

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Die Parkinson-Krankheit

Die Parkinson-Krankheit (Parkinson's disease, PD) ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach dem Morbus Alzheimer (Schapira, 1999). Sie wurde um 1817 erstmals durch den Arzt James Parkinson in seiner Schrift „An Essay on the Shaking Palsy“ beschrieben, in der er die klinische Symptomatik dieser Bewegungsstörung bereits einer zentralen neurologischen Erkrankung zuordnete (Parkinson, 1817; Sian et al., 1999).

Im Gegensatz zur sekundären PD sind bei der primären Form die auslösenden Ursachen unbekannt, daher wird sie auch als idiopathisches Parkinson-Syndrom (IPS) bezeichnet (Gandhi und Wood, 2005). Das IPS ist eine Erkrankung, deren Prävalenz mit steigendem Alter zunimmt, 1,8% der über 65jährigen in Europa sind betroffen (de Rijk et al., 2000). Bei der stetig steigenden Lebenserwartung der Bevölkerung wird daher in Zukunft auch die Zahl der Patienten mit PD zunehmen.

Neuropathologisch ist die Degeneration dopaminergener Neurone in der Substantia nigra pars compacta, einer Basalganglienstruktur, das Hauptmerkmal der Erkrankung. Der hierdurch entstehende Mangel an Dopamin (DA) im Projektionsgebiet der Nervenfasern dieser Neurone, dem Striatum, führt zu vier Kardinalsymptomen: Bradykinesie, Rigor, Tremor und posturale Instabilität (Conley und Kirchner, 1999). Es sind jedoch noch weitere dopaminerge und nichtdopaminerge Gehirnregionen betroffen, und die Symptomatik beschränkt sich nicht nur auf das motorische System (Hirsch et al., 2003; Jellinger, 1991). Wird das IPS klinisch manifest, sind bereits ca. 70-80% der nigralen dopaminergen Neurone verloren, und die progressive Degeneration ist durch die bisher lediglich palliative Therapie nicht aufzuhalten (Blandini und Greenamyre, 1999; Schapira, 1999).

Die fortschreitende Aufklärung der Ätiopathogenese des IPS ist v.a. Erkenntnissen aus der Erforschung an Tiermodellen zu verdanken (Betarbet et al., 2002b).

2.2. Neuropathologie der Parkinson-Krankheit

2.2.1. Die Basalganglien als funktionelle Grundlage der Parkinson-Krankheit

2.2.1.1. Neuroanatomie und Physiologie der Basalganglien

Als Basalganglien wird ein System funktionell verbundener neuronaler Kerngebiete (Nuclei) zwischen Kortex (Großhirnrinde) und Thalamus im Bereich des Mittelhirnes bezeichnet, welches Regelkreise zur Kontrolle und Modifizierung motorischer, assoziativer und limbischer Informationen bildet (Joel und Weiner, 2000). Beim Primaten zählt zu den Basalganglien im engeren Sinne (anatomisch) der Nucleus (N.) caudatus (Teil des Großhirns) und der N. lentiformis. Der N. lentiformis besteht aus dem Putamen (Teil des Großhirns) und dem Globus pallidus (Teil des Zwischenhirns, GP), der sich in ein externes (GPe, gesamter GP des Nagers) und ein internes Segment (GPi, N. entopeduncularis des Nagers) unterteilt. N. caudatus und Putamen werden beim Primaten, nicht jedoch beim Nager, durch die Capsula interna (Projektionsbahn) getrennt. Sie bleiben jedoch über feine Streifen grauer Substanz verbunden und werden daher morphologisch als das dorsale Striatum zusammengefasst, welches auch funktionell einheitlich betrachtet wird. Das ventrale Striatum enthält den N. accumbens. Im weiteren Sinne (funktionell) gehören der N. subthalamicus (STN) und die Substantia nigra (SN), ein im Mittelhirn gelegenes Kerngebiet bestehend aus der Substantia nigra pars compacta (SNc), pars lateralis (SNl) und pars reticulata (SNr) zu den Basalganglien. Basierend auf der Ontogenese und Phylogenie werden von manchen Autoren weitere Strukturen, wie z.B. das Tuberculum olfactorium, zu den Basalganglien gezählt (Mink, 2003; Parent, 1986).

Der im limbischen System entstandene Bewegungsimpuls wird über den (prä)frontalen Assoziationskortex zum Kleinhirn und zu den Basalganglien weitergeleitet (Parent und Hazrati, 1995). Das Kleinhirn ist für die Feinabstimmung von Bewegungsabläufen zuständig, wogegen die Basalganglien Bewegungsimpulse verstärken oder unterdrücken. Beide Systeme laufen im Thalamus zusammen, von wo aus die Impulse an den motorischen Kortex weitergeleitet werden (Hoshi et al., 2005). Hier wird der im unwillkürlichen (extrapyramidalen) System entwickelte Programmentwurf auf das pyramidale System und somit auf das Rückenmark verschaltet.

Es existieren verschiedene Modelle zur Organisation der Basalganglien, welche immer eine Vereinfachung der realen Abläufe darstellen, aber dennoch nützlich sind, um pathomorphologische Konzepte zu entwickeln. Ein häufig verwendetes Modell beschreibt die

Basalganglien als Teil motorischer Regelkreise mit komplexen rückgekoppelten Schleifen zwischen assoziativem und motorischem Kortex (Alexander et al., 1990).

