



# **Charakterisierung der Krankheitsprogression im genetischen $hm^2\alpha$ - SYN-39 Mausmodell des Morbus Parkinson**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,  
Klasse Neurowissenschaften

Vorgelegt von

**Jennifer Kim Behnke**

aus

**Kulmbach**

Würzburg, **2023**



**Eingereicht am:** .....

Bürostempel

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

**Vorsitzende: Prof. Dr. med. Martina Prelog**

**1. Betreuer: Prof. Dr. med. Chi Wang Ip**

**2. Betreuer: Prof. Dr. med. Jens Volkmann**

**3. Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Manfred Lutz**

**4. Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Jörg Wischhusen**

**Tag des Promotionskolloquiums: 27.01.2023**

**Doktorurkunden ausgehändigt am:**

.....





**Characterization of disease progression in the genetic hm<sup>2</sup> $\alpha$ -SYN-39  
mouse model of Parkinson's disease**

Doctoral thesis for a medical doctoral degree at the Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-University Würzburg,  
Section Neuroscience

submitted by

**Jennifer Kim Behnke**

from

**Kulmbach, Germany**

Würzburg, 2023

**Submitted on:** .....  
Office stamp

**Members of the Thesis Committee:**

**Chairperson: Prof. Dr. med. Martina Prelog**

**Primary Supervisor: Prof. Dr. med. Chi Wang Ip**

**Supervisor (Second): Prof. Dr. med. Jens Volkmann**

**Supervisor (Third): Prof. Dr. rer. nat. Manfred Lutz**

**Supervisor (Fourth): Prof. Dr. rer. nat. Jörg Wischhusen**

**Date of Public Defence: January 27<sup>th</sup> 2023**

**Date of Receipt of Certificates: .....**

## Vorbemerkung

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeitschrift *Neurobiology of Disease* (Epub) am 21. Juni 2022 von L Rauschenberger \*, J Behnke \*, A Grotemeyer, S Knorr, J Volkmann und CW Ip unter folgendem Titel publiziert: „Age-dependent neurodegeneration and neuroinflammation in a genetic A30P/A53T double-mutated  $\alpha$ -synuclein mouse model of Parkinson's disease” (Rauschenberger et al., 2022).

\* *gleichwertige Beteiligung*

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung .....	1
1.1 Morbus Parkinson (MP) .....	1
1.2 Pathophysiologie des MP .....	2
1.2.1 Die Rolle der Basalganglien beim MP .....	2
1.2.2 $\alpha$ -Synuclein ( $\alpha$ -Syn) .....	4
1.3 Ätiologie des MP .....	5
1.4 Mausmodelle des MP .....	6
1.5 Neuroinflammation beim MP .....	9
1.5.1 Angeborenes Immunsystem (IS) .....	10
1.5.2 Adaptives IS .....	12
1.6 Ziel der Arbeit .....	15
2 Material und Methoden .....	16
2.1 Tiere und Tierhaltung .....	16
2.2 Reagenzien und Chemikalien .....	17
2.3 Antikörper (Ak) .....	18
2.4 Lösungen .....	19
2.5 Geräte und Instrumente .....	20
2.5.1 Verhaltensexperimente .....	20
2.5.2 Gehirnentnahme .....	21
2.5.3 Immunhistochemie .....	21
2.5.4 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) .....	22
2.6 Verhaltensexperimente .....	22
2.6.1 „Open Field“ .....	23
2.6.2 Zylinder-Test .....	23
2.6.3 Rotarod-Analyse .....	24
2.7 Organentnahme .....	25

2.7.1	Transkardiale Perfusion .....	25
2.7.2	Allgemeines zur Organentnahme .....	25
2.7.3	Organentnahme für die Immunhistochemie .....	26
2.7.4	Organentnahme für die HPLC .....	26
2.8	Immunhistochemie .....	27
2.8.1	Übersicht über die Immunhistochemie .....	27
2.8.1.1	Schneiden der Präparate .....	28
2.8.1.2	Übersicht über gefärbte Gehirnareale der unfixierten Kryoschnitte .....	29
2.8.2	TH- und Nissl-Färbung der SN .....	29
2.8.2.1	Stereologische Quantifizierung dopaminergener Neurone in der SNpc .....	32
2.8.3	TH-Färbung des Striatums .....	35
2.8.3.1	Quantifizierung dopaminergener Terminalen im Striatum .....	35
2.8.4	T- und B-Zell-Färbung des Striatums und der SN .....	38
2.8.4.1	Quantifizierung der T- und B-Zellen im nigrostriatalen Trakt .....	38
2.8.5	CD11b-Färbung des Striatums und der SN .....	39
2.8.5.1	Quantifizierung der Mikroglia im nigrostriatalen Trakt .....	40
2.9	Analyse der striatalen Monoamin-Level mittels HPLC .....	40
2.9.1	Verarbeitung des striatalen Gewebes .....	41
2.9.2	Proteintrennung und -quantifizierung in der HPLC-Anlage .....	41
2.10	Statistische Auswertung .....	42
3	Ergebnisse .....	42
3.1	Charakterisierung des Phänotyps .....	42
3.1.1	„Open Field“-Test .....	42
3.1.2	Rotarod-Testung .....	43
3.1.3	Zylinder-Test .....	44
3.2	Dopaminerge Neurodegeneration und DA-Mangel .....	45
3.2.1	Stereologische Quantifizierung dopaminergener Neurone in der SNpc .....	45
3.2.2	Quantifizierung dopaminergener Terminalen im Striatum .....	47
3.2.3	HPLC-Analyse der striatalen Monoamine .....	49
3.3	Quantifizierung der T-Zellen .....	51

3.3.1 CD4-positive Zellen in der SN.....	51
3.3.2 CD4-positive Zellen im Striatum .....	52
3.3.3 CD8-positive Zellen in der SN.....	53
3.3.4 CD8-positive Zellen im Striatum .....	55
3.4 Quantifizierung der B-Zellen .....	56
3.4.1 CD45/B220-positive Zellen in der SN .....	56
3.4.2 CD45/B220-positive Zellen im Striatum .....	58
3.5 Quantifizierung der Mikroglia .....	59
3.5.1 CD11b-positive Zellen in der SN.....	59
3.5.2 CD11b-positive Zellen im Striatum .....	61
4 Diskussion.....	63
4.1 Nachweis eines Parkinson-Phänotyps.....	63
4.2 Dopaminerge Neurodegeneration und DA-Verlust im nigrostriatalen Trakt.....	67
4.3 Neuroinflammation im hm <sup>2</sup> α-SYN-39 Mausmodell.....	69
4.4 Ausblick .....	74
5 Zusammenfassung.....	75
6 Literaturverzeichnis.....	78
7 Abkürzungsverzeichnis .....	92
8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	94
9 Eidesstattliche Erklärung .....	99
10 Lebenslauf.....	100

# 1 Einleitung

## 1.1 Morbus Parkinson (MP)

Das Krankheitsbild der früher bezeichneten Schüttellähmung („shaking palsy“) wurde erstmals 1817 von James Parkinson (Parkinson, 2002) beschrieben. Er erkannte typisch auftretende Symptome, die er folgendermaßen beschrieb: “Involuntary tremulous motion, with lessened muscular power, in parts not in action and even when supported [...]“ [Unfreiwillige zitternde Bewegung, mit verminderter Muskelkraft, zeitweise völlig unbeweglich selbst mit Unterstützung] (Parkinson, 2002). Zu den heute bekannten Kardinalsymptomen des nach ihm benannten Morbus Parkinson (MP) gehören die Bewegungsverlangsamung (Bradykinese), das meist in Ruhe auftretende Zittern (Ruhetremor), der erhöhte Muskeltonus (Rigor) und die Haltungsinstabilität mit dem Verlust der Haltungsreflexe (posturale Instabilität) (Gelb et al., 1999). Patienten mit Parkinson können zudem an einer Vielzahl von belastenden nicht-motorischen Symptomen leiden, unter anderem an Demenz, was beinahe bei 30% der Parkinson-Patienten auftritt (Aarsland and Kurz, 2010). Des Weiteren kann es zu Depression und Verhaltensstörungen, sowie zu autonomen Dysfunktionen, Neuropathien und Riech- und Schlafstörungen kommen (Chaudhuri et al., 2006). Diese schränken die Lebensqualität der Parkinson-Patienten zusätzlich zu den motorischen Symptomen stark ein. Die pharmakologische Therapie des MP ist bis heute symptomorientiert und knüpft vorwiegend an den Dopamin- (DA-) Stoffwechsel an. Am wirksamsten ist das Levodopa, neben weiteren Medikamenten wie DA-Agonisten, Monoaminoxidasehemmer oder Amantadin (Connolly and Lang, 2014). Bisher gibt es noch keinen therapeutischen Ansatz die Erkrankung in ihrer Progression zu stoppen oder zu verlangsamen.

MP ist eine langsam-progrediente Erkrankung, die sich vor allem im hohen Alter manifestiert. Das Altern stellt den größten Risikofaktor der Erkrankung dar (Collier et al., 2011), was sich unter anderem in dem exponentiellen Anstieg der Inzidenz ab dem Alter von 55 Jahren zeigt (Driver et al., 2009). Aufgrund eines globalen Anstieges der Lebenserwartung und damit einer steigenden Inzidenz der Parkinson-Krankheit hat der MP über die letzten Jahrzehnte zunehmend an Bedeutung gewonnen. Heute stellt der MP die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach der Alzheimer-Erkrankung dar

(Hirtz et al., 2007). Laut einer „Global Burden of Disease“ Studie von 2015 (Group, 2017) kam es von 1950 bis 2015 zu einer Verdopplung der Prävalenz des MP. Schätzungen ergaben zudem, dass sich die globale Prävalenz von 6,9 Millionen im Jahr 2015 auf bemerkenswerte 14,2 Millionen im Jahr 2040 verdoppeln wird (Dorsey and Bloem, 2018).

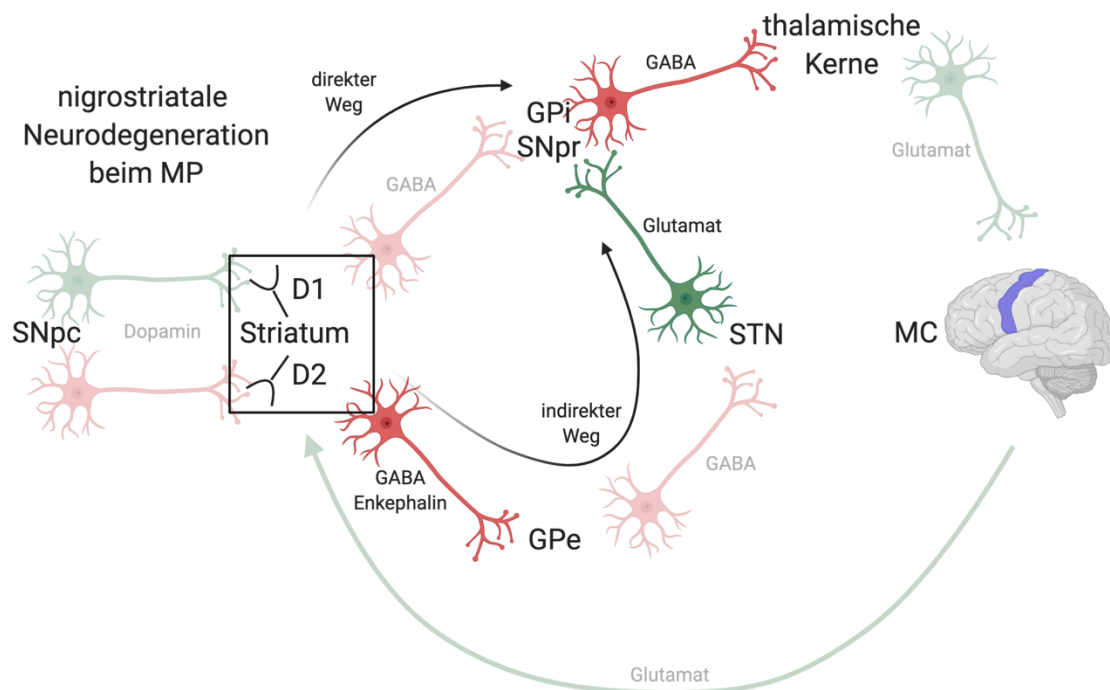
## 1.2 Pathophysiologie des MP

### 1.2.1 Die Rolle der Basalganglien beim MP

Pathophysiologisch ist beim MP eine Störung in den motorischen Basalganglien charakteristisch, insbesondere eine progrediente Degeneration dopaminerger Neurone in der Substantia nigra pars compacta (SNpc) und eine Reduktion der Terminalen dieser Neurone im dorsalen Striatum (Hornykiewicz and Kish, 1987). Dies hat einen zunehmenden striatalen DA-Mangel zur Folge (Ehringer and Hornykiewicz, 1960). Neben der Neurodegeneration in der SNpc sind auch Schädigungen in anderen Hirnarealen beschrieben, unter anderem im Hippocampus, Nucleus basalis Meynert, Locus coeruleus und den Raphe-Kernen (Hirsch and Standaert, 2020, Mosley et al., 2006). Verantwortlich für die klinische Manifestation der Kardinalsymptome ist jedoch hauptsächlich die Pathologie im nigrostriatalen Trakt. Im physiologischen Zustand projizieren die dopaminergen Fasern der SNpc in das Striatum und wirken dort über D1-Rezeptoren (D1) exzitatorisch und über D2-Rezeptoren (D2) inhibitorisch. Der Neurotransmitter DA führt über D1 direkt zu einer verstärkten Inhibition des Globus pallidus internus (GPi). Damit wird der inhibitorische Effekt durch Gamma-Aminobuttersäure (GABA) des GPi auf thalamische und Hirnstamm-Kerne gedämpft. Ebenso führt DA über D2 indirekt über den Globus pallidus externus (GPe) und den subthalamischen Nucleus (STN) zu einer verringerten Inhibition der thalamischen und Hirnstamm-Kerne durch den GPi und die Substantia nigra pars reticulata (SNpr). Zusammenfassend haben die dopaminergen Fasern der SNpc im physiologischen Zustand eine Verminderung der inhibitorischen Wirkung der Basalganglien auf thalamische Kerne zur Folge, welche mit Glutamat exzitatorisch den Motorcortex (MC) stimulieren können (Lang and Lozano, 1998). Aus dem striatalen DA-Mangel beim MP resultiert dementsprechend eine verstärkte GABAerg inhibitorische Rolle der Basalganglien durch den GPi und die SNpr auf thalamische Kerne und Kerne des Hirnstamms (Abbildung 1).



Die Inhibition der betroffenen Kerne des Thalamus führt schließlich zu einer Suppression des MC (Lang and Lozano, 1998). Dies erklärt die akinetisch-rigide Symptomatik beim MP, die sich erst bei einem hohen dopaminergen Verlust, ungefähr ab einem 30 %-igen Verlust dopaminergener Neurone in der SNpc und einem 60-80 %-igen DA-Verlust im Striatum, klinisch manifestiert (Fearnley and Lees, 1991, Bernheimer et al., 1973). Die Pathophysiologie des Ruhetremors lässt sich dagegen nicht auf den striatalen DA-Mangel zurückführen, sondern involviert viel mehr pathologische Interaktionen der Basalganglien mit dem cerebellothalamischen Kreislauf, bestehend aus dem ventralen intermediären thalamischen Nucleus (VIM), dem MC und dem Cerebellum (CBLM) (Helmich et al., 2011, Hallett, 2012). Helmich et al. stellte ein Modell zur Pathophysiologie des Ruhetremors vor, bei dem die Basalganglien (vorwiegend Putamen, Globus Pallidus internus und externus) über den MC den VIM-MC-CBLM Kreislauf überaktivieren und somit den Ruhetremor auslösen (Helmich et al., 2011).



**Abbildung 1:** Basalganglienschleife bei nigrostriatärer Neurodegeneration beim MP. Durch den striatalen DA-Mangel kommt es sowohl über den direkten Weg als auch über den indirekten Weg zu einer verstärkten Inhibition der thalamischen Kerne durch den GPI und die SNpr, was schließlich in einer Suppression des MC und zur akinetisch-rigiden Symptomatik beim MP führt. Die grünen Neurone wirken durch die Freisetzung ihrer Neurotransmitter exzitatorisch (DA über D1, Glutamat), während die roten Neurone

inhibitorisch auf ihr Zielgebiet wirken (DA über D2, GABA, Enkephalin). Eine erniedrigte Aktivität der Neurone wird durch die erhöhte Transparenz dargestellt. Modifiziert nach Lang et al. (Mosley et al., 2012, Lang and Lozano, 1998). Die Abbildung wurde mithilfe von BioRender.com erstellt.

### 1.2.2 $\alpha$ -Synuclein ( $\alpha$ -Syn)

Ein bedeutsames pathophysiologisches Kennzeichen des MP ist das Vorliegen von zytoplasmatischen Einschlusskörperchen, die Lewy-Körperchen („Lewy-bodies“ LBs) genannt werden. Diese bestehen hauptsächlich aus  $\alpha$ -Syn und Ubiquitin (Spillantini et al., 1997, Spillantini et al., 1998b).  $\alpha$ -Syn ist ein präsynaptisches Protein, welches physiologisch vermutlich eine Rolle in der Exozytose von Vesikeln bei der dopaminergen Neurotransmission spielt (Larsen et al., 2006). Es interagiert mit zahlreichen Proteinen, wie dem DA-Transporter (Wersinger and Sidhu, 2003), löslichen N-Ethylmaleimid-sensitiven Faktor-Bindungsrezeptor-Komplexen (Chandra et al., 2005) und weiteren Proteinen, die an der Homöostase des Neurotransmitters DA beteiligt sind (Lee et al., 2001, Perez et al., 2002, Dauer et al., 2002). Die exakte Funktion von  $\alpha$ -Syn ist jedoch noch nicht vollständig erforscht.  $\alpha$ -Syn besitzt normalerweise sehr lösliche Eigenschaften (Weinreb et al., 1996), formt sich allerdings durch bestimmte Trigger in unlösliche Aggregate um (Conway et al., 1998). So führen unter anderem genetische Mutationen (Conway et al., 1998), Überexpressionen von  $\alpha$ -Syn (Conway et al., 1998, Uversky, 2007), oxidativer Stress (Hashimoto et al., 1999) und post-translationale Modifikationen (z.B. Nitration) von  $\alpha$ -Syn (Uversky, 2007) zur vermehrten Aggregation. Die Aggregation von  $\alpha$ -Syn ist ein pathologischer Bestandteil in mehreren neurodegenerativen Erkrankungen und kommt unter anderem neben dem MP auch bei der Multisystematrophie (Spillantini et al., 1998a), der LB-Demenz, Neurodegeneration mit Eisenablagerung und einer Variante der Alzheimer-Krankheit mit LBs vor. Diese Erkrankungen werden als „Synucleinopathien“ zusammengefasst (Galvin et al., 2001). Bei Parkinson-Patienten sind LBs in überlebenden Neuronen der SNpc, und zusätzlich in anderen Hirnarealen, sowie im peripheren Nervensystem zu finden (Beach et al., 2010). Braak et al. (Braak et al., 2003) beschrieb eine aufsteigende Krankheitsentwicklung beim MP und definierte mit den Braak-Stadien eine mögliche zunehmende  $\alpha$ -Syn-Pathologie mit fortschreitendem transsynaptischem Zell-Zell Transfer im Hirngewebe. Laut Braak et al. könnte die Erkrankung initial im Bulbus olfactorius oder im enterischen Nervensystem beginnen, von wo aus sich  $\alpha$ -Syn-Aggregate retrograd bis ins zentrale

Nervensystem (ZNS) ausbreiten. Von den Kernen des N. vagus und N. glossopharyngeus im Hirnstamm könnte die Pathologie über den Coeruleus-Subcoeruleus-Komplex aufsteigen und erst dann die SN erreichen. Im weiteren Verlauf könnte sie sich über den anteromedialen temporalen Mesokortex bis schließlich in präfrontale, prämotorische und motorische Areale ausbreiten (Braak et al., 2003, Braak and Del Tredici, 2008).

### 1.3 Ätiologie des MP

Die Ätiologie des MP ist multifaktoriell und in vielerlei Hinsicht noch nicht vollständig geklärt. Wahrscheinlich spielen mehrere Faktoren eine Rolle („multiple-hit hypothesis“), unter anderem das Altern, sowie die genetische Prädisposition und toxische Umweltfaktoren wie Pestizide (Carvey et al., 2006). Während die Erkrankung meist erst im hohen Alter auftritt, beginnt die Erkrankung selten auch schon im jüngeren Alter, bedingt durch genetische Ursachen. Beispielweise lag der durchschnittliche Krankheitsbeginn bei einer von Polymeropoulos et al. untersuchten italienischen Familie mit familiärem Parkinson bei einem Alter von  $46 \pm 13$  Jahren (Polymeropoulos et al., 1997). Die familiäre Form des MP führte zur Entdeckung zahlreicher genetischer Mutationen, die mit der Parkinsonerkrankung assoziiert sind. Die erste Punktmutation, assoziiert mit autosomal-dominant vererbtem MP, wurde von Polymeropoulos et al. bei der oben genannten italienischen Familie entdeckt (Polymeropoulos et al., 1997). Diese lag im  $\alpha$ -Syn kodierenden Gen (SNCA-Gen) im sogenannten Genlocus *Park1*, was erstmals die pathogenetische Rolle von  $\alpha$ -Syn beim MP betonte. Entdeckt wurde eine Transition von Guanin zu Adenin an der Nukleotid Position 209 des SNCA-Gens, die in einer Substitution der Aminosäure Alanin durch Threonin an Position 53 (A53T) resultiert („missense“ Mutation). Später wurden noch weitere mit MP assoziierte Mutationen im SNCA-Gen entdeckt, wie die Substitution von Alanin durch Prolin an der Aminosäurenposition 30 (A30P) (Kruger et al., 1998) oder der später entdeckte Austausch von Guanin durch Adenin an Position 188 (E46K) (Zarranz et al., 2004). Weitere häufige Mutationen sind in folgenden Genen beschrieben: Parkin (*Park2*) (Kitada et al., 1998), PINK-1 (*Park6*) (Valente et al., 2004), DJ-1 (*Park7*) (Bonifati et al., 2003) und LRRK2 (*Park8*) (Paisan-Ruiz et al., 2004).

Unter den Umweltfaktoren, die das Parkinson-Risiko erhöhen können, spielen z.B. Pestizide eine bedeutende Rolle, unter anderem Paraquat und Rotenon. Außerdem gibt es

Neurotoxine, die mit MP assoziiert sind. Das bekannteste Neurotoxin ist das 1-Methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridinium (MPTP), welches erstmals von Langston et al. durch einen Drogenskandal in Kalifornien entdeckt wurde. Nach der Einnahme von synthetischem Heroin, das mit MPTP kontaminiert war, entwickelten Konsumenten einen ausgeprägten irreversiblen Parkinsonismus (Langston et al., 1983). Nach Umwandlung des MPTP in das toxische 1-Methyl-4-phenylpyridinium Ion (MPP<sup>+</sup>) (Langston et al., 1984) über das Enzym Monoaminoxidase B, wird es in dopaminerge Neurone aufgenommen (Javitch et al., 1985) und hemmt dort den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette (Nicklas et al., 1985, Ramsay et al., 1986). Neuropathologisch resultierte bei den Drogenabhängigen nach einwöchiger intravenöser Injektion von MPTP eine selektive progrediente Degeneration im nigrostriatalen Trakt und eine frühe mikrogliale Aktivierung ohne das Auftreten von LBs (Langston et al., 1999). Eine ähnliche Struktur wie das MPTP haben das Herbizid Paraquat (Di Monte et al., 1986), welches oxidativen Stress auslöst, sowie das Insektizid Rotenon, welches ähnlich wie MPTP den mitochondrialen Komplex I hemmt (McNaught et al., 1996, Tanner et al., 2011). Untersuchungen dieser Substanzen an Tiermodellen weisen deutlich auf eine Beteiligung von oxidativem Stress und mitochondrialer Dysfunktion an der Entstehung des MP hin (Dauer and Przedborski, 2003, Andersen, 2004).

#### 1.4 Mausmodelle des MP

Aufgrund der multifaktoriellen Ätiologie, sowie der heterogenen Entität des MP ist es eine große Herausforderung ein Parkinson-Tiermodell zu entwickeln, welches die Erkrankung in ihrer Gesamtheit widerspiegelt. Es gibt bereits viele verschiedene Tiermodelle, die jeweils einzelne wesentliche neuropathologische Kennzeichen des MP berücksichtigen, jedoch andere Aspekte vernachlässigen. Tiermodelle, besonders Modelle der Nagetiere (Mäuse und Ratten), sind bis heute ein unentbehrliches Instrument in der Parkinson-Forschung zur pathophysiologischen Kenntniserlangung und Testung zum Beispiel von neuroprotektiven Strategien. Am häufigsten verwendet sind neurotoxische Parkinson-Modelle, bei denen die erwähnten, toxischen Substanzen, wie MPTP, Paraquat, Rotenon oder andere Neurotoxine wie das 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) verabreicht werden (Meredith et al., 2008, Schober, 2004). Bei diesen Modellen entwickelt sich recht zuverlässig ein Parkinson-Phänotyp. So resultiert die Applikation

von MPTP bei Nagetieren zum Beispiel in einer motorischen Einschränkung und einem deutlichen neuropathologischen Korrelat mit dopaminergem Neurodegeneration in der SNpc und striatalem DA-Verlust (Dauer and Przedborski, 2003, Schmidt and Ferger, 2001). Bei chronischer Applikation von MPTP über 28 Tage, wird ein schwerwiegender Untergang von bis zu 75 % dopaminergem Neurone in der SN beobachtet (Fornai et al., 2005). Paraquat und Rotenon lösen in Nagetieren ebenfalls eine dopaminerge Neurodegeneration aus (Betarbet et al., 2000, Brooks et al., 1999, Chun et al., 2001). Neurotoxin-Modelle können zwar zuverlässig einen Parkinson-Phänotyp aufzeigen, nachteilig ist jedoch, dass der Krankheitsverlauf nicht im Einklang mit der langsamen Progredienz beim menschlichen MP steht und sich der Phänotyp sehr abrupt in einem kurzen Zeitfenster entwickelt (Meredith et al., 2008). Zudem kann dieses Modell nur bedingt zur Aufarbeitung der  $\alpha$ -Syn-Pathologie verwendet werden. Es ist zwar beschrieben, dass die MPTP-Toxizität von  $\alpha$ -Syn abhängt (Fornai et al., 2005) und dass  $\alpha$ -Syn durch MPTP hochreguliert wird, (Vila et al., 2000), jedoch eignen sich andere Modelle besser, um die Rolle des  $\alpha$ -Syn auch in Bezug auf die Krankheitsprogression näher zu erforschen. Insbesondere Mausmodelle, bei denen es zu einer Überexpression von  $\alpha$ -Syn kommt, werden in diesem Zusammenhang gerne verwendet. Die Überexpression von  $\alpha$ -Syn kann entweder über einen viralen Vektor oder über Genmutationen erfolgen (Benskey et al., 2016). Zur viral vermittelten Überexpression von  $\alpha$ -Syn wird am häufigsten ein adeno-assoziiertes virales (AAV) Vektor stereotaktisch in die SNpc injiziert, um wildtyp oder mutiertes  $\alpha$ -Syn gezielt in dopaminergen Neuronen der SN von Nagetieren exprimieren zu können. In diesem Modell kann es zu einem ausgeprägten Parkinson-Phänotyp mit deutlicher Reduktion striataler DA-Konzentrationen und dopaminergem Zellen in der SNpc nach wenigen Wochen post Injektion kommen (Kirik et al., 2002, Ip et al., 2017). Veränderungen im motorischen Verhalten in diesem Modell treten durchschnittlich erst ab einem dopaminergen Zellverlust von > 50-60 % auf (Kirik et al., 2002). Da sich die Pathologie in diesem Modell ähnlich wie im toxischen Modell in einem kürzeren Zeitraum von Wochen bis wenigen Monaten entwickelt, bietet es sich ebenso nur bedingt zur Untersuchung der Progression der Erkrankung an (Kirik et al., 2002, Benskey et al., 2016, Decressac et al., 2012). Hierfür eignen sich transgene Modelle besser, bei denen sich die Neuropathologie innerhalb von mehreren Monaten bis hin zu Jahren entwickelt (Giasson et al., 2002,

Thiruchelvam et al., 2004). Transgene Mausmodelle des MP wurden basierend auf Mutationen in den oben genannten Genen entwickelt. Die beiden beschriebenen Mutationen A53T und A30P im SNCA-Gen führen zu einer beschleunigten Fibrillenbildung des  $\alpha$ -Syn und einer gesteigerten Aggregationstendenz des  $\alpha$ -Syn (Conway et al., 1998, Li et al., 2001). Sie wurden bereits in verschiedenen Mausmodellen eingesetzt, um durch die Überexpression von  $\alpha$ -Syn einen Parkinson-Phänotyp auszulösen. Die Ausprägung des Phänotyps variiert dabei drastisch je nach Auswahl der Mutation, einer heterozygoten oder homozygoten Expression und der Expressionshöhe des  $\alpha$ -Syn (van der Putten et al., 2000, Gomez-Isla et al., 2003, Giasson et al., 2002, Fleming et al., 2005). Entscheidend in welchen Zellen das  $\alpha$ -Syn exprimiert wird, ist die Auswahl des Promotors (Benskey et al., 2016). So konnte zum Beispiel, unter Verwendung des Thy-1-Promotors, die  $\alpha$ -Syn-Pathologie unter anderem im Hirnstamm und in Motorneuronen der Vorderhörner im spinalen Trakt, nicht aber im nigrostriatalen Trakt der Mäuse nachgewiesen werden (van der Putten et al., 2000). Um eine  $\alpha$ -Syn Expression im nigrostriatalen System zu erreichen, wird ein Tyrosinhydroxylase- (TH-) Promotor verwendet. Die TH ist das Schlüsselenzym, welches die intraneuronale Synthese von Katecholaminen katalysiert, unter anderem die Oxidation von L-Tyrosin zu L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) im Rahmen der DA-Biosynthese (Haavik and Toska, 1998). Unter Verwendung eines TH-Promotors ist die  $\alpha$ -Syn Expression somit nur auf katecholaminerge Zellen beschränkt und kann im nigrostriatalen System nachgewiesen werden (Matsuoka et al., 2001). Dies garantiert jedoch nicht die Ausprägung eines Parkinson-Phänotyps. Zum Beispiel wurde in einem Bericht über ein Mausmodell, welches humanes einfach-mutiertes (A53T oder A30P)  $\alpha$ -Syn unter Verwendung eines TH-Promotors in dopaminergen Neuronen überexprimierte, keine Neurodegeneration im nigrostriatalen Trakt und kein striataler Dopaminverlust beschrieben (Matsuoka et al., 2001). Vielversprechender zeigte sich das hm<sup>2</sup> $\alpha$ -SYN-39 Mausmodell (Richfield et al., 2002, Thiruchelvam et al., 2004), welches auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Diese Mäuse exprimieren doppelt-mutiertes (A30P und A53T) humanes  $\alpha$ -Syn in heterozygoter Form unter Kontrolle des TH-Promotors der Ratte. Die beiden gut charakterisierten, familiären Parkinson-Mutationen im SNCA-Gen werden also in Kombination eingesetzt. Erstmals wurde dieses Mausmodell von Richfield et al. untersucht, der die Expression des mutierten humanen  $\alpha$ -Syns in den Zellkörpern,

Terminalen und Axonen des nigrostriatalen Traktes nachweisen konnte (Richfield et al., 2002). Ein Parkinson-Phänotyp mit altersabhängiger Einschränkung der Lokomotion (ab einem Alter von 7-9 Monaten, sowie eine dopaminerge Neurodegeneration mit reduzierter DA-Konzentration im nigrostriatalen Trakt (ab einem Alter von 16-18 Monaten) konnte in diesem Modell bereits gezeigt werden (Richfield et al., 2002, Thiruchelvam et al., 2004). Thiruchelvam et al. beschrieben eine progressive Degeneration dopaminergener Neurone in der SNpc von 19 % bei 8,5 Monate und 55 % bei 19 Monate alten männlichen Mäusen (Thiruchelvam et al., 2004). Yan et al. untersuchte das hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mausmodell im Alter von 6 Monaten und konnte weder ein verändertes motorisches Verhalten noch eine erniedrigte Zahl dopaminergener Neurone in der SNpc nachweisen (Yan et al., 2017). Die ambivalenten Ergebnisse begründen weitere Untersuchungen des hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mausmodells auf eine neuropathologische Entwicklung des dopaminergen Systems und einen Parkinson-Phänotyp. In dieser Arbeit wird dabei das Augenmerk insbesondere auf die Progression der Pathologie gelegt.

### 1.5 Neuroinflammation beim MP

Präklinische Untersuchungen an Tiermodellen des MP, sowie epidemiologische und post-mortem Studien von Parkinson-Patienten weisen auf neuroinflammatorische Mechanismen hin, die stetig die Progredienz der dopaminergen Neurodegeneration vorantreiben (Mosley et al., 2012, Hirsch et al., 2012). Den ersten Hinweis auf aktive neuroinflammatorische Prozesse beim MP lieferten McGeer und seine Kollegen 1988, als deutlich erhöhte Zahlen von Humanen Leukozytenantigen vom Isotyp DR (HLA-DR) positiver, aktivierter Mikroglia in der SN von post-mortem Parkinson-Patienten nachgewiesen wurden (McGeer et al., 1988b). Damit konnte die damalige Vermutung widerlegt werden, dass ausschließlich akute initiale Ereignisse ohne anhaltende aktive Prozesse neben der physiologischen altersbedingten Degeneration zur Krankheitsentstehung beitragen. Stattdessen wurde eine chronische Beteiligung von aktivierter Mikroglia an der Beschleunigung des Krankheitsprozesses des MP beschrieben (McGeer et al., 1988a). Eine chronisch anhaltende Aktivität von Mikroglia konnte auch bei Affen 1 Jahr nach Exposition von MPTP (Barcia et al., 2004), ebenso bei 3 Patienten noch mehrere Jahre nach MPTP-Exposition gezeigt werden (Langston et al., 1999). Folglich geht man davon aus, dass chronische, inflammatorische Prozesse in Form

eines perpetuierenden Kreislaufs die dopaminerge Neurodegeneration über Jahre hinweg beschleunigen (Barcia et al., 2003, Hirsch et al., 2012, Mosley et al., 2006). Zur Verdeutlichung dieses Kreislaufs werden die neuroinflammatorischen Mechanismen, die zur Krankheitsprogression des MP beitragen, näher erläutert. Neben der Aktivierung von Mikroglia (angeborenes Immunsystem) spielt auch die Migration von lymphatischen Zellen (adaptives Immunsystem) in das ZNS eine bedeutende Rolle.

### 1.5.1 Angeborenes Immunsystem (IS)

Mikroglia sind die angeborenen lokalen Phagozyten des ZNS, die unspezifisch auf Fremdkörper, aggregierte Proteine und kleinste Veränderungen ihrer Mikroumgebung reagieren. Ihre Hauptfunktion ist der Schutz des Hirnparenchyms vor einer möglichen Schädigung, sowie die Gewebsreparatur und die Wiederherstellung einer homöostatischen Stabilität (Kreutzberg, 1996). Mikroglia spielen allerdings eine Doppelrolle und können in Abhängigkeit von dem umgebendem Milieu auch als schädigende Zellen agieren und neurotoxische Substanzen, wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) sowie Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) freisetzen (Kreutzberg, 1996, Mosley et al., 2006). Mosley et al. beschrieb diese gegensätzlichen Rollen der Mikroglia eindrücklich als „Dr. Jekyll and Mr. Hyde“ (Mosley et al., 2006) des Nervensystems. Bei Parkinson-Patienten ist vorwiegend die neurotoxische, proinflammatorische Seite der Mikroglia aktiv, die zu einer beschleunigten Progredienz der Neurodegeneration beim MP führt (McGeer et al., 1988a). Der neurotoxische Effekt von aktivierter Mikroglia auf dopaminerge Neurone wurde bereits mehrfach demonstriert (Gao et al., 2002, Gao et al., 2008b, Stefanova et al., 2007). Die verantwortlichen Mechanismen sind allerdings immer noch Gegenstand vieler Studien. Früh erkannt wurde die Relevanz der durch Mikroglia freigesetzten proinflammatorischen Zytokine wie TNF $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) (Gayle et al., 2002). Diese Zytokine wurden in der SN von Parkinsonerkrankten erhöht vorgefunden (Boka et al., 1994, Hunot et al., 1999, Mogi et al., 2000). Ebenso wurden im Striatum, Liquor und peripherem Blut von Parkinson-Patienten erhöhte Level von TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  nachgewiesen (Mogi et al., 1994, Nagatsu et al., 2000, Hunot and Hirsch, 2003, Qin et al., 2016). TNF $\alpha$  erwies sich als eine unabdingbare Komponente im neurodegenerativen Prozess im MPTP-Mausmodell. So zeigten sich TNF $\alpha$  Rezeptor-



defiziente Mäuse gegen den neurotoxischen Effekt von MPTP geschützt (Sriram et al., 2002). Die genannten Zytokine  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1b}$  und  $\text{IFN}\gamma$  führen zur Hochregulation der induzierten Stickstoffmonoxid-Synthase auf glialen Zellen (Hunot et al., 1996) und damit zur erhöhten Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) (Hunot et al., 1999, Knott et al., 2000), welches als RNS *in vitro* neurotoxische Effekte vermittelte (Dawson et al., 1993, Chao et al., 1996). Daneben spielt die Produktion von Superoxidradikalen eine bedeutende Rolle in der mikroglialen Neurotoxizität. Diese werden durch das Enzym Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase, auch Phagozytenoxidase (PHOX) genannt, von aktivierter Mikroglia gebildet (Gao et al., 2003) und führen neben den genannten RNS zu oxidativem Stress. Es gibt zahlreiche Evidenz für oxidativen Stress als pathogenetischen Faktor beim MP (Jenner, 2003, Koutsilieri et al., 2002). Dies verdeutlichte auch eine bereits durchgeführte MPTP-Behandlung von Neuron-Glia Kulturen, bei der die MPTP-induzierte dopaminerge Neurotoxizität sowohl durch einen PHOX-Inhibitor, Apocynine, als auch durch die Verwendung von PHOX-defizienten Mäusen abgeschwächt werden konnte (Gao et al., 2003).

