Kahle, der mir diese Arbeit erst ermöglichte und der sich immer wieder die Zeit nahm meine Ergebnisse zu diskutieren und mir mit verschiedensten Ratschlägen weiterhalf. Ebenso danken möchte ich Olaf Rieß für das unkomplizierte Übernehmen der weiteren Betreuung und das Interesse an meiner Arbeit.

Danken möchte ich Heinrich, für das erste Einarbeiten im Labor und die zahllosen Hilfestellungen sowie Cindy für die vielfache Unterstützung in Labor und Tierstall. Außerdem danke ich den Tierpflegern, allen voran Martin, für ihre Arbeit. Ein großer Dank gilt Philipp, Martin und Yvonne für das kritische Lesen und Verbessern meiner Arbeit. Zudem danke ich meiner Arbeitsgruppe – Catha, Cindy, Emmy, Heinrich, Rike, Sandra, Sven und ganz besonders Martin, Steffi und Steffi für die schöne Zeit und die kleinen Aufmunterungen zwischendurch.

Ganz besonders danke ich meinem Papa für seine fortwährende Unterstützung und Liebe in allen Lebenslagen, Sonja, für's tolle große Schwester sein, und auch meiner restlichen Familie für ihr stetiges Interesse. Außerdem danke ich Wiki für seine Hilfe und Zuneigung. Danke, dass es euch gibt!

Danken möchte ich außerdem meinen Freunden, ohne die ich nie so weit gekommen wäre. Danke für die tollen Freundschaften, die schönen Zeiten, die vielen gegenseitigen Besuche und den ganzen Spaß! Ganz besonders erwähnen möchte ich Andi, Anne, Caro, Julia, Maggie, Milla, Oliver, Stephan, Tine, Uli und Yvonne – ihr seid super!

Zuletzt danke ich dem Skiclub, für die immer wieder tollen Zeiten im Schnee, auf dem Kahn und am Abend, meinen lieben Tennis- und Beachfreunden, für die schönen Sportstunden und meinen Kneipengenossen für die spaßigen Abende beim Kickern.

Danke Ulm, danke Woodbridge, danke Jena, danke Tübingen!