Wie in Abbildung (Abb.) 1 A dargestellt, erregen in der motorischen Schleife kortikale Felder mittels exzitatorischer Neurotransmitter (Glutamat, Aspartat) das Putamen des dorsalen Striatums, welches auch als Eingangsstruktur der Basalganglien und im folgenden vereinfacht als „Striatum“ bezeichnet wird (Divac et al., 1977). Von hier aus werden über zwei entgegensteuernde Wege die Ausgangsstrukturen der Basalganglien, der GPi und die SNr, moduliert. Durch den „direkten“ Weg werden die Ausgangsstrukturen mittels Projektionsneurone des Striatums gehemmt, welche den inhibitorischen Transmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) freisetzen. Der „indirekte“ Weg führt über eine GABA-vermittelte Inhibition des GPe, wodurch dieser vermindert den STN hemmt. Der STN erregt somit vermehrt den GPi mittels Glutamat. Die „direkt“ gehemmten und „indirekt“ erregten Ausgangsstrukturen wiederum enthalten GABAerge Neurone, welche die den Kortex erregende Aktivität nachgeschalteter Thalamuskern inhibieren (Parent, 1986).

Zu dieser motorischen Schleife werden weitere Informationen integriert, z.B. aus dem limbischen System. Das Striatum erhält dopaminerge Zuströme von der SNc/SNl sowie glutamaterge Projektionen von Thalamus und Amygdala, serotonerge Projektionen von den Raphekernen und noradrenerge Zuströme vom Locus coeruleus (Pollack, 2001). Verschiedene Schleifen dienen der Parallelverarbeitung der Informationen aus unterschiedlichen kortikalen Arealen und gleichzeitig der Informationszusammenführung durch eine sukzessive Verringerung der Zahl der Neurone vom Kortex zum Striatum bis zu GPi/SNr. Unter physiologischen Bedingungen wird von einem Gleichgewicht zwischen den beiden beschriebenen Projektionsbahnen ausgegangen.

Störungen innerhalb der Basalganglien sollten nach diesem Modell in Abhängigkeit von den betroffenen Strukturen bzw. den beteiligten Transmittersystemen in Bewegungsverminderung (Hypokinesie) oder in überschießender Bewegung (Hyperkinesie) resultieren. Die PD ist vorwiegend hypokinetisch geprägt (s. 2.2.2.). Erkrankungen mit verstärkt hyperkinetischen Symptomen sind z.B. Chorea Huntington und die Dystonien (Vitek, 2002).

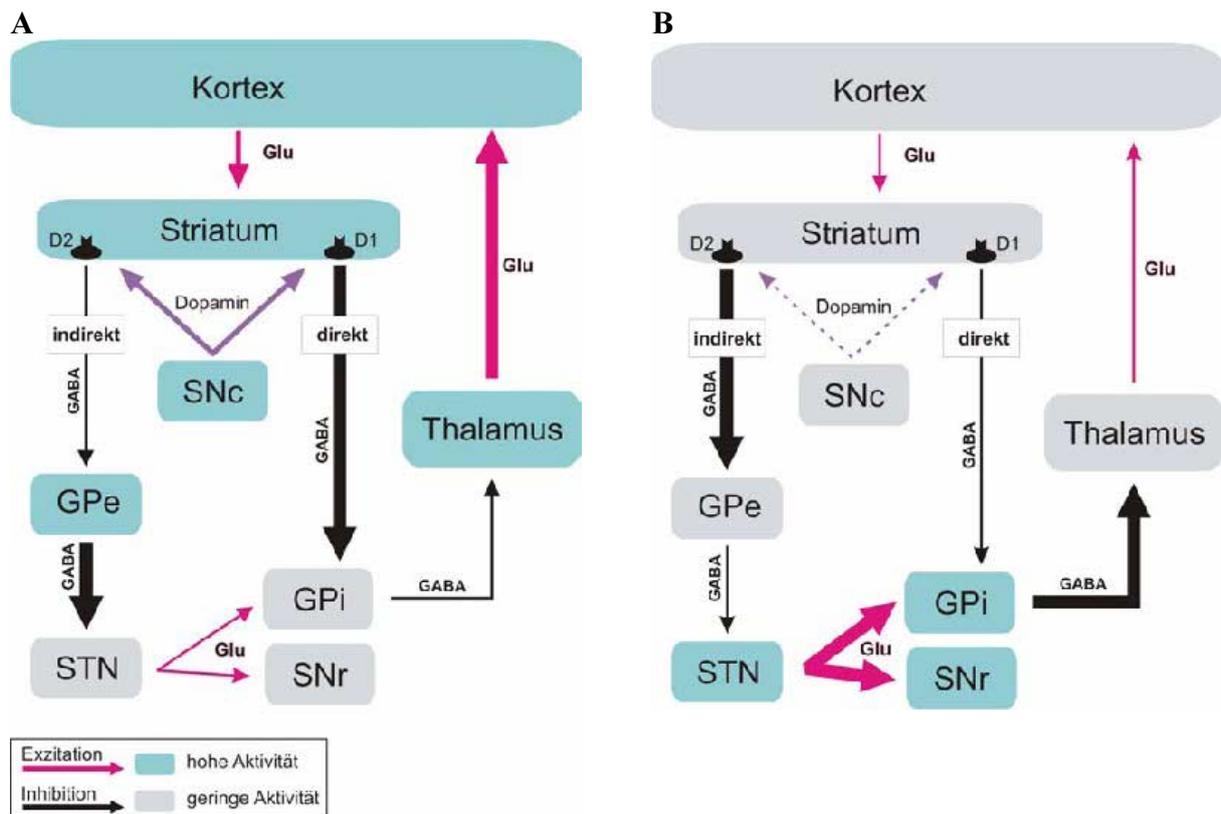


Abb. 1: Vereinfachtes Schema zu den Verbindungen innerhalb der Basalganglien mit erregenden glutamatergen (Glu) Zuströmen vom Kortex und inhibierenden GABAergen Projektionen zum Thalamus. Gegenübergestellt sind der physiologische Zustand (A) und die pathophysiologischen Veränderungen im PD-Patienten (B). Das IPS ist gekennzeichnet durch eine progressive Abnahme dopaminerger Projektionen von der SN zum Striatum, woraus eine Überaktivität der Ausgangsstrukturen (GPi, SNr) und somit eine Inhibition der erregenden thalamokortikalen Rückkopplungsschleife resultiert (GPe: Globus pallidus externus, GPi: Globus pallidus internus, SNc: Substantia nigra pars compacta, SNr: Substantia nigra pars reticulata, STN: N. subthalamicus, weitere Erläuterungen im Text; modifiziert nach Blandini et al., 2000).