#### *Kreislauf von aktivierter Mikroglia und dopaminergem Neurodegeneration (Abbildung 2)*

Beim MP werden mehrere Faktoren diskutiert, die zur Aktivierung von Mikroglia führen können (Hirsch and Standaert, 2020), wie zum Beispiel Substanzen, die von absterbenden neuronalen Zellen freigesetzt werden. So führt ein Pigment aus katecholaminergen Neuronen, das humane Neuromelanin, in der SN von Ratten zur mikroglialen Aktivierung (Zecca et al., 2008). In dopaminergen Neuronen beim MP befinden sich zudem Aggregate von nitrirtem  $\alpha$ -Syn, welche nach Absterben der Zelle freigesetzt werden und ebenso Mikroglia aktivieren (Reynolds et al., 2008). Aktivierte Mikroglia mit hochregulierter induzierter Stickstoffmonoxid-Synthase führen wiederum durch die Produktion von RNS zu einer erhöhten Nitration von  $\alpha$ -Syn, welches schneller aggregiert (Hunot et al., 1996, Shavali et al., 2006, Gao et al., 2008a). Es schließt sich somit ein Kreis aus absterbenden Neuronen, die mit der Freisetzung von nitrirtem  $\alpha$ -Syn zur Aktivierung von mikroglialen Zellen führen, was über die ausgelösten neurotoxischen Effekte eine fortlaufende Neurodegeneration aufrechterhält.

### 1.5.2 Adaptives IS

Neben dem angeborenen IS gibt es beim MP Hinweise für eine relevante Beteiligung des adaptiven IS an der Krankheitsprogression, ähnlich wie bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Alzheimerdemenz und der amyotrophen Lateralsklerose (Anderson et al., 2014). Das ZNS nimmt eine immunologische Sonderrolle ein, da es den Zellen des adaptiven Immunsystems nur einen stark eingeschränkten Zugang gewährt. Das liegt zum einen an der Bluthirnschranke und zum anderen an fehlenden Lymphgefäßen, weshalb der Zugang zu Antigenen im Gehirn erschwert ist (Weller et al., 1996). Im gesunden Zustand limitiert die Bluthirnschranke die Infiltration von Zellen, Erregern und Makromolekülen in das ZNS. Dennoch sind wenige T-Zellen im ZNS gesunder Menschen und Tiere zu finden (Hickey et al., 1991, Engelhardt and Ransohoff, 2005). Zur Aktivierung des adaptiven IS werden spezifische Antigene benötigt. Antigene aus dem ZNS treffen größtenteils in tiefen zervikalen Lymphknoten auf naive Lymphozyten (Weller et al., 1996), was aufgrund der fehlenden Lymphgefäße einen anderen vorhandenen Drainageweg vom ZNS in die Peripherie vermuten lässt. Ein Abfluss mit dem Liquor über die Lamina cribrosa und Arachnoidalzotten, sowie mit interstitieller Flüssigkeit über perivaskuläre Wege wurde erkannt (Cserr and Knopf, 1992, Weller et al., 1996, Laman and Weller, 2013) und ist seit 2012 als sogenannter glymphatischer (glial-lymphatischer) Weg bekannt (Iliff et al., 2012). Dabei fließt Liquor über arterielle perivaskuläre Räume in das Hirnparenchym, wo es sich mit der interstitiellen Flüssigkeit vermischt und anschließend über venöse perivaskuläre Räume wieder abfließt (Rasmussen et al., 2018). Über diesen Weg könnten ZNS-Antigene in die Peripherie gelangen, von wo aus sie über dendritische, antigen-präsentierende Zellen (APZ) den T- und B-Zellen präsentiert werden. Die stimulierten Lymphozyten können daraufhin die Bluthirnschranke überqueren und sich im ZNS auf die Suche nach dem spezifischen Antigen machen (Engelhardt and Ransohoff, 2005).

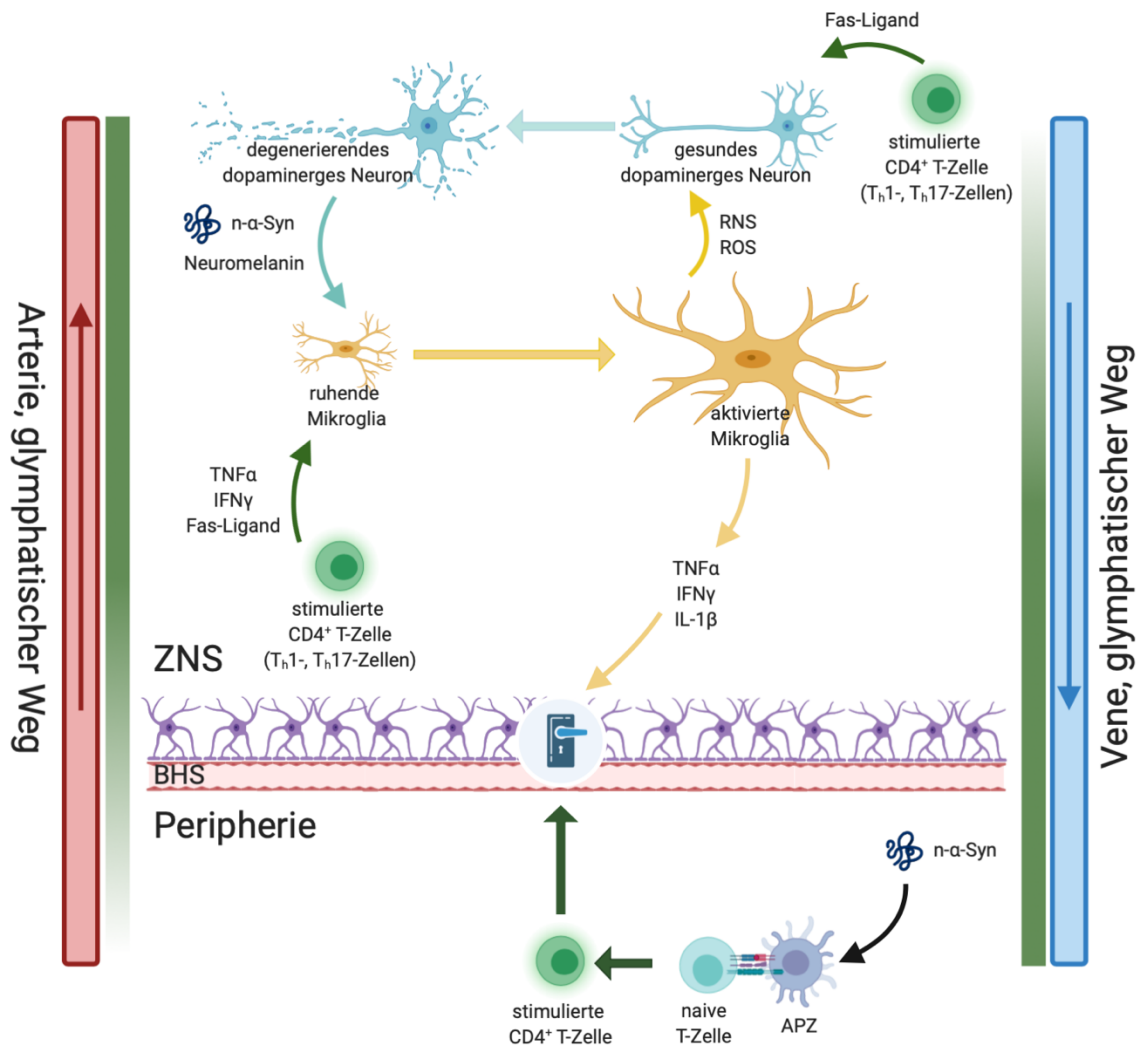
Beim MP wurde eine vermehrte T-Zellinfiltration in das ZNS beschrieben. Auffallend waren bei Untersuchungen von post-mortem Parkinsonerkrankten höhere Zahlen von CD4- und CD8-positiven T-Zellen nahe degenerierender Neurone in der SN, während keine Häufung von B-Zellen auffiel (Brochard et al., 2009). Im Serum von Parkinson-Patienten wurden zudem Veränderungen mit verringerter Lymphozytenzahl festgestellt (Bas et al., 2001, Stevens et al., 2012). Auf der Suche nach möglichen Mechanismen, die

eine vermehrte T-Zellinfiltration begünstigen, konnte bei Parkinson-Patienten eine Dysfunktion der Bluthirnschranke mit verminderter Funktion regulatorischer Effluxpumpen entdeckt werden (Farkas et al., 2000, Korteckaas et al., 2005). Aktivierte Mikroglia beeinflussen mit der Freisetzung von oben genannten proinflammatorischen Zytokinen die Permeabilität der Bluthirnschranke (Desai et al., 2007, Wong et al., 2004). So führt unter anderem TNF $\alpha$  zu einer Reduktion der Stabilität von „tight junctions“ (Wong et al., 2004) und erhöht *in vitro* ihre Permeabilität (Deli et al., 2005). TNF $\alpha$  erhöht außerdem die Expression von Adhäsionsmolekülen wie dem intrazellulären Adhäsionsmolekül-1 auf Endothelzellen (Wong et al., 1999). Eine vermehrte Expression des intrazellulären Adhäsionsmoleküls-1 konnte auch im MPTP-Mausmodell (Kurkowska-Jastrzebska et al., 1999) und bei Parkinson-Patienten in der SN auf reaktiven Astrozyten nachgewiesen werden (Miklossy et al., 2006). Dies weist auf eine erleichterte transendotheliale Migration von Leukozyten beim MP hin. Die Rekrutierung von T-Zellen wird außerdem durch den vermehrten axonalen Zelltod gefördert, der zu einer gesteigerten glialen Expression von Chemokinen führt (Babcock et al., 2003). In Bezug auf die Parkinson-Pathologie stellte sich die Frage, ob infiltrierende T-Zellen neurotoxische Effekte vermitteln und damit einen Beitrag zur fortschreitenden dopaminergen Neurodegeneration leisten. Brochard et al. konnte am MPTP-Mausmodell eine T-Zell-vermittelte dopaminerge Toxizität zeigen und demonstrierte, dass diese hauptsächlich von CD4-, nicht aber von CD8-positiven T-Zellen ausging. In CD4-defizienten Mäusen waren dopaminerge Neurone deutlich vor der MPTP-Toxizität geschützt, im Gegensatz zu CD8-defizienten Mäusen (Brochard et al., 2009). Differenzierter betrachtet konnte am MPTP-Mausmodell gezeigt werden, dass verschiedene CD4-Subgruppen unterschiedliche regulatorische Effekte auf die mikrogliale Aktivität ausüben (Reynolds et al., 2009). CD4-positive und CD25-negative nitriertes  $\alpha$ -Syn-spezifische Effektor-T-Zellen, vor allem T<sub>h</sub>17- und T<sub>h</sub>1-Zellen, führten zu einer verstärkten mikroglialen Aktivierung mit ausgeprägter neurotoxischer Funktion und verursachten in einem MPTP-Modell einen erhöhten dopaminergen Neuronenverlust (Reynolds et al., 2010). CD4-positive und CD25-positive regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>) zeigten dagegen neuroprotektive Effekte durch die Abschwächung der mikroglialen Aktivierung (Reynolds et al., 2007, Reynolds et al., 2010). Die genauen neurotoxischen Mechanismen und die Rolle von T<sub>h</sub>17-Zellen in der Parkinson-Pathologie sind noch

umstritten (Storelli et al., 2019). T<sub>h</sub>1-Zellen setzen proinflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$ , und IFN $\gamma$  frei, welche synergistisch zur kontinuierlichen Aktivierung von Mikroglia führen (Barcia et al., 2011). Außerdem können mikrogliale Zellen über den Fas/FasL-Weg von aktivierten T-Zellen direkt über die Bindung des Fas-Liganden an den Fas-Rezeptor ihrer Zelloberfläche stimuliert werden (Hirsch and Hunot, 2009). Somit schließt sich erneut ein kleiner perpetuierender Kreislauf zwischen aktivierter Mikroglia, die die Infiltration von T-Zellen in das ZNS begünstigen, welche wiederum die Aktivierung der Mikroglia auf mehreren Wegen regulieren und aufrechterhalten.

*Kreislauf von aktivierten CD4-positiven T-Zellen und dopaminergem Neurodegeneration (Abbildung 2)*

Modifiziertes  $\alpha$ -Syn wird beim MP als ein relevantes Antigen als Auslöser der adaptiven Immunantwort diskutiert (Reynolds et al., 2009, Sulzer et al., 2017). Für diese Hypothese spricht unter anderem eine Untersuchung im Tiermodell, bei der modifiziertes  $\alpha$ -Syn in zervikalen Lymphknoten nachweisbar war und periphere Lymphozyten aktivierte (Benner et al., 2008). Ebenso im peripheren Gewebe von Parkinson-Patienten konnten Anreicherungen von modifiziertem  $\alpha$ -Syn gezeigt werden (Beach et al., 2010). Außerdem wurde in einem AAV-Vektor-induziertem Mausmodell, bei dem humanes  $\alpha$ -Syn in der SN überexprimiert wird, neben der Aktivierung von Mikroglia auch eine Stimulation des adaptiven Immunsystems mit vermehrter Produktion inflammatorischer Zytokine beschrieben (Theodore et al., 2008). Wenn degenerierende Neurone nitriertes  $\alpha$ -Syn freisetzen, kann es vermutlich über den glymphatischen Weg in die Peripherie gelangen und in zervikalen Lymphknoten CD4-positive T-Zellen aktivieren. Diese, vor allem T<sub>h</sub>17- und T<sub>h</sub>1-Zellen, könnten sowohl indirekt als auch direkt zum fortschreitenden Zelltod von dopaminergen Neuronen führen. Zum einen könnten sie mikrogliale Zellen aktivieren, wie oben beschrieben, und somit indirekt neurotoxische Effekte auslösen. Zum anderen könnten sie mit der Bindung von Fas am Fas-Rezeptor auf dopaminergen Zellen direkt zum Zelltod der Neurone führen, womit sich wieder der Kreis der fortschreitenden Neurodegeneration schließen würde (Hirsch and Hunot, 2009).



**Abbildung 2:** Modell des perpetuierenden Kreislaufs aus Neurodegeneration und Neuroinflammation beim MP. Modifiziert nach Mosley et al. (Mosley et al., 2012). Die Abbildung wurde mithilfe von BioRender.com erstellt.

## 1.6 Ziel der Arbeit

Die Krankheitsprogression des MP steht in einem starken Zusammenhang mit dem Alterungsprozess und, wie zunehmend in Studien gezeigt werden konnte, auch mit neuroinflammatorischen Prozessen. Das Ziel dieser Arbeit ist die Krankheitsprogression im hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mausmodell in diesem Zusammenhang zu charakterisieren. Dabei wurden die Mäuse in verschiedenen Altersgruppen (im Alter von 2-3, 7-8, 11-12 und 16-17 Monaten) auf einen Parkinson-Phänotyp und auf neuropathologische Veränderungen des dopaminergen Systems untersucht. Es erfolgten zunächst Verhaltenstests und

anschließend Untersuchungen des nigrostriatalen Traktes auf eine mögliche dopaminerge Neurodegeneration und einen striatalen DA-Mangel. Bisherige Publikationen über dieses tg Mausmodell ergaben hierzu widersprüchliche Ergebnisse, sodass es noch immer ungeklärt ist, ob und ab welchem Alter Veränderungen im dopaminergen System sowie ein Parkinson-Phänotyp in diesem Modell auftreten. Das zunehmend relevante Forschungsthema der Neuroinflammation in der Parkinson-Pathologie wird bereits ansatzweise in pharmakologischen Mausmodellen wie dem MPTP-Modell analysiert (Kohutnicka et al., 1998, Sugama et al., 2003). Tg Mausmodelle bieten jedoch in Hinblick auf den langsam-progredienten Krankheitsverlauf einen höheren translationalen Wert zum menschlichen MP und könnten eine bessere Grundlage zur Erforschung der Rolle der Neuroinflammation beim MP bilden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals neuroinflammatorische Prozesse im hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mausmodell in verschiedenen Altersgruppen untersucht, mit dem Fokus auf eine mögliche Korrelation zwischen der Neuroinflammation und der Krankheitsprogression. Hierzu wurden in den festgelegten Altersgruppen die Infiltration von CD4- und CD8-positiven T-Zellen und B220/CD45-positiven B-Zellen, sowie die Zahl CD11b-positiver mikroglialer Zellen im nigrostriatalen Trakt quantifiziert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tiere und Tierhaltung

Es wurden weibliche und männliche heterozygote Mausmutante mit A30P und A53T Doppelmutation im SNCA-Gen sowie Wildtyp- (wt-) Mäuse auf einem C57BL/6J Hintergrund aus dem Jackson Laboratory verwendet. Hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mäuse exprimieren unter Kontrolle des Katecholamin-spezifischen TH-Promotors doppelt-mutiertes (A30P\*A53T), humanes α-Syn (Richfield et al., 2002). Für die Zucht wurden heterozygote hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mäuse mit wt Mäusen des gleichen Wurfes verpaart. Nach Aufteilung in vier verschiedene Altersgruppen (Alter von 2-3, 7-8, 11-12 und 16-17 Monaten), wurden die Versuche an heterozygoten tg Mäusen ( $n=67$ ) und zur Kontrolle an wt Mäusen ( $n=60$ ) durchgeführt. Eine Geschlechter-getrennte Analyse ergab keinen

signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschied, somit wurden bei allen Untersuchungen beide Geschlechter einbezogen.

Die Tiere waren in der Tierhaltung der Universität Würzburg im Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin (ZEMM) untergebracht. Gehalten wurden sie unter Standardbedingungen bei einer Raumtemperatur von  $22 \pm 2$  °C, einem Hell-Dunkel-Zyklus von 12 Stunden/ 12 Stunden, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 45-65 % und einer relativ pathogen-freien Umgebung. Ein ständiger freier Zugang zu Haltungsfutter und Wasser war gewährleistet. Alle Tierversuche wurden von der zuständigen Regierung von Unterfranken, Würzburg, genehmigt. Die vorgegebenen Richtlinien zur Haltung, Pflege und Nutzung der Tiere wurden befolgt.

## 2.2 Reagenzien und Chemikalien

<b>Reagenzien und Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
0,1 M Phosphate buffered saline (PBS)	Eigenherstellung, siehe unten
2-Methylbutan $\geq 99$ %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
2,3- Dihydroxybenzoesäure (DHBA)	
3,3-diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB)	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
Peroxidase Substrate Kit	
AB-Blocking Kit	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA/ SP-2001
AB-Komplex Kit	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA/ PK6100
Aceton	
Aquatex®	Merck KGaA, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
D (+) - Saccharose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
DAB Kit	Abcam, Cambridge, UK ab64238
Ethanol $> 99,8$ % absolut	Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol 70 % und 96 %	Otto Fischar GmbH, Saarbrücken
Flüssigstickstoff	
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm®	Ratiopharm GmbH, Ulm
Kohlenstoffdioxid	

---

Kresylviolett Gebrauchslösung	
Methanol	Sigma- Aldrich, Steinheim
Normal Goat Serum (NGS, 100 %)	Dako Denmark, AS, Glostrup, Dänemark
Normal Rabbit Serum (NRS, 100 %)	Dako Denmark, AS, Glostrup, Denmark
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt
Standard Ultra-Sensitive ABC Staining Kit	Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura, AV Alphen aan Den Rijn, Niederlande
Triton® X-100	Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
Vitrocloud	
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30 %)	Merck KGaA, Darmstadt
Xylol	

---

### 2.3 Antikörper (Ak)

Ak	Hersteller	Verdünnung
<b>Primär-Ak</b>		
TH rabbit anti-rat	Abcam, Cambridge, UK ab112	1:1000
CD4 rat anti-mouse	Serotec, Oxford, UK/ MCA 1767	1:1000
CD8 rat anti-mouse	Serotec, Oxford, UK/ MCA 609G	1:500
CD11b rat anti-mouse	Serotec, Oxford, UK/ MCA 711	1:100
CD45/ B220 rat anti-mouse	PD Pharma	1:100
<b>Sekundär-Ak</b>		
goat anti-rabbit-IgG H+L, biotinylated	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA/ BA-1000	1:100
rabbit anti-rat IgG, biotinylated	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA/ BA-4001	1:100

---



## 2.4 Lösungen

<b>Lösung</b>	<b>Chemikalien (Hersteller)</b>
<b>1 M PBS</b>	Für einen Liter: - 80 g NaCl (Sigma- Aldrich, St. Louis, USA) - 2 g KCl (Merck KGaA, Darmstadt) - 13,2 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O (Merck KGaA, Darmstadt) - 4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck KGaA, Darmstadt) Bis auf 1 L mit Aqua dest. auffüllen
<b>0,1 M PBS</b>	100 ml 1 M PBS in 900 ml Aqua dest. gelöst
<b>Perfusionslösung</b>	0,9 ml Heparin in 250 ml 0,1 M PBS gelöst
<b>4 % PFA, pH 7,4</b>	- 6 g PFA in 150 ml 0,1 M PBS gelöst - Rühren und Erwärmung auf 50 °C für 90 min - Abkühlung auf Raumtemperatur (RT) und Einstellung auf einen pH-Wert von 7,4 mithilfe von NaOH und HCl
<b>30 % Saccharose</b>	30 g Saccharose in 100 ml 0,1 M PBS gelöst
<b>Kryoprotektivum</b>	30 % Glycerol (Merck KGaA, Darmstadt) 30 % Ethoxyethanol 40 % PBS
<b>10 % BSA</b>	10 g BSA in 100 ml 0,1 M PBS gelöst
<b>POD-Block</b>	1,75 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in 100 ml Methanol
<b>DAB-Lösung</b>	4 Tropfen (Tr.) DAB 2 Tr. Buffer-Stock

---

	2 Tr. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> In 5 ml Aqua dest.
<b>DAB-Kit</b>	- 1 ml Substrat Puffer - 50 µl Enhancer - 20 µl Chromogen
<b>AB-Komplex Kit</b>	- 2 Tr. Avidin - 2 Tr. Biotin - in 5 ml 0,1 M PBS, 30 min Vorinkubation
<b>Standard Ultra-Sensitive ABC Staining Kit</b>	Avidin und Biotin 1:55 verdünnt in der jeweiligen Ak-Lösung, 30 min Vorinkubation
<b>Homogenisat-Puffer</b>	- 150 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> - 500 µM Diethylentriaminpentaessigsäure
<b>HPLC-Laufmittel</b>	- 0,975 mM Octansulfonsäure - 0,5 mM Triethylamin - 0,1 mM Ethylendiamintetraessigsäure - 2 mM KCl - 0,09 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 14 % Methanol pH- Wert Einstellung mit Phosphorsäure auf 3,88

---

## 2.5 Geräte und Instrumente

### 2.5.1 Verhaltensexperimente

---

<b>Geräte und Instrumente</b>	<b>Hersteller</b>
Open Field Box 39,5 x 39,5 cm	Werkstatt der Neurologie Würzburg

---

Kamera	Panasonic WV-CP500 SD5
Ethovision XT 8.5 (Software)	Noldus, Wageningen, Niederlande
Rotarod®	TSE Systems, Bad Homburg
TSE RotaRod V4.0.1 (Software)	TSE Systems, Bad Homburg
Zylinder (Durchmesser 12 cm, Höhe 30 cm)	Werkstatt der Neurologie Würzburg

### 2.5.2 Gehirnentnahme

Geräte und Instrumente	Hersteller
Cryomolds®	Polysciences Inc., Warrington, PA, USA
Cryotubes	
Petrischale	
Aufziehspritze 20 ml	
Präparier-Besteck	
Gehirn Matrix, koronal	Ted Pella, Redding, CA, USA

### 2.5.3 Immunhistochemie

Geräte und Instrumente	Hersteller
Deckglas	R. Langenbrinck, Emmendingen
Objektträger Superfrost Plus	R. Langenbrinck, Emmendingen
Falcon® Cellstar 50 ml Röhren	Greiner Bio One, Tokyo, Japan
Eppendorf Tubes® 5 ml	
Eppendorfgefäße 150 µl und 200 µl	
6-Kammer-Platten	
Wippschüttler	
Kryostat Leica 3050	Leica Biosystems, Nussloch
Axiophot/ Axioplan 2 Mikroskop mit Kamera	Zeiss, Göttingen Visitron Systems, Puchheim
Lichtmikroskop Olympus BH2	Olympus, Hamburg
Olympus BX53 Lichtmikroskop	Olympus, Hamburg

mit Kamera	Mbf Bio Science, Williston, USA
Metavue Software	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
Spot Imaging Software 5.2	Diagnostics Instruments, Inc.
NIH Image J Software 4.7	
Stereo Investigator Hardware und Software-Version 11.07	MicroBrightfield Biosciences, Williston, Vermont, USA
Vortex Mixer	Labinco, Breda, Niederlande

#### 2.5.4 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

<b>Geräte und Instrumente</b>	<b>Hersteller</b>
HPLC 1260 Infinity	Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA
Sonopuls Ultrasonic Homogenizer	Bandelin, Berlin
Zentrifuge 5427 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Haraeus, Hanau
Nucleosil 120-5 C <sub>18</sub> Säule (250 mm x 4 mm, 5 µm)	Macherey- Nagel, Düren
DECADE Elite (elektrochemischer Detektor)	Antec Scientific, Zoeterwoude, Niederlande
Ultrafree-MC Zentrifugen Filter 0,22 µm	Merck, Darmstadt

## 2.6 Verhaltensexperimente

Zur Charakterisierung eines Parkinson-Phänotyps im hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mausmodell erfolgten zunächst drei verschiedene Verhaltensexperimente, die die motorische Funktionsfähigkeit der Mäuse in den vier Altersgruppen (Alter von 2-3, 7-8, 11-12 und 16-17 Monaten) prüften. Die Verhaltenstests wurden konsequent morgens durchgeführt, um gleiche tagesabhängige Bedingungen zu gewährleisten. Die Reihenfolge der Experimente wurde bei allen Tieren gleichermaßen eingehalten.

**Tag 1:** „Open Field“-Testung und 1. Rotarod-Training

**Tag 2:** Zylinder-Test und 2. Rotarod-Training

**Tag 3:** Rotarod-Testung

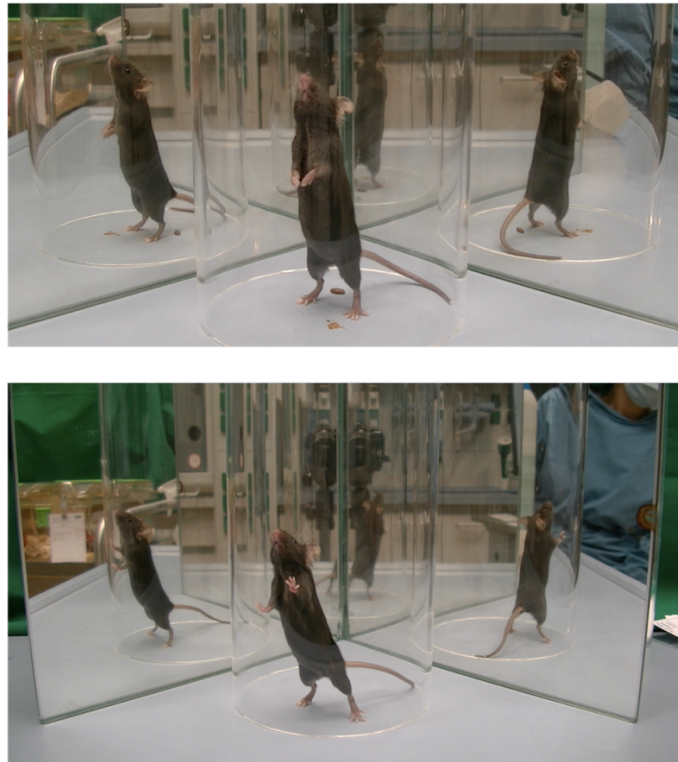
### 2.6.1 „Open Field“

Zur Untersuchung des explorativen Verhaltens, der Gehfähigkeit und der spontanen motorischen Aktivität der Mäuse wurde eine „Open Field“-Testung durchgeführt. Dazu wurde eine standardisierte Box unter einem Licht und einer CCD Kamera auf einem Tisch platziert, sodass die gesamte Box unter einer einheitlich verteilten Lichtbestrahlung aufgenommen werden konnte. Eine Maus wurde in die Box gesetzt, wo sie sich frei bewegen konnte. Dabei wurde mithilfe eines integrierten Computeranalysesystems, der Ethovision XT Software (Noldus), die Wegdistanz [cm] über jeweils 30 min aufgezeichnet. Nach Beendigung der Messung wurde die Box nach jeder Maus gründlich mit 0,1 % Essigsäure ausgewischt, um eine Neutralisierung der Gerüche zu gewährleisten.

### 2.6.2 Zylinder-Test

Der Zylinder-Test diente der allgemeinen Koordinations- und motorischen Aktivitätsprüfung der Mäuse. Zur Durchführung wurde eine Maus in einen Plexiglas Zylinder gesetzt, in dem sie sich bewegen konnte. Dieser war zwischen zwei in einem 90° Winkel zueinander aufgestellten Spiegeln platziert, um Bewegungen der Vorderpfoten auch beim Wegdrehen der Maus von der Kamera gut sichtbar aufnehmen zu können. Es wurde ein Video über 12 min, von vorne auf den Zylinder blickend, mit einer Kamera aufgezeichnet. Nach jeder Maus wurde der Zylinder gründlich mit Glasreiniger gesäubert, um Gerüche zu neutralisieren. Das Aufbäumen einer Maus wurde jeweils in 10-minütigen Zeiträumen ab der abgelaufenen 1. bis zur 11. Minute quantitativ bestimmt. Je höher die Anzahl des Aufbäumens, desto höher wurde die Aktivität einer Maus eingeschätzt. Außerdem wurde differenziert zwischen einem häufigen Aufbäumen ohne Kontakt der Vorderpfoten mit der Wand, was als gutes Koordinationsvermögen gewertet wurde, und einem häufigen Aufbäumen mit Verwendung der Vorderpfoten zum Abstützen an der Wand, was wiederum auf ein schlechtes Koordinationsvermögen mit möglicher posturaler Instabilität hindeuten könnte. Da keine relevanten Unterschiede

bezüglich einer Differenzierung zwischen dem Aufbäumen mit Kontakt der Vorderpfoten zur Zylinderwand bzw. ohne Kontakt ersichtlich waren, wird in dieser Arbeit ausschließlich auf die Gesamtzahl des Aufbäumens eingegangen.



---

**Abbildung 3:** Repräsentative Szenen aus Videoaufnahmen während dem Zylinder Test. Ein freies Aufbäumen ohne Berührung der Vorderpfoten an der Wand (oben) und ein Aufbäumen mit Berührung beider Vorderpfoten an der Wand (unten).

### 2.6.3 Rotarod-Analyse

Zur Analyse der Motorfunktion der Mäuse wurde zusätzlich eine Rotarod-Testung durchgeführt. Verwendet wurde hierfür die TSE RotaRod Software und die Rotarod Apparatur. Pro Durchlauf konnten 5 Mäuse in 5 voneinander getrennten Kammern gleichzeitig getestet werden. Ein rotierendes Rad mit 3 cm Durchmesser, auf einer Höhe von 27,2 cm zog durch alle 5 Kammern. Die Mäuse wurden auf das langsam vorwärtsrotierende Rad gesetzt und sollten sich darauf fortbewegen. Die Rotationsgeschwindigkeit des Rades stieg pro Durchlauf innerhalb von maximal 5 min kontinuierlich von 5 UpM auf 50 UpM an. Der Boden der Apparatur bestand aus einem

Gestell aus Gitterstäben, auf dem die Mäuse nach dem Herunterfallen landeten. Dieses Gitter war an Sensoren verknüpft, die das Herabfallen der Mäuse detektierten. So wurde für jede Maus die Latenz ab dem Aufsetzen auf das Rad bis zum Zeitpunkt des Herunterfallens [s] gestoppt. Nach Beendigung der Messung wurden die Trennwände, das Rad und das Gitter mit 0,1 % Essigsäure gesäubert, um Gerüche zu neutralisieren. Zur Gewöhnung an die Testapparatur und den Versuchsablauf wurde jede Maus an 2 Tagen vorher trainiert. Am 3. Tag wurden 6 Durchläufe pro Maus gemessen. Für jede Maus wurde der Mittelwert aus den besten 5 Latenzen bis zum Herunterfallen berechnet. Wenige Mäuse mit Mittelwerten unter 50 s wurden aus der Auswertung exkludiert.

## 2.7 Organentnahme

### 2.7.1 Transkardiale Perfusion

Nach Durchführung aller Verhaltensexperimente wurden die Tiere in einer mit CO<sub>2</sub> gefüllten Kammer eingeschläfert. Bei Eintreten der Bewusstlosigkeit und Ausfall von Schmerzreaktionen wurde die Maus an einer mit Aluminium bezogenen Styroporplatte fixiert und der Brustkorb eröffnet. Es folgte die Inzision des rechten Vorhofs und zeitgleich die transkardiale Perfusion mit 15 ml der Heparin-PBS-Perfusionslösung über den linken Ventrikel. Zur Gehirnentnahme wurde die Kopfhaut vom Nacken bis zu den Augen ab präpariert und die Schädelkalotte entlang der Sagittalnaht eröffnet und von medial nach lateral entfernt. Anschließend wurde das Gehirn *in toto* entnommen.

### 2.7.2 Allgemeines zur Organentnahme

Für die Immunhistochemie und die HPLC wurden die beiden Hirnstrukturen SN und Striatum benötigt. Das Striatum füllt große Teile des rostralen Gehirnbereichs aus, wohingegen die SN mit den Somata der dopaminergen Neurone sich eher im okzipitalen Bereich des Gehirns befindet. Daher wurden die Gehirne nach kurzem Waschen in 0,1 M PBS jeweils am Übergang zur SN in der koronaren Ebene bei Bregma -0,94 mm (Abbildung 39 des Maushirn-Atlas von Paxinos, George; Franklin, Keith B. J., Second Edition, 2001) mit einer Gehirn Matrix halbiert, sodass das Striatum und die SN getrennt voneinander weiterverarbeitet werden konnten.

### 2.7.3 Organentnahme für die Immunhistochemie

#### *Immunhistochemie von unfixiertem Gewebe*

Die Gehirnhälften wurden nach der Teilung jeweils in ein Cryomold® in Tissue Tek® mit den Schnittflächen gerade und plan auf dem Boden aufliegend eingebettet. Anschließend wurden beide Hälften in Trockeneis gekühltem Methylbutan eingefroren und bei -22 °C gelagert.

#### *Immunhistochemie von PFA-fixiertem Gewebe*

Für die Immunhistochemie von PFA-fixiertem Gewebe (TH- und Nissl-Färbung) wurde ausschließlich die SN in der okzipitalen Gehirnhälfte benötigt. Diese wurde zunächst in einem mit 4 % PFA in 0,1 M PBS gefüllten Röhrchen für 48 Stunden bei 4 °C fixiert. Anschließend wurde das Gewebe in einem mit 30 % Saccharose in 0,1 M PBS gefüllten Röhrchen für weitere 48 Stunden bei 4 °C inkubiert. Am 5. Tag wurde die Hirnhälfte in ein mit Tissue Tek® befülltes Cryomold® vollständig eingebettet. Die Schnittfläche sollte dabei gerade und plan dem Boden des Cryomolds aufliegen. Die Gewebeblöcke wurden vorsichtig in Trockeneis gekühltem Methylbutan eingefroren und bei -22 °C im Gefrierschrank gelagert.

### 2.7.4 Organentnahme für die HPLC

Für die HPLC wurde ausschließlich striatales Gewebe aus der rostralen Hirnhälfte benötigt. Nach kurzem Waschen in 0,1 M PBS wurden die Gehirne mit einer Gehirn Matrix in der koronaren Ebene an drei Stellen geteilt:

1. Klinge: ca. 3 mm okzipital des Chiasma opticum (Bregma -0,94 mm)
2. Klinge: 2 mm rostral von 1. Klinge (Bregma +1.06 mm)
3. Klinge: 2 mm rostral von 2. Klinge (Bregma +3.06 mm)

Die rostralen 2 mm dicken Schnitte zwischen 1. und 2. Klinge, sowie zwischen 2. und 3. Klinge wurden unter dem Mikroskop weiterverarbeitet. Dabei wurde der Cortex vom Striatum mit einem Skalpell entfernt. Das Striatum der rechten und linken Hirnhemisphäre wurde seitengetreunt in 2 Cryotubes gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der Cortex des größeren Schnittes wurde in beiden Hemisphären jeweils in drei Abschnitte unterteilt: somatosensibler Cortex (S), motorischer Cortex medial (M1)



und motorischer Cortex lateral (M2). Diese wurden seitentrennt in 3 Cryotubes gegeben und ebenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Gelagert wurde das Gewebe bei -80 °C.

## 2.8 Immunhistochemie

### 2.8.1 Übersicht über die Immunhistochemie

Zur Detektion einer möglichen dopaminergen Neurodegeneration wurde zum einen die optische Dichte (OD) der TH-positiven Terminalen im Striatum gemessen, zum anderen wurde die Anzahl TH- und Nissl-positiver Zellen in der SN stereologisch bestimmt. Die Darstellung dopaminergener Neurone erfolgte durch eine TH-Färbung der SN und des Striatums. Zur Untersuchung der Inflammation im nigrostriatalen Trakt wurden T-Zellen durch eine CD4- und CD8-Färbung, B-Zellen durch eine B220/CD45-Färbung und die Mikroglia durch eine CD11b-Färbung dargestellt und unter einem Lichtmikroskop quantifiziert. Alle Auswertungen erfolgten verblindet und ausschließlich in einer Hemisphäre, wobei zufällig die linke Hemisphäre ausgewählt wurde. Tabelle 1 stellt eine Übersicht über die Färbungen mit Angabe der gefärbten Präparate und ihrer Schnittdicke dar.

<b>Immunhistochemie</b>	<b>Gehirnareal</b>	<b>Präparate, Schnittdicke</b>
TH- und Nissl-Färbung	SN	PFA-fixiertes Gewebe, 40 µm
TH-Färbung	Striatum	Unfixiertes Gewebe, 10 µm
T-Zell-Färbung (CD4, CD8)	Striatum und SN	Unfixiertes Gewebe, 10 µm
Mikroglia Färbung (CD11b)	Striatum und SN	Unfixiertes Gewebe, 10 µm
B-Zell-Färbung (B220/CD45)	Striatum und SN	Unfixiertes Gewebe, 10 µm

**Tabelle 1:** Übersicht über die Immunhistochemie mit den durchgeführten Färbungen, der gefärbten Gehirnareale (SN oder Striatum) und der verwendeten Präparate mit unterschiedlicher Fixierung und Schnittdicke.

### 2.8.1.1 Schneiden der Präparate

Zur Anfertigung der Gehirnschnitte wurde ein Kryostat (Leica) mit einer Kammertemperatur von  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  und einer Objektträgertemperatur von ca.  $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$  verwendet. Um die gesamte SN zu erfassen, wurden die okzipitalen Gewebeblöcke in koronarer Ebene ab Bregma  $-2,46\text{ mm}$  (Abbildung 51 des Maushirn-Atlas von Paxinos und Franklin) bis Bregma  $-4,04\text{ mm}$  (Abbildung 64 des Maushirn-Atlas von Paxinos und Franklin) geschnitten. Das Striatum in den rostralen Gewebeblöcken wurde in koronarer Ebene ab Bregma  $-0,82\text{ mm}$  (Abbildung 38 des Maushirn-Atlas von Paxinos und Franklin) bis Bregma  $+1,18\text{ mm}$  (Abbildung 21, Maushirn-Atlas von Paxinos und Franklin) geschnitten.