2.2.1.2. Das dopaminerge System innerhalb der Basalganglien

Das Katecholamin DA ist ein bedeutender Botenstoff (Neurotransmitter) in Gehirnstrukturen, welche für die Regulation der Motorik eine zentrale Rolle spielen. Synthetisiert wird DA in mehreren Schritten aus der Aminosäure L-Phenylalanin, wie in Abb. 2 dargestellt. In der Leber wird aus L-Phenylalanin L-Tyrosin gebildet, welches über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) in das Gehirn aufgenommen und von katecholaminergen Neuronen zu DA umgewandelt wird. Den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt katalysiert das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH), welches außer im Nebennierenmark hauptsächlich in dopaminergen Neuronen vorkommt und daher auch zum Nachweis der Syntheseaktivität dopaminergere Neurone verwendet wird. Durch dieses Enzym wird Tyrosin zu L-Dihydroxyphenylalanin (Levodopa oder L-DOPA) hydroxyliert. Die DOPA-Decarboxylase

setzt L-DOPA zu DA um, welches seinerseits als Ausgangsstoff zur Synthese von Noradrenalin und Adrenalin fungiert (Curzon, 1977; Hutson und Curzon, 1983).

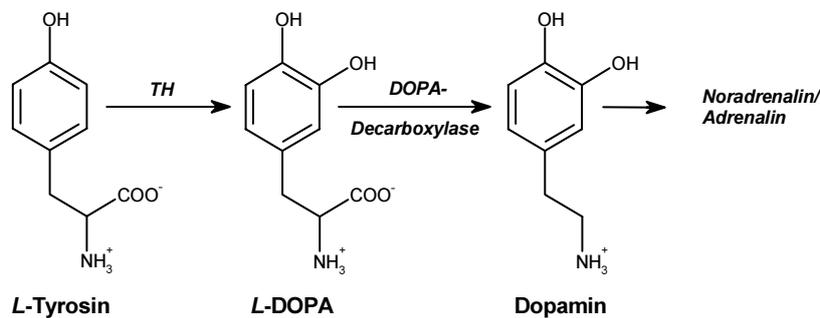


Abb. 2: Schematische Darstellung der **DA-Synthese**. L-Tyrosin wird durch die TH zu L-DOPA und weiter über die DOPA-Decarboxylase zu DA umgesetzt.

Wie in Abb. 3 schematisch dargestellt, wird DA anschließend über den vesikulären Monoamin-Transporter (VMAT) in synaptischen Vesikeln gespeichert, und bei Eintreffen eines Nervenimpulses in den synaptischen Spalt freigesetzt (Iversen, 2006). Dopaminrezeptor-Subtypen werden folgendermaßen pharmakologisch klassifiziert: D₁- (Rezeptorfamilie mit D₁ und D₅) und D₂- (Rezeptorfamilie mit D₂-D₄) Rezeptoren (Sibley und Monsma, 1992). Präsynaptisch wird über die Rezeptorbindung die Transmitterfreisetzung gesenkt, was für D₂-Autorezeptoren nachgewiesen ist (Hahn et al., 2006). Postsynaptisch sind D₁-Rezeptoren positiv (aktivierend) und D₂-Rezeptoren negativ (inhibierend) G-Protein gekoppelt. Die Verteilung dieser Subtypen variiert innerhalb des dopaminergen Systems, und je nach Subtyp des Rezeptors den ein postsynaptisches Neuron besitzt, wird es somit von DA aktiviert oder inhibiert (Levey et al., 1993). Die Wiederaufnahme von DA in die Nervenendigungen wird über den Dopamintransporter (DAT) vermittelt (s. Abb. 3), wonach DA entweder wieder in synaptische Vesikel aufgenommen oder enzymatisch abgebaut wird (Sotnikova et al., 2006). Der Abbau erfolgt im Zentralnervensystem (ZNS) über die Monoaminoxidase Typ B (MAO-B) und die Katecholamin-O-Methyl-Transferase (COMT) und findet auch extrazellulär und in den benachbarten Gliazellen statt. Über Zwischenstufen entstehen dabei die Dopaminmetabolite 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC) und Homovanillinsäure (HVA), die über den Harn ausgeschieden werden (Abb. 3; Hutson und Curzon, 1983).

Das dopaminerge System greift abhängig vom auf der Zielzelle exprimierten Dopaminrezeptor-Subtyp auf unterschiedliche Weise modulierend in den indirekten und direkten Weg der Basalganglienphysiologie ein (Abb. 1 A).

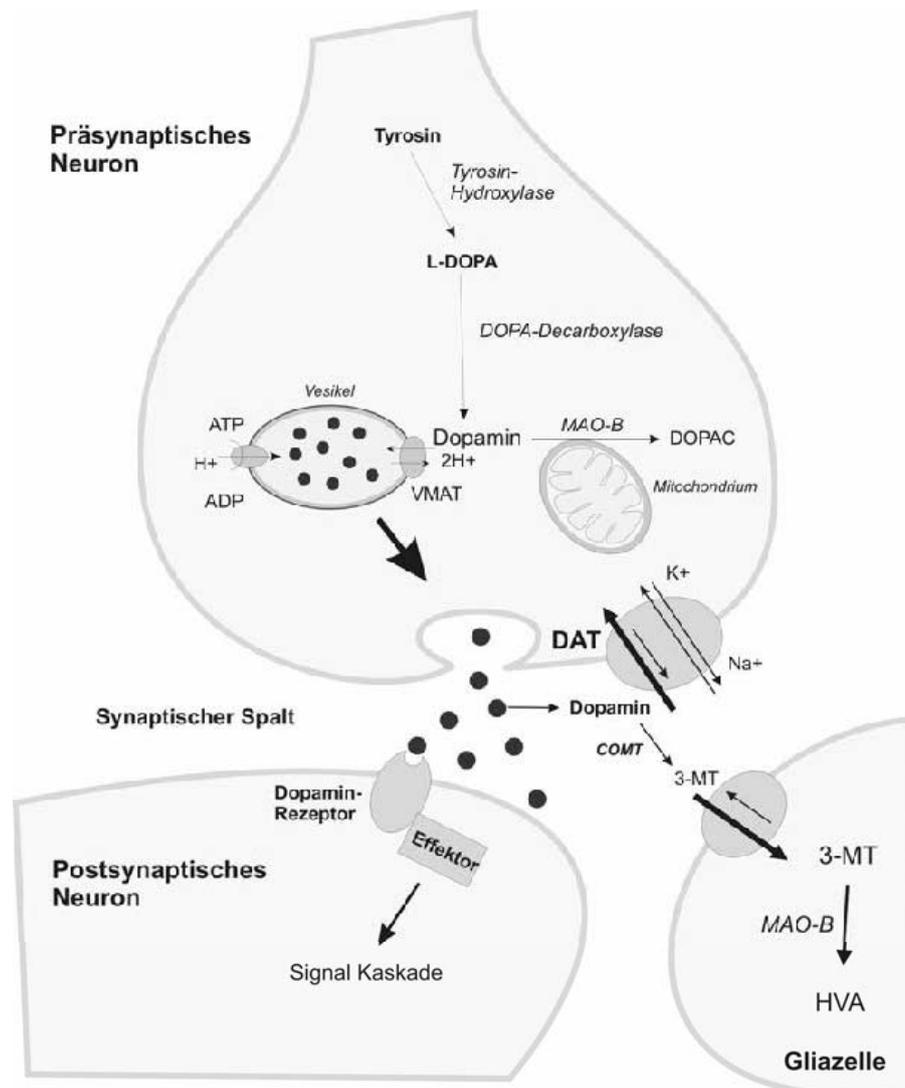


Abb. 3: Schematische Darstellung der dopaminergen Neurotransmission. DA wird nach der Synthese präsynaptisch in Vesikeln gespeichert und beim Eintreffen eines Nervenimpulses in den synaptischen Spalt freigesetzt. Postsynaptische Neurone werden via Dopaminrezeptoren je nach Rezeptor-Subtyp inhibiert bzw. erregt. Anschließend wird DA mittels enzymatischem Abbau oder über Transportersysteme wieder aus dem synaptischen Spalt entfernt (COMT: Catecholamin-O-Methyl-Transferase, DAT: Dopamintransporter, DOPAC: 3,4-Dihydroxyphenylethylsäure, HVA: Homovanillinsäure, MAO-B: Monoamin-Oxidase, Typ B, 3-MT: 3-Methoxytyramin, VMAT: vesikulärer Monoamintransporter; weitere Erläuterungen im Text; modifiziert nach Gerlach, 2003).

Dopaminerge Neurone der SNc und SNl entsenden ihre Nervenfasern entlang des medialen Vorderhirnbündels in das Striatum und setzen hier über Nervenendigungen DA frei (Moore et al., 1971). Die striatalen GABAergen Projektionsneurone des direkten Weges exprimieren überwiegend D₁-Rezeptoren, d.h. DA bewirkt eine Verstärkung der hemmenden Wirkung dieser Neurone auf den GPi. Im Gegensatz dazu tragen striatale GABAerge Neurone des indirekten Weges überwiegend D₂-Rezeptoren. Hier resultiert die Rezeptorbindung von DA in einer Disinhibition des GPe, welcher somit vermehrt den STN hemmt. Da somit die Erregung des GPi durch den STN vermindert wird, bewirkt DA über beide Wege eine

Verringerung der GABAergen Aktivität des GPi als Ausgangsstruktur der Basalganglien (Aizman et al., 2000). Die erregende Aktivität nachgeschalteter Thalamuskern auf den Kortex wird somit erhöht (Abb. 1 A). DA verstärkt nach diesem Modell die direkte positive Rückkopplungsschleife zur Manifestation kortikaler Bewegungsmuster und hemmt die indirekte negative Rückkopplung ungewollter kortikaler Bewegungsmuster.