#### *Unfixiertes, frisch eingefrorenes Gewebe*

Von den frisch eingefrorenen Gehirnhälften wurden  $10\text{ }\mu\text{m}$  dünne Schnitte der SN und des Striatums direkt auf Objektträger (OT) aufgenommen. Die linke Hirnhemisphäre wurde durch vorsichtige Punktion eines kleinen Lochs mit der Spitze einer gekühlten Pinzette in den oberen Teil des linken Cortex markiert. Pro OT wurden 4 Schnitte aufgenommen. Diese wurden bei  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

#### *PFA-fixiertes SN-Gewebe*

Von den PFA-fixierten okzipitalen Gehirnhälften wurden  $40\text{ }\mu\text{m}$  dünne Gefrierschnitte der SN angefertigt. Zur Unterscheidung der linken von der rechten Hemisphäre wurde durch zarte Punktion eines kleinen Lochs in den oberen Teil des linken Hirnstamms die linke Hemisphäre markiert (Abbildung 2). Die Markierung sollte dabei außerhalb der zu untersuchenden SN, jedoch nicht im Hippocampus oder Cortex liegen, da diese Areale im Färbeprozess verloren gehen könnten. Die Schnitte wurden nach dem Prinzip „free floating“ seriell der Reihe nach in 5 mit Kryoprotektivum gefüllte Röhrchen gegeben. Bei einer rostral-kaudalen Gesamtlänge der SN von  $1,58\text{ mm}$ , einer Schnittdicke von  $40\text{ }\mu\text{m}$  und in jedem Röhrchen Schnitte mit Abständen von  $160\text{ }\mu\text{m}$  zueinander (Serie 1/5) lagen letztendlich in jedem Röhrchen 7-9 freischwimmende Gefrierschnitte vor. Die Röhrchen wurden bis zur Weiterverarbeitung in Gefrierschränken bei  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.8.1.2 Übersicht über gefärbte Gehirnareale der unfixierten Kryoschnitte

Von den 10 µm dünnen frisch eingefrorenen Gefrierschnitten wurden jeweils 3 Areale des Striatums (rostral, mittig, okzipital) und 1 Areal der SN gefärbt. Die Areale für die Färbungen wurden in Anlehnung an den Maushirnatlas von Paxinos und Franklin (Paxinos, George; Franklin, Keith B. J.: The Mouse Brain in Stereotactic Coordinates, Second Edition, 2001) ausgewählt. In der Tabelle 2 ist die Übersicht über die Auswahl der gefärbten Gehirnareale des Striatums und der SN dargestellt.

<b>Gehirnareal</b> <b>10 µm Schnitte</b>	<b>Maushirnatlas Paxinos und Franklin</b>	<b>Färbung</b> <b>Primärantikörper</b>
<b>Striatum rostral</b>	Abbildung 23, Bregma +0,98 mm	TH CD4
<b>Striatum mittig</b>	Abbildung 30, Bregma +0,14 mm	CD8 CD11b
<b>Striatum okzipital</b>	Abbildung 34, Bregma -0,46 mm	B220/CD45
<b>Substantia nigra</b>	Abbildung 57, Bregma -3,16 mm	CD4 CD8 CD11b B220/CD45

**Tabelle 2:** Übersicht über die gefärbten Gehirnareale der 10 µm dünnen, unfixierten Kryoschnitte in Anlehnung an entsprechende Abbildungen aus dem Maushirnatlas von Paxinos und Franklin (2001). Die durchgeführten Färbungen sind zur Übersicht nochmals dargestellt.

### 2.8.2 TH- und Nissl-Färbung der SN

#### *TH-Färbung*

Pro Versuchstier wurde eines der 5 Röhrchen mit einer Serie (1/5) von 40 µm dicken Gefrierschnitten der PFA-fixierten SN gefärbt. Die Auswahl des Röhrchens erfolgte rein zufällig. Die in Kryoprotektivum freischwimmenden Gefrierschnitte wurden zunächst in Aqua dest. 3 min und anschließend in einer 6-Kammer-Waschplatte mit 0,1 M PBS 3x jeweils 5 min gewaschen. Alle Inkubationen erfolgten auf einem Wippschüttler. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde in der Block-Lösung wurden die Schnitte in eine Lösung aus dem Primär-Ak gegeben und inkubierten über Nacht bei RT.

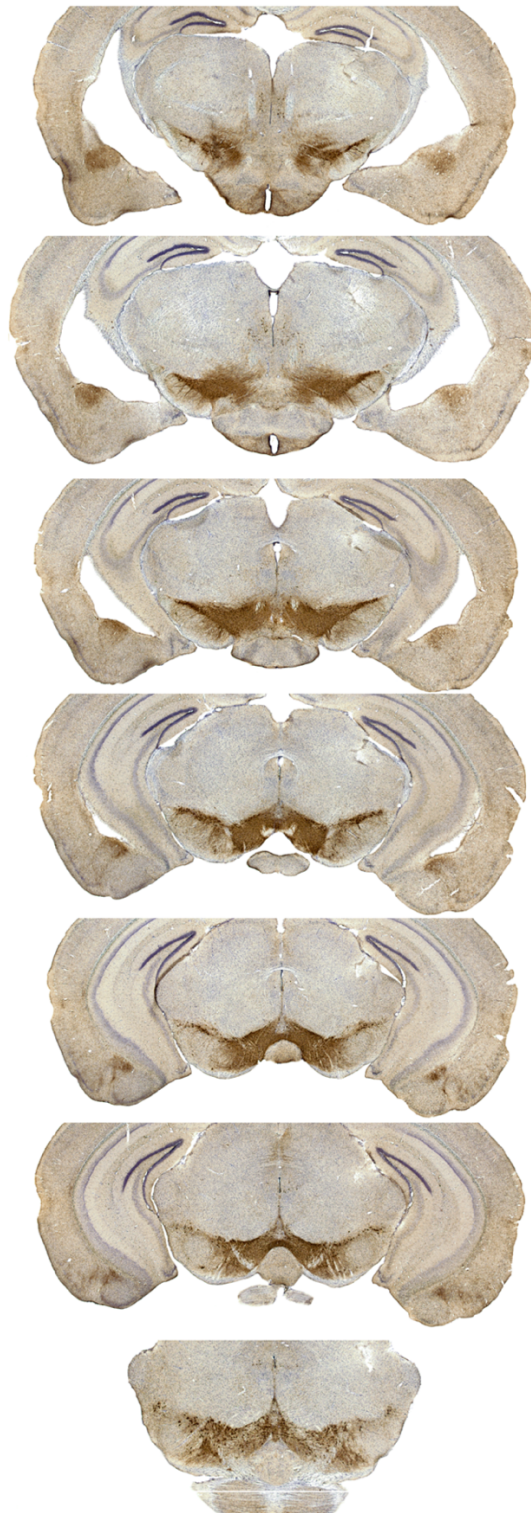
Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte in 0,1 M PBS 3x 5 min gewaschen. Anschließend inkubierten die Schnitte für 2 Stunden bei RT in einer Lösung aus dem Sekundär-Ak. Nach 2 Stunden Inkubation in der Lösung des Sekundär-Aks wurden die Schnitte erneut in 0,1 M PBS 3x 5 min gewaschen. Es folgte eine 2-stündige Inkubation in der vorinkubierten Lösung aus Avidin und Biotin (Standard Ultra-sensitive ABC Staining Kit) und ein anschließendes 3-maliges Waschen in 0,1 M PBS für jeweils 5 min. Unter dem Abzug wurde die DAB-Lösung hergestellt, in eine flache Petrischale gefüllt, sodass die Schnitte anschließend in die Lösung überführt werden konnten. Nach 2-4 min, sobald die Braunfärbung eine optimale Intensität erreicht hatte, wurden die Schnitte 2x 4 min in Aqua dest. zum Waschen gegeben. Die kanzerogene DAB-Lösung und alle verwendeten kontaminierten Materialien wurden im dafür vorgesehenen DAB-Abfall unter dem Abzug entsorgt. Die Schnitte wurden daraufhin einzeln auf die OT aufgezogen. Die OT mit den aufgezogenen Schnitten trockneten bei RT über Nacht.

*Block-Lösung:* 10 % NGS/ 2 % BSA/ 0,5 % Triton® X-100/ 0,1 M PBS

*Ak-Lösung:* 2 % NGS/ 2 % BSA/ 0,5 % Triton® X-100/ 0,1 M PBS

### *Nissl-Färbung*

Am 3. Tag wurde eine gebrauchte Kresylviolett-Lösung unter dem Abzug in eine große Glasküvette gefiltert, in die die OT in einem Glaskörbchen für 30 min gestellt wurden. Die OT wurden anschließend 3-malig für jeweils 5 min in Aqua dest. gewaschen. Es folgte die Inkubation in einer aufsteigenden Alkoholreihe, bei der die OT für jeweils 1 min in 3 mit 70 %-igem Ethanol, anschließend in 2 mit 96 %-igem Ethanol und in 2 mit 100 %-igem Ethanol gefüllte Glasküvetten gestellt wurden. In der letzten mit 100 %-igem Ethanol gefüllten Glasküvette wurden die OT nur für 35 s belassen. Abschließend wurden die OT noch in 2 mit Xylol gefüllten Glasküvetten für jeweils 5 min inkubiert. Die OT wurden einzeln aus dem Xylol genommen und mit einem Deckglas bedeckt, welches vorher mit Vitrocloud beträufelt wurde. Die OT trockneten unter dem Abzug über Nacht. In Abbildung 4 ist eine Serie aus 7 TH- und Nissl-gefärbten Kryoschnitten repräsentativ dargestellt.



**Abbildung 4:** Serie (1/5) aus 7 TH- und Nissl-gefärbten 40  $\mu\text{m}$  dicken Kryoschnitten der SN (von rostral/oben nach kaudal/unten) mit Abständen von jeweils 160  $\mu\text{m}$  zueinander. Die linke Hemisphäre ist mit einem sichtbaren kleinen Loch im linken Hirnstamm markiert.

### 2.8.2.1 Stereologische Quantifizierung dopaminergener Neurone in der SNpc

Zur Abschätzung der Gesamtzahl dopaminergener Neurone in der SNpc und pars lateralis einer Hemisphäre (links) wurde die Stereo Investigator Software-Version 11.07 (MicroField Biosciences) verwendet. Es wurden TH- und Nissl-positive Zellen gezählt, wobei von den Nissl-positiven Zellen nur die als Neuron identifizierbaren Zellen mit eindeutig erkennbarem Zellkern und hellem Zytoplasma gezählt wurden. Die Zählung der Nissl-gefärbten Neurone diente der Differenzierung zwischen einem ausschließlichen Enzymverlust der TH und dem tatsächlichen Untergang TH-positiver Neurone.

Die OT mit den 6-7 SN-Schnitten einer Maus wurden nacheinander auf dem motorisierten Objektträgtisch des BX53-Lichtmikroskops positioniert und die SN der linken Hemisphäre gut sichtbar eingestellt. Eine Kamera (Mbf Bio Science, Williston) übertrug die Bilder des Mikroskops auf einen Computer, auf dem das Stereo Investigator Programm geöffnet wurde. Folgende Einstellungen erfolgten:

- Schnittdicke '40  $\mu\text{m}$ '
- Schnittintervall '5'
- Auswahl des Objektivs mit 2-facher Vergrößerung für die Übersicht und manuelle Umrandung der Pars compacta und Pars lateralis der SN einer Hemisphäre (links) in Anlehnung an Baquet (Baquet et al., 2009) und dem Maushirnatlas von Paxinos und Franklin (2001)
- Auswahl des Objektivs mit 100-facher Vergrößerung für die Tiefenschärfe
- Anpassung der Helligkeit
- Größe des Zählrahmens '50  $\mu\text{m}$  x 50  $\mu\text{m}$ '
- Rastergröße '110  $\mu\text{m}$  x 110  $\mu\text{m}$ '
- Grenzzone '2  $\mu\text{m}$ '

Das Programm legte automatisch und randomisiert ein Rastersystem innerhalb des umrandeten Bereichs fest. In jedem Raster musste die Grenze der Ober- und Unterseite des Schnittes festgelegt werden. Innerhalb jeden Rasters wurde jede regelhafte TH- bzw. Nissl-positive Zelle mit 2 verschiedenen Markern auf dem Monitor gekennzeichnet. Zur Zählung wurden bestimmte Regeln befolgt, die im folgenden Abschnitt genauer erläutert

werden. Auf diese Art und Weise wurde jedes Raster bearbeitet und nach Vollendung eines Schnittes das gleiche Prozedere für einen nächsten Schnitt der gleichen SN wiederholt. Sobald alle 6-7 Schnitte der SN eines Tieres bearbeitet waren, wurde der Zählvorgang beendet. Das Programm berechnete nun aus den gesetzten Markern die Gesamtzahl aller TH- und Nissl-positiven Neurone. Der Fehlerkoeffizient („Coefficient of Error/ CE“) - Wert nach Gundersen ( $m=1$ ) sollte bei einer glaubwürdigen Zählung weniger als 0,1 betragen (Gundersen and Jensen, 1987).

#### *Regeln zur Zählung TH- und Nissl-positiver Zellen (Abbildung 5)*

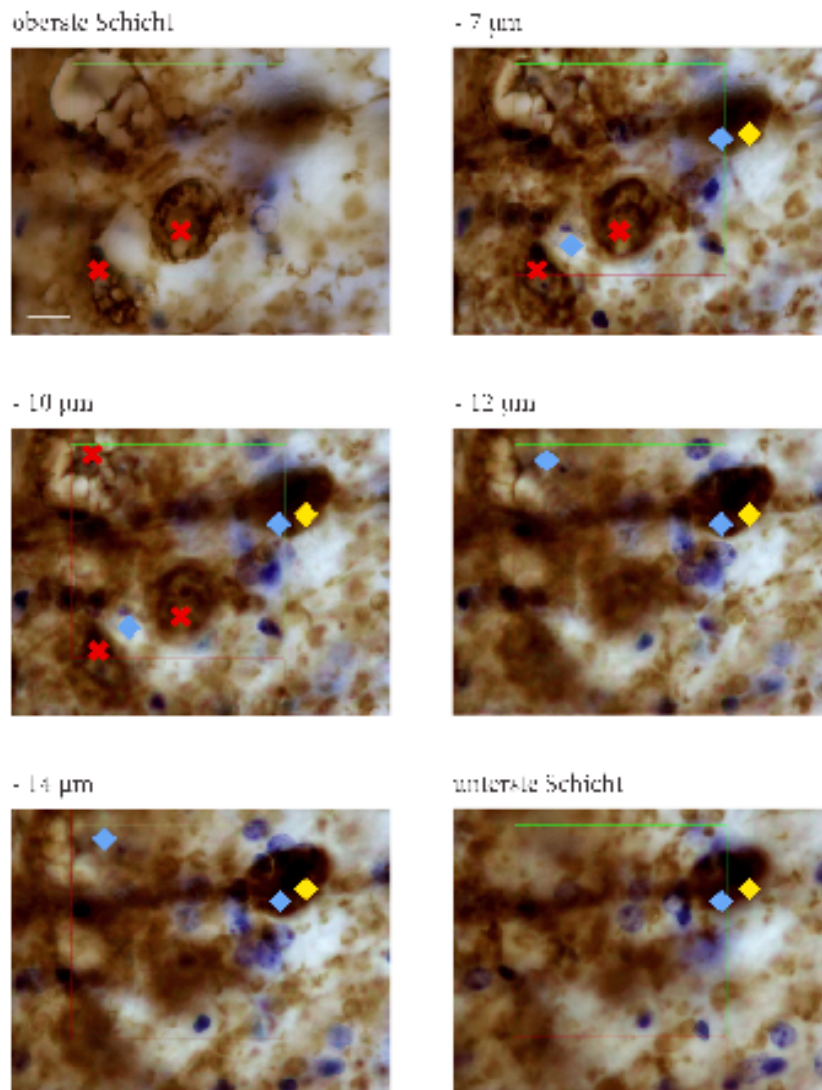
Generell wurden nur Zellen gezählt, die entweder komplett innerhalb des Rasters lagen oder die grünen Rasterlinien berührten. Zellen, die die roten Rasterlinien berührten, wurden primär ausgeschlossen. Ebenso wurden Zellen, die an der Oberseite des Schnittes angeschnitten waren, ausgeschlossen. Jede gezählte TH-positive Zelle wurde gleichzeitig auch als Nissl-positive Zelle markiert. Eine Berührung der roten oder grünen Rasterlinien von der braunen TH-Umrandung einer Zelle, nicht aber von dem Nissl-gefärbten Zellanteil, wurde dennoch als Berührung der gesamten Zelle gewertet.

#### TH-positive Zelle:

- braune Färbung einer Zelle, die sich deutlich auf die Zelle beschränkte
- klar erkennbare Zellstruktur
- erkennbare bläuliche Nissl-Färbung eines Neurons innerhalb der braun gefärbten Zelle oder ohne sichtbare bläuliche Nissl-Färbung

#### Nissl-positive Zelle:

- bläulich-gefärbte Somata von Neuronen
- blasses Zytoplasma und dunkler, runder und zentraler Zellkern
- alle TH-positiv markierten Zellen wurden zugleich Nissl-positiv markiert



**Abbildung 5:** Repräsentative Bilder eines Rasters innerhalb der SNpc schichtweise von der Obergrenze (oben links) bis zur Untergrenze (unten rechts) des Schnittes. Mit einem roten Kreuz markierte Zellen berühren entweder die roten Linien des Rasters oder sind an der Obergrenze des Schnittes angeschnitten und wurden dementsprechend nicht gezählt. Zellen, die mit einer blauen Raute markiert sind, wurden als Nissl-Zellen gezählt. Mit einer gelben Raute markierte Zellen wurden als TH-positive Zellen gezählt. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10µm.



### 2.8.3 TH-Färbung des Striatums

Die ausgewählten unfixierten, 10 µm dünnen Gefrierschnitte des rostralen, mittigen bzw. okzipitalen Striatums (Tabelle 2), wurden nach kurzem Trocknen in einer Glasküvette mit 4 % PFA für 15 min unter dem Abzug fixiert. Die Schnitte wurden anschließend mit 0,1 M PBS abgespritzt und das PFA in den entsprechenden Abfall entsorgt. Jeder Schnitt wurde mit einem Pap-Pen umrandet. Es erfolgte für jeden Schnitt ein Waschvorgang von 3x 5 min mit 0,1 M PBS in einer Feuchtkammer. Daraufhin folgte eine 15-minütige Inkubation in einer Glasküvette mit einer POD-Block Lösung. Anschließend wurden die Schnitte erneut in 0,1 M PBS 3-malig über jeweils 5 min gewaschen. Es folgte eine 1-stündige Inkubation in der Blocklösung (Tabelle 3). Nach 1 Stunde erfolgte eine Inkubation in der Primär-Ak-Lösung (Tabelle 3) über Nacht bei Raumtemperatur (RT). Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte nach 3-maligem Waschen in 0,1 M PBS über jeweils 5 min mit der Sekundär-Ak-Lösung (Tabelle 3) beträufelt und eine Inkubationszeit von 1 Stunde wurde eingehalten. Die Schnitte wurden erneut gewaschen (3x 5 min) und anschließend in der vorinkubierten Avidin-Biotin-Lösung (Standard Ultra-sensitive ABC Staining Kit) für 1 Stunde inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschvorgang (3x 5 min). In der Zwischenzeit wurde die DAB-Lösung unter dem Abzug vorbereitet. Auf jeden Schnitt wurde 1 Tr. der DAB-Lösung gegeben und 2-2,5 min inkubiert. Unter dem Mikroskop konnte die Braunfärbung beobachtet und bei optimaler Farbintensität durch Abspritzen der Schnitte mit Aqua dest. gestoppt werden. Die DAB-Lösung wurde in dem entsprechenden Abfall entsorgt. Die gefärbten OT wurden abschließend 2x 5 min in Aqua dest. gewaschen und mit Aquatex® und Deckgläsern bedeckt.

#### 2.8.3.1 Quantifizierung dopaminerger Terminalen im Striatum

Durch die Ermittlung der Grauwerte des Striatums mit der NIH Image J Software sollte die OD der gefärbten Striatumschnitte bestimmt werden. Die OD stellt in dieser Methode ein Maß zur Quantifizierung TH-positiver Terminalen dar. Je mehr TH-positive Zellen im Striatum vorhanden sind, desto stärker war die bräunliche Färbung und desto größer die OD zu erwarten. Aufgrund von unvermeidbaren Ungenauigkeiten beim Färbeprozess, beispielsweise durch Temperaturschwankungen oder durch minimale Unterschiede bei den Inkubationszeiten, wurde für jeden Schnitt die OD des Corpus callosum einer

Hemisphäre (linksseitig) ermittelt und von der OD des jeweils gleichseitigen Striatums subtrahiert. Dadurch sollten Ungenauigkeiten während des Färbens in der Auswertung ausgeschlossen werden. Zunächst wurden die 3 gefärbten Areale (rostral, mittig, okzipital) vom Striatum einer Hemisphäre (links) am Axiophot bei 2,5-facher Vergrößerung fotografiert. Pro Areal wurden 2 Schnitte mit der NIH Image J Software ausgewertet.

#### *Bildaufnahme am Axiophot-2*

Unter Verwendung eines PCs, eines Axiophot-2-Mikroskops (Zeiss) und einer daran angeschlossenen Kamera (Visitron Systems) wurde das Programm MetaVue geöffnet und unter Illum 50% via 50% doc ausgewählt. Anschließend wurde das Programm SPOT 5.2. geöffnet und folgende Durchlicht-Einstellungen vorgenommen:

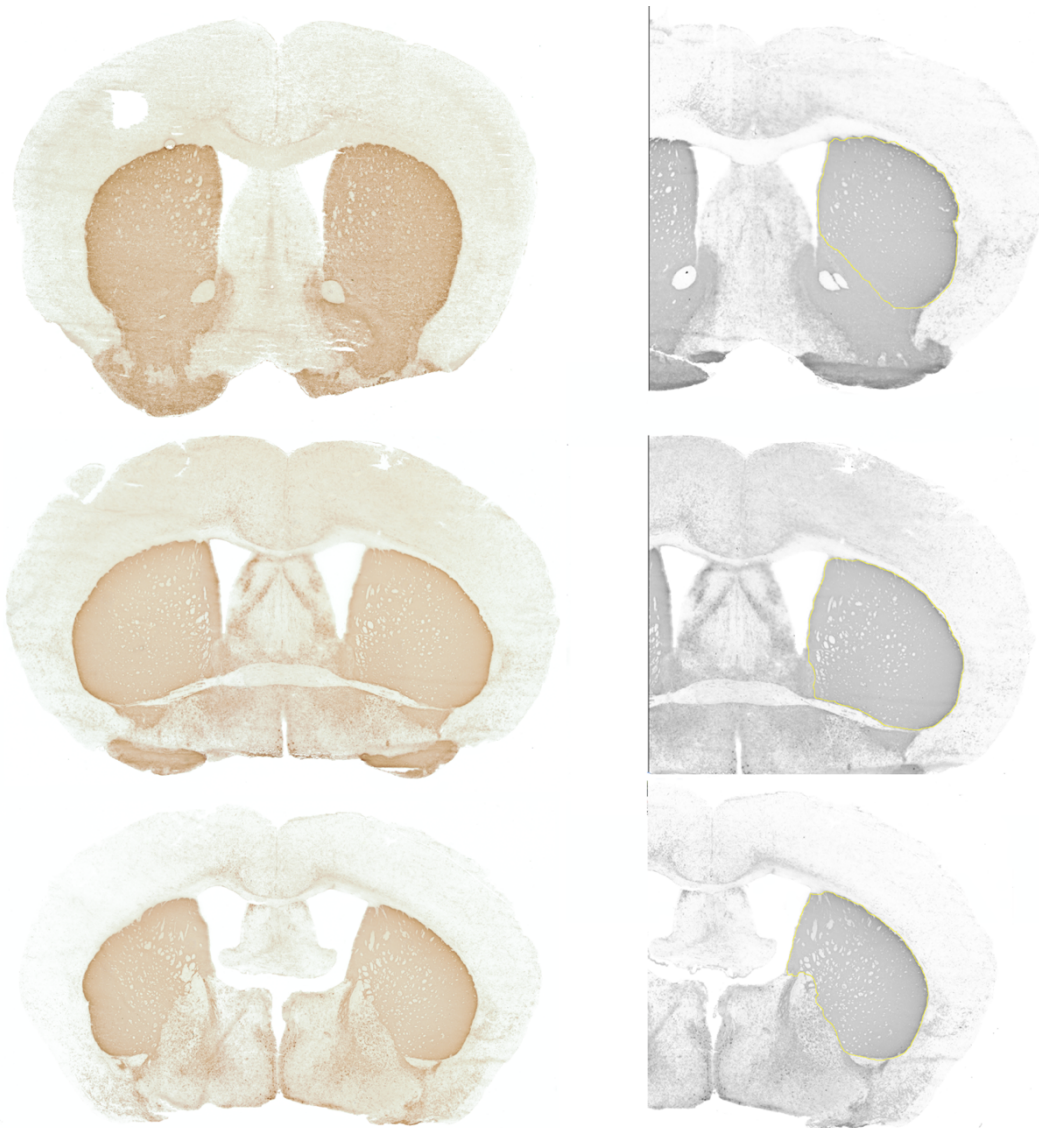
- Belichtungszeit: 5,56
- Verstärkung („gain“): 1
- Farbkorrektur: Gamma 1,09; Kontrast 0,6; Sättigung 0,74; Kälte: 8427

Am Mikroskop wurden folgende Parameter eingestellt:

- Objektiv mit 2,5-facher Vergrößerung
- Filter: 12 und 6
- Mikroskopleuchte: 3200K angeschaltet
- Kontrast H/DIC II: 0,6

#### *Ermittlung der OD des Striatums mit der NIH Image J Software*

Die am Axiophot aufgenommenen Bilder wurden in die NIH Image J Software importiert. Zur Kalibrierung der Grauwerte wurde '8 bit' eingestellt. Zur weiteren Kalibrierung wurde 'Rodbard' ausgewählt. Das Striatum der linken Hemisphäre wurde manuell umrandet (Abbildung 6), wobei zur Orientierung der Maushirnatlas von Paxinos und Franklin (2001) diente. Anschließend erfolgte die Messung des Mittelwertes der Grauwerte im markierten Bereich. Auf gleiche Art und Weise wurde zudem eine kleine Umrandung an einer möglichst einheitlichen Stelle des Corpus callosum der linken Hemisphäre gesetzt und ebenfalls der Mittelwert der Grauwerte gemessen.



**Abbildung 6:** Auf der linken Seite sind repräsentative Bilder der TH-Färbung des Striatums (rostral, mittig, okzipital von oben nach unten), auf der rechten Seite die manuellen Umrandungen (gelb) des Striatums (rostral, mittig, okzipital von oben nach unten) in der NIH ImageJ Software zur Messung der OD zu sehen.

In den 3 Arealen (rostral, mittig, okzipital) eines linksseitigen Striatums wurde für jeden der 2 Schnitte jeweils die OD des Corpus callosum von der OD des Striatums subtrahiert. Daraus wurde für jedes Areal der Mittelwert dieser 2 Schnitte ermittelt. Diese 3 Mittelwerte pro Striatum (rostral, mittig, okzipital) wurden nochmals gemittelt und ergaben so das Endresultat der OD eines linksseitigen Striatums pro Tier.

## 2.8.4 T- und B-Zell-Färbung des Striatums und der SN

Ähnlich zum Ablauf der TH-Färbung der unfixierten, frisch eingefrorenen Striatumschnitte erfolgte die Färbung der T-Zellen (CD4, CD8) und B-Zellen (B220/CD45). Allerdings wurden neben den entsprechenden Arealen des Striatums (rostral, mittig und okzipital) auch die 10 µm dünnen unfixierten Gefrierschnitte der SN gefärbt. Unterschiede zwischen den einzelnen Färbungen gab es hinsichtlich der Fixierungen, Block-, Ak-Lösungen, Primär- und Sekundärantikörper und deren Konzentrationen, sowie der DAB-Inkubationszeiten (Tabelle 3).

<b>Färbung</b>	<b>Fixierung</b>	<b>Block-Lösung</b>	<b>Ak-Lösung</b>	<b>Primär-Ak</b>	<b>Sekundär-Ak</b>	<b>DAB [min]</b>
<b>TH</b>	4 % PFA, RT, 15 min	2 % BSA 10 % NGS 0,1 M PBS	2 % BSA 2 % NGS 0,1 M PBS	1:500	biotinylated goat anti rabbit IgG 1:100	2- 2,5
<b>CD4</b>	Aceton, -20 °C, 15 min	5 % BSA 0,1 M PBS	1 % BSA 0,1 M PBS	1:1000	biotinylated rabbit anti rat IgG 1:100	10-13
<b>CD8</b>	Aceton, -20 °C, 15 min	5 % BSA 0,1 M PBS	1 % BSA 0,1 M PBS	1:500	biotinylated rabbit anti rat IgG 1:100	10-13
<b>CD45/ B220</b>	4 % PFA, RT, 15 min	5 % BSA 0,1 M PBS	1 % BSA 0,1 M PBS	1:100	biotinylated rabbit anti rat IgG 1:100	7

**Tabelle 3:** Übersicht über die Unterschiede in der Durchführung der TH-, CD4- und CD8- und CD45/B220-Färbungen der 10 µm unfixierten Gefrierschnitte.

### 2.8.4.1 Quantifizierung der T- und B-Zellen im nigrostriatalen Trakt

Die Zählung der CD4- und CD8-positiven T-Zellen und B220/CD45-positiven B-Zellen erfolgte am Lichtmikroskop bei 20- und 40-facher Vergrößerung. Die Zellzahl wurde pro

mm<sup>2</sup> berechnet. Hierfür wurde zunächst die Fläche der SN bzw. der 3 Areale des Striatums (rostral, mittig und okzipital) ermittelt. Ein Foto des jeweils ausgewählten Areals, welches vorher am Axiophot in 2,5-facher Vergrößerung aufgenommen wurde, wurde in die NIH Image J Software importiert. Nach Eichung des Maßstabs konnte die SN (inklusive Pars compacta, Pars lateralis und Pars reticulata) bzw. das Striatum manuell umrandet und schließlich die entsprechende Fläche in [ $\mu\text{m}^2$ ] gemessen werden (Tabelle 4). Die positiv-gefärbten Zellen der 3 Färbungen wurden jeweils in der linken Hemisphäre in der Pars compacta, Pars reticulata und Pars lateralis der SN bzw. im Striatum (rostral, mittig und okzipital) gezählt. Pro Maus wurden die Zellen in 2 CD4-, 2 CD8- und 4 B220/CD45-gefärbten Schnitten gezählt und der Mittelwert der Zellzahlen pro mm<sup>2</sup> berechnet.

Gehirnareal	Maushirnatlas Paxinos und Franklin	Fläche [mm <sup>2</sup> ]
Striatum rostral	Abbildung 23, Bregma +0,98 mm	6,39
Striatum mittig	Abbildung 30, Bregma +0,14 mm	5,48
Striatum okzipital	Abbildung 34, Bregma -0,46 mm	3,57
Substantia nigra	Abbildung 57, Bregma -3,16 mm	0,65

**Tabelle 4:** Übersicht über die mit NIH Image J gemessenen Flächen der 3 Areale des Striatums und der SN (Pars compacta, lateralis und reticularis).

### 2.8.5 CD11b-Färbung des Striatums und der SN

Die unfixierten 10  $\mu\text{m}$  dünnen Gefrierschnitte des Striatums und der SN wurden vor der Fixierung 60 min bei RT getrocknet. Anschließend wurden die OT in einer Glasküvette mit 4 % PFA für 8 min unter dem Abzug fixiert. Die Schnitte wurden mit 0,1 M PBS abgespritzt und das PFA in den entsprechenden Abfall entsorgt. Es folgte ein 3-maliger Waschvorgang von 3 min mit 0,1 M PBS. Die OT wurden in eine Feuchtkammer gelegt und jeder Schnitt mit einem Pap-Pen umrandet. Anschließend wurden die Schnitte 30 min bei RT in der Block-Lösung inkubiert. Es folgte die 1-stündige Inkubation bei RT in der Primär-Ak-Lösung. Nach einer Stunde wurde nach 3-maligem Waschen in 0,1 M PBS über jeweils 3 min der Sekundär-Ak auf die Schnitte gegeben und eine Inkubationszeit von 1 Stunde bei RT eingehalten. Die Schnitte wurden erneut mit 0,1 M PBS gewaschen (3x 3 min). Es folgte eine 10-minütige Inkubation in 30 %-igem Wasserstoffperoxid, 1:100 verdünnt in 0,1 M PBS und ein erneuter Waschvorgang (3x 3 min) in 0,1M PBS. Auf die Schnitte wurde eine 30-minütig-vorinkubierte Avidin-Biotin-Lösung (AB-

Komplex Kit) pipettiert und eine Inkubationszeit von 30 min bei RT abgewartet. Es folgte ein erneuter Waschvorgang (3x 3 min). In der Zwischenzeit wurde die DAB-Lösung (DAB-Kit) unter dem Abzug vorbereitet. Anschließend wurde auf jeden Schnitt jeweils 1 Tr. der DAB-Lösung gegeben und 2-3 min inkubiert. Unter dem Mikroskop konnte die Braunfärbung beobachtet und bei optimaler Farbintensität durch Abspritzen der Schnitte mit Aqua dest. gestoppt werden. Die DAB-Lösung wurde in dem entsprechenden Abfall entsorgt. Die gefärbten OT wurden abschließend 2x 5 min in Aqua dest. gewaschen und mit Aquatex® und Deckgläsern bedeckt.

*Block-Lösung:* 1 % BSA/ 5 % NRS/ 0,1 M PBS/ 4 Tr./ml Avidin Serum (AB-Blocking Kit)

*Ak-Lösung:* 1 % BSA/ 5 % NGS/ 0,1 M PBS/ 4 Tr./ml Biotin Serum (AB-Blocking Kit)

#### 2.8.5.1 Quantifizierung der Mikroglia im nigrostriatalen Trakt

Die Zählung der Mikroglia erfolgte am Lichtmikroskop bei 60-facher Vergrößerung. Die Zellzahl wurde pro mm<sup>2</sup> berechnet. Dabei wurde ein Okular mit einem eingezeichneten Gitter verwendet, dessen Fläche bei 60-facher Vergrößerung 0,0256 mm<sup>2</sup> betrug. Es wurden im Striatum pro Areal (rostral, mittig, okzipital) und in der SN einer Hemisphäre (links) jeder Maus jeweils 2 Schnitte ausgewertet und pro Schnitt wurde das Gitter an 2 verschiedene Stellen möglichst einheitlich platziert. Pro Gitter wurden die CD11b-positiv gefärbten mikroglialen Zellen gezählt, die entweder innerhalb des Gitters lagen oder die obere bzw. die rechte Seite des Gitters berührten. Zellen, die die untere bzw. linke Seite des Gitters berührten, wurden primär ausgeschlossen. Es wurden sowohl große als auch kleine Zellen mit erkennbaren Ausläufern gezählt. Die Zellzahl pro mm<sup>2</sup> wurde pro Gitter berechnet und die Ergebnisse beider Gitter für jeden Schnitt gemittelt. Anschließend wurden für jede SN bzw. für jedes striatale Areal einer Maus der Mittelwert beider ausgewerteter Schnitte berechnet. Die 3 Ergebnisse der Areale des Striatums wurden schließlich nochmals gemittelt und ergaben somit einen Durchschnittswert für das Striatum einer Maus.

#### 2.9 Analyse der striatalen Monoamin-Level mittels HPLC

Mit der HPLC konnten die Monoamine aus striatalem Gewebe basierend auf ihrer unterschiedlichen molekularen Struktur aufgetrennt und quantifiziert werden. In dieser

Arbeit erfolgte die Quantifizierung der striatalen Level von DA und seinen Metaboliten, 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC), Homovanillinsäure (HVA) und 3-Methoxytyramin (3-MT), sowie Noradrenalin (NA) und Serotonin (5-HT) mit seinem Metaboliten 5-Hydroxyindolylessigsäure (5-HIAA).

### 2.9.1 Verarbeitung des striatalen Gewebes

Das frisch gefrorene striatale Gewebe einer Hemisphäre (links) wurde abgewogen und anschließend in 55 µl Homogenisat-Puffer gegeben und auf Eis aufgetaut. Nach 20 s langer Begasung mit Argon erfolgte eine Homogenisierung des Gewebes mit einem Sonopuls Ultrasonic Homogenisier-Gerät (Bandelin; Amplitude von 50 %, 20 s). Anschließend wurde das Gewebe mit 14.000 rpm für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. 5 µl des Überstandes wurden pipettiert, für 10 min mit 10.000 rpm bei 4°C zentrifugiert und in die HPLC-Anlage transferiert.

### 2.9.2 Proteintrennung und -quantifizierung in der HPLC-Anlage

Zur Durchführung der HPLC wurde das Agilent 1260 LC System verwendet. Eine konstante Flussrate des Laufmittels von 1 ml/min wurde durch eine binäre Pumpe, 1260 Infinity Binary Pump, gewährleistet. Durch einen Autoinjektor, 1260 Infinity Standard Autosampler, wurde die Probe mit einem Injektionsvolumen von 5 µl in die HPLC-Anlage gegeben. Die Trennung der Probe erfolgte im isokratischen Modus in einer Nukleosil 120-5 C<sub>18</sub> Säule (250 mm x 4 mm, 5 µm; Macherey-Nagel) bei 30 °C. Nach dem Prinzip der Umkehrphasenchromatographie bestand die stationäre Phase im Inneren der Säule aus einem Oberflächen-modifizierten Silikon Gel mit unpolaren Octadecylsilan-Alkylgruppen (C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>). Dementsprechend passierten hydrophile Moleküle die Säule schneller als hydrophobe Moleküle aufgrund der Interaktion mit der unpolaren Oberfläche des Silikon Gels. Die aufgetrennten Probenkomponenten trafen zeitversetzt auf einen elektrochemischen Detektor, Decade Elite ECD (Antec), bestehend aus einer 2 mm gläsernen Kohlenstoff-Arbeits Elektrode, einer L316-Hilfselektrode aus Edelstahl und einer in-situ Ag/AgCl Referenzelektrode. Aufgrund der elektrochemischen Aktivität von Monoaminen und sauren Metaboliten wurden diese nach dem Anlegen eines Elektrodenpotentials von +0,77 V (=770 mV) gegen die Ag/AgCl Referenzelektrode oxidiert. Die Messung der Spannungsdifferenz erfolgte zwischen

Mess- und Hilfselektrode bei einer Temperatur von 37 °C, einem Messbereich zwischen 5 nA und 50 nA und einer Filtereinstellung von 0,05 Hz. Zur Quantifizierung der Proteinmenge wurde als interner Standard 2,3-Dihydroxybenzoesäure verwendet. Eine externe Standard-Kalibrierung wurde zur Erkennung der Retentionszeiten und Quantifizierung der Peak-Flächen verwendet. Die Proteinmengen wurden mit dem Lowry Reagenz mittels Photometrie bestimmt. Die Ergebnisse wurden als ng/mg Gesamtprotein berechnet und auf das Neurotransmitter-Niveau der 2-3 Monate alten wt Tiere normalisiert.