2.2.2. Pathophysiologie des IPS

Die Neuropathologie des IPS beinhaltet als hauptsächliches Kriterium eine **Degeneration dopaminerger Neurone** der SNc und SNl bis zu 90%. Beim Menschen sind diese Neurone durch enthaltenes Neuromelanin schwarz pigmentiert, so dass beim IPS ein Verlust der Pigmentierung des Mittelhirnes vorliegt. Neuropathochemisch resultiert hieraus eine verringerte Ausschüttung von DA im Projektionsgebiet, dem Striatum (Hornykiewicz, 1963; Hornykiewicz und Kish, 1987). Diese Störung des nigrostriatalen Weges führt zu pathophysiologischen Veränderungen in den Basalganglien (Abb. 1 B). Ein Dopamindefizit im Striatum erzeugt eine verringerte Aktivität des direkten und eine vermehrte Aktivität des indirekten Weges. Beide Projektionsbahnen bedingen somit eine Erhöhung der GABAergen Aktivität der Neurone des GPi, welche wiederum den Thalamus vermehrt hemmen, woraus schließlich eine verringerte glutamaterge Erregung des Kortex resultiert (Abb. 1 B). Kortikale Bewegungsmuster werden somit nicht verstärkt und die Umsetzung in willkürliche Bewegung ist abgeschwächt (Blandini et al., 2000; Crossman, 1989). Insbesondere neu zu erlernende Bewegungsmuster können nicht mehr innerhalb der Basalganglien moduliert und angepasst werden. Repetitive Bewegungen müssen stetig von neuem initiiert werden. Die sich daraus entwickelnde Symptomatik im PD-Patienten tritt bei einem striatalen Dopamindefizit von 50-70% auf (Bernheimer et al., 1973).

Chirurgische Eingriffe in das System der Basalganglien und Messungen der neuronalen Aktivität einzelner Strukturen lieferten Ergebnisse die teils dieses Modell unterstützen, teils aber auch widersprüchlich sind (Marsden und Obeso, 1994; Parent und Cicchetti, 1998). Das Dopamindefizit ist begleitet von einer Abnahme der Metaboliten DOPAC und HVA und der DA-synthetisierenden Enzyme TH und DOPA-Decarboxylase (Hornykiewicz, 1982; Riederer und Youdim, 1986). Die Dopaminrezeptordichte im Striatum ist vor dem Einsatz von Therapeutika erhöht, was als Kompensationsmechanismus angesehen wird (Antonini et al., 1995).

Bei PD-Patienten wurden subregionale Unterschiede in der nigralen Degeneration beschrieben. Lateroventrale dopaminerge Neurone degenerieren bevorzugt. Diese projizieren vorwiegend zum dorsalen Anteil des Striatums, dem Putamen des Menschen. Diesem wird ein Hauptanteil an den motorischen kortikalen Schleifen zugeschrieben (Damier et al., 1999; Fearnley und Lees, 1991; Gibb und Lees, 1991). Eine Degeneration der medialen und rostralen SNc, welche zum ventromedialen Anteil des Striatums, dem N. caudatus, projizieren, ist dagegen häufiger in Patienten mit kognitiven Symptomen und Demenz beschrieben (Rinne et al., 1989). Da im Nager das Putamen im (dorsalen) Striatum nicht anatomisch vom N. caudatus abgrenzbar ist, müssen die Zuordnungen anhand vergleichbarer Projektionsgebiete kortikaler, limbischer und nigraler Neurone getroffen werden. Untersuchungen ergaben, dass dem Putamen des Menschen der ventrolaterale Anteil des (dorsalen) Striatums, dem N. caudatus der dorsomediale Anteil des (dorsalen) Striatums im Nager weitgehend entspricht (Deumens et al., 2002).

Neben dem nigrostriatalen System sind auch die übrigen dopaminergen Systeme betroffen, wenn auch in geringerem Ausmaß. Neurone des ventralen tegmental Areal (VTA) degenerieren zu 45-60%, wodurch ein Dopaminmangel im mesokortikalen-mesolimbischen System entsteht (N. accumbens, Gyrus cinguli, Hypothalamus, Area olfactoria, Corpus amygdaloideum). Insbesondere kognitive Störungen im PD-Patienten werden hierauf zurückgeführt (Javoy-Agid et al., 1984; Jellinger, 1991).

Auch wenn die Veränderungen im dopaminergen System charakteristisch sind für das IPS, liegen auch Störungen in **weiteren Transmittersystemen** vor (Jellinger, 1991). Es wird noch diskutiert, in wieweit ein Dopaminmangel primär verantwortlich ist für die Degeneration nichtdopaminerg Neurone (Hirsch et al., 2003). Eine Degeneration noradrenerger Neurone des Locus coeruleus wurde bereits 1919 durch Tretiakoff beschrieben (Tretiakoff, 1919). Bei PD-Patienten sind Neuronenverluste zwischen 28% und 90% nachgewiesen, wobei die Ausprägung von dementiellen und depressiven Symptomen mit dem Ausmaß des Noradrenalinmangels einhergeht (Jellinger, 1991). Da Noradrenalin ein wichtiger vegetativer Botenstoff ist, treten auch Kreislaufstörungen in betroffenen PD-Patienten auf. Depressionen werden weiterhin auf Neuronenverluste in den serotonergen Raphe-Kernen zurückgeführt, welche jedoch mit bis zu 40% relativ gering ausgeprägt sind (Jellinger, 1991). Die Neurodegeneration im cholinergen System betrifft u.a. den N. basalis Meynert und wird mit dementiellen Symptomen verbunden. Da aber lediglich bis zu 40% der Neurone absterben, das Auftreten einer klinisch manifesten Demenz jedoch einen Verlust von mindestens 75% erfordert, ist dieser Zusammenhang umstritten (Jellinger, 1999). Es wurden auch

Verschiebungen in einigen Neuropeptidspiegeln beschrieben. Im Striatum ist Enkephalin mit D₂-Rezeptor-exprimierenden, Substanz P mit D₁-Rezeptor-exprimierenden Neuronen kolokalisiert. Bei einem Mangel an DA sollte nach dem beschriebenen Basalganglienmodell in den Projektionsgebieten Enkephalin (GPe) daher eher eine höhere Konzentration zeigen, Substanz P (GPi/SNr) eine verringerte. Entgegen dieser Hypothese sind jedoch beide Neuropeptide vermindert (Fernandez et al., 1996).