## 2.10 Statistische Auswertung

Die Prüfung auf eine Normalverteilung wurde mittels Quantil-Quantil-Diagramm („Q-Q-Plot“) durchgeführt. Ergaben die Ergebnisse aller 8 Gruppen im „Q-Q-Plot“ eine parametrische Verteilung, konnte ein parametrisches Einweg-ANOVA-Verfahren mit einem Posthoc-Tukey-Test durchgeführt werden. Bei einer nicht-parametrischen Verteilung wurde der Kruskal-Wallis Test und anschließend ein Dunn’s Test durchgeführt. Für diese statistische Auswertung wurde GraphPad Prism 8 verwendet. Die Signifikanzgrenze wurde auf  $p < 0,05$  (\*) festgelegt und die p-Werte  $p < 0,01$  (\*\*) wurden als sehr signifikant und  $p < 0,001$  (\*\*\*) und  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*) als hoch signifikant gewertet. In den mit GraphPad Prism 8 erstellten Grafiken sind die Mittelwerte und die Standardfehler (SEM) mit den einzelnen Rohdaten dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen 2 Gruppen wurden mit farbigen Sternen markiert: rot bei einer Signifikanz zwischen 2 tg Altersgruppen, schwarz zwischen 2 wt Altersgruppen und grau zwischen einer tg und einer wt Altersgruppe. Die Anzahl der biologisch-unabhängigen Tiere wurde mit  $n$  angegeben.

## 3 Ergebnisse

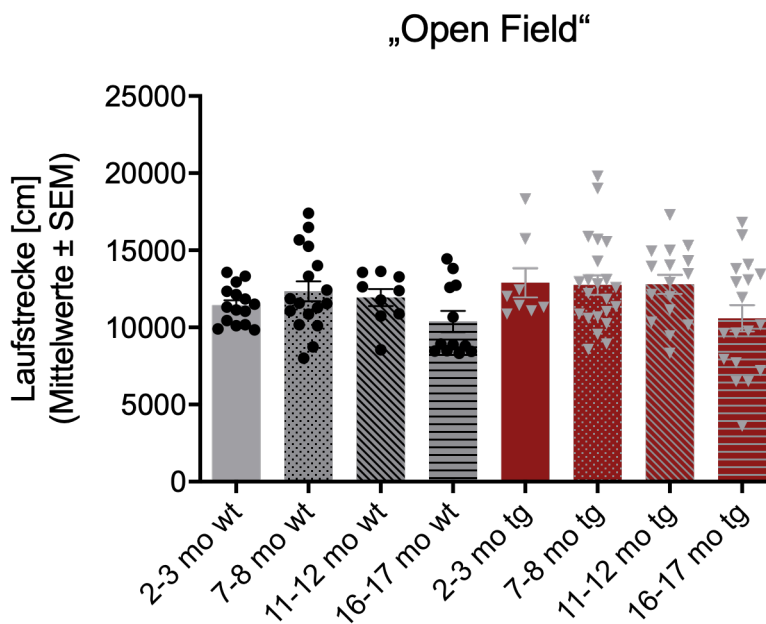
### 3.1 Charakterisierung des Phänotyps

#### 3.1.1 „Open Field“-Test

Zur Untersuchung der Gehfähigkeit, sowie der spontanen Bewegungsaktivität wurde die Wegdistanz [cm] der Mäuse während 30-minütigen „Open Field“-Aufnahmen verglichen (Abbildung 7). Im Alter von 16-17 Monaten zeigte sich sowohl bei den tg als auch bei



den wt Mäusen eine leichte, nicht-signifikante Abnahme der Laufstrecke. Es waren jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den wt und tg Altersgruppen erkennbar. Folglich zeigten die tg Mäuse des hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mausmodells in unserer „Open Field“-Analyse keine eingeschränkte Gehfähigkeit bzw. spontane Bewegungsaktivität im Vergleich zu den wt Mäusen in allen 4 Altersgruppen.

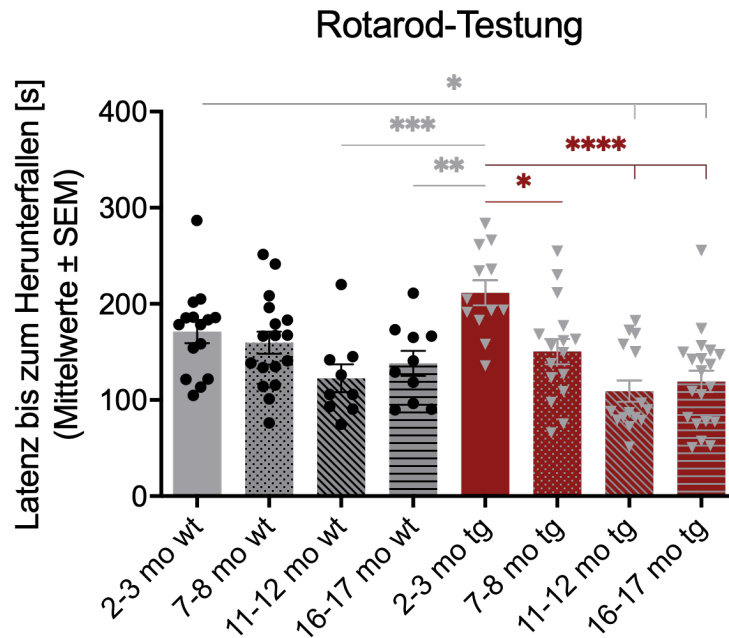


**Abbildung 7:** Altersabhängige Messung (Altersangabe in Monaten (mo)) der zurückgelegten Laufstrecke während einer 30-minütigen „Open Field“-Testung von wt (grau: 2-3 mo wt  $n=15$ ; 7-8 mo wt  $n=17$ ; 11-12 mo wt  $n=9$ ; 16-17 mo wt  $n=12$ ) und tg Mäusen (rot: 2-3 mo tg  $n=8$ , 7-8 mo tg  $n=22$ , 11-12 mo tg  $n=16$ , 16-17 mo tg  $n=18$ ). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem einfachen ANOVA-Test gefolgt von einem Posthoc-Tukey-Test.

### 3.1.2 Rotarod-Testung

Zur weiteren Untersuchung der Motorfunktion wurden in der Rotarod-Testung die Latenzen jeder Maus bis zum Herabfallen vom rotierenden Rad verglichen (Abbildung 8). Sowohl bei den wt als auch bei den tg Tieren zeigte sich im hohen Alter eine Verkürzung der Latenz. Innerhalb der wt Gruppe war dieser Alterseffekt nicht signifikant. In der tg Gruppe konnte dagegen eine signifikante Verkürzung der Latenz der 3 älteren Altersgruppen (7-8 mo tg:  $150,4 \pm 13,1$  s,  $p < 0,05$ ; 11-12 mo tg:  $109,3 \pm 11,2$  s,  $p < 0,0001$ ; 16-17 mo tg:  $119,2 \pm 11,2$  s,  $p < 0,0001$ ) verglichen zur jüngsten tg Altersgruppe (2-3 mo tg:  $211,6 \pm 13,0$  s) nachgewiesen werden. Erwähnenswert ist die gute motorische Leistungsfähigkeit der 2-3 Monate jungen tg Mäuse, deren gestoppte Zeiten ( $211,6 \pm 13,0$

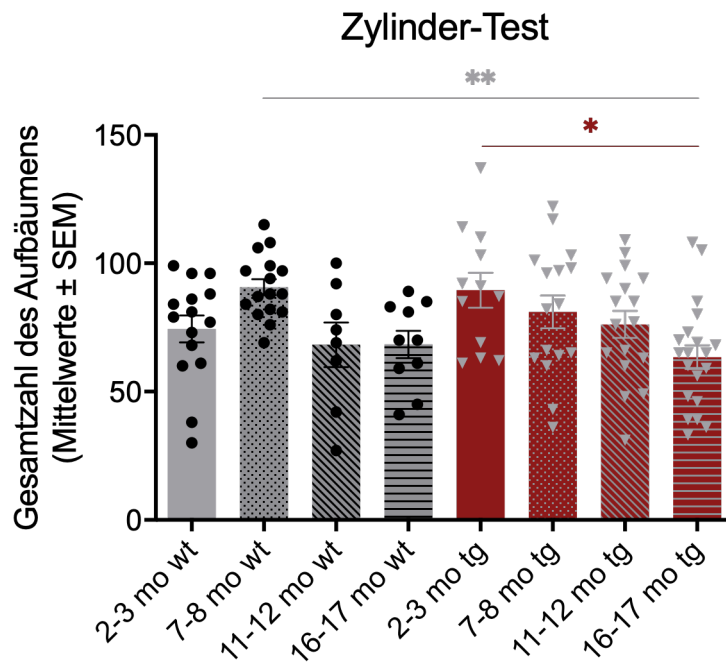
s) tendenziell, allerdings nicht-signifikant, länger als die der 2-3 Monate jungen wt Mäuse ( $171,1 \pm 11,8$  s) waren. Die Latenzen der 16-17 Monate alten mutierten Mäuse waren verglichen zu gleichaltrigen wt Mäusen leicht, nicht signifikant erniedrigt.



**Abbildung 8:** Altersabhängige Messung der Latenz bis zum Herunterfallen während der Rotarod-Testung bei wt Mäusen (grau: 2-3 mo wt  $n=15$ ; 7-8 mo wt  $n=17$ ; 11-12 mo wt  $n=9$ ; 16-17 mo wt  $n=10$ ) und tg Mäusen (rot: 2-3 mo tg  $n=12$ , 7-8 mo tg  $n=16$ , 11-12 mo tg  $n=15$ , 16-17 mo tg  $n=20$ ). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem einfachen ANOVA-Test gefolgt von einem Posthoc-Tukey-Test.

### 3.1.3 Zylinder-Test

Die Gesamtzahl des Aufbäumens der Mäuse während eines 10-minütigen Zylinder-Tests ergab ähnlich wie bei den anderen Verhaltenstests eine Reduktion der Anzahl mit zunehmendem Alter sowohl bei wt als auch bei tg Mäusen (Abbildung 9). Bei den tg Mäusen war dieser Alterseffekt mit einer signifikanten Reduktion der Anzahl des Aufbäumens im Alter von 16-17 Monaten ( $63,4 \pm 4,6$ ) verglichen zu 2-3 Monate jungen Tieren ( $89,5 \pm 6,8$ ;  $p < 0,05$ ) zu sehen. Die niedrige Zahl des Aufbäumens der 16-17 Monate alten tg Gruppe ( $63,4 \pm 4,6$ ) unterschied sich nur leicht, nicht signifikant von der Zahl der gleichaltrigen wt Gruppe ( $68,4 \pm 5,3$ ). Zusammengefasst konnten wir nur eine leichte motorische Einschränkung der  $hm^2\alpha$ -SYN-39 Mäuse mit zunehmendem Alter im Zylinder-Test nachweisen.



**Abbildung 9:** Altersabhängige Bestimmung der Gesamtzahl des Aufbäumens während des 10-minütigen Zylinder-Tests (grau: 2-3 mo wt  $n=15$ ; 7-8 mo wt  $n=16$ ; 11-12 mo wt  $n=8$ ; 16-17 mo wt  $n=10$ ; rot: 2-3 mo tg  $n=12$ , 7-8 mo tg  $n=16$ , 11-12 mo tg  $n=17$ , 16-17 mo tg  $n=20$ ). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem einfachen ANOVA-Test gefolgt von einem Posthoc-Tukey-Test.

### 3.2 Dopaminerge Neurodegeneration und DA-Mangel

#### 3.2.1 Stereologische Quantifizierung dopaminerger Neurone in der SNpc

Bei der Auswertung der Nissl- und TH-positiven Zellen wurde bei jedem Tier ein CE-Wert nach Gundersen ( $m=1$ )  $\leq 0,10$  erreicht.

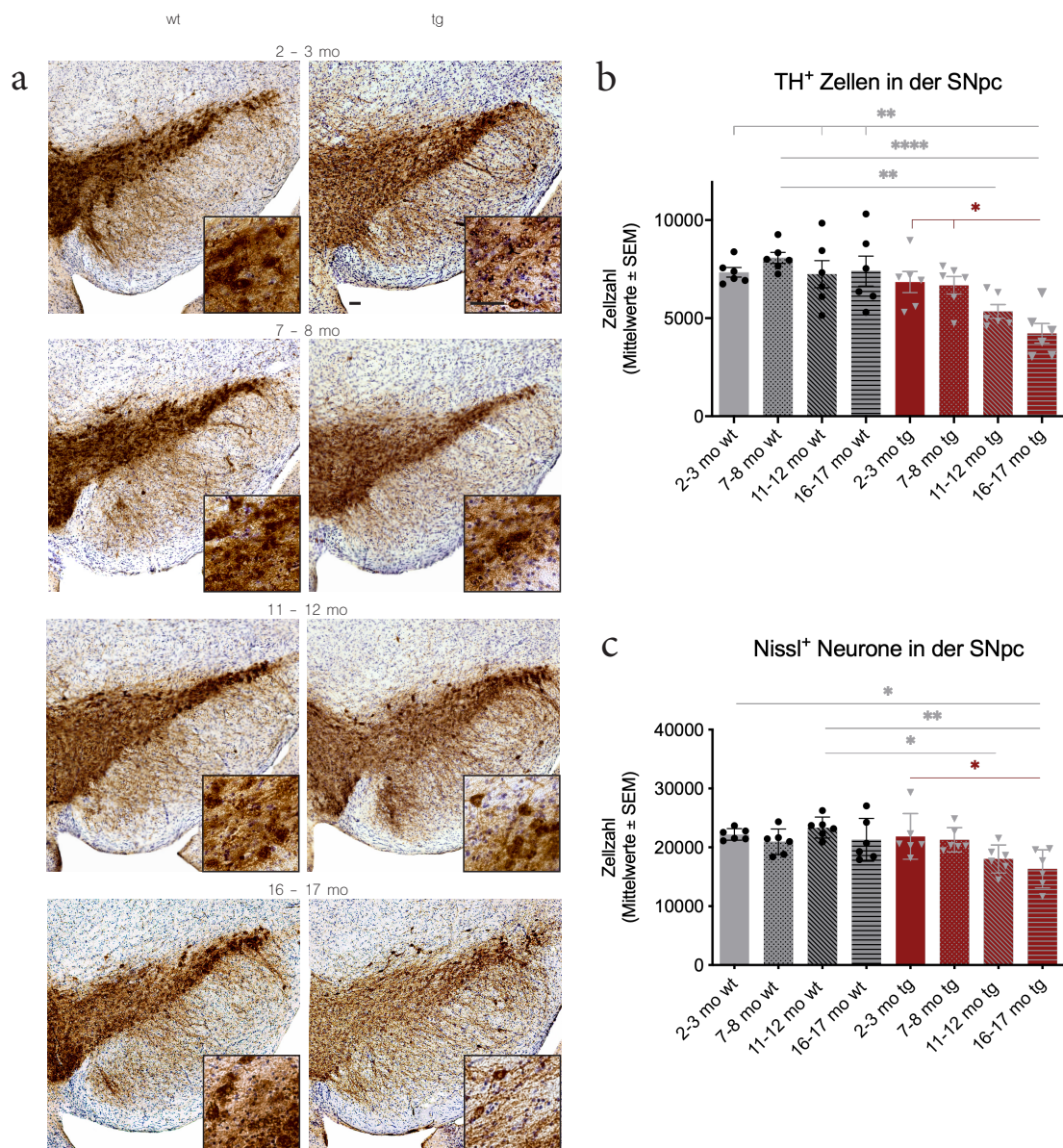
##### *TH-positive Zellen*

Die wt Mäuse zeigten in der SNpc aller 4 Altersgruppen eine in etwa gleichbleibende TH-positive Zellzahl mit einer durchschnittlichen Population von 7517 Zellen (Abbildung 10 a, b). Bei den tg Mäusen nahm mit zunehmendem Alter die Zahl TH-positiver Zellen in der SNpc stetig ab. Im jungen Alter von 2-3 Monaten lag die Zellzahl bei den tg Tieren noch bei  $6844 \pm 535,7$  Zellen und sank im hohen Alter von 16-17 Monaten auf eine Zahl von nur noch  $4228 \pm 497,2$  Zellen signifikant ( $p < 0,05$ ) ab. Es degenerierten bei den tg Tieren bis zum Alter von 16-17 Monaten ca. 42,9 % der

dopaminergen Zellen in der SNpc einer Hemisphäre verglichen zu wt Tieren des gleichen Alters. Der Mittelwert  $\pm$  SEM der 16-17 Monate alten tg Gruppe ( $4228 \pm 497,2$  Zellen) war verglichen zu allen wt Altersgruppen signifikant erniedrigt (2-3 mo wt:  $7339 \pm 243,1$  Zellen,  $p < 0,01$ ; 7-8 mo wt:  $8079 \pm 279,6$  Zellen,  $p < 0,0001$ ; 11-12 mo wt:  $7245 \pm 690,3$  Zellen,  $p < 0,01$ ; 16-17 mo wt:  $7404 \pm 765,6$  Zellen,  $p < 0,01$ ). Zusammengefasst konnte bei den tg Mäusen ab einem Alter von 16-17 Monaten eine signifikante Reduktion TH-positiver Zellen in der SNpc verglichen zu den wt Mäusen und den jungen tg Mäusen nachgewiesen werden.

#### *Nissl-positive Neurone*

Mit der Quantifizierung von Nissl-positiven Neuronen, sollte eine tatsächliche Neurodegeneration in der SNpc überprüft und ein ausschließlicher Untergang des TH-Enzyms ausgeschlossen werden (Abbildung 10 c). Bei den tg Mäusen, im Gegensatz zu den wt Mäusen, nahm mit zunehmendem Alter die Zahl Nissl-positiver Neurone stetig ab, sodass sich die Zellzahl von jungen tg Tieren im Alter von 2-3 Monaten ( $21861 \pm 1582$  Zellen) bis zu den ältesten 16-17 Monate alten Tieren des gleichen Genotyps ( $16355 \pm 1325$  Zellen,  $p < 0,05$ ) signifikant erniedrigte. Die 16-17 Monate alten tg Mäuse ( $16355 \pm 1325$  Zellen) zeigten verglichen zu den gleichaltrigen wt Mäusen ( $21285 \pm 1479$  Zellen) eine deutliche, jedoch nicht signifikante, Erniedrigung der Nissl-positiven Neurone. Der Vergleich von 11-12 Monate alten tg Tieren ( $18034 \pm 967,8$  Zellen) zu gleichaltrigen wt Tieren ( $23365 \pm 726,0$  Zellen,  $p < 0,05$ ) ergab eine signifikant niedrige Neuronenzahl der tg Tiere. Es zeigte sich somit ein tendenzieller Neuronen-Verlust bei den hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mäusen mit zunehmendem Alter.



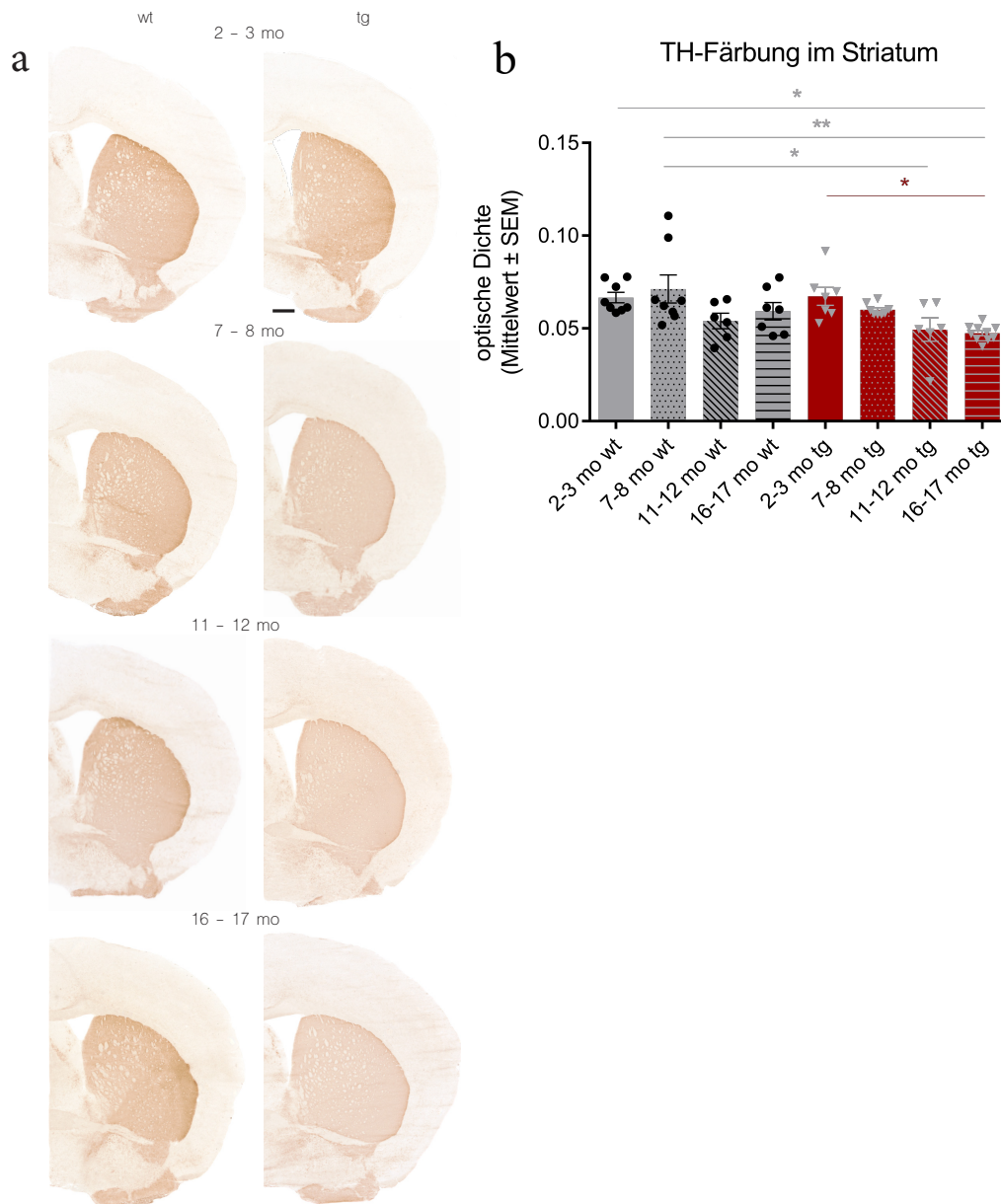
**Abbildung 10:** (a) Repräsentative Darstellung von TH- und Nissl-gefärbtem SN-Gewebe für jede tg und wt Altersgruppe. Die Kästchen unten rechts im Bild stellen eine Vergrößerung der Zellen aus einem Ausschnitt der jeweiligen SNpc dar. Der Balken entspricht einer Länge von 50 µm. (b) Stereologisch quantifizierte TH-positive Zellen und (c) Nissl-positive Neurone in der SNpc, jeweils von wt (grau: 2-3 mo wt  $n=6$ ; 7-8 mo wt  $n=6$ ; 11-12 mo wt  $n=6$ ; 16-17 mo wt  $n=6$ ) und tg Mäusen (rot: 2-3 mo tg  $n=6$ ; 7-8 mo tg  $n=6$ ; 11-12 mo tg  $n=6$ ; 16-17 mo tg  $n=6$ ). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem einfachen ANOVA-Test gefolgt von einem Posthoc-Tukey-Test.

### 3.2.2 Quantifizierung dopaminerger Terminalen im Striatum

Zur Quantifizierung dopaminerger Terminalen im Striatum, wurde die OD von TH-gefärbtem striatalem Gewebe mittels Image J bestimmt (Abbildung 11 a). In beiden

Kohorten kam es mit zunehmendem Alter zu einer Reduktion der OD im Striatum. Diese Reduktion war bei den wt Tieren im Alter von 2-3 Monaten ( $20,067 \pm 0,003$ ) bis 16-17 Monaten ( $0,059 \pm 0,005$ ) leicht, nicht signifikant ausgeprägt (Abbildung 11 b), wohingegen bei den tg Tieren ein signifikanter abnehmender Trend mit zunehmendem Alter erkennbar war (2-3 mo tg:  $0,067 \pm 0,005$ ; 16-17 mo tg:  $0,047 \pm 0,001$ ,  $p < 0,05$ ). Außerdem zeigte sich die OD der 16-17 Monate alten tg Mäuse ( $0,047 \pm 0,001$ ) signifikant niedriger als die der jüngsten wt Tiere ( $0,067 \pm 0,003$ ,  $p < 0,05$ ) und der 7-8 Monate alten wt Mäuse ( $0,071 \pm 0,008$ ,  $p < 0,01$ ). Im Vergleich zu der gleichaltrigen 16-17 Monate alten wt Gruppe ( $0,059 \pm 0,005$ ) zeigten die 16-17 Monate alten tg Mäuse ( $0,047 \pm 0,001$ ) eine nicht-signifikante Erniedrigung der dopaminergen Terminalen. Somit konnte ein signifikanter Verlust dopaminерger Terminalen innerhalb der tg Gruppen mit zunehmendem Alter festgestellt werden, während verglichen zu den jeweiligen gleichaltrigen wt Tieren tendenzielle nicht-signifikante Erniedrigungen nachweisbar waren.



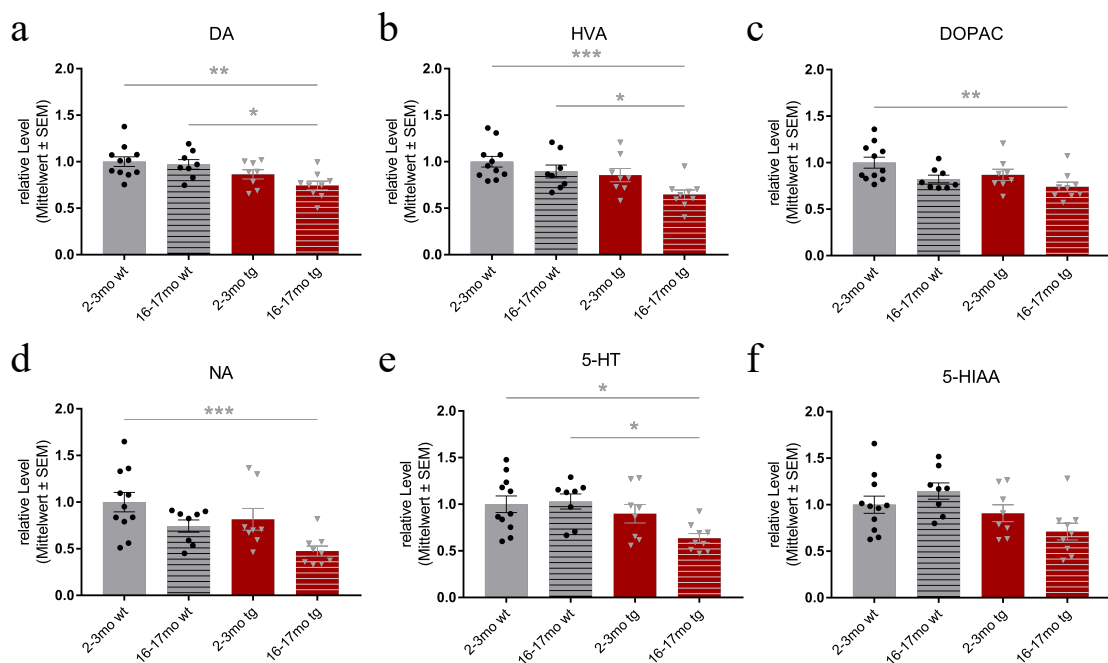


**Abbildung 11: (a)** Repräsentative Darstellung von TH-gefärbtem striatalem Gewebe für jede tg und wt Altersgruppe. Der Balken entspricht einer Länge von 500  $\mu$ m. **(b)** Altersabhängige Messung der OD von TH-gefärbtem striatalem Gewebe von wt (grau: 2-3 mo wt  $n=8$ ; 7-8 mo wt  $n=8$ ; 11-12 mo wt  $n=6$ ; 16-17 mo wt  $n=7$ ) und tg Mäusen (rot: 2-3 mo tg  $n=7$ , 7-8 mo tg  $n=8$ , 11-12 mo tg  $n=6$ , 16-17 mo tg  $n=10$ ). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem einfachen ANOVA-Test gefolgt von einem Posthoc-Tukey-Test.

### 3.2.3 HPLC-Analyse der striatalen Monoamine

Die Auswertung der HPLC Ergebnisse ergab eine signifikante Reduktion der DA-Level im Striatum von 16-17 Monate alten  $hm^2\alpha$ -SYN-39 Mäusen ( $0,74 \pm 0,05$ ) verglichen

sowohl zu den jungen wt Mäusen ( $1,00 \pm 0,05$ ,  $p < 0,01$ ) als auch zu den 16-17 Monate alten wt Mäusen ( $0,97 \pm 0,05$ ,  $p < 0,05$ ) (Abbildung 12 a). Von den dopaminergen Metaboliten zeigten sich die Level der HVA bei den 16-17 Monate alten mutierten Mäusen ( $0,65 \pm 0,05$ ) ebenfalls signifikant reduziert im Vergleich zu gleichaltrigen wt Mäusen ( $0,89 \pm 0,07$ ,  $p < 0,05$ ), während für DOPAC bei den 16-17 Monate alten tg Tieren ( $0,74 \pm 0,05$ ) nur im Vergleich zu 2-3 Monate alten wt Tieren ( $1,00 \pm 0,06$ ,  $p < 0,01$ ) signifikant erniedrigte Level nachgewiesen wurden (Abbildung 12 b, c). Außerdem wurden weiterhin die Neurotransmitter NA und 5-HT mit seinem Metaboliten 5-HIAA quantifiziert (Abbildung 12 d-f). Die catecholaminergen NA-Level zeigten sich bei 16-17 Monate alten  $hm^2\alpha$ -SYN-39 Mäusen ( $0,48 \pm 0,05$ ) erniedrigt mit hochsignifikantem Unterschied zu den 2-3 Monate alten wt Mäusen ( $1,00 \pm 0,1$ ,  $p < 0,001$ ). Im serotoninergen System wurden signifikant erniedrigte 5-HT-Level der ältesten tg Mäuse ( $0,64 \pm 0,05$ ) verglichen zu den ältesten wt Mäusen ( $1,03 \pm 0,08$ ,  $p < 0,05$ ) nachgewiesen. Der serotoninerge Metabolit 5-HIAA zeigte bei tg Tieren im Alter von 16-17 Monaten ( $0,71 \pm 0,09$ ) keine signifikanten Unterschiede zu den wt Gruppen (2-3 mo wt:  $1,00 \pm 0,09$ ; 16-17 mo wt:  $1,15 \pm 0,09$ ).



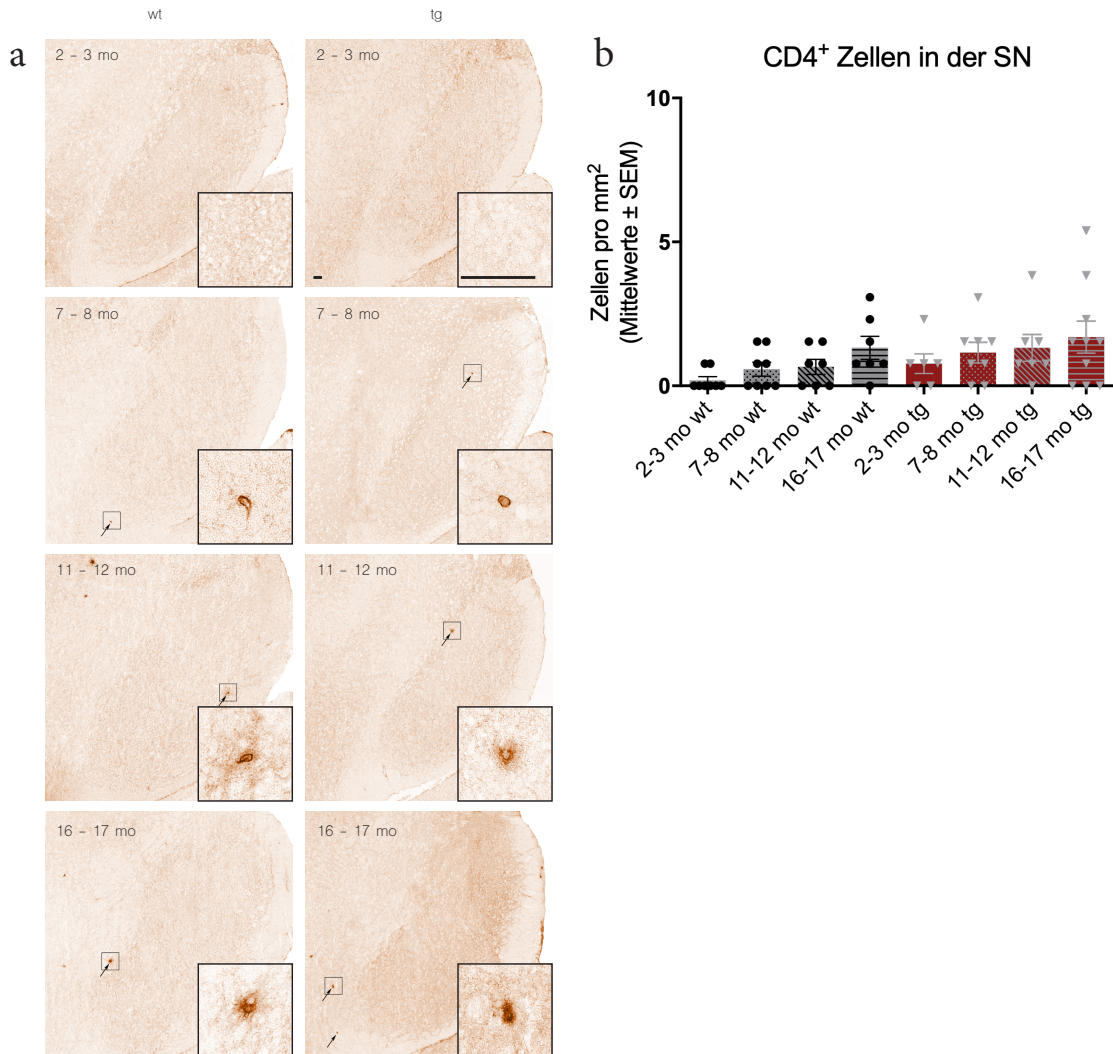
**Abbildung 12:** HPLC-Analyse der striatalen Monoamin-Level. **(a-c)** Striatale Level von DA und seiner Metabolite HVA und DOPAC in wt Mäusen (grau: 2-3 mo wt  $n=11$ ; 16-17 mo wt  $n=8$ ) und tg Mäusen (rot: 2-3 mo wt  $n=8$ ; 16-17 mo wt  $n=9$ ). **(d-f)** Striatale



Level von NA, 5-HT und dem serotonergen Metaboliten 5-HIAA in wt Mäusen (grau: 2-3 mo wt  $n=11$ ; 16-17 mo wt  $n=8$ ) und tg Mäusen (rot: 2-3 mo wt  $n=8$ ; 16-17 mo wt  $n=9$ ). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem einfachen ANOVA-Test gefolgt von einem Posthoc-Tukey-Test.

### 3.3 Quantifizierung der T-Zellen

#### 3.3.1 CD4-positive Zellen in der SN



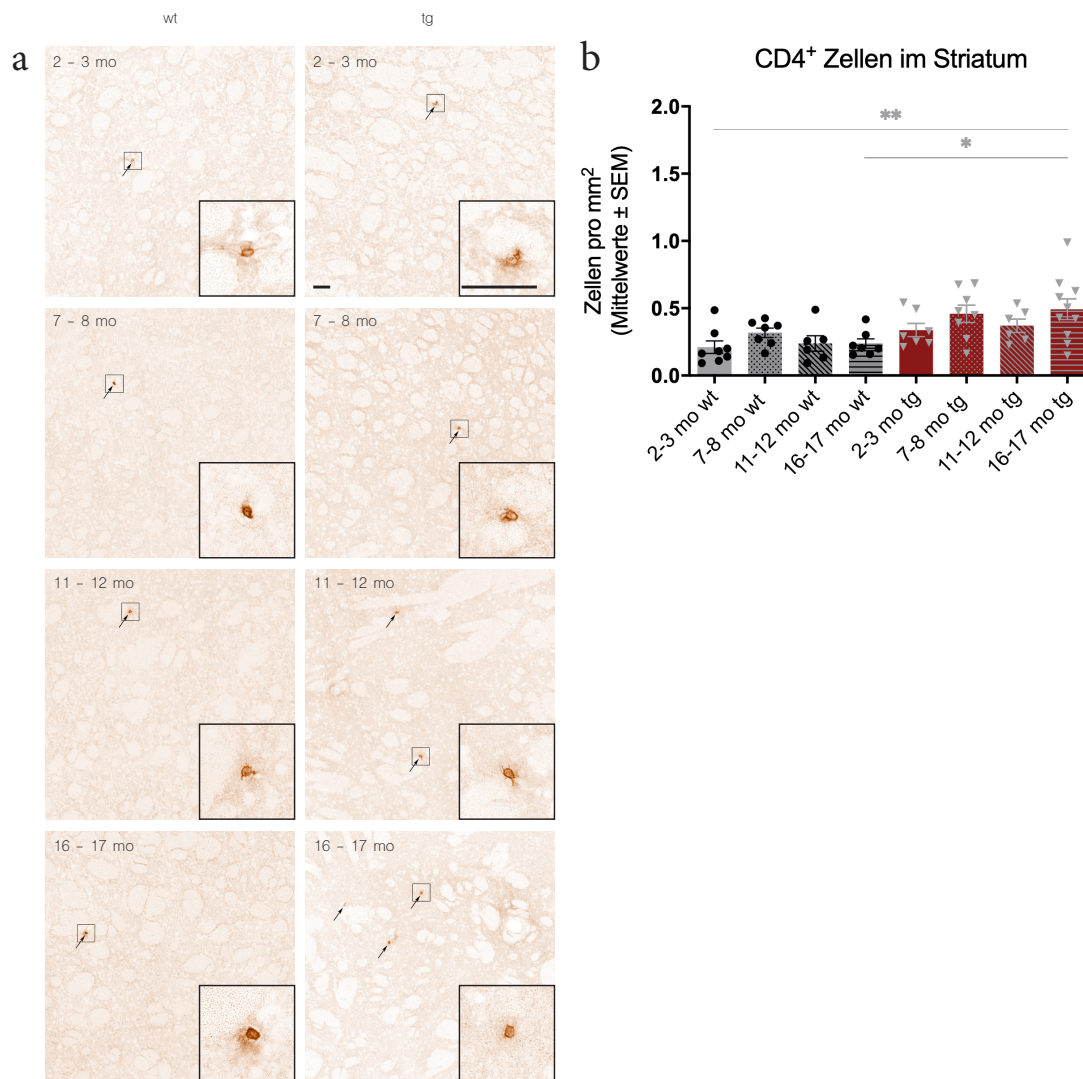
**Abbildung 13:** (a) Repräsentative Darstellung von CD4-gefärbtem SN-Gewebe für jede tg und wt Altersgruppe. Die Pfeile markieren jeweils die CD4-positiv gefärbten Zellen und die Kästchen umranden die entsprechende Zelle, die in der Vergrößerung (unten rechts im Bild jeweils) dargestellt ist. Der Balken entspricht einer Länge von 50  $\mu$ m. (b) Anzahl CD4-positiver Zellen in der SN von wt (grau: 2-3 mo wt  $n=8$ ; 7-8 mo wt  $n=8$ ; 11-12 mo wt  $n=7$ ; 16-17 mo wt  $n=7$ ) und tg Tieren (rot: 2-3 mo tg  $n=6$ , 7-8 mo tg  $n=8$ , 11-12 mo tg  $n=7$ , 16-17 mo tg  $n=10$ ). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit einem einfachen ANOVA-Test gefolgt von einem Posthoc-Tukey-Test.

Sowohl bei wt als auch bei tg Mäusen nahm die Zahl CD4-positiver Zellen in der SN mit zunehmendem Alter gleichermaßen leicht zu (Abbildung 13 a, b). Die Zellzahl der tg Tiere war in jeder Altersgruppe (tg: 2-3 mo:  $0,77 \pm 0,34$  Zellen/mm<sup>2</sup>; 7-8 mo:  $1,15 \pm 0,35$  Zellen/mm<sup>2</sup>; 11-12 mo:  $1,32 \pm 0,46$  Zellen/mm<sup>2</sup>; 16-17 mo:  $1,69 \pm 0,56$  Zellen/mm<sup>2</sup>) etwas, jedoch nicht signifikant höher als die Zellzahl der gleichaltrigen wt Tiere (wt: 2-3 mo:  $0,19 \pm 0,13$  Zellen/mm<sup>2</sup>; 7-8 mo:  $0,58 \pm 0,24$  Zellen/mm<sup>2</sup>; 11-12 mo:  $0,66 \pm 0,26$  Zellen/mm<sup>2</sup>; 16-17 mo:  $1,32 \pm 0,40$  Zellen/mm<sup>2</sup>).

### 3.3.2 CD4-positive Zellen im Striatum

Die Zahl CD4-positiver Zellen im Striatum blieb bei wt Tieren relativ konstant mit durchschnittlich  $0,25$  Zellen/mm<sup>2</sup>, während bei tg Tieren mit zunehmendem Alter ein leichter, nicht-signifikanter Anstieg zu sehen war (Abbildung 14 a, b). Die jüngeren tg Mäuse der Altersgruppen von 2-3 Monaten ( $0,34 \pm 0,05$  Zellen/mm<sup>2</sup>), 7-8 Monaten ( $0,46 \pm 0,06$  Zellen/mm<sup>2</sup>) und 11-12 Monaten ( $0,37 \pm 0,05$  Zellen/mm<sup>2</sup>) zeigten tendenziell höhere Zahlen, jedoch ohne signifikanten Unterschied zu den jeweilig gleichaltrigen wt Gruppen (wt: 2-3 mo:  $0,21 \pm 0,05$  Zellen/mm<sup>2</sup>; 7-8 mo:  $0,32 \pm 0,03$  Zellen/mm<sup>2</sup>; 11-12 mo:  $0,24 \pm 0,06$  Zellen/mm<sup>2</sup>). Im Alter von 16-17 Monaten konnte bei den tg Mäusen ( $0,49 \pm 0,08$  Zellen/mm<sup>2</sup>) eine signifikant höhere CD4-positive Zellzahl verglichen mit der Zellzahl der gleichaltrigen wt Gruppe ( $0,24 \pm 0,03$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $p < 0,05$ ) nachgewiesen werden.

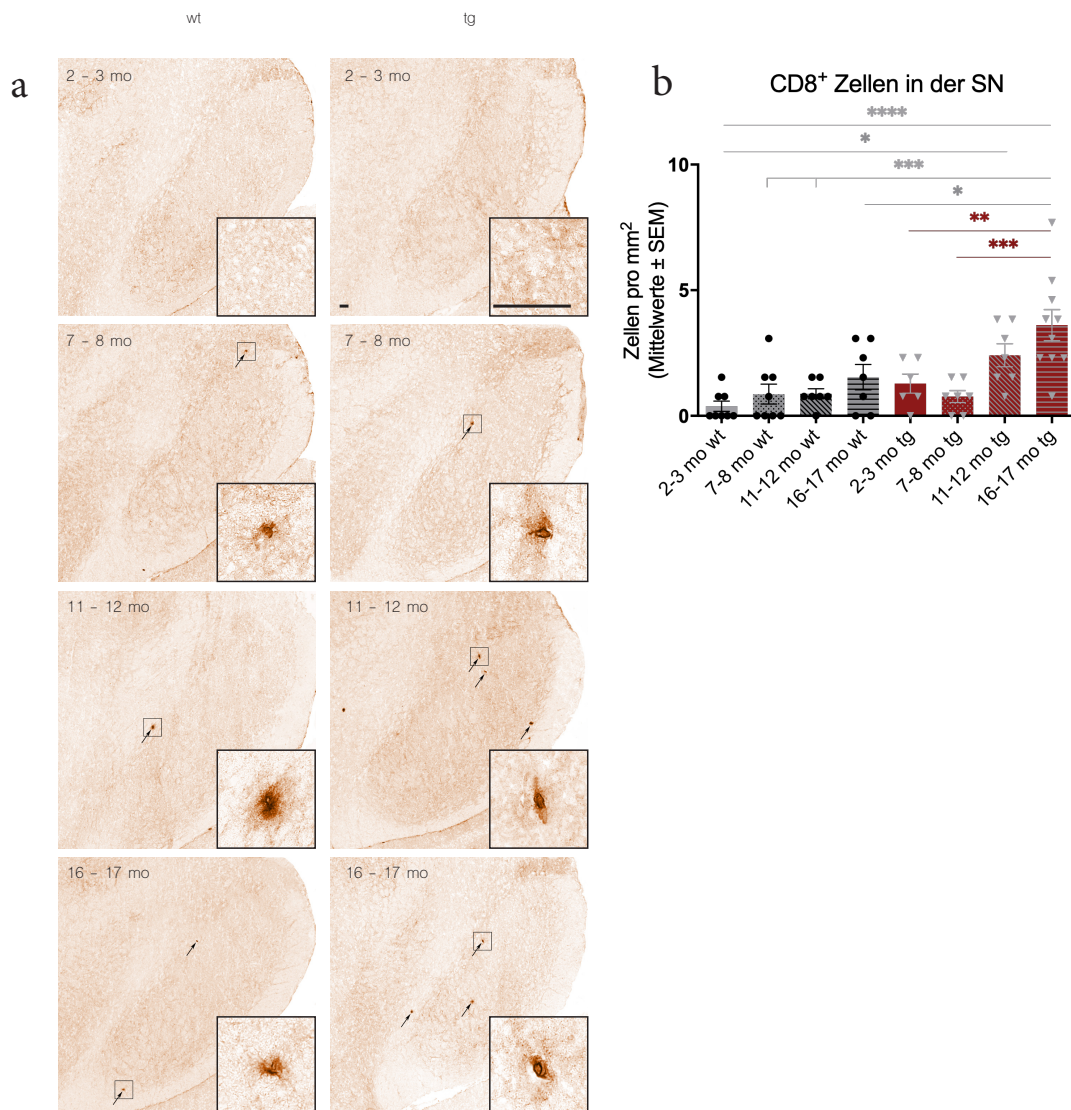


**Abbildung 14:** (a) Repräsentative Darstellung von CD4-gefärbtem striatalem Gewebe für jede tg und wt Altersgruppe. Die Pfeile markieren jeweils die CD4-positiv gefärbten Zellen und die Kästchen umranden die entsprechende Zelle, die in der Vergrößerung (unten rechts im Bild jeweils) dargestellt ist. Der Balken entspricht einer Länge von 50  $\mu\text{m}$ . (b) Anzahl CD4-positiver Zellen im Striatum von wt (grau: 2-3 mo wt  $n=8$ ; 7-8 mo wt  $n=7$ ; 11-12 mo wt  $n=6$ ; 16-17 mo wt  $n=7$ ) und tg Tieren (rot: 2-3 mo tg  $n=7$ , 7-8 mo tg  $n=8$ , 11-12 mo tg  $n=6$ , 16-17 mo tg  $n=10$ ). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem einfachen ANOVA-Test gefolgt von einem Posthoc-Tukey-Test.

### 3.3.3 CD8-positive Zellen in der SN

Die Zahl CD8-positiver Zellen in der SN stieg bei den wt Tieren nur leicht mit zunehmendem Alter an (Abbildung 15 a, b). Bei den  $hm^2\alpha$ -SYN-39 Mäusen dagegen stieg die CD8-positive Zellzahl von  $1,28 \pm 0,38$  Zellen/ $\text{mm}^2$  im Alter von 2-3 Monaten

auf eine Zellzahl von  $3,61 \pm 0,62$  Zellen/mm<sup>2</sup> im Alter von 16-17 Monaten hochsignifikant ( $p < 0,01$ ) an. Die Zellzahl der ältesten tg Mäuse ( $3,61 \pm 0,62$  Zellen/mm<sup>2</sup>) zeigte sich zudem signifikant höher verglichen zu allen wt Altersgruppen (2-3 mo alten wt:  $0,38 \pm 0,21$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $p < 0,0001$ ; 7-8 mo wt:  $0,87 \pm 0,40$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $p < 0,001$ ; 11-12 mo wt:  $0,88 \pm 0,20$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $p < 0,001$ ; 16-17 mo wt:  $1,54 \pm 0,50$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $p < 0,05$ ). Die übrigen tg Altersgruppen zeigten keinen signifikanten Unterschied zu gleichaltrigen wt Tieren.

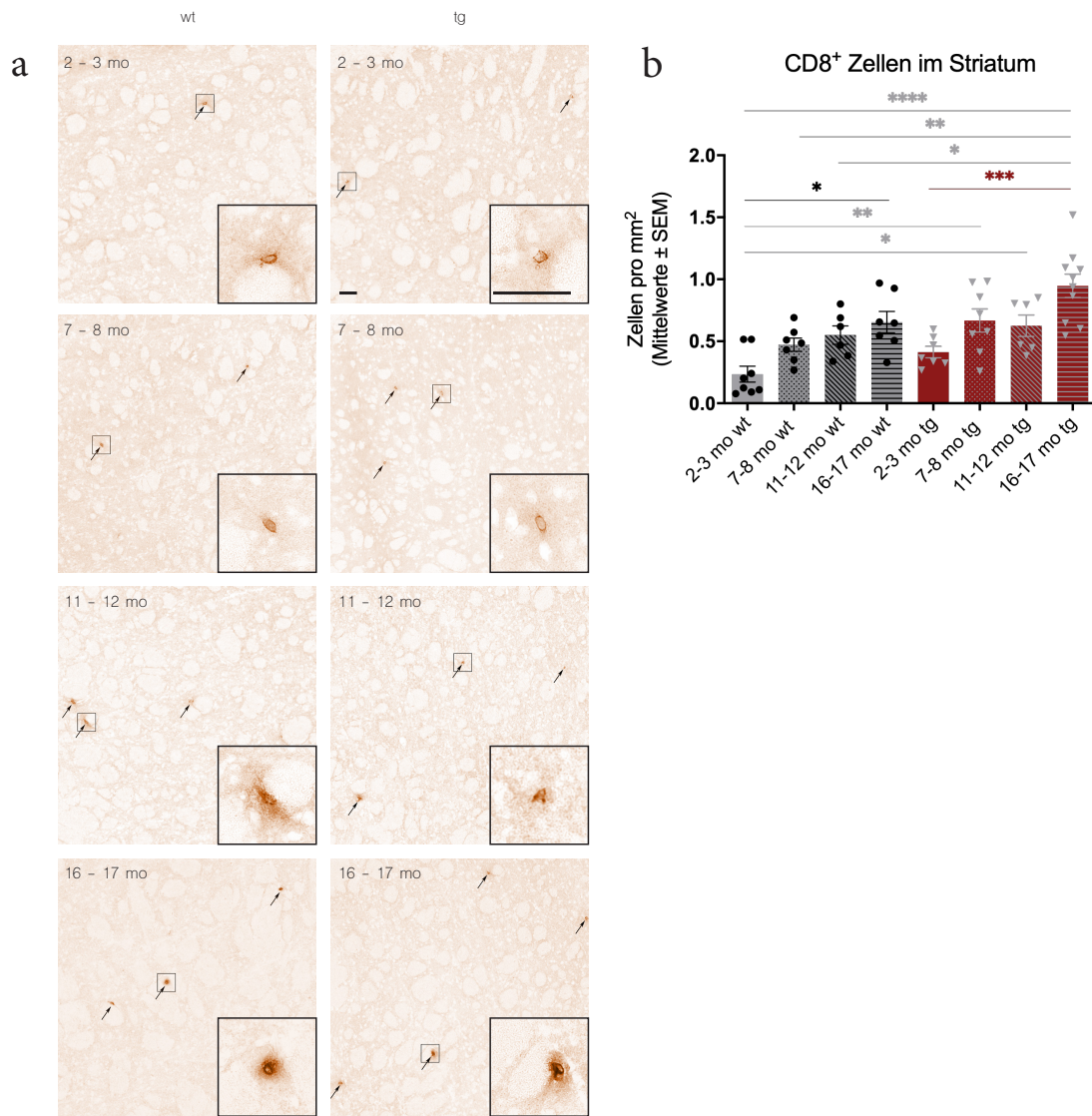


**Abbildung 15:** (a) Repräsentative Darstellung von CD8-gefärbtem SN-Gewebe für jede tg und wt Altersgruppe. Die Pfeile markieren jeweils die CD8-positiv gefärbten Zellen und die Kästchen umranden die entsprechende Zelle, die in der Vergrößerung (unten rechts im Bild jeweils) dargestellt ist. Der Balken entspricht einer Länge von 50  $\mu$ m. (b) Anzahl CD8-positiver Zellen in der SN von wt (grau: 2-3 mo wt  $n=8$ ; 7-8 mo wt  $n=8$ ;



11-12 mo wt  $n=7$ ; 16-17 mo wt  $n=7$ ) und tg Tieren (rot: 2-3 mo tg  $n=6$ , 7-8 mo tg  $n=7$ , 11-12 mo tg  $n=7$ , 16-17 mo tg  $n=10$ ). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem einfachen ANOVA-Test gefolgt von einem Posthoc-Tukey-Test.

### 3.3.4 CD8-positive Zellen im Striatum



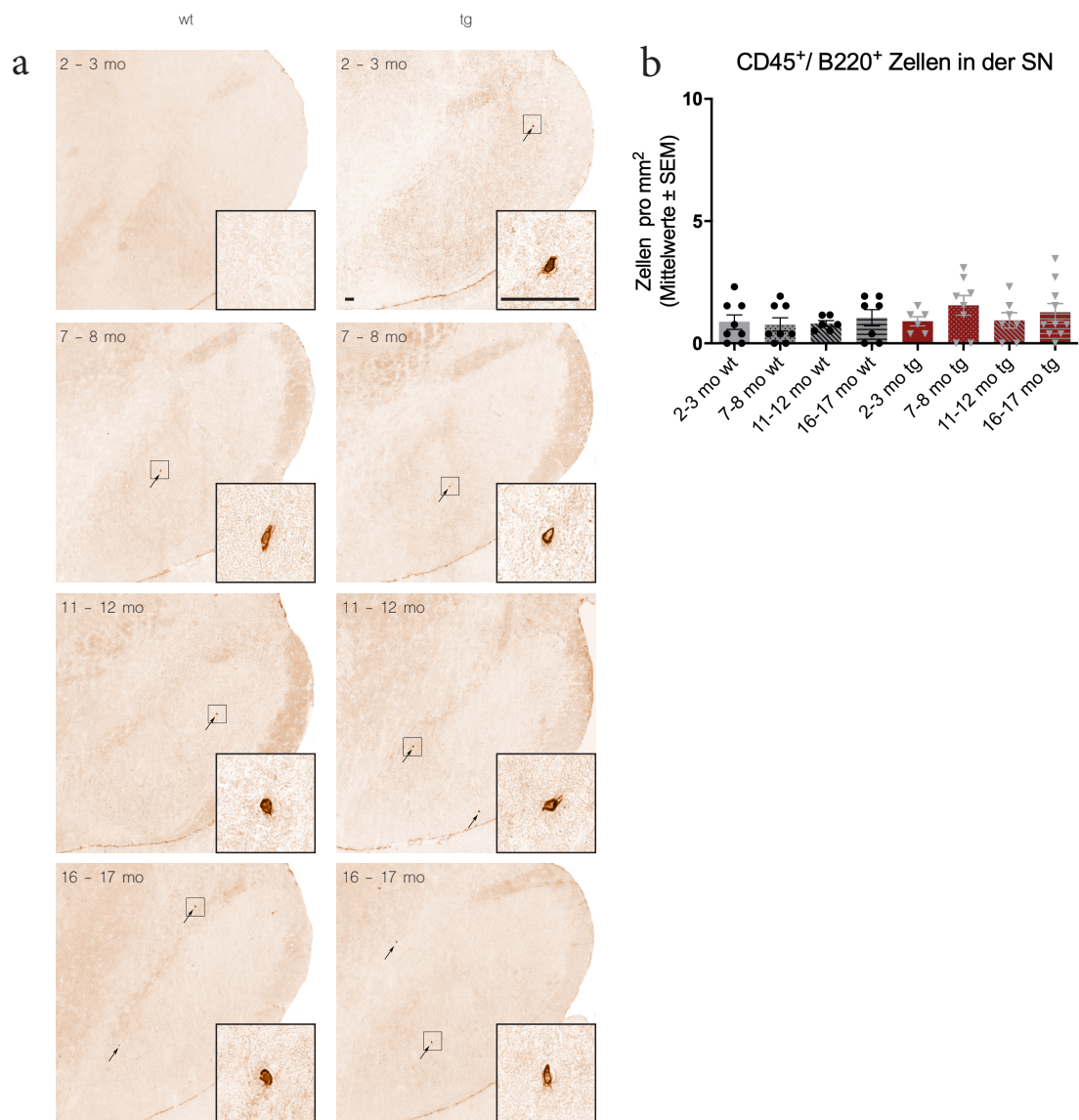
**Abbildung 16: (a)** Repräsentative Darstellung von CD8-gefärbtem striatalem Gewebe für jede tg und wt Altersgruppe. Die Pfeile markieren jeweils die CD8-positiv gefärbten Zellen und die Kästchen umranden die entsprechende Zelle, die in der Vergrößerung (unten rechts im Bild jeweils) dargestellt ist. Der Balken entspricht einer Länge von 50  $\mu$ m. **(b)** Anzahl CD8-positiver Zellen im Striatum von wt (grau: 2-3 mo wt  $n=8$ ; 7-8 mo wt  $n=7$ ; 11-12 mo wt  $n=6$ ; 16-17 mo wt  $n=7$ ) und tg Tieren (rot: 2-3 mo tg  $n=7$ , 7-8 mo tg  $n=8$ , 11-12 mo tg  $n=6$ , 16-17 mo tg  $n=10$ ). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem einfachen ANOVA-Test gefolgt von einem Posthoc-Tukey-Test.

Die Zahl CD8-positiver Zellen im Striatum stieg sowohl bei wt als auch bei tg Tieren mit zunehmendem Alter an (Abbildung 16 a, b). Die Zellzahl der ältesten wt Tiere ( $0,65 \pm 0,09$  Zellen/mm<sup>2</sup>) unterschied sich signifikant von der Zellzahl der jüngsten wt Tiere ( $0,23 \pm 0,06$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $p < 0,05$ ). Bei den tg Mäusen zeigten die ältesten Tiere ( $0,95 \pm 0,09$  Zellen/mm<sup>2</sup>) eine hochsignifikant höhere Zellzahl verglichen zu den jüngsten tg Mäusen ( $0,41 \pm 0,05$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $p < 0,001$ ), sowie signifikant höhere Zellzahlen verglichen zu den jüngsten wt Mäusen ( $0,23 \pm 0,06$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $p < 0,0001$ ), den 7-8 Monate alten wt ( $0,47 \pm 0,05$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $p < 0,01$ ) und den 11-12 Monate alten wt Mäusen ( $0,55 \pm 0,07$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $p < 0,05$ ). Der Vergleich zu den gleichaltrigen wt Tieren ergab bei den 16-17 Monate alten tg Tieren eine tendenzielle nicht-signifikante Erhöhung der CD8-positiven Zellzahl.

### 3.4 Quantifizierung der B-Zellen

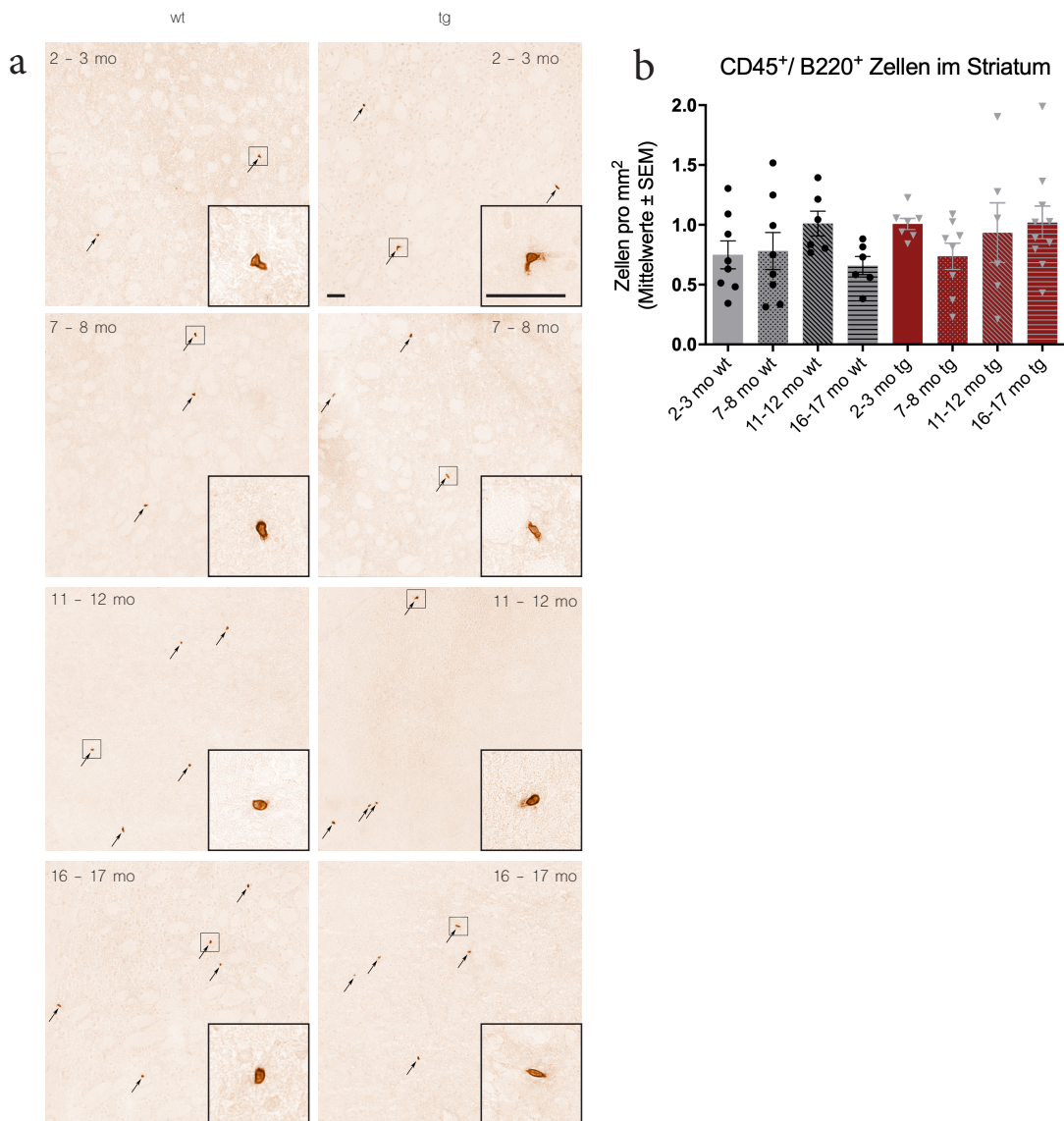
#### 3.4.1 CD45/B220-positive Zellen in der SN

Die Zahl CD45/B220-positiver Zellen in der SN blieb sowohl bei wt als auch bei tg Mäusen relativ konstant und es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 17 a, b). Bei wt Tieren (2-3 mo:  $0,87 \pm 0,30$  Zellen/mm<sup>2</sup>; 7-8 mo:  $0,77 \pm 0,27$  Zellen/mm<sup>2</sup>; 11-12 mo:  $0,81 \pm 0,12$  Zellen/mm<sup>2</sup>; 16-17 mo:  $1,05 \pm 0,33$  Zellen/mm<sup>2</sup>) ergab sich eine durchschnittliche Zahl von  $0,87$  Zellen/mm<sup>2</sup> und bei tg Tieren (2-3 mo:  $0,90 \pm 0,19$  Zellen/mm<sup>2</sup>; 7-8 mo:  $1,55 \pm 0,40$  Zellen/mm<sup>2</sup>; 11-12 mo:  $0,94 \pm 0,31$  Zellen/mm<sup>2</sup>; 16-17 mo:  $1,27 \pm 0,35$  Zellen/mm<sup>2</sup>) eine etwas höhere durchschnittliche Zahl von  $1,17$  Zellen/mm<sup>2</sup>.



**Abbildung 17: (a)** Repräsentative Darstellung von CD45/B220-gefärbtem SN-Gewebe für jede tg und wt Altersgruppe. Die Pfeile markieren jeweils die CD45/B220-positiv gefärbten Zellen und die Kästchen umranden die entsprechende Zelle, die in der Vergrößerung (unten rechts im Bild jeweils) dargestellt ist. Der Balken entspricht einer Länge von 50  $\mu\text{m}$ . **(b)** Anzahl CD45/B220-positiver Zellen in der SN von wt (grau: 2-3 mo wt  $n=8$ ; 7-8 mo wt  $n=8$ ; 11-12 mo wt  $n=6$ ; 16-17 mo wt  $n=7$ ) und tg Mäusen (rot: 2-3 mo tg  $n=6$ , 7-8 mo tg  $n=8$ , 11-12 mo tg  $n=7$ , 16-17 mo tg  $n=10$ ). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem einfachen ANOVA-Test gefolgt von einem Posthoc-Tukey-Test.

### 3.4.2 CD45/B220-positive Zellen im Striatum



**Abbildung 18:** (a) Repräsentative Darstellung von CD45/B220-gefärbtem striatalem Gewebe für jede tg und wt Altersgruppe. Die Pfeile markieren jeweils die CD45/B220-positiv gefärbten Zellen und die Kästchen umranden die entsprechende Zelle, die in der Vergrößerung (unten rechts im Bild jeweils) dargestellt ist. Der Balken entspricht einer Länge von 50  $\mu\text{m}$ . (b) Anzahl CD45/B220-positiver Zellen im Striatum von wt (grau: 2-3 mo wt  $n=8$ ; 7-8 mo wt  $n=8$ ; 11-12 mo wt  $n=6$ ; 16-17 mo wt  $n=6$ ) und tg Mäusen (rot: 2-3 mo tg  $n=7$ , 7-8 mo tg  $n=8$ , 11-12 mo tg  $n=6$ , 16-17 mo tg  $n=10$ ). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem Kruskal-Wallis Test gefolgt von einem Dunn's Test.

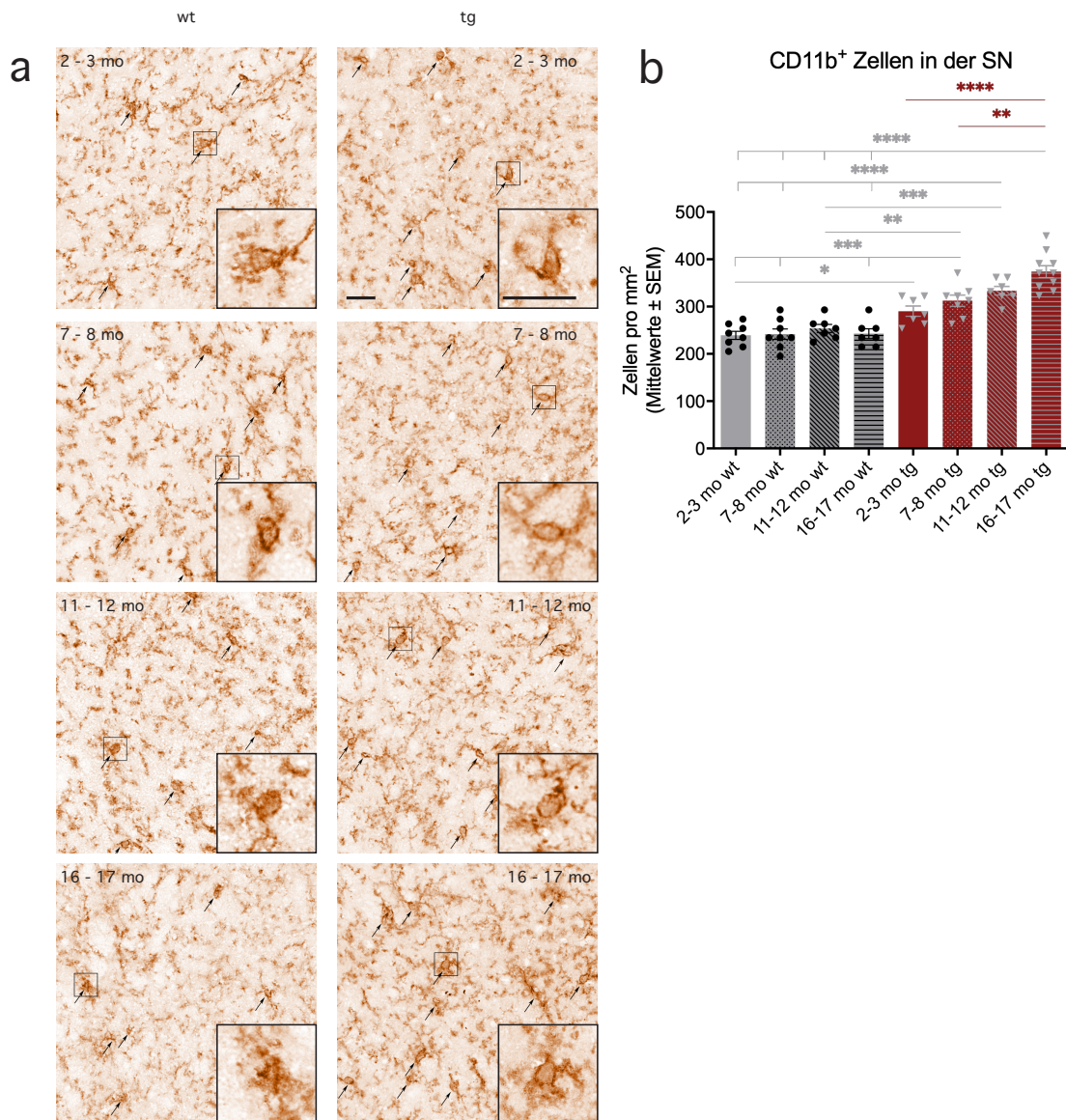


Die Zahl CD45/B220-positiver Zellen im Striatum schwankte sowohl bei wt als auch bei tg Tieren des hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mausmodells um einen Durchschnittswert von 0,80 Zellen/mm<sup>2</sup> (wt) bzw. von 0,92 Zellen/mm<sup>2</sup> (tg) (Abbildung 18 a, b). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der wt Altersgruppen (2-3 mo: 0,75 ± 0,12 Zellen/mm<sup>2</sup>; 7-8 mo: 0,78 ± 0,15 Zellen/mm<sup>2</sup>; 11-12 mo: 1,01 ± 0,10 Zellen/mm<sup>2</sup>; 16-17 mo: 0,66 ± 0,07 Zellen/mm<sup>2</sup>) mit den tg Altersgruppen (2-3 mo: 1,01 ± 0,05 Zellen/mm<sup>2</sup>; 7-8 mo: 0,74 ± 0,11 Zellen/mm<sup>2</sup>; 11-12 mo: 0,93 ± 0,25 Zellen/mm<sup>2</sup>; 16-17 mo: 1,02 ± 0,13 Zellen/mm<sup>2</sup>).

### 3.5 Quantifizierung der Mikroglia

#### 3.5.1 CD11b-positiv Zellen in der SN

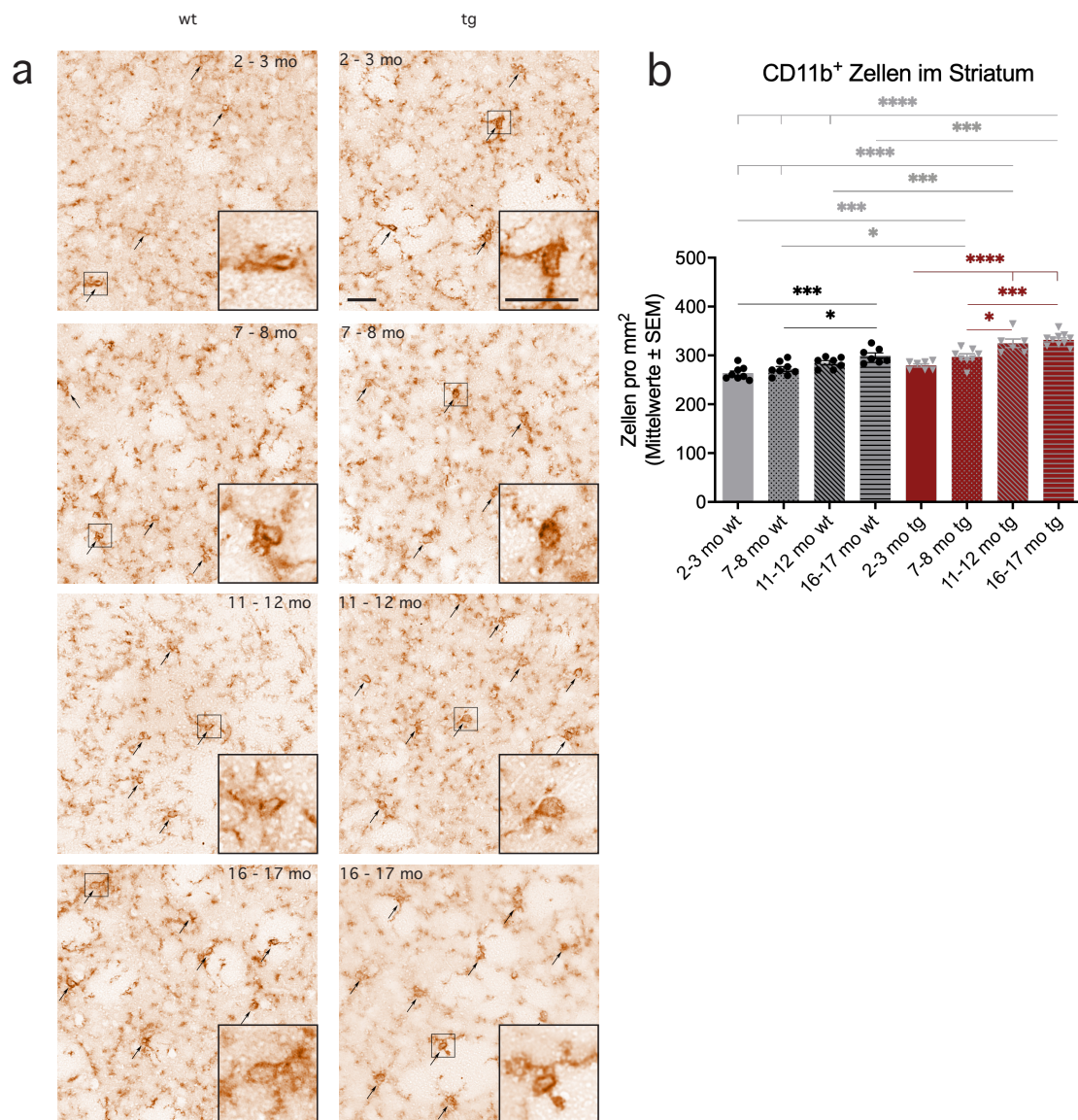
Die Zahl CD11b-positiver Zellen blieb bei wt Mäusen in allen Altersgruppen relativ konstant mit durchschnittlich 244,4 Zellen/mm<sup>2</sup> (wt: 2-3 mo: 239,3 ± 8,5 Zellen/mm<sup>2</sup>, 7-8 mo: 241,7 ± 11,0 Zellen/mm<sup>2</sup>, 11-12 mo: 253,9 ± 8,5 Zellen/mm<sup>2</sup>, 16-17 mo: 242,7 ± 10,3 Zellen/mm<sup>2</sup>) (Abbildung 19 a, b). Die tg Mäuse zeigten dagegen mit zunehmendem Alter einen hochsignifikanten Anstieg der Zellzahl von der jüngsten (2-3 mo tg: 290,2 ± 10,8 Zellen/mm<sup>2</sup>) bis zur ältesten Altersgruppe (16-17 mo tg: 374,0 ± 12,6 Zellen/mm<sup>2</sup>, p < 0,0001). Der Vergleich gleichaltriger wt und tg Tiere ergab bei allen Altersgruppen einen signifikanten Unterschied. Bereits die jüngste tg Altersgruppe (290,2 ± 10,8 Zellen/mm<sup>2</sup>) zeigte signifikant höhere Zellzahlen als die gleichaltrige wt Altersgruppe (239,3 ± 8,5 Zellen/mm<sup>2</sup>, p < 0,05). Im Alter von 7-8 Monaten unterschied sich die Zellzahl der tg Tiere (312,5 ± 12,0 Zellen/mm<sup>2</sup>) hochsignifikant zu den Zellzahlen 7-8 Monate alter wt Tiere (241,7 ± 11,0 Zellen/mm<sup>2</sup>, p < 0,001). Ebenso im Alter von 11-12 Monaten zeigte sich eine hochsignifikant höhere CD11b-positiv Zellzahl der tg Tiere (11-12 mo tg: 333,4 ± 9,15 Zellen/mm<sup>2</sup>) verglichen zu der gleichaltrigen wt Altersgruppe (11-12 mo wt: 253,9 ± 8,5 Zellen/mm<sup>2</sup>, p < 0,001). Die Zellzahl der ältesten tg Altersgruppe (16-17 mo tg: 374,0 ± 12,61 Zellen/mm<sup>2</sup>) lag hochsignifikant höher (p < 0,0001) verglichen zu allen wt Altersgruppen (wt: 2-3 mo: 239,3 ± 8,46 Zellen/mm<sup>2</sup>, 7-8 mo: 241,7 ± 11,04 Zellen/mm<sup>2</sup>, 11-12 mo: 253,9 ± 8,52 Zellen/mm<sup>2</sup>, 16-17 mo: 242,7 ± 10,32 Zellen/mm<sup>2</sup>).