Das zweite neuropathologische Kriterium stellen so genannte **Lewy-Körperchen** (nach F. H. Lewy 1912) dar, welche in der SN von verstorbenen PD-Patienten gefunden wurden (Holdorff, 2002). Es handelt sich hierbei um eosinophile Einschlusskörperchen im Zytoplasma der Neurone mit einem dichten Kern im Zentrum umgeben von filamentartigen Strukturen. Die Rolle dieser Einschlusskörperchen in der Pathogenese der Erkrankung ist noch unklar, da sowohl eine neurodegenerative als auch eine neuroprotektive Funktion möglich ist (Di Monte, 2003). Lewy-Körperchen werden auch in anderen Bereichen des Nervensystems gefunden (z.B. zentral im limbischen System und in vegetativen Zentren, peripher in Nervenganglien) und werden als neuropathologische Marker von Zytoskelettveränderungen angesehen. Da die Entstehung von Lewy-Körperchen bereits vor der Entwicklung eines IPS nachgewiesen wurde und in weiteren Erkrankungen des Alters wie z.B. Demenz ebenso auftreten kann, werden diese neuropathologischen Veränderungen unter der Bezeichnung „Lewy-Body-Disease“ zusammengefasst. Lewy-Körperchen außerhalb der SN werden auch als pathomorphologische Anzeichen präklinischer Stadien in der Entwicklung eines IPS beschrieben (Braak et al., 2002).

2.3. Ätiopathogenese der Parkinson-Krankheit

2.3.1. Parkinson-Syndrome mit bekannter Ätiologie

80% aller Parkinson-Erkrankungen zählen mit noch ungeklärter Ätiopathogenese zum IPS, dagegen sind die Ursachen der Entwicklung eines symptomatischen (sekundären) Parkinson-Syndroms bekannt (Gerlach, 2003). Es werden metabolische (z.B. Morbus Wilson, hepatozerebrale Degeneration), vaskuläre (Mikroangiopathie), traumatische (Mikrohämatome), toxische (z.B. Mangan, Kohlenmonoxid, Zyanid), infektiöse (z.B. nach Encephalitis lethargica, Japan-B-Enzephalitis, Syphilis) und medikamentöse (z.B. Neuroleptika, Reserpin) Ursachen unterschieden (Gerlach, 2003; Manfredi et al., 1995). Die

PD kann auch als Teil neuronaler Systemdegenerationen (Multisystematrophie, Morbus Alzheimer) auftreten (Tolosa et al., 2006).

Von den sporadisch auftretenden idiopathischen und symptomatischen Formen sind die hereditären Formen abzugrenzen, welche etwa 5-10% aller PD-Fälle beinhalten (Mizuno et al., 1999). Hier liegt eine monogenetische Determinierung der Pathogenese vor, wobei verschiedene Genloci (PARK1-11) identifiziert wurden (Bonifati et al., 2004). Hiervon wurden in 4 Fällen Gene mit autosomal dominantem (α -Synuclein, UCH-L1, NURR1, LRRK2) und in 3 Fällen mit autosomal rezessivem Erbgang (DJ1, PINK1, parkin) zugeordnet (vgl. 2.6.1., Tabelle [Tab.] 2; Bonifati et al., 2004; Le und Appel, 2004). Nach den zugehörigen Genprodukten und ihren Funktionen wird intensiv geforscht, um so Hinweise auf die Pathogenese der Erkrankung zu erhalten. Zu PARK1, dem ersten identifizierten Genlocus, ist das exprimierte Protein bekannt, es handelt sich um das präsynaptische Protein α -Synuclein, einem Hauptbestandteil der Lewy-Körperchen (s. 2.2.2.; Polymeropoulos et al., 1997). Seine Funktion ist erst teilweise geklärt, es scheint im Membrantransport und in der Signaltransduktion eine Rolle zu spielen und ist ein Inhibitor der TH und somit der Dopaminsynthese (Farrer, 2006). In den von der Mutation betroffenen Patienten waren nur wenige Lewy-Körperchen nachweisbar. Aus dieser und aus weiteren Abweichungen von der Pathomorphologie entstanden Zweifel an der Vergleichbarkeit dieser monogenetisch determinierten hereditären Form mit dem IPS (Duda et al., 2002). Auf Hypothesen und Untersuchungen zu weiteren bekannten Genloci wird in der Darstellung der Pathogenese des IPS und im Rahmen der Tiermodelle eingegangen (s. 2.6.1.).

2.3.2. Hypothesen zur Ätiopathogenese des IPS

Zurzeit wird in der Ursachenforschung des IPS von einer Kombination aus genetischer Prädisposition, Umweltfaktoren und Altersdefiziten ausgegangen (vgl. Abb. 4; Betarbet et al., 2002a; von Bohlen und Halbach et al., 2004). Diese Hypothese entwickelte sich aus epidemiologischen Studien zur Prävalenz und Inzidenz in verschiedenen Bevölkerungsgruppen (Di Monte, 2003; Uversky, 2004). Da Verwandte von PD-Patienten mit doppelt so hoher Wahrscheinlichkeit erkranken, ist eine Beteiligung genetischer Faktoren an der Ätiopathogenese sehr wahrscheinlich (Hattori et al., 2003; Vieregge, 1994). Nach dem derzeitigen Kenntnisstand wird davon ausgegangen, dass dem IPS im Gegensatz zu den hereditären Formen eher eine polygenetische Determinierung zugrunde liegt, welche mit multifaktoriellen exogenen Risikofaktoren interagiert (Scott et al., 2001; Sherer et al., 2001a).

Der Einfluss von Umweltfaktoren, wie Pestiziden, wurde durch epidemiologische Studien deutlich (Brown et al., 2005; Di Monte, 2003). Die exponentiell steigende Prävalenz, mit höherem Alter an IPS zu erkranken, ist unumstritten und gibt Hinweise auf einen altersabhängigen Anstieg neuronaler Suszeptibilität gegenüber neurotoxischen Faktoren (Le Couteur et al., 2002; Zhang und Roman, 1993).

Einflüsse von Genetik, Umwelt und Alter potenzieren das Risiko zu erkranken, da sie z.T. dieselben pathogenetischen Mechanismen aktivieren können, die letztlich zum progressiven Zelltod dopaminerger Neurone führen (Jenner, 1998). Zu diesen molekularen Mechanismen gehören v.a. oxidativer Stress, mitochondriale Dysfunktionen, Exzitotoxizität, Protein-Aggregation und inflammatorische Prozesse (Betarbet et al., 2002a).

Im Folgenden werden Erkenntnisse zu diesen Mechanismen und ihrer Aktivierung vorgestellt, welche aus der Erforschung der Erkrankung am Patienten, in Tiermodellen und Zellkulturen bis hin zu isolierten Mitochondrien gewonnen wurden (Orth und Tabrizi, 2003). Abb. 4 zeigt eine Übersicht der in den folgenden Kapiteln näher beschriebenen Faktoren. Anschließend wird der aktuelle Wissensstand zur Ätiologie des IPS im Zusammenhang mit Genetik, Umwelt und Alter dargestellt. Abb. 7 fasst alle Faktoren grafisch zusammen.

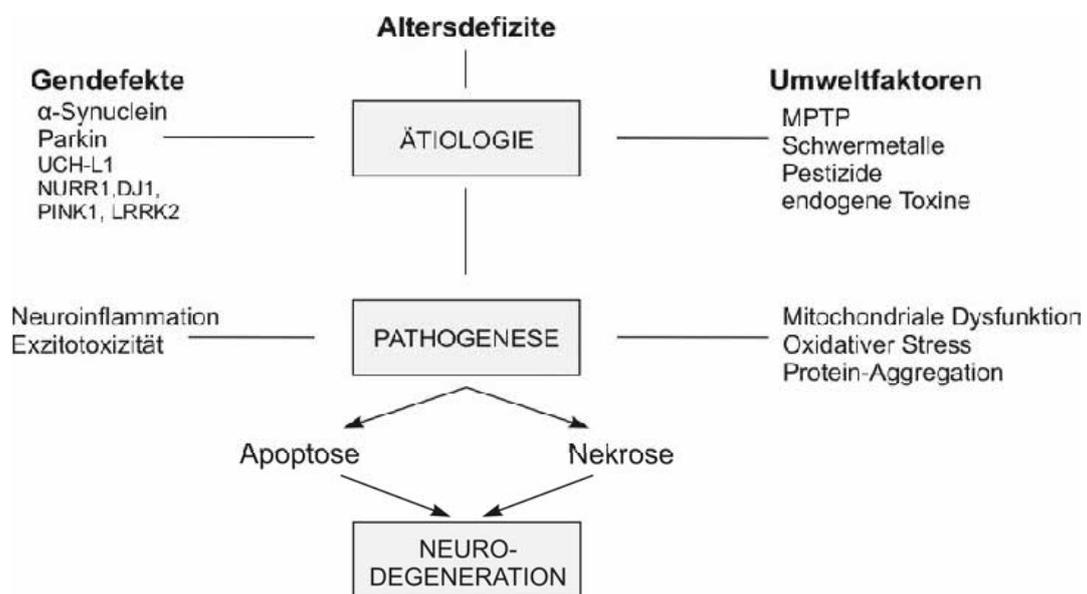


Abb. 4: Hypothese zur Äthiopathogenese des IPS. Übersicht der Faktoren, welche wahrscheinlich in Ätiologie und Pathogenese des IPS eine entscheidende Rolle spielen. Erläuterungen zu den Gendefekten vgl. Kapitel 2.6.1., Tab. 2 (nach Schapira, 2005).

2.3.2.1. Oxidativer Stress

Oxidativer Stress wird als zentraler Mechanismus in der Pathogenese des IPS angesehen (Jenner, 1998; Sherer et al., 2001a). Darunter wird die Schädigung biologischer Systeme durch „Reaktive Sauerstoffspezies“ (ROS; hochreaktive Abkömmlinge des molekularen Sauerstoffs) verstanden. Es werden freie Radikale (Superoxid-Radikal-Anion, Hydroxyl-Radikal) und stabile molekulare Oxidantien (Wasserstoffperoxid) unterschieden. Auch „reaktive Stickstoffspezies“ sind am oxidativen Stress beteiligt (Stickstoffmonoxid, Peroxynitrit). Freie Radikale zeichnen sich durch ein oder mehrere ungepaarte Elektronen aus und sind daher sehr reaktionsfreudig (Halliwell, 1992). Durch Modifikation von Aminosäureresten oder durch Lipidperoxidation werden Funktionsstörungen membranassoziierter Proteine und zellulärer Enzyme (z.B. des Citratzyklus) (Bowling und Beal, 1995), Schäden an der Desoxyribonukleinsäure (DNA) mit Erhöhung des 8-Hydroxy-Deoxyguanosin-Anteils (Yoritaka et al., 1996), mitochondriale Defekte (Allen et al., 1995) sowie apoptotische Mechanismen (Li et al., 2003) ausgelöst (vgl. Abb. 7a). ROS und reaktive Stickstoffspezies sind im physiologischen Zellstoffwechsel auftretende Zwischenprodukte, die von zelleigenen Antioxidantien (Glutathion-Peroxidase, Superoxid-Dismutase, Katalase, Vitamin E, Vitamin C) abgefangen werden, wie in Abb. 5 dargestellt.