**Abbildung 19: (a)** Repräsentative Darstellung von CD11b-gefärbtem SN-Gewebe für jede tg und wt Altersgruppe. Die Pfeile markieren jeweils die CD11b-positiv gefärbten Zellen und die Kästchen umranden die entsprechende Zelle, die in der Vergrößerung (unten rechts im Bild jeweils) dargestellt ist. Der Balken entspricht einer Länge von 25µm. **(b)** Anzahl CD11b-positiver Zellen in der SN von wt (grau: 2-3 mo wt  $n=8$ ; 7-8 mo wt  $n=8$ ; 11-12 mo wt  $n=7$ ; 16-17 mo wt  $n=7$ ) und tg Mäusen (rot: 2-3 mo tg  $n=7$ , 7-8 mo tg  $n=8$ , 11-12 mo tg  $n=7$ , 16-17 mo tg  $n=10$ ). Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem einfachen ANOVA-Test gefolgt von einem Posthoc-Tukey-Test.

### 3.5.2 CD11b-positive Zellen im Striatum

Die Zahl CD11b-positiver Zellen im Striatum stieg mit zunehmendem Alter sowohl bei wt als auch bei tg Tieren hochsignifikant an (Abbildung 20 a, b). Der Anstieg bei den tg Gruppen von den jüngsten (2-3 mo tg:  $279,5 \pm 3,4$  Zellen/mm<sup>2</sup>) bis zu den ältesten Mäusen (16-17 mo tg:  $332,0 \pm 4,1$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $p < 0,0001$ ) war etwas ausgeprägter als bei den wt Gruppen (2-3 mo wt:  $263,5 \pm 4,8$  Zellen/mm<sup>2</sup>; 16-17 mo wt:  $299,5 \pm 5,9$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $p < 0,001$ ). Generell ergab der Vergleich von gleichaltrigen wt und tg Tieren einen signifikanten Unterschied mit höheren Zellzahlen der tg Tiere in den Altersgruppen von 7-8 Monaten (tg:  $297,0 \pm 6,0$  Zellen/mm<sup>2</sup>, wt:  $272,4 \pm 5,0$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $p < 0,05$ ), 11-12 Monaten (tg:  $325,0 \pm 8,9$  Zellen/mm<sup>2</sup>, wt:  $284,8 \pm 4,4$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $p < 0,001$ ) und 16-17 Monaten (tg:  $332,0 \pm 4,1$  Zellen/mm<sup>2</sup>, wt:  $299,5 \pm 5,9$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $p < 0,001$ ).



**Abbildung 20: (a)** Repräsentative Darstellung von CD11b-gefärbtem striatalem Gewebe für jede tg und wt Altersgruppe. Die Pfeile markieren jeweils die CD11b-positiv gefärbten Zellen und die Kästchen umranden die entsprechende Zelle, die in der Vergrößerung (unten rechts im Bild jeweils) dargestellt ist. Der Balken entspricht einer Länge von 25µm. **(b)** Anzahl CD11b-positiver Zellen im Striatum von wt (grau: 2-3 mo wt  $n=8$ ; 7-8 mo wt  $n=8$ ; 11-12 mo wt  $n=7$ ; 16-17 mo wt  $n=7$ ) und tg Mäusen (rot: 2-3 mo tg  $n=7$ , 7-8 mo tg  $n=8$ , 11-12 mo tg  $n=6$ , 16-17 mo tg  $n=10$ ). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem einfachen ANOVA-Test gefolgt von einem Posthoc-Tukey-Test.

## 4 Diskussion

Um die multifaktorielle Pathophysiologie der Krankheitsprogression des MP, insbesondere die Rolle der Neuroinflammation, näher untersuchen zu können, ist ein Mausmodell notwendig, welches einen zum menschlichen MP ähnlichen langsam-progredienten Krankheitsverlauf zeigt. Bisher basieren die Erkenntnisse bezüglich neuroinflammatorischer Prozesse beim MP größtenteils auf Untersuchungen an neurotoxischen oder viralen-Vektor-Modellen. Zudem sollte das Modell möglichst viele pathologische Aspekte der Erkrankung wie die  $\alpha$ -Syn-Pathologie, eine progrediente nigrostriatale Neurodegeneration mit fortschreitendem Alter und einen Parkinson-Phänotyp präsentieren. Das hm<sup>2</sup> $\alpha$ -SYN-39 Mausmodell, erstmals beschrieben von Richfield et al. (Richfield et al., 2002), ist ein genetisches Modell, bei dem doppelmutiertes (A53T und A30P) humanes  $\alpha$ -Syn spezifisch in katecholaminergen Zellen überexprimiert wird. In dieser Arbeit wurden hm<sup>2</sup> $\alpha$ -SYN-39 Mäuse in 4 Altersgruppen (2-3, 7-8, 11-12 und 16-17 Monate) bezüglich eines Parkinson-Phänotyps und einer dopaminergen Neurodegeneration im nigrostriatalen Trakt charakterisiert. Zudem wurde erstmals in diesem Mausmodell das angeborene und adaptive IS im nigrostriatalen Trakt der Mäuse untersucht.

### 4.1 Nachweis eines Parkinson-Phänotyps

Die Entwicklung motorischer Auffälligkeiten ist ein essenzieller Aspekt der Parkinsonerkrankung, der in Nagetieren nur schwierig zu detektieren ist. Die Neuroanatomie der Basalganglienschleife ist beim Nagetier zwar ähnlich wie beim Menschen, jedoch unterscheidet sich der Phänotyp der Tiere von der Kardinalsymptomatik beim menschlichen MP. Dabei zeigen die neurotoxischen Parkinson-Modelle in bisherigen Publikationen noch die deutlichsten motorischen Auffälligkeiten. Nagetiere des neurotoxischen Parkinson-Modells entwickeln zwar nur selten einen Tremor (Cenci et al., 2002), jedoch zeigen sich Bewegungsauffälligkeiten der Vorderpfoten, z.B. beim Laufen und Platzieren der Pfoten, sowie Einschränkungen der Sensomotorik (Meredith and Kang, 2006, Aldridge and Berridge, 1998). Die in dieser Arbeit eingesetzten Verhaltenstests untersuchten u.a. die Motorfunktion, die die Mäuse auf einem rotierenden Rad hielt, die Motoraktivität beim Aufbäumen in einem Glas-

Zylinder, sowie die Gehfähigkeit und Aktivität der Mäuse während eines 30-minütigen Zeitraums („Open-Field“). Mit diesen Tests konnte in vorherigen Untersuchungen an neurotoxischen Modellen mit stark ausgeprägtem striatalem DA-Verlust ein Parkinson-Phänotyp detektiert werden. Im Rotarod-Test zeigten beispielsweise sowohl Nagetiere des MPTP- (Rozas et al., 1998, Petroske et al., 2001), als auch des 6-OHDA-Modells (Rozas et al., 1997, Rozas and Labandeira Garcia, 1997) signifikante Bewegungseinschränkungen. Ebenso im Zylinder-Test wurden u.a. beim 6-OHDA-Modell asymmetrische Verhaltensauffälligkeiten beim Aufbäumen und bei der Verwendung der Vorderpfoten erkannt (Schallert et al., 2000, Tillerson et al., 2001). Im „Open Field“-Test wurde im MPTP-Modell in vorherigen Arbeiten zwar kaum eine Einschränkung erkannt (Tillerson et al., 2002, Rousselet et al., 2003), allerdings zeigten u.a. Ratten, die mit Rotenon behandelt wurden, eine signifikante motorische Einschränkung in diesem Test (Alam et al., 2004).

In unserer Arbeit konnten bei  $hm^2\alpha$ -SYN-39 Mäusen im Rotarod- und Zylinder-Test, leichte motorische Einschränkungen festgestellt werden, im „Open Field“ Test zeigten sich keine Auffälligkeiten. Eine Erklärung für die lediglich leichten Verhaltensauffälligkeiten ist ggf. eine nicht ausreichend ausgeprägte Neurodegeneration, insbesondere der dopaminergen Terminalen im Striatum. Ein Parkinson-Phänotyp wird vermutlich erst ab einem dopaminergen Neuronenverlust von ca. 30 % in der SN und einem striatalen Dopaminverlust von ca. 60-80 % erkennbar, wie sowohl bei Parkinson-Patienten als auch in Tiermodellen gezeigt wurde (Kirik et al., 2002, Fearnley and Lees, 1991, Bernheimer et al., 1973, Chang et al., 1999, Cheng et al., 2010). Möglicherweise ließe sich ein Phänotyp erst bei deutlich älteren Mäusen nachweisen, wobei hier die maximale Lebensdauer von Mäusen eine Limitation darstellt. Des Weiteren könnten mögliche Kompensationsmechanismen der tg Mäuse die Entwicklung eines Parkinson-Phänotyps verhindern. Dies ist im genetischen Mausmodell wahrscheinlicher als im neurotoxischen Modell, da sich die Neurodegeneration über einen längeren Zeitraum erstreckt, als bei einer Neurotoxin-Injektion, die rasch zu einer starken Neurodegeneration führt (Kreiner, 2015). Generell gestaltet sich die Untersuchung eines Parkinson-Phänotyps im tg Mausmodell schwieriger als im neurotoxischen Modell. Bei Mäusen, die z.B. ein Neurotoxin wie 6-OHDA unilateral in eine Hirnhemisphäre injiziert bekommen, kann eine asymmetrische Bewegungsstörung in Verhaltenstests, wie im

Zylinder-Test, leichter detektiert werden (Schallert et al., 2000). Im tg Mausmodell sind dagegen beide Hirnhälften symmetrisch betroffen, weshalb keine gesunde Körperseite zum Vergleich herangezogen werden kann und allgemeine Bewegungseinschränkungen beider Körperseiten erkannt werden müssen. Nichtsdestotrotz konnten vorherige Arbeiten im  $hm^2\alpha$ -SYN-39 Mausmodell signifikante altersabhängige Beeinträchtigungen der Lokomotion nachweisen. Es wurden dabei z.B. eine automatisierte Bewegungsaktivitätskammer verwendet, bei der in einem Zeitraum von 45 min die horizontalen und vertikalen Bewegungen einer Maus über Infrarot-Strahlen detektiert und gezählt wurden. Mit diesem Verhaltenstest konnte eine signifikante Reduktion der Bewegungsaktivität ab dem Alter von 7-9 Monaten bei  $hm^2\alpha$ -SYN-39 Mäusen nachgewiesen werden (Richfield et al., 2002). Zudem wurde auch ein invertierter Drahtgitter-Hängetest eingesetzt, bei dem eine Maus in das Zentrum eines Gitters platziert wurde, welches sich anschließend um 180 ° drehte, sodass sich die Maus am Gitter hängend festhalten musste. Die Zeit, die eine Maus benötigte, um auf die obere Seite des Gitters zu klettern, wurde gestoppt. In diesem Test zeigten ältere (13-23 Monate alte) tg Mäuse des  $hm^2\alpha$ -SYN-39 Mausmodells signifikante Verlängerungen der gestoppten Zeiten verglichen zu den wt Tieren (Richfield et al., 2002). Thiruchelvam et al. zeigten ebenso in der automatisierten Bewegungsaktivitätskammer eine erniedrigte Aktivität von nur noch 60 % bei 21-23 Monate alten tg Tieren verglichen zu den 2-3 Monate alten tg Tieren, bei signifikanten Verlusten von TH-positiven Neuronen bereits ab einem Alter von 7-9 Monaten (Thiruchelvam et al., 2004). In den von uns durchgeführten Rotarod- und Zylinder-Tests war eine tendenziell bessere Motorfunktion und Aktivität der jüngsten tg Mäuse (2-3 Monate) verglichen zu gleichaltrigen wt Mäusen erkennbar. Im „Open-Field“ war dieser Unterschied allerdings nicht sichtbar. Andere Arbeiten zeigten in der automatisierten Bewegungsaktivitätskammer und im invertiertem Drahtgitter-Hängetest eine auffällige Hyperaktivität bei jungen  $hm^2\alpha$ -SYN-39 Mäusen (Richfield et al., 2002, Thiruchelvam et al., 2004). Eine eindeutige Erklärung für dieses Verhalten bei jungen  $hm^2\alpha$ -SYN-39 Mäusen wurde bisher noch nicht gefunden.

In Anbetracht der verschiedenen Ergebnisse bezüglich eines möglichen Parkinson-Phänotyps bei Mäusen des  $hm^2\alpha$ -SYN-39 Mausmodells, ist eine eindeutige Einschätzung weiterhin noch nicht möglich. Die Ergebnisse unserer Arbeit schließen die Entwicklung einer deutlicher ausgeprägten, altersabhängigen Bewegungseinschränkung nicht aus.



Gegebenenfalls sind andere Verhaltenstests zur Detektion der Verhaltensauffälligkeit besser geeignet, wie z.B. die von Richfield et al. eingesetzte automatisierte Bewegungsaktivitätskammer oder der invertierte Drahtgitter-Hängetest (Richfield et al., 2002). Unterschiedliche Verhaltenstests können verschiedene Ergebnisse bezüglich eines Parkinson-Phänotyps im gleichen Mausmodell präsentieren. Dies demonstrierte z.B. eine Arbeit an Mäusen des MPTP-Modells, bei denen im Rotarod- und „Open Field“-Test keine Verhaltensauffälligkeit erkannt wurde, während bei den gleichen Mäusen in anderen Tests wie dem Gitter-Test und der Vorderpfoten-Schrittlängen-Messung beim Gehen durchaus signifikante Bewegungsauffälligkeiten nachgewiesen werden konnten. Bei den letzteren beiden Tests wurde v.a. die Bewegung und Verwendung der Vorderpfoten evaluiert. So wurden z.B. beim Gitter-Test die Schritte einer Maus mittels Videoaufnahmen analysiert und bei der Vorderpfoten-Schrittlängen-Messung mittels Einfärbung der Vorderpfoten die Schrittlängen einer Maus gemessen und beurteilt (Tillerson et al., 2002). Außerdem lassen sich die variierenden Ergebnisse bezüglich eines Phänotyps möglicherweise durch unterschiedliche Bedingungen während der Durchführung der Verhaltenstests erklären. Die Durchführung z.B. zu unterschiedlichen Tageszeiten könnte tatsächlich einen Einfluss auf das Verhalten der Mäuse haben. In unserer Arbeit wurden alle Verhaltenstest einheitlich zu morgendlichen Stunden durchgeführt. Kilpelainen et al. untersuchten die Aktivität von homozygoten A30P/A53T-Mäusen in einer automatisierten Bewegungsaktivitätskammer über einen Zeitraum von 22 Stunden und konnten signifikante Unterschiede je nach Tageszeit feststellen. Die tg Mäuse im Alter von 6, 9 und 12 Monaten zeigten vor allem zu abendlichen Zeiten, kurz nach dem Ausschalten der Lichter, eine signifikant erhöhte Bewegungsaktivität, während sie zwischen 22:00 und 1:00 eine erniedrigte Bewegungsaktivität verglichen zu den wt Tieren aufzeigten (Kilpelainen et al., 2019). Es wäre somit denkbar, dass auch die Mäuse des heterozygoten hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mausmodells zu bestimmten Tageszeiten unterschiedliche Verhaltensauffälligkeiten zeigen und die Untersuchung nur in den morgendlichen Stunden nicht ausreichte, um diese zu detektieren.



## 4.2 Dopaminerge Neurodegeneration und DA-Verlust im nigrostriatalen Trakt

Die  $hm^2\alpha$ -SYN-39 Mäuse entwickelten in dieser Arbeit eine progrediente, altersabhängige dopaminerge Neurodegeneration in der SNpc (Abbildung 10). Im Alter von 16-17 Monaten konnte ein 42,9 %-iger Verlust von TH-positiven Zellen in der SNpc der tg Mäuse verglichen zu den gleichaltrigen wt Mäusen nachgewiesen werden. Auch im Striatum ergab die immunhistochemische TH-Färbung und OD-Messung eine signifikante Reduktion dopaminerger Terminalen bei den tg Mäusen mit zunehmendem Alter, welche jedoch verglichen zur SN weniger deutlich ausgeprägt war (Abbildung 11). Ein milder DA-Verlust im striatalen Gewebe konnte außerdem mittels HPLC-Analyse bestätigt werden. Dabei zeigte sich eine signifikante 23,2 %-ige Reduktion von DA bei  $hm^2\alpha$ -SYN-39 Mäusen im Alter von 16-17 Monaten verglichen zu wt Mäusen des gleichen Alters (Abbildung 12 a). Zudem ergab die Analyse weiterer striataler Monoamine bei 16-17 Monate alten mutierten Mäusen eine Reduktion von NA und 5-HT verglichen zu der 16-17 Monate alten wt Gruppe (Abbildung 12 d, e). Tatsächlich ist bei Patienten mit MP neben dem dopaminergen System auch ein Verlust von noradrenergen Neuronen besonders im Locus coeruleus, sowie eine striatale Reduktion von 5-HT bekannt (Zarow et al., 2003, Patt and Gerhard, 1993, Fahn et al., 1971, Kish et al., 2008). Erwähnenswert in diesem Zusammenhang ist ein vermuteter Einfluss des noradrenergen Systems auf die Neuroinflammation. Dies konnte z.B. in einem NA-depletierten Mausmodell präsentiert werden, das neben einer erhöhten chronischen Neuroinflammation auch eine verstärkte Neurodegeneration zeigte (Song et al., 2019). Ein striataler DA-Verlust bei  $hm^2\alpha$ -SYN-39 Mäusen wurde bereits von Richfield et al. nachgewiesen, bei dem die mutierten Mäuse im Alter von 16-18 Monaten ebenfalls signifikant erniedrigte striatale DA-Level verglichen zu gleichaltrigen wt Tieren mittels HPLC zeigten (Richfield et al., 2002).

Die geringe Ausprägung der Reduktion dopaminerger Nervenenden im Striatum der  $hm^2\alpha$ -SYN-39 Mäuse lässt sich z.B. mit der Hypothese erklären, dass es zu einem kompensatorischen Aussprossen TH-positiver Nervenenden bei einem striatalen DA-Mangel kommen könnte (Song and Haber, 2000). Dies könnte das Erkennen einer Reduktion TH-positiver Terminalen im Striatum mittels OD-Messung erschweren, da ein Aussprossen der übrigen TH-positiven Nervenenden diesen Verlust kompensieren würde.

Bezüglich einer Neurodegeneration in der SN wurde in einer vorherigen Publikation über das hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mausmodell ein etwas stärkerer Verlust stereologisch quantifizierter TH-positiver Neurone in der SNpc mit zunehmendem Alter präsentiert. Dabei wurde bei 8-9 Monate alten Mäusen ein Verlust von 29 % und bei 19 Monate alten Mäusen ein Verlust von 55 % TH-positiven Neuronen nachgewiesen (Thiruchelvam et al., 2004). In einer weiteren vorherigen Arbeit wurden nur 6 Monate alte Mäuse des gleichen Mausmodells untersucht, bei denen, ähnlich zu unseren jungen tg Mäusen, kein signifikanter Verlust von TH-positiven Neuronen in der SNpc quantifiziert werden konnte (Yan et al., 2017). Die variierende Ausprägung des neuronalen Verlustes in der SNpc könnte u.a. durch unterschiedliche Bedingungen in der Tierhaltung oder durch generell unvermeidbare Variationen der verwendeten Methoden bedingt sein, wie z.B. verschiedene Färbungsvorgänge oder eine unterschiedliche Zellerkennung bei der stereologischen Quantifizierung je nach Untersucher. Die Ausprägung der Neurodegeneration in genetischen Mausmodellen hängt zudem u.a. von der Wahl der exprimierten Mutation und der Verwendung von einem heterozygoten oder homozygoten Genotyp ab. Das hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mausmodell, welches doppelt-mutiertes (A53T, A30P) humanes α-Syn exprimiert, zeigte z.B. einen früheren Verlust von TH-positiven Neuronen in der SNpc als Mäuse, die nicht-mutiertes humanes α-Syn exprimieren (Thiruchelvam et al., 2004). Ähnlich wie beim menschlichen MP, bei dem Patienten mit einer Parkinson-Mutation klassischerweise bereits vor dem 40. bis 50. Lebensjahr erkranken und eine schnellere Neurodegeneration aufweisen (Schrag and Schott, 2006), verläuft die Neurodegeneration der tg Mäuse mit einer doppelten Parkinson-Mutation ebenfalls deutlich schneller. Genetische Mausmodelle, die nur A30P- oder A53T-einfach-mutiertes α-Syn exprimieren, zeigten bisher allerdings keine eindeutige dopaminerge Neurodegeneration im nigrostriatalen Trakt (Giasson et al., 2002, Lee et al., 2002, Matsuoka et al., 2001). Einen noch früheren Verlust von dopaminergen Neuronen in der SNpc als die heterozygoten hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mäuse zeigten die homozygoten Mäuse mit der gleichen Expression von doppelt-mutiertem (A53T, A30P) humanen α-Syn. Bei diesen Mäusen wurde bereits im Alter von 12 Monaten eine signifikant erniedrigte TH-Immunoreaktivität sowohl in der SNpc als auch im Striatum nachgewiesen (Kilpelainen et al., 2019). Außerdem ermöglicht eine zusätzliche Exposition zu einem Risikofaktor, z.B. zu Pestiziden, einen früheren Verlust von dopaminergen Neuronen in der SNpc bei

hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mäusen. Dies zeigte die Exposition zu einer Kombination aus 2 Pestiziden im hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mausmodell, was zu einer noch stärkeren Ausprägung der dopaminergen Neurodegeneration im nigrostriatalen Trakt führte (Thiruchelvam et al., 2004).

#### 4.3 Neuroinflammation im hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mausmodell

Das Immunsystem spielt im physiologischen Zustand eine überwiegend neuroprotektive Rolle und soll das Hirngewebe vor fremden Erregern und Verletzungen schützen. Beim MP gibt es jedoch zahlreiche Hinweise für aktivierte Mikroglia und infiltrierende T-Zellen, die neurotoxische Effekte vermitteln und die dopaminerge Neurodegeneration beschleunigen. Sowohl das angeborene als auch das adaptive IS scheinen an einem perpetuierenden Kreislauf beteiligt zu sein und die dopaminerge Neurodegeneration beim MP voranzutreiben (Mosley et al., 2012, Hirsch et al., 2012, Stone et al., 2009). Eine bedeutende Rolle für die Aktivierung sowohl des adaptiven als auch des angeborenen IS spielen nitriertes α-Syn bzw. α-Syn-Oligomere (Sulzer et al., 2017, Reynolds et al., 2009, Kim et al., 2013). Durch die Überexpression von doppelt-mutiertem (A53T, A30P) humanen α-Syn sollte es vermutlich zu einer vermehrten Proteinaggregation in dem hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mausmodell kommen. Die Expression des humanen α-Syns wurde in diesem Modell bereits in Zellkörpern, Dendriten und Axonen von dopaminergen Neuronen in der SN sowie im Striatum gezeigt, jedoch konnten noch keine α-Syn-Einschlusskörperchen bzw. LBs nachgewiesen werden (Richfield et al., 2002, Thiruchelvam et al., 2004). Dennoch besteht die Möglichkeit, dass α-Syn-Einschlusskörperchen in diesem Modell existieren. Der erschwerte Nachweis dieser Einschlusskörperchen lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass sie sich vorwiegend in den absterbenden Neuronen befinden könnten. In einer Arbeit von Thiruchelvam et al. wurde die durchschnittliche Zahl absterbender Neurone im hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mausmodell jedoch nur auf 5-6 pro Tag geschätzt, was die Suche nach Einschlusskörperchen durchaus erschweren und das Fehlen eines bisherigen Nachweises von LBs erklären könnte (Thiruchelvam et al., 2004). In genetischen Mausmodellen, die einfach-mutiertes humanes α-Syn (A53T oder A30P) mit anderen Promotoren exprimierten, wurde teilweise ebenso das Fehlen von LB-ähnlichen Einschlüssen beschrieben (Matsuoka et al., 2001, Gomez-Isla et al., 2003). In weiteren Arbeiten dieser

Modelle wiederum konnten durchaus LBs in verschiedenen Regionen, nicht aber in der SN, nachgewiesen werden (Giasson et al., 2002, van der Putten et al., 2000, Lee et al., 2002). Die Entwicklung von LB im hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mausmodell erscheint somit möglich, ist jedoch bisher noch nicht bewiesen. Zur Untersuchung der Neuroinflammation in einem Parkinson-Modell sollte neben der α-Syn-Pathologie auch das Altern als größter Risikofaktor des MP berücksichtigt werden. Neben zahlreichen epidemiologischen Studien wurde die Bedeutung des Alterns beim MP auch in Tiermodellen gezeigt. Beispielsweise konnte eine niedrigdosierte Injektion von Rotenon bei jungen Ratten keine dopaminerge Neurodegeneration auslösen, während bei alten Ratten ein 20-30 %-iger Verlust von dopaminergen Neuronen in der SN detektiert werden konnte (Phinney et al., 2006). Das Altern ist sowohl beim Menschen als auch bei Tieren u.a. mit Veränderungen des Immunsystems assoziiert. So geht das normale Altern mit einer leichten chronischen Inflammation einher, was auch als „Inflamm-aging“ bezeichnet wird (Franceschi et al., 2000). Es liegt ein leichter, genereller Anstieg von proinflammatorischen Mediatoren, sowohl in der Zirkulation (Krabbe et al., 2004) als auch im Gehirn von alternden Menschen und Nagetieren vor (Joseph et al., 2005). Im menschlichen Gehirn ist im fortgeschrittenen Alter auch ein Anstieg von aktivierten mikroglialen Zellen zu sehen (Sheng et al., 1998, Mrak and Griffin, 2005). Man spricht inzwischen von seneszenten mikroglialen Zellen, die im höheren Alter durch eine erhöhte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, einer dysfunktionalen Phagozytose, einer vermehrten Proliferation und eingeschränkter Motilität gekennzeichnet sind (Rawji et al., 2016). Eine signifikant höhere mikrogliale Aktivierung wurde beispielsweise in der gesunden menschlichen SN bei älteren Menschen verglichen zu jungen Menschen beschrieben (Beach et al., 2007). Auch in alternden Mäusen (24 Monate alt) wurde eine erhöhte Zahl von CD68-positiven mikroglialen Zellen im Neocortex verglichen zu jungen Mäusen nachgewiesen (Lucin and Wyss-Coray, 2009). Das adaptive IS zeigt ebenfalls Veränderungen mit zunehmendem Alter, wobei es zu einer vermehrten ZNS-Infiltration von T-Zellen kommt. Im normalen alternden Gehirn von Mäusen wurden z.B. ab dem Alter von 12 Monaten erhöhte Zahlen von T-Zellen (CD3-positive Zellen) in der weißen Substanz und später auch in der grauen Substanz beschrieben (Stichel and Luebbert, 2007). Die ansteigende T-Zell Einwanderung ins ZNS ist assoziiert mit einer zunehmenden Veränderung der Bluthirnschranke im alternden Gehirn (Gemechu and

Bentivoglio, 2012). Zahlreiche Evidenzen deuten dabei auf eine Dysfunktion der Bluthirnschranke mit erhöhter Permeabilität im fortgeschrittenen Alter hin (Popescu et al., 2009). Dieser Alterseffekt auf das IS konnte in dieser Arbeit teilweise bei den wt Mäusen bestätigt werden. Dementsprechend wurde eine signifikante Zunahme von CD11b-positiven Zellen im Striatum von wt Mäusen mit zunehmendem Alter nachgewiesen. Bezüglich der erhöhten T-Zell Infiltration in das ZNS wurde in dieser Arbeit bei den wt Mäusen keine signifikante Zunahme von CD4-positiven Zellen im nigrostriatalen Trakt erkannt. Allerdings konnte eine signifikante Zunahme der CD8-positiven Zellen im Striatum ab dem Alter von 16-17 Monaten und eine leichte Zunahme in der SN der wt Mäuse gezeigt werden. Dieser altersabhängige Anstieg der CD8-positiven Zellzahl im ZNS entspricht u.a. den Ergebnissen von Groh et al., die zudem in alternden Mäusen einen relevanten Zusammenhang zwischen vermehrter CD8-positiver Zellinvasion in das ZNS und axonaler Degeneration präsentieren konnten (Groh et al., 2021).

Im pathologischen Zustand bei Parkinson-Patienten gibt es Hinweise auf eine noch weiter ausgeprägte Neuroinflammation sowohl des angeborenen als auch des adaptiven IS. Bezüglich des angeborenen IS sind eine mikrogliale Aktivierung (McGeer et al., 1988b) sowie erhöhte Level von proinflammatorischen Zytokinen im Gehirn, Blut und Liquor bei Parkinson-Patienten bekannt (Nagatsu et al., 2000). Die mikrogliale Aktivierung wurde bei Parkinson-Patienten auch mittels Bildgebungsverfahren (Ouchi et al., 2005) und in zahlreichen neurotoxischen Parkinson-Modellen bestätigt (Barcia et al., 2004, Akiyama and McGeer, 1989). In dieser Doktorarbeit wurden mikrogliale Immunzellen im nigrostriatalen Trakt von hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mäusen in verschiedenen Altersgruppen mittels immunhistochemischer Färbung quantifiziert. Dabei wurde sowohl in der SN als auch im Striatum ein sehr früher, signifikant progredienter Anstieg von CD11b-positiven Zellen bei tg Mäusen erkannt, was mit Untersuchungen in anderen Modellen im Einklang steht. In einer Publikation über ein MPTP-Modell wurde ein früher Anstieg von aktivierten mikroglialen Zellen bereits vor einer vermehrten CD3-positiven T-Zellinvasion in der SN nachgewiesen (Brochard et al., 2009). Zudem ergaben Untersuchungen in einem genetischen humanen α-Syn Modell einen Nachweis von vermehrter, aktivierter Mikroglia bereits im Alter von 1 Monat und damit zeitlich vor dem Eintreten einer dopaminergen Neurodegeneration (Su et al., 2009, Su et al., 2008).

Diese Ergebnisse weisen auf eine frühe, relevante Beteiligung vermehrter aktivierter Mikroglia an dem Verlauf der neuroinflammatorischen, sowie neurodegenerativen Parkinson-Pathologie hin, wobei die exakten Mechanismen der mikroglialen Beteiligung weiterhin unklar sind. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beschränken sich dabei jedoch, wie beschrieben, auf eine Quantifizierung mikroglialer Zellen, daher wäre es noch von Interesse zukünftig den Aktivierungszustand der Mikroglia in diesem Mausmodell genauer zu untersuchen.

Wie bereits erwähnt, spielt das adaptive IS ebenfalls eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie des MP. Es sind Veränderungen in der T-Zellzahl sowohl im Blut als auch im Gehirn von Parkinson-Patienten erkennbar. Im peripheren Blut wurden dabei verringerte Zahlen mit reduzierten CD4-positiven und vermehrten CD8-positiven T-Zellen gezeigt (Baba et al., 2005, Saunders et al., 2012, Stevens et al., 2012, Bas et al., 2001). In der SN von Parkinson-Patienten wurde dagegen eine vermehrte Infiltration sowohl von CD4- als auch von CD8-positiven T-Zellen, nicht aber von B-Zellen, post-mortem erkannt (Brochard et al., 2009). Diese erhöhte Infiltration von CD4- und CD8-positiven T-Zellen wurde auch in neurotoxischen Parkinson-Modellen, wie im MPTP-Mausmodell, selektiv im nigrostriatalen Trakt nachgewiesen (Brochard et al., 2009, Kurkowska-Jastrzebska et al., 1999, Hirsch and Hunot, 2009). Eine aktive neurotoxische Beteiligung des adaptiven IS an der progredienten Neurodegeneration des MP zeigten hauptsächlich CD4-positive T-Zellen, was auch besonders in MPTP-Modellen demonstriert wurde (Hirsch and Hunot, 2009, Brochard et al., 2009, Gonzalez et al., 2013). In genetischen Mausmodellen wurde die Infiltration von T-Zellen in das ZNS bisher nur wenig untersucht. In dieser Arbeit wurde erstmals die Invasion von CD4- und CD8-positiven T-Zellen in den nigrostriatalen Trakt des hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mausmodells in verschiedenen Altersgruppen quantifiziert. Dabei zeigte sich vor allem im Striatum eine vermehrte Infiltration von CD4-positiven Zellen mit zunehmendem Alter, sodass ab 16-17 Monaten bei den tg Mäusen signifikant höhere Zellzahlen verglichen zu gleichaltrigen wt Mäusen nachgewiesen wurden. Etwas ausgeprägter war die Invasion von CD8-positiven Zellen, die sowohl im Striatum als auch in der SN signifikant mit zunehmendem Alter zunahm. In der SN unterschied sich die CD8-positive Zellzahl im Alter von 16-17 Monaten bei tg Tieren signifikant zu allen wt Gruppen, während im Striatum nur eine leichte, nicht-signifikante Erhöhung verglichen zu den wt Tieren nachgewiesen wurde.

Die immunhistochemische Quantifizierung der T-Zellen wies in dieser Arbeit somit auf eine tendenziell progredient erhöhte Infiltration von CD4- und CD8-positiven T-Zellen in den nigrostriatalen Trakt von hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mäusen mit fortschreitendem Alter hin. Relevant wäre noch eine zusätzliche Untersuchung weiterer T-Zell-Subpopulationen, da bei Parkinson-Patienten eine Assoziation bestimmter T-Zell-Phänotypen mit der Ausprägung der Beschwerden und der Krankheitsprogression erkannt wurde (Saunders et al., 2012). Besonders von Interesse wären die Proportionen der CD4-positiven T-Zelluntergruppen, da nur bestimmte Subpopulationen der CD4-positiven Zellen neurotoxische Effekte zeigen. Im MPTP-Modell führten spezifisch CD4-positiv und CD25-negativ Effektor-T-Zellen (T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>17-Zellen) zur verstärkten mikroglialen Aktivierung mit ausgeprägter neurotoxischer Funktion (Reynolds et al., 2009). So führte z.B. der adoptive Transfer von *ex vivo* polarisierten T<sub>H</sub>17-Zellen zu einer Exazerbation der Neurodegeneration im MPTP-Modell, während der Transfer von CD4- und CD25-positiven T<sub>reg</sub>-Zellen neuroprotektive Effekte zeigte und über 90 % der dopaminergen Neurone vor der MPTP-Toxizität schützte (Reynolds et al., 2007, Reynolds et al., 2010). Außerdem interessant wäre die Untersuchung von α-Syn als relevantes Antigen zur Auslösung einer adaptiven Immunantwort im hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Modell (Reynolds et al., 2009). Man könnte analysieren, ob in diesem Mausmodell T-Zellen entdeckt werden, die spezifisch α-Syn erkennen, ähnlich wie es im menschlichen MP bereits nachgewiesen wurde (Sulzer et al., 2017).

B-Zellen wurden bisher nicht vermehrt im nigrostriatalen Trakt von Parkinson-Patienten entdeckt (Brochard et al., 2009). In dieser Arbeit wurde eine CD45-positiv immunhistochemische Färbung zur Quantifizierung der B-Zellen im nigrostriatalen Trakt der hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mäuse durchgeführt. Wie erwartet, war keine signifikante Erhöhung von CD45-positiven Zellen weder in der SN (Abbildung 16) noch im Striatum (Abbildung 17) der tg Mäuse mit zunehmendem Alter erkennbar. Trotz fehlender vermehrter Infiltration von B-Zellen in das ZNS, könnten B-Zellen durch die Ak-Produktion dennoch eine bedeutende Rolle in der Parkinson-Pathologie spielen. In der SN von Parkinson-Patienten wurden z.B. vermehrte IgG-Ablagerungen an dopaminergen Neuronen und LBs entdeckt (Orr et al., 2005), während im Liquor und peripheren Blut von Parkinson-Patienten erhöhte Level an α-Syn-spezifischen Ak nachgewiesen wurden (Horvath et al., 2017, Shalash et al., 2017, Akhtar et al., 2018).

## 4.4 Ausblick

Bisher gibt es noch keine kausale Therapie für den MP, da immer noch zahlreiche Prozesse in der Parkinson-Pathophysiologie ungeklärt sind. Aufgrund der bedeutenden Rolle des IS in der Krankheitsprogression des MP, könnten immunmodulatorische Therapieansätze zur Verlangsamung der Neurodegeneration eingesetzt werden. So führte z.B. das antiinflammatorische Ibuprofen bei einer langzeitigen Einnahme zu einer leichten Risikoreduktion zur Entwicklung von MP (Samii et al., 2009, Gagne and Power, 2010). Immunmodulatorische Therapieansätze wurden bisher überwiegend in pharmakologischen Tiermodellen untersucht (von Euler Chelpin and Vorup-Jensen, 2017). In dieser Arbeit konnten wir jedoch zeigen, dass das hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mausmodell mit zunehmender Krankheitsprogression auch eine zunehmende Neuroinflammation aufweist und somit ebenfalls für die Untersuchung von neuen immunmodulatorischen Therapieansätzen geeignet sein könnte. Ein Vorteil dieses genetischen Mausmodells gegenüber den pharmakologischen Modellen ist die Berücksichtigung eines langsam-progredienten Krankheitsverlaufs während des Alterns, sowie der α-Syn-Pathologie. Diese beiden Aspekte sind an der Exazerbation neuroinflammatorischer Prozesse beim MP beteiligt, sodass dem hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mausmodell ein hoher translationaler Wert zugeschrieben werden kann. Neben vielen möglichen Ansatzpunkten im IS könnten z.B. die neuroprotektiven T<sub>reg</sub>-Zellen als therapeutischer Ansatz beim MP genutzt werden. T<sub>reg</sub>-Zellen sind CD4- und CD25-positive T-Zellen, die zur Regulation der Immunhomöostase dienen und sowohl das adaptive als auch das angeborene IS hemmen (Reynolds et al., 2007, Reynolds et al., 2010, Maloy et al., 2003). Wie bereits erwähnt, wurde eine Neuroprotektion durch T<sub>reg</sub>-Zellen im MPTP-Modell bereits demonstriert (Reynolds et al., 2007). Die Induktion von T<sub>reg</sub>-Zellen wird z.B. mit dem Medikament Copaxone® (Glatirameracetat) bereits für die Therapie der Multiplen Sklerose genutzt (von Euler Chelpin and Vorup-Jensen, 2017, Vargas and Tyor, 2017). Eine weitere Substanz zur effektiven Stimulation von T<sub>reg</sub>-Zellen ist zum Beispiel der CD28-Superagonist (CD28SA). Dies ist ein CD28-spezifischer monoklonaler Ak, welcher zu einer präferenziellen Expansion von T<sub>reg</sub>-Zellen führt und in zahlreichen Krankheitsmodellen z.B. der Autoimmun-Enzephalomyelitis oder einer chronisch-destruktiven Form der Arthritis präventive bzw. therapeutische Effekte zeigte (Beyersdorf et al., 2005, Win et al., 2016). Durch eine frühe Injektion des CD28SA bei



jungen Mäusen des hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Modells könnte eine Progressionshemmung der Parkinson-Pathologie mit fortschreitendem Alter erreicht werden. Eventuell könnte die antiinflammatorische Wirkung der T<sub>reg</sub>-Zellen den perpetuierenden Kreislauf aus Neuroinflammation und -degeneration bereits im jungen Alter durchbrechen, sodass es mit zunehmendem Alter zu einer niedrigeren dopaminergen Neurodegeneration kommt. Zur Untersuchung eines solchen Therapieansatzes, sowie für zahlreiche weitere immunmodulatorische Therapien könnte das hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mausmodell eine geeignete Grundlage bieten und möglicherweise einen ausschlaggebenden Beitrag zur Erforschung von neuroinflammatorischen Prozessen beim MP leisten.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Krankheitsprogression im Parkinson-Mausmodell hm<sup>2</sup>α-SYN-39 mit zunehmendem Alter charakterisiert. Die Mäuse wurden in 4 Altersgruppen (2-3, 7-8, 11-12, 16-17 Monate) mit motorischen Verhaltenstests auf einen Parkinson-Phänotyp untersucht. Zudem erfolgten Untersuchungen des dopaminergen Systems zur Detektion von neurochemischen Veränderungen und einer Neurodegeneration im nigrostriatalen Trakt. Weiterhin wurden neuroinflammatorische Prozesse des adaptiven und angeborenen IS in der SN und im Striatum mittels immunhistochemischer Färbungen beurteilt.

Ein Parkinson-Phänotyp in diesem Mausmodell zeigte sich nur leicht ausgeprägt, sodass der Rotarod- und Zylinder-Test lediglich den Hinweis auf eine nicht-signifikante Einschränkung der Motorik erbrachte. Dennoch ergab die stereologische Quantifizierung TH- und Nissl-positiver Zellen in der SNpc der hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mäuse eine altersabhängige, signifikant-progrediente Reduktion der dopaminergen Neurone mit zunehmendem Alter. Eine signifikant niedrigere TH-positive Zellzahl dieser tg Mäuse zeigte sich ab einem Alter von 16-17 Monaten verglichen zu gleichaltrigen wt Tieren. Dagegen war die Neurodegeneration im Striatum etwas weniger ausgeprägt. Die tg Mäuse präsentierten im Alter von 16-17 Monaten eine nicht-signifikante Erniedrigung der dopaminergen Terminalen verglichen zu gleichaltrigen wt Tieren. Ein DA-Mangel im Striatum der tg Mäuse konnte mittels HPLC bestätigt werden. Bis zum Alter von 16-17 Monaten wurde eine signifikante Reduktion der DA-Level von 23,2 % verglichen zu gleichaltrigen wt Mäusen gezeigt. Außerdem erniedrigt waren die striatalen Level von

NA und 5-HAT bei tg Mäusen, passend zu den bisherigen Ergebnissen bei Parkinson-Patienten.

Immunhistochemische Untersuchungen einer Neuroinflammation im nigrostriatalen Trakt ergaben eine tendenziell erhöhte Infiltration von CD4- und CD8-positiven T-Zellen bei hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mäusen mit zunehmendem Alter, wobei die Infiltration CD8-positiver Zellen ausgeprägter war als bei CD4-positiven Zellen. Eine noch deutlichere neuroinflammatorische Reaktion zeigte das angeborene IS. Hierbei ergab die immunhistologische Quantifizierung CD11b-positiver mikroglialer Zellen einen hochsignifikanten Anstieg im nigrostriatalen Trakt bei hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mäusen schon im jungen Alter.

Zusammenfassend präsentierte dieses Parkinson-Mausmodell eine langsam-progrediente Parkinson-Pathologie mit begleitender Neuroinflammation im nigrostriatalen Trakt während des Alterns, wobei die Immunantwort der mikroglialen Zellen zu einem früheren Zeitpunkt einsetzte als die T-Zellinfiltration und Neurodegeneration. Dieses Mausmodell bietet zahlreiche Möglichkeiten zur zukünftigen Erforschung der Pathophysiologie beim MP. Generell weist diese Arbeit auf eine bedeutende Rolle neuroinflammatorischer Prozesse in der Krankheitsprogression der Parkinsonerkrankung hin und soll dazu ermutigen Neuroinflammation durchaus intensiver in tg Tiermodellen zu untersuchen.

## Summary

In this doctoral thesis the progression of disease during ageing has been characterized in the mouse model of Parkinson's disease hm<sup>2</sup>α-SYN-39. Mice in 4 age groups (2-3, 7-8, 11-12, 16-17 months of age) were tested for a Parkinson's phenotype through motor performance analysis. Additionally, investigations of the dopaminergic system were performed to detect neurochemical changes and neurodegeneration in the nigrostriatal tract. Furthermore, neuroinflammatory processes of the adaptive and innate immune system in the SN and striatum were evaluated via immunohistochemical staining.

A Parkinson's phenotype in this mouse model appeared only mildly, revealing a hint of non-significant motor impairment in the Rotarod and Cylinder test. However, stereological quantification of TH- and Nissl-positive cells in the SNpc of hm<sup>2</sup>α-SYN-39 mice resulted in an age-dependent, significant-progressive reduction of dopaminergic neurons with increased age. A significant lower TH-positive cell count of these tg mice

was shown at an age of 16-17 months compared to wt mice of the same age. In contrast, the neurodegeneration in the striatum was less pronounced. At an age of 16-17 months tg mice presented with a non-significant reduction of dopaminergic terminals compared to wt mice of the same age. Loss of DA in the striatum of tg mice has been confirmed via HPLC. A significant reduction of DA-levels of 23,2 % was shown at the age of 16-17 months in comparison to same-aged wt mice. Striatal levels of NA and 5-HT of tg mice were reduced as well, matching previous results of Parkinson's patients.

Immunohistochemical investigations of neuroinflammation in the nigrostriatal tract revealed a tendency of increased infiltration of CD4- and CD8-positive T cells in hm<sup>2</sup>α-SYN-39 mice with increased age, an infiltration of CD8-positive cells being more distinct though than of CD4-positive cells. The innate IS exposed an even stronger neuroinflammatory response. Immunohistochemical quantification of CD11b-positive microglial cells resulted in a highly significant surge in the nigrostriatal tract of hm<sup>2</sup>α-SYN-39 mice starting at a young age already.

In summary, this mouse model of Parkinson's disease presented with a slowly progressive Parkinson's pathology accompanied by neuroinflammation in the nigrostriatal tract during the process of ageing, taking in account that an immune response of microglial cells was setting in earlier than T cell infiltration and neurodegeneration. This mouse model offers various opportunities for exploring Parkinson's pathophysiology in the future. Generally, this work points to a substantial role of neuroinflammatory responses in the progression of Parkinson's disease and should encourage to further investigate neuroinflammation in tg animal models.

## 6 Literaturverzeichnis

- AARSLAND, D. & KURZ, M. W. 2010. The epidemiology of dementia associated with Parkinson's disease. *Brain Pathol*, 20, 633-9.
- AKHTAR, R. S., LICATA, J. P., LUK, K. C., SHAW, L. M., TROJANOWSKI, J. Q. & LEE, V. M. 2018. Measurements of auto-antibodies to alpha-synuclein in the serum and cerebral spinal fluids of patients with Parkinson's disease. *J Neurochem*, 145, 489-503.
- AKIYAMA, H. & MCGEER, P. L. 1989. Microglial response to 6-hydroxydopamine-induced substantia nigra lesions. *Brain Res*, 489, 247-53.
- ALAM, M., MAYERHOFER, A. & SCHMIDT, W. J. 2004. The neurobehavioral changes induced by bilateral rotenone lesion in medial forebrain bundle of rats are reversed by L-DOPA. *Behav Brain Res*, 151, 117-24.
- ALDRIDGE, J. W. & BERRIDGE, K. C. 1998. Coding of serial order by neostriatal neurons: a "natural action" approach to movement sequence. *J Neurosci*, 18, 2777-87.
- ANDERSEN, J. K. 2004. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med*, 10 Suppl, S18-25.
- ANDERSON, K. M., OLSON, K. E., ESTES, K. A., FLANAGAN, K., GENDELMAN, H. E. & MOSLEY, R. L. 2014. Dual destructive and protective roles of adaptive immunity in neurodegenerative disorders. *Transl Neurodegener*, 3, 25.
- BABA, Y., KUROIWA, A., UITTI, R. J., WSZOLEK, Z. K. & YAMADA, T. 2005. Alterations of T-lymphocyte populations in Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 11, 493-8.
- BABCOCK, A. A., KUZIEL, W. A., RIVEST, S. & OWENS, T. 2003. Chemokine expression by glial cells directs leukocytes to sites of axonal injury in the CNS. *J Neurosci*, 23, 7922-30.
- BAQUET, Z. C., WILLIAMS, D., BRODY, J. & SMEYNE, R. J. 2009. A comparison of model-based (2D) and design-based (3D) stereological methods for estimating cell number in the substantia nigra pars compacta (SNpc) of the C57BL/6J mouse. *Neuroscience*, 161, 1082-90.
- BARCIA, C., FERNANDEZ BARREIRO, A., POZA, M. & HERRERO, M. T. 2003. Parkinson's disease and inflammatory changes. *Neurotox Res*, 5, 411-8.
- BARCIA, C., ROS, C. M., ANNESE, V., GOMEZ, A., ROS-BERNAL, F., AGUADROYERA, D., MARTINEZ-PAGAN, M. E., DE PABLOS, V., FERNANDEZ-VILLALBA, E. & HERRERO, M. T. 2011. IFN-gamma signaling, with the synergistic contribution of TNF-alpha, mediates cell specific microglial and astroglial activation in experimental models of Parkinson's disease. *Cell Death Dis*, 2, e142.
- BARCIA, C., SANCHEZ BAHILLO, A., FERNANDEZ-VILLALBA, E., BAUTISTA, V., POZA, Y. P. M., FERNANDEZ-BARREIRO, A., HIRSCH, E. C. & HERRERO, M. T. 2004. Evidence of active microglia in substantia nigra pars compacta of parkinsonian monkeys 1 year after MPTP exposure. *Glia*, 46, 402-9.
- BAS, J., CALOPA, M., MESTRE, M., MOLLEVI, D. G., CUTILLAS, B., AMBROSIO, S. & BUENDIA, E. 2001. Lymphocyte populations in Parkinson's disease and in rat models of parkinsonism. *J Neuroimmunol*, 113, 146-52.

- BEACH, T. G., ADLER, C. H., SUE, L. I., VEDDERS, L., LUE, L., WHITE III, C. L., AKIYAMA, H., CAVINESS, J. N., SHILL, H. A., SABBAGH, M. N., WALKER, D. G. & ARIZONA PARKINSON'S DISEASE, C. 2010. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol*, 119, 689-702.
- BEACH, T. G., SUE, L. I., WALKER, D. G., LUE, L. F., CONNOR, D. J., CAVINESS, J. N., SABBAGH, M. N. & ADLER, C. H. 2007. Marked microglial reaction in normal aging human substantia nigra: correlation with extraneuronal neuromelanin pigment deposits. *Acta Neuropathol*, 114, 419-24.
- BENNER, E. J., BANERJEE, R., REYNOLDS, A. D., SHERMAN, S., PISAREV, V. M., TSIPERSON, V., NEMACHEK, C., CIBOROWSKI, P., PRZEDBORSKI, S., MOSLEY, R. L. & GENDELMAN, H. E. 2008. Nitrated alpha-synuclein immunity accelerates degeneration of nigral dopaminergic neurons. *PLoS One*, 3, e1376.
- BENSKEY, M. J., PEREZ, R. G. & MANFREDSSON, F. P. 2016. The contribution of alpha synuclein to neuronal survival and function - Implications for Parkinson's disease. *J Neurochem*, 137, 331-59.
- BERNHEIMER, H., BIRKMAYER, W., HORNYKIEWICZ, O., JELLINGER, K. & SEITELBERGER, F. 1973. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci*, 20, 415-55.
- BETARBET, R., SHERER, T. B., MACKENZIE, G., GARCIA-OSUNA, M., PANOV, A. V. & GREENAMYRE, J. T. 2000. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, 3, 1301-6.
- BEYERSDORF, N., GAUPP, S., BALBACH, K., SCHMIDT, J., TOYKA, K. V., LIN, C. H., HANKE, T., HUNIG, T., KERKAU, T. & GOLD, R. 2005. Selective targeting of regulatory T cells with CD28 superagonists allows effective therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*, 202, 445-55.
- BOKA, G., ANGLADE, P., WALLACH, D., JAVOY-AGID, F., AGID, Y. & HIRSCH, E. C. 1994. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 172, 151-4.
- BONIFATI, V., RIZZU, P., VAN BAREN, M. J., SCHAAP, O., BREEDVELD, G. J., KRIEGER, E., DEKKER, M. C., SQUITIERI, F., IBANEZ, P., JOOSSE, M., VAN DONGEN, J. W., VANACORE, N., VAN SWIETEN, J. C., BRICE, A., MECO, G., VAN DUIJN, C. M., OOSTRA, B. A. & HEUTINK, P. 2003. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*, 299, 256-9.
- BRAAK, H. & DEL TREDICI, K. 2008. Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. *Neurology*, 70, 1916-25.
- BRAAK, H., DEL TREDICI, K., RUB, U., DE VOS, R. A., JANSEN STEUR, E. N. & BRAAK, E. 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 24, 197-211.
- BROCHARD, V., COMBADIÈRE, B., PRIGENT, A., LAOUAR, Y., PERRIN, A., BERAY-BERTHAT, V., BONDUELLE, O., ALVAREZ-FISCHER, D., CALLEBERT, J., LAUNAY, J. M., DUYCKAERTS, C., FLAVELL, R. A., HIRSCH, E. C. & HUNOT, S. 2009. Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J Clin Invest*, 119, 182-92.

- BROOKS, A. I., CHADWICK, C. A., GELBARD, H. A., CORY-SLECHTA, D. A. & FEDEROFF, H. J. 1999. Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. *Brain Res*, 823, 1-10.
- CARVEY, P. M., PUNATI, A. & NEWMAN, M. B. 2006. Progressive dopamine neuron loss in Parkinson's disease: the multiple hit hypothesis. *Cell Transplant*, 15, 239-50.
- CENCI, M. A., WHISHAW, I. Q. & SCHALLERT, T. 2002. Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nat Rev Neurosci*, 3, 574-9.
- CHANDRA, S., GALLARDO, G., FERNANDEZ-CHACON, R., SCHLUTER, O. M. & SUDHOF, T. C. 2005. Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell*, 123, 383-96.
- CHANG, J. W., WACHTEL, S. R., YOUNG, D. & KANG, U. J. 1999. Biochemical and anatomical characterization of forepaw adjusting steps in rat models of Parkinson's disease: studies on medial forebrain bundle and striatal lesions. *Neuroscience*, 88, 617-28.
- CHAO, C. C., HU, S., SHENG, W. S., BU, D., BUKRINSKY, M. I. & PETERSON, P. K. 1996. Cytokine-stimulated astrocytes damage human neurons via a nitric oxide mechanism. *Glia*, 16, 276-84.
- CHAUDHURI, K. R., HEALY, D. G., SCHAPIRA, A. H. & NATIONAL INSTITUTE FOR CLINICAL, E. 2006. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol*, 5, 235-45.
- CHENG, H. C., ULANE, C. M. & BURKE, R. E. 2010. Clinical progression in Parkinson disease and the neurobiology of axons. *Ann Neurol*, 67, 715-25.
- CHUN, H. S., GIBSON, G. E., DEGIORGIO, L. A., ZHANG, H., KIDD, V. J. & SON, J. H. 2001. Dopaminergic cell death induced by MPP(+), oxidant and specific neurotoxicants shares the common molecular mechanism. *J Neurochem*, 76, 1010-21.
- COLLIER, T. J., KANAAN, N. M. & KORDOWER, J. H. 2011. Ageing as a primary risk factor for Parkinson's disease: evidence from studies of non-human primates. *Nat Rev Neurosci*, 12, 359-66.
- CONNOLLY, B. S. & LANG, A. E. 2014. Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. *JAMA*, 311, 1670-83.
- CONWAY, K. A., HARPER, J. D. & LANSBURY, P. T. 1998. Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat Med*, 4, 1318-20.
- CSERR, H. F. & KNOPF, P. M. 1992. Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. *Immunol Today*, 13, 507-12.
- DAUER, W., KHOLODILOV, N., VILA, M., TRILLAT, A. C., GOODCHILD, R., LARSEN, K. E., STAAL, R., TIEU, K., SCHMITZ, Y., YUAN, C. A., ROCHA, M., JACKSON-LEWIS, V., HERSCH, S., SULZER, D., PRZEDBORSKI, S., BURKE, R. & HEN, R. 2002. Resistance of alpha -synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 14524-9.
- DAUER, W. & PRZEDBORSKI, S. 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39, 889-909.
- DAWSON, V. L., DAWSON, T. M., BARTLEY, D. A., UHL, G. R. & SNYDER, S. H. 1993. Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J Neurosci*, 13, 2651-61.

- DECRESSAC, M., MATTSSON, B., LUNDBLAD, M., WEIKOP, P. & BJORKLUND, A. 2012. Progressive neurodegenerative and behavioural changes induced by AAV-mediated overexpression of alpha-synuclein in midbrain dopamine neurons. *Neurobiol Dis*, 45, 939-53.
- DELI, M. A., ABRAHAM, C. S., KATAOKA, Y. & NIWA, M. 2005. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol*, 25, 59-127.
- DESAI, B. S., MONAHAN, A. J., CARVEY, P. M. & HENDEY, B. 2007. Blood-brain barrier pathology in Alzheimer's and Parkinson's disease: implications for drug therapy. *Cell Transplant*, 16, 285-99.
- DI MONTE, D., SANDY, M. S., EKSTROM, G. & SMITH, M. T. 1986. Comparative studies on the mechanisms of paraquat and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*, 137, 303-9.
- DORSEY, E. R. & BLOEM, B. R. 2018. The Parkinson Pandemic-A Call to Action. *JAMA Neurol*, 75, 9-10.
- DRIVER, J. A., LOGROSCINO, G., GAZIANO, J. M. & KURTH, T. 2009. Incidence and remaining lifetime risk of Parkinson disease in advanced age. *Neurology*, 72, 432-8.
- 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]. *Klin Wochenschr*, 38, 1236-9.
- ENGELHARDT, B. & RANSOHOFF, R. M. 2005. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol*, 26, 485-95.
- FAHN, S., LIBSCH, L. R. & CUTLER, R. W. 1971. Monoamines in the human neostriatum: topographic distribution in normals and in Parkinson's disease and their role in akinesia, rigidity, chorea, and tremor. *J Neurol Sci*, 14, 427-55.
- FARKAS, E., DE JONG, G. I., APRO, E., DE VOS, R. A., STEUR, E. N. & LUITEN, P. G. 2000. Similar ultrastructural breakdown of cerebrocortical capillaries in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and experimental hypertension. What is the functional link? *Ann N Y Acad Sci*, 903, 72-82.
- FEARNLEY, J. M. & LEES, A. J. 1991. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain*, 114 ( Pt 5), 2283-301.
- FLEMING, S. M., FERNAGUT, P. O. & CHESSELET, M. F. 2005. Genetic mouse models of parkinsonism: strengths and limitations. *NeuroRx*, 2, 495-503.
- FORNAI, F., SCHLUTER, O. M., LENZI, P., GESI, M., RUFFOLI, R., FERRUCCI, M., LAZZERI, G., BUSCETI, C. L., PONTARELLI, F., BATTAGLIA, G., PELLEGRINI, A., NICOLETTI, F., RUGGIERI, S., PAPARELLI, A. & SUDHOF, T. C. 2005. Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 3413-8.
- FRANCESCHI, C., BONAFE, M., VALENSIN, S., OLIVIERI, F., DE LUCA, M., OTTAVIANI, E. & DE BENEDICTIS, G. 2000. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*, 908, 244-54.
- GAGNE, J. J. & POWER, M. C. 2010. Anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson disease: a meta-analysis. *Neurology*, 74, 995-1002.
- GALVIN, J. E., LEE, V. M. & TROJANOWSKI, J. Q. 2001. Synucleinopathies: clinical and pathological implications. *Arch Neurol*, 58, 186-90.

- GAO, H. M., JIANG, J., WILSON, B., ZHANG, W., HONG, J. S. & LIU, B. 2002. Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem*, 81, 1285-97.
- GAO, H. M., KOTZBAUER, P. T., URYU, K., LEIGHT, S., TROJANOWSKI, J. Q. & LEE, V. M. 2008a. Neuroinflammation and oxidation/nitration of alpha-synuclein linked to dopaminergic neurodegeneration. *J Neurosci*, 28, 7687-98.
- GAO, H. M., LIU, B., ZHANG, W. & HONG, J. S. 2003. Critical role of microglial NADPH oxidase-derived free radicals in the in vitro MPTP model of Parkinson's disease. *FASEB J*, 17, 1954-6.
- GAO, X., HU, X., QIAN, L., YANG, S., ZHANG, W., ZHANG, D., WU, X., FRASER, A., WILSON, B., FLOOD, P. M., BLOCK, M. & HONG, J. S. 2008b. Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced dopaminergic neurotoxicity via microglial activation: a mediator between peripheral infection and neurodegeneration? *Environ Health Perspect*, 116, 593-8.
- GAYLE, D. A., LING, Z., TONG, C., LANDERS, T., LIPTON, J. W. & CARVEY, P. M. 2002. Lipopolysaccharide (LPS)-induced dopamine cell loss in culture: roles of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and nitric oxide. *Brain Res Dev Brain Res*, 133, 27-35.
- GELB, D. J., OLIVER, E. & GILMAN, S. 1999. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol*, 56, 33-9.
- GEMECHU, J. M. & BENTIVOGLIO, M. 2012. T Cell Recruitment in the Brain during Normal Aging. *Front Cell Neurosci*, 6, 38.
- GIASSON, B. I., DUDA, J. E., QUINN, S. M., ZHANG, B., TROJANOWSKI, J. Q. & LEE, V. M. 2002. Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. *Neuron*, 34, 521-33.
- GOMEZ-ISLA, T., IRIZARRY, M. C., MARIASH, A., CHEUNG, B., SOTO, O., SCHRUMP, S., SONDEL, J., KOTILINEK, L., DAY, J., SCHWARZSCHILD, M. A., CHA, J. H., NEWELL, K., MILLER, D. W., UEDA, K., YOUNG, A. B., HYMAN, B. T. & ASHE, K. H. 2003. Motor dysfunction and gliosis with preserved dopaminergic markers in human alpha-synuclein A30P transgenic mice. *Neurobiol Aging*, 24, 245-58.
- GONZALEZ, H., CONTRERAS, F., PRADO, C., ELGUETA, D., FRANZ, D., BERNALES, S. & PACHECO, R. 2013. Dopamine receptor D3 expressed on CD4+ T cells favors neurodegeneration of dopaminergic neurons during Parkinson's disease. *J Immunol*, 190, 5048-56.
- GROH, J., KNÖPPER, K., ARAMPATZI, P., YUAN, X., LÖSSLEI, L., SALIBA, A.-E., KASTENMÜLLER, W. & MARTINI, R. 2021. Accumulation of cytotoxic T cells in the aged CNS leads to axon degeneration and contributes to cognitive and motor decline. *Nat Aging*, 1, 357-367.
- GROUP, G. B. D. N. D. C. 2017. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Neurol*, 16, 877-897.
- GUNDERSEN, H. J. & JENSEN, E. B. 1987. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc*, 147, 229-63.
- HAAVIK, J. & TOSKA, K. 1998. Tyrosine hydroxylase and Parkinson's disease. *Mol Neurobiol*, 16, 285-309.



- HALLETT, M. 2012. Parkinson's disease tremor: pathophysiology. *Parkinsonism Relat Disord*, 18 Suppl 1, S85-6.
- HASHIMOTO, M., HSU, L. J., XIA, Y., TAKEDA, A., SISK, A., SUNDSMO, M. & MASLIAH, E. 1999. Oxidative stress induces amyloid-like aggregate formation of NACP/alpha-synuclein in vitro. *Neuroreport*, 10, 717-21.
- HELMICH, R. C., JANSSEN, M. J., OYEN, W. J., BLOEM, B. R. & TONI, I. 2011. Pallidal dysfunction drives a cerebellothalamic circuit into Parkinson tremor. *Ann Neurol*, 69, 269-81.
- HICKEY, W. F., HSU, B. L. & KIMURA, H. 1991. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res*, 28, 254-60.
- HIRSCH, E. C. & HUNOT, S. 2009. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol*, 8, 382-97.
- HIRSCH, E. C. & STANDAERT, D. G. 2020. Ten Unsolved Questions About Neuroinflammation in Parkinson's Disease. *Mov Disord*.
- HIRSCH, E. C., VYAS, S. & HUNOT, S. 2012. Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 18 Suppl 1, S210-2.
- HIRTZ, D., THURMAN, D. J., GWINN-HARDY, K., MOHAMED, M., CHAUDHURI, A. R. & ZALUTSKY, R. 2007. How common are the "common" neurologic disorders? *Neurology*, 68, 326-37.
- HORNYKIEWICZ, O. & KISH, S. J. 1987. Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease. *Adv Neurol*, 45, 19-34.
- HORVATH, I., IASHCHISHYN, I. A., FORSGREN, L. & MORZOVA-ROCHE, L. A. 2017. Immunochemical Detection of alpha-Synuclein Autoantibodies in Parkinson's Disease: Correlation between Plasma and Cerebrospinal Fluid Levels. *ACS Chem Neurosci*, 8, 1170-1176.
- HUNOT, S., BOISSIERE, F., FAUCHEUX, B., BRUGG, B., MOUATT-PRIGENT, A., AGID, Y. & HIRSCH, E. C. 1996. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 72, 355-63.
- HUNOT, S., DUGAS, N., FAUCHEUX, B., HARTMANN, A., TARDIEU, M., DEBRE, P., AGID, Y., DUGAS, B. & HIRSCH, E. C. 1999. FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. *J Neurosci*, 19, 3440-7.
- HUNOT, S. & HIRSCH, E. C. 2003. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 53 Suppl 3, S49-58; discussion S58-60.
- ILIFF, J. J., WANG, M., LIAO, Y., PLOGG, B. A., PENG, W., GUNDERSEN, G. A., BENVENISTE, H., VATES, G. E., DEANE, R., GOLDMAN, S. A., NAGELHUS, E. A. & NEDERGAARD, M. 2012. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid beta. *Sci Transl Med*, 4, 147ra111.
- IP, C. W., KLAUS, L. C., KARIKARI, A. A., VISANJI, N. P., BROTCHE, J. M., LANG, A. E., VOLKMANN, J. & KOPRICH, J. B. 2017. AAV1/2-induced overexpression of A53T-alpha-synuclein in the substantia nigra results in degeneration of the nigrostriatal system with Lewy-like pathology and motor impairment: a new mouse model for Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun*, 5, 11.
- JAVITCH, J. A., D'AMATO, R. J., STRITTMATTER, S. M. & SNYDER, S. H. 1985. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by

- dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82, 2173-7.
- JENNER, P. 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 53 Suppl 3, S26-36; discussion S36-8.
- JOSEPH, J. A., SHUKITT-HALE, B., CASADESUS, G. & FISHER, D. 2005. Oxidative stress and inflammation in brain aging: nutritional considerations. *Neurochem Res*, 30, 927-35.
- KILPELAINEN, T., JULKU, U. H., SVARCBAHS, R. & MYOHANEN, T. T. 2019. Behavioural and dopaminergic changes in double mutated human A30P\*A53T alpha-synuclein transgenic mouse model of Parkinson s disease. *Sci Rep*, 9, 17382.
- KIM, C., HO, D. H., SUK, J. E., YOU, S., MICHAEL, S., KANG, J., JOONG LEE, S., MASLIAH, E., HWANG, D., LEE, H. J. & LEE, S. J. 2013. Neuron-released oligomeric alpha-synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. *Nat Commun*, 4, 1562.
- KIRIK, D., ROSENBLAD, C., BURGER, C., LUNDBERG, C., JOHANSEN, T. E., MUZYCZKA, N., MANDEL, R. J. & BJORKLUND, A. 2002. Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. *J Neurosci*, 22, 2780-91.
- KISH, S. J., TONG, J., HORNYKIEWICZ, O., RAJPUT, A., CHANG, L. J., GUTTMAN, M. & FURUKAWA, Y. 2008. Preferential loss of serotonin markers in caudate versus putamen in Parkinson's disease. *Brain*, 131, 120-31.
- 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, 605-8.
- KNOTT, C., STERN, G. & WILKIN, G. P. 2000. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Mol Cell Neurosci*, 16, 724-39.
- KOHUTNICKA, M., LEWANDOWSKA, E., KURKOWSKA-JASTRZEBSKA, I., CZLONKOWSKI, A. & CZLONKOWSKA, A. 1998. Microglial and astrocytic involvement in a murine model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Immunopharmacology*, 39, 167-80.
- KORTEKAAS, R., LEENDERS, K. L., VAN OOSTROM, J. C., VAALBURG, W., BART, J., WILLEMSSEN, A. T. & HENDRIKSE, N. H. 2005. Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. *Ann Neurol*, 57, 176-9.
- KOUTSILIERI, E., SCHELLER, C., GRUNBLATT, E., NARA, K., LI, J. & RIEDERER, P. 2002. Free radicals in Parkinson's disease. *J Neurol*, 249 Suppl 2, II1-5.
- KRABBE, K. S., PEDERSEN, M. & BRUUNSGAARD, H. 2004. Inflammatory mediators in the elderly. *Exp Gerontol*, 39, 687-99.
- KREINER, G. 2015. Compensatory mechanisms in genetic models of neurodegeneration: are the mice better than humans? *Front Cell Neurosci*, 9, 56.
- KREUTZBERG, G. W. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 19, 312-8.
- KRUGER, R., KUHN, W., MULLER, T., WOITALLA, D., GRAEBER, M., KOSEL, S., PRZUNTEK, H., EPPLEN, J. T., SCHOLS, L. & RIESS, O. 1998. Ala30Pro

- mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet*, 18, 106-8.
- KURKOWSKA-JASTRZEBSKA, I., WRONSKA, A., KOHUTNICKA, M., CZLONKOWSKI, A. & CZLONKOWSKA, A. 1999. The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. *Exp Neurol*, 156, 50-61.
- LAMAN, J. D. & WELLER, R. O. 2013. Drainage of cells and soluble antigen from the CNS to regional lymph nodes. *J Neuroimmune Pharmacol*, 8, 840-56.
- LANG, A. E. & LOZANO, A. M. 1998. Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med*, 339, 1130-43.
- LANGSTON, J. W., BALLARD, P., TETRUD, J. W. & IRWIN, I. 1983. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 219, 979-80.
- LANGSTON, J. W., FORNO, L. S., TETRUD, J., REEVES, A. G., KAPLAN, J. A. & KARLUK, D. 1999. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol*, 46, 598-605.
- LANGSTON, J. W., IRWIN, I., LANGSTON, E. B. & FORNO, L. S. 1984. 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>): identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra. *Neurosci Lett*, 48, 87-92.
- LARSEN, K. E., SCHMITZ, Y., TROYER, M. D., MOSHAROV, E., DIETRICH, P., QUAZI, A. Z., SAVALLE, M., NEMANI, V., CHAUDHRY, F. A., EDWARDS, R. H., STEFANIS, L. & SULZER, D. 2006. Alpha-synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis. *J Neurosci*, 26, 11915-22.
- LEE, F. J., LIU, F., PRISTUPA, Z. B. & NIZNIK, H. B. 2001. Direct binding and functional coupling of alpha-synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis. *FASEB J*, 15, 916-26.
- LEE, M. K., STIRLING, W., XU, Y., XU, X., QUI, D., MANDIR, A. S., DAWSON, T. M., COPELAND, N. G., JENKINS, N. A. & PRICE, D. L. 2002. Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 --> Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 8968-73.
- LI, J., UVERSKY, V. N. & FINK, A. L. 2001. Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. *Biochemistry*, 40, 11604-13.
- LUCIN, K. M. & WYSS-CORAY, T. 2009. Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? *Neuron*, 64, 110-22.
- MALOY, K. J., SALAUN, L., CAHILL, R., DOUGAN, G., SAUNDERS, N. J. & POWRIE, F. 2003. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med*, 197, 111-9.
- MATSUOKA, Y., VILA, M., LINCOLN, S., MCCORMACK, A., PICCIANO, M., LAFRANCOIS, J., YU, X., DICKSON, D., LANGSTON, W. J., MCGOWAN, E., FARRER, M., HARDY, J., DUFF, K., PRZEDBORSKI, S. & DI MONTE, D. A. 2001. Lack of nigral pathology in transgenic mice expressing human alpha-synuclein driven by the tyrosine hydroxylase promoter. *Neurobiol Dis*, 8, 535-9.

- MCGEER, P. L., ITAGAKI, S., AKIYAMA, H. & MCGEER, E. G. 1988a. Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. *Ann Neurol*, 24, 574-6.
- MCGEER, P. L., ITAGAKI, S., BOYES, B. E. & MCGEER, E. G. 1988b. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*, 38, 1285-91.
- MCNAUGHT, K. S., THULL, U., CARRUPT, P. A., ALTOMARE, C., CELLAMARE, S., CAROTTI, A., TESTA, B., JENNER, P. & MARSDEN, C. D. 1996. Effects of isoquinoline derivatives structurally related to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on mitochondrial respiration. *Biochem Pharmacol*, 51, 1503-11.
- MEREDITH, G. E. & KANG, U. J. 2006. Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem. *Mov Disord*, 21, 1595-606.
- MEREDITH, G. E., SONSALLA, P. K. & CHESSELET, M. F. 2008. Animal models of Parkinson's disease progression. *Acta Neuropathol*, 115, 385-98.
- MIKLOSSY, J., DOUDET, D. D., SCHWAB, C., YU, S., MCGEER, E. G. & MCGEER, P. L. 2006. Role of ICAM-1 in persisting inflammation in Parkinson disease and MPTP monkeys. *Exp Neurol*, 197, 275-83.
- MOGI, M., HARADA, M., RIEDERER, P., NARABAYASHI, H., FUJITA, K. & NAGATSU, T. 1994. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci Lett*, 165, 208-10.
- MOGI, M., TOGARI, A., KONDO, T., MIZUNO, Y., KOMURE, O., KUNO, S., ICHINOSE, H. & NAGATSU, T. 2000. Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain. *J Neural Transm (Vienna)*, 107, 335-41.
- MOSLEY, R. L., BENNER, E. J., KADIU, I., THOMAS, M., BOSKA, M. D., HASAN, K., LAURIE, C. & GENDELMAN, H. E. 2006. Neuroinflammation, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Clin Neurosci Res*, 6, 261-281.
- MOSLEY, R. L., HUTTER-SAUNDERS, J. A., STONE, D. K. & GENDELMAN, H. E. 2012. Inflammation and adaptive immunity in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2, a009381.
- MRAK, R. E. & GRIFFIN, W. S. 2005. Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiol Aging*, 26, 349-54.
- NAGATSU, T., MOGI, M., ICHINOSE, H. & TOGARI, A. 2000. Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 277-90.
- NICKLAS, W. J., VYAS, I. & HEIKKILA, R. E. 1985. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci*, 36, 2503-8.
- ORR, C. F., ROWE, D. B., MIZUNO, Y., MORI, H. & HALLIDAY, G. M. 2005. A possible role for humoral immunity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Brain*, 128, 2665-74.
- OUCHI, Y., YOSHIKAWA, E., SEKINE, Y., FUTATSUBASHI, M., KANNO, T., OGUSU, T. & TORIZUKA, T. 2005. Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 57, 168-75.

- PAISAN-RUIZ, C., JAIN, S., EVANS, E. W., GILKS, W. P., SIMON, J., VAN DER BRUG, M., LOPEZ DE MUNAIN, A., APARICIO, S., GIL, A. M., KHAN, N., JOHNSON, J., MARTINEZ, J. R., NICHOLL, D., MARTI CARRERA, I., PENA, A. S., DE SILVA, R., LEES, A., MARTI-MASSO, J. F., PEREZ-TUR, J., WOOD, N. W. & SINGLETON, A. B. 2004. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*, 44, 595-600.
- PARKINSON, J. 2002. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 14, 223-36; discussion 222.
- PATT, S. & GERHARD, L. 1993. A Golgi study of human locus coeruleus in normal brains and in Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 19, 519-23.
- PEREZ, R. G., WAYMIRE, J. C., LIN, E., LIU, J. J., GUO, F. & ZIGMOND, M. J. 2002. A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci*, 22, 3090-9.
- PETROSKE, E., MEREDITH, G. E., CALLEN, S., TOTTERDELL, S. & LAU, Y. S. 2001. Mouse model of Parkinsonism: a comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/probenecid treatment. *Neuroscience*, 106, 589-601.
- PHINNEY, A. L., ANDRINGA, G., BOL, J. G., WOLTERS, E., VAN MUISWINKEL, F. L., VAN DAM, A. M. & DRUKARCH, B. 2006. Enhanced sensitivity of dopaminergic neurons to rotenone-induced toxicity with aging. *Parkinsonism Relat Disord*, 12, 228-38.
- POLYMEROPOULOS, M. H., LAVEDAN, C., LEROY, E., IDE, S. E., DEHEJIA, A., DUTRA, A., PIKE, B., ROOT, H., RUBENSTEIN, J., BOYER, R., STENROOS, E. S., CHANDRASEKHARAPPA, S., ATHANASSIADOU, A., PAPAPETROPOULOS, T., JOHNSON, W. G., LAZZARINI, A. M., DUVOISIN, R. C., DI IORIO, G., GOLBE, L. I. & NUSSBAUM, R. L. 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276, 2045-7.
- POPESCU, B. O., TOESCU, E. C., POPESCU, L. M., BAJENARU, O., MURESANU, D. F., SCHULTZBERG, M. & BOGDANOVIC, N. 2009. Blood-brain barrier alterations in ageing and dementia. *J Neurol Sci*, 283, 99-106.
- QIN, X. Y., ZHANG, S. P., CAO, C., LOH, Y. P. & CHENG, Y. 2016. Aberrations in Peripheral Inflammatory Cytokine Levels in Parkinson Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurol*, 73, 1316-1324.
- RAMSAY, R. R., SALACH, J. I. & SINGER, T. P. 1986. Uptake of the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) by mitochondria and its relation to the inhibition of the mitochondrial oxidation of NAD<sup>+</sup>-linked substrates by MPP+. *Biochem Biophys Res Commun*, 134, 743-8.
- RASMUSSEN, M. K., MESTRE, H. & NEDERGAARD, M. 2018. The glymphatic pathway in neurological disorders. *Lancet Neurol*, 17, 1016-1024.
- RAUSCHENBERGER, L., BEHNKE, J., GROTEMEYER, A., KNORR, S., VOLKMANN, J. & IP, C. W. 2022. Age-dependent neurodegeneration and neuroinflammation in a genetic A30P/A53T double-mutated alpha-synuclein mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 171, 105798.
- RAWJI, K. S., MISHRA, M. K., MICHAELS, N. J., RIVEST, S., STYS, P. K. & YONG, V. W. 2016. Immunosenscence of microglia and macrophages: impact on the ageing central nervous system. *Brain*, 139, 653-61.

- REYNOLDS, A. D., BANERJEE, R., LIU, J., GENDELMAN, H. E. & MOSLEY, R. L. 2007. Neuroprotective activities of CD4+CD25+ regulatory T cells in an animal model of Parkinson's disease. *J Leukoc Biol*, 82, 1083-94.
- REYNOLDS, A. D., GLANZER, J. G., KADIU, I., RICARDO-DUKELOW, M., CHAUDHURI, A., CIBOROWSKI, P., CERNY, R., GELMAN, B., THOMAS, M. P., MOSLEY, R. L. & GENDELMAN, H. E. 2008. Nitrated alpha-synuclein-activated microglial profiling for Parkinson's disease. *J Neurochem*, 104, 1504-25.
- REYNOLDS, A. D., STONE, D. K., HUTTER, J. A., BENNER, E. J., MOSLEY, R. L. & GENDELMAN, H. E. 2010. Regulatory T cells attenuate Th17 cell-mediated nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in a model of Parkinson's disease. *J Immunol*, 184, 2261-71.
- REYNOLDS, A. D., STONE, D. K., MOSLEY, R. L. & GENDELMAN, H. E. 2009. Nitrated {alpha}-synuclein-induced alterations in microglial immunity are regulated by CD4+ T cell subsets. *J Immunol*, 182, 4137-49.
- RICHFIELD, E. K., THIRUCHELVAM, M. J., CORY-SLECHTA, D. A., WUERTZER, C., GAINETDINOV, R. R., CARON, M. G., DI MONTE, D. A. & FEDEROFF, H. J. 2002. Behavioral and neurochemical effects of wild-type and mutated human alpha-synuclein in transgenic mice. *Exp Neurol*, 175, 35-48.
- ROUSSELET, E., JOUBERT, C., CALLEBERT, J., PARAIN, K., TREMBLAY, L., ORIEUX, G., LAUNAY, J. M., COHEN-SALMON, C. & HIRSCH, E. C. 2003. Behavioral changes are not directly related to striatal monoamine levels, number of nigral neurons, or dose of parkinsonian toxin MPTP in mice. *Neurobiol Dis*, 14, 218-28.
- ROZAS, G., GUERRA, M. J. & LABANDEIRA-GARCIA, J. L. 1997. An automated rotarod method for quantitative drug-free evaluation of overall motor deficits in rat models of parkinsonism. *Brain Res Brain Res Protoc*, 2, 75-84.
- ROZAS, G. & LABANDEIRA GARCIA, J. L. 1997. Drug-free evaluation of rat models of parkinsonism and nigral grafts using a new automated rotarod test. *Brain Res*, 749, 188-99.
- ROZAS, G., LOPEZ-MARTIN, E., GUERRA, M. J. & LABANDEIRA-GARCIA, J. L. 1998. The overall rod performance test in the MPTP-treated-mouse model of Parkinsonism. *J Neurosci Methods*, 83, 165-75.
- SAMII, A., ETMINAN, M., WIENS, M. O. & JAFARI, S. 2009. NSAID use and the risk of Parkinson's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Drugs Aging*, 26, 769-79.
- SAUNDERS, J. A., ESTES, K. A., KOSLOSKI, L. M., ALLEN, H. E., DEMPSEY, K. M., TORRES-RUSSOTTO, D. R., MEZA, J. L., SANTAMARIA, P. M., BERTONI, J. M., MURMAN, D. L., ALI, H. H., STANDAERT, D. G., MOSLEY, R. L. & GENDELMAN, H. E. 2012. CD4+ regulatory and effector/memory T cell subsets profile motor dysfunction in Parkinson's disease. *J Neuroimmune Pharmacol*, 7, 927-38.
- SCHALLERT, T., FLEMING, S. M., LEASURE, J. L., TILLERSON, J. L. & BLAND, S. T. 2000. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology*, 39, 777-87.
- SCHMIDT, N. & FERGER, B. 2001. Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*, 108, 1263-82.

- SCHOBER, A. 2004. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res*, 318, 215-24.
- SCHRAG, A. & SCHOTT, J. M. 2006. Epidemiological, clinical, and genetic characteristics of early-onset parkinsonism. *Lancet Neurol*, 5, 355-63.
- SHALASH, A., SALAMA, M., MAKAR, M., ROUSHDY, T., ELRASSAS, H. H., MOHAMED, W., EL-BALKIMY, M. & ABOU DONIA, M. 2017. Elevated Serum alpha-Synuclein Autoantibodies in Patients with Parkinson's Disease Relative to Alzheimer's Disease and Controls. *Front Neurol*, 8, 720.
- SHAVALI, S., COMBS, C. K. & EBADI, M. 2006. Reactive macrophages increase oxidative stress and alpha-synuclein nitration during death of dopaminergic neuronal cells in co-culture: relevance to Parkinson's disease. *Neurochem Res*, 31, 85-94.
- SHENG, J. G., MRAK, R. E. & GRIFFIN, W. S. 1998. Enlarged and phagocytic, but not primed, interleukin-1 alpha-immunoreactive microglia increase with age in normal human brain. *Acta Neuropathol*, 95, 229-34.
- SONG, D. D. & HABER, S. N. 2000. Striatal responses to partial dopaminergic lesion: evidence for compensatory sprouting. *J Neurosci*, 20, 5102-14.
- SONG, S., JIANG, L., OYARZABAL, E. A., WILSON, B., LI, Z., SHIH, Y. I., WANG, Q. & HONG, J. S. 2019. Loss of Brain Norepinephrine Elicits Neuroinflammation-Mediated Oxidative Injury and Selective Caudo-Rostral Neurodegeneration. *Mol Neurobiol*, 56, 2653-2669.
- SPILLANTINI, M. G., CROWTHER, R. A., JAKES, R., CAIRNS, N. J., LANTOS, P. L. & GOEDERT, M. 1998a. Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci Lett*, 251, 205-8.
- SPILLANTINI, M. G., CROWTHER, R. A., JAKES, R., HASEGAWA, M. & GOEDERT, M. 1998b. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6469-73.
- SPILLANTINI, M. G., SCHMIDT, M. L., LEE, V. M., TROJANOWSKI, J. Q., JAKES, R. & GOEDERT, M. 1997. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388, 839-40.
- SRIRAM, K., MATHESON, J. M., BENKOVIC, S. A., MILLER, D. B., LUSTER, M. I. & O'CALLAGHAN, J. P. 2002. Mice deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: implications for Parkinson's disease. *FASEB J*, 16, 1474-6.
- STEFANOVA, N., REINDL, M., NEUMANN, M., KAHLE, P. J., POEWE, W. & WENNING, G. K. 2007. Microglial activation mediates neurodegeneration related to oligodendroglial alpha-synucleinopathy: implications for multiple system atrophy. *Mov Disord*, 22, 2196-203.
- STEVENS, C. H., ROWE, D., MOREL-KOPP, M. C., ORR, C., RUSSELL, T., RANOLA, M., WARD, C. & HALLIDAY, G. M. 2012. Reduced T helper and B lymphocytes in Parkinson's disease. *J Neuroimmunol*, 252, 95-9.
- STICHEL, C. C. & LUEBBERT, H. 2007. Inflammatory processes in the aging mouse brain: participation of dendritic cells and T-cells. *Neurobiol Aging*, 28, 1507-21.
- STONE, D. K., REYNOLDS, A. D., MOSLEY, R. L. & GENDELMAN, H. E. 2009. Innate and adaptive immunity for the pathobiology of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*, 11, 2151-66.

- STORELLI, E., CASSINA, N., RASINI, E., MARINO, F. & COSENTINO, M. 2019. Do Th17 Lymphocytes and IL-17 Contribute to Parkinson's Disease? A Systematic Review of Available Evidence. *Front Neurol*, 10, 13.
- SU, X., FEDEROFF, H. J. & MAGUIRE-ZEISS, K. A. 2009. Mutant alpha-synuclein overexpression mediates early proinflammatory activity. *Neurotox Res*, 16, 238-54.
- SU, X., MAGUIRE-ZEISS, K. A., GIULIANO, R., PRIFTI, L., VENKATESH, K. & FEDEROFF, H. J. 2008. Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 29, 1690-701.
- SUGAMA, S., YANG, L., CHO, B. P., DEGIORGIO, L. A., LORENZL, S., ALBERS, D. S., BEAL, M. F., VOLPE, B. T. & JOH, T. H. 2003. Age-related microglial activation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurodegeneration in C57BL/6 mice. *Brain Res*, 964, 288-94.
- SULZER, D., ALCALAY, R. N., GARRETTI, F., COTE, L., KANTER, E., AGIN-LIEBES, J., LIONG, C., MCMURTREY, C., HILDEBRAND, W. H., MAO, X., DAWSON, V. L., DAWSON, T. M., OSEROFF, C., PHAM, J., SIDNEY, J., DILLON, M. B., CARPENTER, C., WEISKOPF, D., PHILLIPS, E., MALLAL, S., PETERS, B., FRAZIER, A., LINDESTAM ARLEHAMN, C. S. & SETTE, A. 2017. T cells from patients with Parkinson's disease recognize alpha-synuclein peptides. *Nature*, 546, 656-661.
- TANNER, C. M., KAMEL, F., ROSS, G. W., HOPPIN, J. A., GOLDMAN, S. M., KORELL, M., MARRAS, C., BHUDHIKANOK, G. S., KASTEN, M., CHADE, A. R., COMYNS, K., RICHARDS, M. B., MENG, C., PRIESTLEY, B., FERNANDEZ, H. H., CAMBI, F., UMBACH, D. M., BLAIR, A., SANDLER, D. P. & LANGSTON, J. W. 2011. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect*, 119, 866-72.
- THEODORE, S., CAO, S., MCLEAN, P. J. & STANDAERT, D. G. 2008. Targeted overexpression of human alpha-synuclein triggers microglial activation and an adaptive immune response in a mouse model of Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 67, 1149-58.
- THIRUCHELVAM, M. J., POWERS, J. M., CORY-SLECHTA, D. A. & RICHFIELD, E. K. 2004. Risk factors for dopaminergic neuron loss in human alpha-synuclein transgenic mice. *Eur J Neurosci*, 19, 845-54.
- TILLERSON, J. L., CAUDLE, W. M., REVERON, M. E. & MILLER, G. W. 2002. Detection of behavioral impairments correlated to neurochemical deficits in mice treated with moderate doses of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Exp Neurol*, 178, 80-90.
- TILLERSON, J. L., COHEN, A. D., PHILHOWER, J., MILLER, G. W., ZIGMOND, M. J. & SCHALLERT, T. 2001. Forced limb-use effects on the behavioral and neurochemical effects of 6-hydroxydopamine. *J Neurosci*, 21, 4427-35.
- UVERSKY, V. N. 2007. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J Neurochem*, 103, 17-37.
- VALENTE, E. M., ABOU-SLEIMAN, P. M., CAPUTO, V., MUQIT, M. M., HARVEY, K., GISPERS, S., ALI, Z., DEL TURCO, D., BENTIVOGLIO, A. R., HEALY, D. G., ALBANESE, A., NUSSBAUM, R., GONZALEZ-MALDONADO, R., DELLER, T., SALVI, S., CORTELLI, P., GILKS, W. P., LATCHMAN, D. S., HARVEY, R. J., DALLAPICCOLA, B., AUBURGER, G. & WOOD, N. W.



2004. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*, 304, 1158-60.
- VAN DER PUTTEN, H., WIEDERHOLD, K. H., PROBST, A., BARBIERI, S., MISTL, C., DANNER, S., KAUFFMANN, S., HOFELE, K., SPOOREN, W. P., RUEGG, M. A., LIN, S., CARONI, P., SOMMER, B., TOLNAY, M. & BILBE, G. 2000. Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein. *J Neurosci*, 20, 6021-9.
- VARGAS, D. L. & TYOR, W. R. 2017. Update on disease-modifying therapies for multiple sclerosis. *J Investig Med*, 65, 883-891.
- VILA, M., VUKOSAVIC, S., JACKSON-LEWIS, V., NEYSTAT, M., JAKOWEC, M. & PRZEDBORSKI, S. 2000. Alpha-synuclein up-regulation in substantia nigra dopaminergic neurons following administration of the parkinsonian toxin MPTP. *J Neurochem*, 74, 721-9.
- VON EULER CHELPIN, M. & VORUP-JENSEN, T. 2017. Targets and Mechanisms in Prevention of Parkinson's Disease through Immunomodulatory Treatments. *Scand J Immunol*, 85, 321-330.
- WEINREB, P. H., ZHEN, W., POON, A. W., CONWAY, K. A. & LANSBURY, P. T., JR. 1996. NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry*, 35, 13709-15.
- WELLER, R. O., ENGELHARDT, B. & PHILLIPS, M. J. 1996. Lymphocyte targeting of the central nervous system: a review of afferent and efferent CNS-immune pathways. *Brain Pathol*, 6, 275-88.
- WERSINGER, C. & SIDHU, A. 2003. Attenuation of dopamine transporter activity by alpha-synuclein. *Neurosci Lett*, 340, 189-92.
- WIN, S. J., KUHLE, A. A., SPARWASSER, T., HUNIG, T. & KAMRADT, T. 2016. In vivo activation of Treg cells with a CD28 superagonist prevents and ameliorates chronic destructive arthritis in mice. *Eur J Immunol*, 46, 1193-202.
- WONG, D., DOROVINI-ZIS, K. & VINCENT, S. R. 2004. Cytokines, nitric oxide, and cGMP modulate the permeability of an in vitro model of the human blood-brain barrier. *Exp Neurol*, 190, 446-55.
- WONG, D., PRAMEYA, R. & DOROVINI-ZIS, K. 1999. In vitro adhesion and migration of T lymphocytes across monolayers of human brain microvessel endothelial cells: regulation by ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and PECAM-1. *J Neuropathol Exp Neurol*, 58, 138-52.
- YAN, J., ZHANG, P., JIAO, F., WANG, Q., HE, F., ZHANG, Q., ZHANG, Z., LV, Z., PENG, X., CAI, H. & TIAN, B. 2017. Quantitative proteomics in A30P\*A53T alpha-synuclein transgenic mice reveals upregulation of Sel1l. *PLoS One*, 12, e0182092.
- ZAROW, C., LYNESS, S. A., MORTIMER, J. A. & CHUI, H. C. 2003. Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. *Arch Neurol*, 60, 337-41.
- ZARRANZ, J. J., ALEGRE, J., GOMEZ-ESTEBAN, J. C., LEZCANO, E., ROS, R., AMPUERO, I., VIDAL, L., HOENICKA, J., RODRIGUEZ, O., ATARES, B., LLORENS, V., GOMEZ TORTOSA, E., DEL SER, T., MUNOZ, D. G. & DE YEBENES, J. G. 2004. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol*, 55, 164-73.
- ZECCA, L., WILMS, H., GEICK, S., CLAASEN, J. H., BRANDENBURG, L. O., HOLZKNECHT, C., PANIZZA, M. L., ZUCCA, F. A., DEUSCHL, G.,

SIEVERS, J. & LUCIUS, R. 2008. Human neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat substantia nigra: implications for Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*, 116, 47-55.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
<b>3-MT</b>	3-Methoxytyramin
<b>5-HIAA</b>	5-Hydroxyindolylessigsäure
<b>5-HT</b>	Serotonin
<b>6-OHDA</b>	6-Hydroxydopamin
<b><math>\alpha</math>-Syn</b>	$\alpha$ -Synuklein
<b>A30P</b>	Aminosäuren Austausch von Alanin zu Prolin an Position 30
<b>A53T</b>	Aminosäuren Austausch von Alanin zu Threonin an Position 53
<b>AAV</b>	Adeno-assoziierte Viren
<b>Ak</b>	Antikörper
<b>APZ</b>	Antigen-präsentierende Zellen
<b>Aqua dest.</b>	Destilliertes Wasser
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>CBLM</b>	Cerebellum
<b>CD28SA</b>	CD28-Superagonist
<b>CE</b>	Fehlerkoeffizient ("Coefficient of Error")
<b>D1</b>	Dopamin Rezeptor 1
<b>D2</b>	Dopamin Rezeptor 2
<b>DA</b>	Dopamin
<b>DAB</b>	3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
<b>DOPAC</b>	3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure
<b>E46K</b>	Aminosäuren Austausch von Guanin zu Adenin an Position 188
<b>ECD</b>	Elektrochemischer Detektor

<b>GABA</b>	Gamma-Aminobuttersäure
<b>GPe</b>	Globus pallidus externus
<b>GPI</b>	Globus pallidus internus
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Wasserstoffperoxid
<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	Phosphorsäure
<b>HLA-DR</b>	Humanes Leukozytenantigen, Isotyp DR
<b>HPLC</b>	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
<b>HVA</b>	Homovanillinsäure
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferon $\gamma$
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleukin-1 $\beta$
<b>IS</b>	Immunsystem
<b>KCl</b>	Kaliumchlorid
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Kaliumdihydrogenphosphat
<b>L-DOPA</b>	L-Dihydroxyphenylalanin
<b>LBs</b>	Lewy Körperchen "Lewy bodies"
<b>MC</b>	Motorcortex
<b>mo</b>	Monate („months")
<b>MP</b>	Morbus Parkinson
<b>MPTP</b>	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridinium
<b>MPP<sup>+</sup></b>	1-Methyl-4-phenylpyridinium Ion
<b>NA</b>	Noradrenalin
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Dinatriumhydrogencarbonat
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NGS</b>	Normales Ziegen Serum („Normal Goat Serum")
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>OT</b>	Objektträger
<b>PBS</b>	Phosphat gepufferte Salzlösung („phosphate buffered saline")
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd

<b>PHOX</b>	Phagozytenoxidase
<b>RNS</b>	Reaktive Stickstoffspezies
<b>ROS</b>	Reaktive Sauerstoffspezies
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SEM</b>	Standardfehler („Standard Error of Mean“)
<b>SN</b>	Substantia nigra
<b>SNCA-Gen</b>	$\alpha$ -Synuklein kodierendes Gen
<b>SNpc</b>	Substantia nigra pars compacta
<b>SNpr</b>	Substantia nigra pars reticulata
<b>STN</b>	Subthalamischer Nucleus
<b>TH</b>	Tyrosin-Hydroxylase
<b>Tg</b>	Transgen
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
<b>Tr.</b>	Tropfen
<b>T<sub>reg</sub></b>	Regulatorische T Zellen
<b>Wt</b>	Wildtyp
<b>VIM</b>	Ventraler intermediärer thalamischer Nucleus
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem

---

## 8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

**Abbildung 1:** Basalganglienschleife bei nigrostriataler Neurodegeneration beim MP. Durch den striatalen DA-Mangel kommt es sowohl über den direkten Weg als auch über den indirekten Weg zu einer verstärkten Inhibition der thalamischen Kerne durch den GPi und die SNpr, was schließlich in einer Suppression des MC und zur akinetisch-rigididen Symptomatik beim MP führt. Die grünen Neurone wirken durch die Freisetzung ihrer Neurotransmitter exzitatorisch (DA über D1, Glutamat), während die roten Neurone inhibitorisch auf ihr Zielgebiet wirken (DA über D2, GABA, Enkephalin). Eine erniedrigte Aktivität der Neurone wird durch die erhöhte Transparenz dargestellt. Modifiziert nach Lang et al. (Mosley et al., 2012, Lang and Lozano, 1998). Die Abbildung wurde mithilfe von BioRender.com erstellt. ....3

<b>Abbildung 2:</b> Modell des perpetuierenden Kreislaufs aus Neurodegeneration und Neuroinflammation beim MP. Modifiziert nach Mosley et al. (Mosley et al., 2012). Die Abbildung wurde mithilfe von BioRender.com erstellt. ....	15
<b>Abbildung 3:</b> Repräsentative Szenen aus Videoaufnahmen während dem Zylinder Test. Ein freies Aufbäumen ohne Berührung der Vorderpfoten an der Wand (oben) und ein Aufbäumen mit Berührung beider Vorderpfoten an der Wand (unten). ....	24
<b>Abbildung 4:</b> Serie (1/5) aus 7 TH- und Nissl-gefärbten 40 µm dicken Kryoschnitten der SN (von rostral/oben nach kaudal/unten) mit Abständen von jeweils 160 µm zueinander. Die linke Hemisphäre ist mit einem sichtbaren kleinen Loch im linken Hirnstamm markiert. ....	31
<b>Abbildung 5:</b> Repräsentative Bilder eines Rasters innerhalb der SNpc schichtweise von der Obergrenze (oben links) bis zur Untergrenze (unten rechts) des Schnittes. Mit einem roten Kreuz markierte Zellen berühren entweder die roten Linien des Rasters oder sind an der Obergrenze des Schnittes angeschnitten und wurden dementsprechend nicht gezählt. Zellen, die mit einer blauen Raute markiert sind, wurden als Nissl-Zellen gezählt. Mit einer gelben Raute markierte Zellen wurden als TH-positive Zellen gezählt. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10µm. ....	34
<b>Abbildung 6:</b> Auf der linken Seite sind repräsentative Bilder der TH-Färbung des Striatums (rostral, mittig, okzipital von oben nach unten), auf der rechten Seite die manuellen Umrandungen (gelb) des Striatums (rostral, mittig, okzipital von oben nach unten) in der NIH ImageJ Software zur Messung der OD zu sehen. ....	37
<b>Abbildung 7:</b> Altersabhängige Messung (Altersangabe in Monaten (mo)) der zurückgelegten Laufstrecke während einer 30-minütigen „Open Field“-Testung von wt (grau: 2-3 mo wt $n=15$ ; 7-8 mo wt $n=17$ ; 11-12 mo wt $n=9$ ; 16-17 mo wt $n=12$ ) und tg Mäusen (rot: 2-3 mo tg $n=8$ , 7-8 mo tg $n=22$ , 11-12 mo tg $n=16$ , 16-17 mo tg $n=18$ ). Die Daten sind als Mittelwerte $\pm$ SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem einfachen ANOVA-Test gefolgt von einem Posthoc-Tukey-Test. ....	43
<b>Abbildung 8:</b> Altersabhängige Messung der Latenz bis zum Herunterfallen während der Rotarod-Testung bei wt Mäusen (grau: 2-3 mo wt $n=15$ ; 7-8 mo wt $n=17$ ; 11-12 mo wt $n=9$ ; 16-17 mo wt $n=10$ ) und tg Mäusen (rot: 2-3 mo tg $n=12$ , 7-8 mo tg $n=16$ , 11-12 mo tg $n=15$ , 16-17 mo tg $n=20$ ). Die Daten sind als Mittelwerte $\pm$ SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem einfachen ANOVA-Test gefolgt von einem Posthoc-Tukey-Test. ....	44
<b>Abbildung 9:</b> Altersabhängige Bestimmung der Gesamtzahl des Aufbäumens während des 10-minütigen Zylinder-Tests (grau: 2-3 mo wt $n=15$ ; 7-8 mo wt $n=16$ ; 11-12 mo wt $n=8$ ; 16-17 mo wt $n=10$ ; rot: 2-3 mo tg $n=12$ , 7-8 mo tg $n=16$ , 11-12 mo tg $n=17$ , 16-17 mo tg $n=20$ ). Die Daten sind als Mittelwerte $\pm$ SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem einfachen ANOVA-Test gefolgt von einem Posthoc-Tukey-Test. ....	45
<b>Abbildung 10: (a)</b> Repräsentative Darstellung von TH- und Nissl-gefärbtem SN-Gewebe für jede tg und wt Altersgruppe. Die Kästchen unten rechts im Bild stellen eine Vergrößerung der Zellen aus einem Ausschnitt der jeweiligen SNpc dar. Der Balken	

entspricht einer Länge von 50  $\mu\text{m}$ . **(b)** Stereologisch quantifizierte TH-positive Zellen und **(c)** Nissl-positive Neurone in der SNpc, jeweils von wt (grau: 2-3 mo wt  $n=6$ ; 7-8 mo wt  $n=6$ ; 11-12 mo wt  $n=6$ ; 16-17 mo wt  $n=6$ ) und tg Mäusen (rot: 2-3 mo tg  $n=6$ , 7-8 mo tg  $n=6$ , 11-12 mo tg  $n=6$ , 16-17 mo tg  $n=6$ ). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem einfachen ANOVA-Test gefolgt von einem Posthoc-Tukey-Test. ....47

**Abbildung 11:** **(a)** Repräsentative Darstellung von TH-gefärbtem striatalem Gewebe für jede tg und wt Altersgruppe. Der Balken entspricht einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ . **(b)** Altersabhängige Messung der OD von TH-gefärbtem striatalem Gewebe von wt (grau: 2-3 mo wt  $n=8$ ; 7-8 mo wt  $n=8$ ; 11-12 mo wt  $n=6$ ; 16-17 mo wt  $n=7$ ) und tg Mäusen (rot: 2-3 mo tg  $n=7$ , 7-8 mo tg  $n=8$ , 11-12 mo tg  $n=6$ , 16-17 mo tg  $n=10$ ). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem einfachen ANOVA-Test gefolgt von einem Posthoc-Tukey-Test. ....49

**Abbildung 12:** HPLC-Analyse der striatalen Monoamin-Level. **(a-c)** Striatale Level von DA und seiner Metabolite HVA und DOPAC in wt Mäusen (grau: 2-3 mo wt  $n=11$ ; 16-17 mo wt  $n=8$ ) und tg Mäusen (rot: 2-3 mo wt  $n=8$ ; 16-17 mo wt  $n=9$ ). **(d-f)** Striatale Level von NA, 5-HT und dem serotoninergen Metaboliten 5-HIAA in wt Mäusen (grau: 2-3 mo wt  $n=11$ ; 16-17 mo wt  $n=8$ ) und tg Mäusen (rot: 2-3 mo wt  $n=8$ ; 16-17 mo wt  $n=9$ ). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem einfachen ANOVA-Test gefolgt von einem Posthoc-Tukey-Test. ....50

**Abbildung 13:** **(a)** Repräsentative Darstellung von CD4-gefärbtem SN-Gewebe für jede tg und wt Altersgruppe. Die Pfeile markieren jeweils die CD4-positiv gefärbten Zellen und die Kästchen umranden die entsprechende Zelle, die in der Vergrößerung (unten rechts im Bild jeweils) dargestellt ist. Der Balken entspricht einer Länge von 50  $\mu\text{m}$ . **(b)** Anzahl CD4-positiver Zellen in der SN von wt (grau: 2-3 mo wt  $n=8$ ; 7-8 mo wt  $n=8$ ; 11-12 mo wt  $n=7$ ; 16-17 mo wt  $n=7$ ) und tg Tieren (rot: 2-3 mo tg  $n=6$ , 7-8 mo tg  $n=8$ , 11-12 mo tg  $n=7$ , 16-17 mo tg  $n=10$ ). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem einfachen ANOVA-Test gefolgt von einem Posthoc-Tukey-Test. ....51

**Abbildung 14:** **(a)** Repräsentative Darstellung von CD4-gefärbtem striatalem Gewebe für jede tg und wt Altersgruppe. Die Pfeile markieren jeweils die CD4-positiv gefärbten Zellen und die Kästchen umranden die entsprechende Zelle, die in der Vergrößerung (unten rechts im Bild jeweils) dargestellt ist. Der Balken entspricht einer Länge von 50  $\mu\text{m}$ . **(b)** Anzahl CD4-positiver Zellen im Striatum von wt (grau: 2-3 mo wt  $n=8$ ; 7-8 mo wt  $n=7$ ; 11-12 mo wt  $n=6$ ; 16-17 mo wt  $n=7$ ) und tg Tieren (rot: 2-3 mo tg  $n=7$ , 7-8 mo tg  $n=8$ , 11-12 mo tg  $n=6$ , 16-17 mo tg  $n=10$ ). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem einfachen ANOVA-Test gefolgt von einem Posthoc-Tukey-Test. ....53

**Abbildung 15:** **(a)** Repräsentative Darstellung von CD8-gefärbtem SN-Gewebe für jede tg und wt Altersgruppe. Die Pfeile markieren jeweils die CD8-positiv gefärbten Zellen und die Kästchen umranden die entsprechende Zelle, die in der Vergrößerung (unten rechts im Bild jeweils) dargestellt ist. Der Balken entspricht einer Länge von 50  $\mu\text{m}$ . **(b)** Anzahl CD8-positiver Zellen in der SN von wt (grau: 2-3 mo wt  $n=8$ ; 7-8 mo wt  $n=8$ ; 11-12 mo wt  $n=7$ ; 16-17 mo wt  $n=7$ ) und tg Tieren (rot: 2-3 mo tg  $n=6$ , 7-8

mo tg  $n=7$ , 11-12 mo tg  $n=7$ , 16-17 mo tg  $n=10$ ). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem einfachen ANOVA-Test gefolgt von einem Posthoc-Tukey-Test. ....54

**Abbildung 16: (a)** Repräsentative Darstellung von CD8-gefärbtem striatalem Gewebe für jede tg und wt Altersgruppe. Die Pfeile markieren jeweils die CD8-positiv gefärbten Zellen und die Kästchen umranden die entsprechende Zelle, die in der Vergrößerung (unten rechts im Bild jeweils) dargestellt ist. Der Balken entspricht einer Länge von 50  $\mu\text{m}$ . **(b)** Anzahl CD8-positiver Zellen im Striatum von wt (grau: 2-3 mo wt  $n=8$ ; 7-8 mo wt  $n=7$ ; 11-12 mo wt  $n=6$ ; 16-17 mo wt  $n=7$ ) und tg Tieren (rot: 2-3 mo tg  $n=7$ , 7-8 mo tg  $n=8$ , 11-12 mo tg  $n=6$ , 16-17 mo tg  $n=10$ ). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem einfachen ANOVA-Test gefolgt von einem Posthoc-Tukey-Test. ....55

**Abbildung 17: (a)** Repräsentative Darstellung von CD45/B220-gefärbtem SN-Gewebe für jede tg und wt Altersgruppe. Die Pfeile markieren jeweils die CD45/B220-positiv gefärbten Zellen und die Kästchen umranden die entsprechende Zelle, die in der Vergrößerung (unten rechts im Bild jeweils) dargestellt ist. Der Balken entspricht einer Länge von 50  $\mu\text{m}$ . **(b)** Anzahl CD45/B220-positiver Zellen in der SN von wt (grau: 2-3 mo wt  $n=8$ ; 7-8 mo wt  $n=8$ ; 11-12 mo wt  $n=6$ ; 16-17 mo wt  $n=7$ ) und tg Mäusen (rot: 2-3 mo tg  $n=6$ , 7-8 mo tg  $n=8$ , 11-12 mo tg  $n=7$ , 16-17 mo tg  $n=10$ ). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem einfachen ANOVA-Test gefolgt von einem Posthoc-Tukey-Test. ....57

**Abbildung 18: (a)** Repräsentative Darstellung von CD45/B220-gefärbtem striatalem Gewebe für jede tg und wt Altersgruppe. Die Pfeile markieren jeweils die CD45/B220-positiv gefärbten Zellen und die Kästchen umranden die entsprechende Zelle, die in der Vergrößerung (unten rechts im Bild jeweils) dargestellt ist. Der Balken entspricht einer Länge von 50  $\mu\text{m}$ . **(b)** Anzahl CD45/B220-positiver Zellen im Striatum von wt (grau: 2-3 mo wt  $n=8$ ; 7-8 mo wt  $n=8$ ; 11-12 mo wt  $n=6$ ; 16-17 mo wt  $n=6$ ) und tg Mäusen (rot: 2-3 mo tg  $n=7$ , 7-8 mo tg  $n=8$ , 11-12 mo tg  $n=6$ , 16-17 mo tg  $n=10$ ). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem Kruskal-Wallis Test gefolgt von einem Dunn's Test. ....58

**Abbildung 19: (a)** Repräsentative Darstellung von CD11b-gefärbtem SN-Gewebe für jede tg und wt Altersgruppe. Die Pfeile markieren jeweils die CD11b-positiv gefärbten Zellen und die Kästchen umranden die entsprechende Zelle, die in der Vergrößerung (unten rechts im Bild jeweils) dargestellt ist. Der Balken entspricht einer Länge von 25  $\mu\text{m}$ . **(b)** Anzahl CD11b-positiver Zellen in der SN von wt (grau: 2-3 mo wt  $n=8$ ; 7-8 mo wt  $n=8$ ; 11-12 mo wt  $n=7$ ; 16-17 mo wt  $n=7$ ) und tg Mäusen (rot: 2-3 mo tg  $n=7$ , 7-8 mo tg  $n=8$ , 11-12 mo tg  $n=7$ , 16-17 mo tg  $n=10$ ). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem einfachen ANOVA-Test gefolgt von einem Posthoc-Tukey-Test. ....60

**Abbildung 20: (a)** Repräsentative Darstellung von CD11b-gefärbtem striatalem Gewebe für jede tg und wt Altersgruppe. Die Pfeile markieren jeweils die CD11b-positiv gefärbten Zellen und die Kästchen umranden die entsprechende Zelle, die in der Vergrößerung (unten rechts im Bild jeweils) dargestellt ist. Der Balken entspricht einer Länge von 25  $\mu\text{m}$ . **(b)** Anzahl CD11b-positiver Zellen im Striatum von wt (grau: 2-3 mo wt  $n=8$ ; 7-8 mo wt  $n=8$ ; 11-12 mo wt  $n=7$ ; 16-17 mo wt  $n=7$ ) und tg Mäusen (rot: 2-3

mo tg  $n=7$ , 7-8 mo tg  $n=8$ , 11-12 mo tg  $n=6$ , 16-17 mo tg  $n=10$ ). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem einfachen ANOVA-Test gefolgt von einem Posthoc-Tukey-Test. ....62

**Tabelle 1:** Übersicht über die Immunhistochemie mit den durchgeführten Färbungen, der gefärbten Gehirnareale (SN oder Striatum) und der verwendeten Präparate mit unterschiedlicher Fixierung und Schnittdicke.....27

**Tabelle 2:** Übersicht über die gefärbten Gehirnareale der 10  $\mu$ m dünnen, unfixierten Kryoschnitte in Anlehnung an entsprechende Abbildungen aus dem Maushirnatlas von Paxinos und Franklin (2001). Die durchgeführten Färbungen sind zur Übersicht nochmals dargestellt.....29

**Tabelle 3:** Übersicht über die Unterschiede in der Durchführung der TH-, CD4- und CD8- und CD45/B220-Färbungen der 10  $\mu$ m unfixierten Gefrierschnitte. ....38

**Tabelle 4:** Übersicht über die mit NIH Image J gemessenen Flächen der 3 Areale des Striatums und der SN (Pars compacta, lateralis und reticularis).....39



## 9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Charakterisierung der Krankheitsprogression im genetischen hm<sup>2</sup>α-SYN-39 Mausmodell des Morbus Parkinson“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, den 18.08.2022

## Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “Characterization of disease progression in the genetic hm<sup>2</sup>α-SYN-39 mouse model of Parkinson’s disease” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, 18.08. 2022

## 10 Lebenslauf

### **Persönliche Daten**

Name Jennifer Kim Behnke

### **Schulbildung**

06/ 2014 Abitur am Graf-Münster-Gymnasium, Bayreuth

### **Studium**

04/ 2015 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Julius-Maximilians Universität, Würzburg

03/ 2017 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

02/ 2019 Promotionsbeginn in der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Würzburg bei Prof. Dr. med. Ip

04/ 2021 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

05/ 2021 – 04/ 2022 Praktisches Jahr

05/ 2022 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### **Wissenschaftliche Publikation:**

L Rauschenberger\*, **J Behnke\***, A Grotemeyer, S Knorr, J Volkmann, CW Ip. Age-dependent neurodegeneration and neuroinflammation in a genetic A30P/A53T double-mutated  $\alpha$ -synuclein mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2022

\* *gleichwertige Beteiligung*

Würzburg, den 18.08.2022

## Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bei all denjenigen bedanken, ohne deren Unterstützung das Gelingen dieser Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre. An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Chi Wang Ip für die Themenfindung, die herausragende Betreuung und kompetente Unterstützung während der mehrjährigen Arbeit. Die gemeinsame Planung und die effizienten Besprechungen waren eine enorme Hilfe und haben einen Großteil zur Umsetzung dieser Arbeit beigetragen. Sein professioneller Rat hat mir zudem in vielen Aspekten meiner Karriere weitergeholfen. Herzlichen Dank für alles.

Zudem gilt ein großer Dank unserem Klinikdirektor Prof. Dr. med. Jens Volkmann für die Ermöglichung und Betreuung dieser Doktorarbeit, sowie Prof. Dr. rer. nat. Manfred Lutz aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie und Prof. Dr. rer. nat. Jörg Wischhusen aus der Experimentellen Tumorummunologie für die Betreuung dieser Arbeit im Rahmen meines Promotionskomitees.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. med. Lisa Rauschenberger, die mir von Anfang bis Ende dieser Doktorarbeit zur Seite stand und immer ein offenes Ohr und wertvollen Rat für mich hatte. Durch das großartige Teamwork ging die Arbeit schnell voran und das Zusammenarbeiten mit ihr hat mir sehr viel Freude bereitet. Vielen Dank für alles.

Nicht zu vergessen ist die unverzichtbare Unterstützung aus dem Labor bei der praktischen Umsetzung dieser Arbeit, hierfür möchte ich vor allem Louisa Frieß, Veronika Senger und Heike Menzel danken. Vielen Dank auch an Dr. rer. nat. Susanne Knorr, Dr. med. Alexander Grottemeyer, Dr. med. Rhonda McFleder, an die gesamte Arbeitsgruppe von Prof. Ip und an Dr. rer. nat. Dennis Klein aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rudolf Martini für die professionelle Mithilfe und den guten Rat zu jeder Zeit.

Abschließend gebührt mein größter und herzlichster Dank meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich mit ihrer wertvollen Unterstützung stetig motivierten und diese Doktorarbeit grundsätzlich ermöglicht haben.