Oxidantien			
$O_2^{\bullet -}$	Superoxid-Radikal-Anion	ONOOH	Peroxynitrit
OH•	Hydroxyl-Radikal	NO•	Stickstoffmonoxid
H_2O_2	Wasserstoffperoxid		
Antioxidantien			
Superoxid-Dismutase:	$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2 H^+$	→	$H_2O_2 + O_2$
Glutathion-Peroxidase:	$2 GSH + H_2O_2$	→	$GSSG + 2 H_2O$
Katalase:	$H_2O_2 + H_2O_2$	→	$O_2 + 2 H_2O$
	GSH: reduziertes Glutathion		GSSG: oxidiertes Glutathion

Abb. 5: Übersicht häufig auftretender **Oxidantien und Antioxidantien** im Zellstoffwechsel dopaminergener Neurone. Antioxidantien sind vorwiegend Enzyme, welche die Oxidantien in Redoxreaktionen umsetzen und somit die Zelle vor oxidativem Stress schützen.

Bei oxidativem Stress herrscht ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien zugunsten ersterer vor, was entweder durch vermehrte Radikalbildung oder durch einen Mangel an Antioxidantien bedingt sein kann (Jenner, 1998). Mit zunehmendem Alter ist ein Anstieg des oxidativen Stresses beschrieben worden, wobei eine altersabhängige Verringerung dopaminergener Neurone nachgewiesen wurde, auch wenn kein Parkinson-Syndrom vorliegt (Kim et al., 2006; Le Couteur et al., 2002; Manczak et al., 2005; Sawle et

al., 1990). Die Pathogenese im PD-Patienten scheint jedoch davon abweichende Mechanismen zu enthalten, da sich das Muster der Degeneration dopaminerger Neurone unterscheidet (Fearnley und Lees, 1991).

Dopaminerge Neurone zeichnen sich per se durch hohen oxidativen Stress aus, da der Katabolismus von DA via MAO-B, die Autooxidation von DA, hohe Eisenspiegel und ein hoher Neuromelaningehalt vermehrt zu einer Entstehung von freien Radikalen führen (Coyle und Puttfarcken, 1993). Hieraus resultiert eine höhere Vulnerabilität dieser Neuronen gegenüber Verschiebungen im Zellstoffwechsel, was eine Ursache für ihren bevorzugten Untergang im IPS darstellen könnte (Jenner, 1998). Daher werden im Folgenden der DA-, Eisen- und Neuromelaninstoffwechsel dargestellt.

Der **Dopaminstoffwechsel** selbst bildet eine Quelle für toxische ROS. Bereits während der Synthese kann die TH, welche zu den eisenabhängigen Biopterinenzymen gehört, durch einen 1-Elektron-Transfer in die radikalische Form übergehen und in Gegenwart von Sauerstoff Superoxid-Radikale erzeugen (Adams et al., 1997). Des Weiteren spielt die durch MAO-B induzierte Radikalbildung eine wichtige Rolle, denn der Großteil des neuronalen DA wird über dieses Enzym abgebaut. Dabei entsteht pro Molekül DA ein Molekül Wasserstoffperoxid (H_2O_2) aber auch andere potenziell toxische Verbindungen wie DOPA-Aldehyd und Ammoniak (Graham, 1978; Jenner, 1998). DA wird aber auch bei Anwesenheit von Sauerstoff autooxidativ, d.h. ohne Enzymbeteiligung, umgesetzt, wobei neben H_2O_2 zytotoxische Semichinone und Superoxid-Radikal-Anionen gebildet werden (vgl. Abb. 7b; Spencer et al., 1998; Zoccarato et al., 2005).

Reduzierte Eisenionen können in der Fenton-Reaktion mit H_2O_2 unter Bildung freier Radikale reagieren (Abb. 7b). In der SN liegt eine hohe Eisenkonzentration und durch den Dopaminstoffwechsel eine kontinuierliche Bildung von H_2O_2 vor, wodurch die Fenton-Reaktion begünstigt wird (Dexter et al., 1987). Die Konzentration an reaktivem Eisen wird durch freie Radikale weiter erhöht, da diese eiweißgebundenes Eisen (Ferritin) freisetzen können (Riederer et al., 1989). Da post mortem Untersuchungen jedoch nur in fortgeschrittenen Fällen der Neurodegeneration Veränderungen im Eisenmetabolismus ergaben, wird davon ausgegangen, dass dieser Mechanismus die Pathogenese nicht einleitet, wohl aber progressiv vorantreibt (Riederer et al., 1989).

Neuromelanin ist als Namen gebendes schwarzes Pigment dopaminerger Neurone der SN bisher in höherer Konzentration nur im humanen ZNS beschrieben. Es entsteht bei der Autooxidation von DA durch Polymerisation von Abbauprodukten und kann von der Zelle

nicht weiter metabolisiert werden (Abb. 7b, Zecca et al., 2003). Neuromelanin vereint nach derzeitigen Erkenntnissen neurodegenerative und neuroprotektive Eigenschaften in sich, in Abhängigkeit von der umgebenden Konzentration an Eisen (Youdim et al., 1994). Das Protein zeichnet sich durch eine hohe Eisenbindungskapazität aus. Es ist beschrieben, dass Ferritin, nicht jedoch Neuromelanin, im Alter eine geringere intrazelluläre Konzentration aufweisen. Diese und andere Untersuchungen geben zudem Hinweise, dass in der SN Neuromelanin das eisenspeichernde Protein darstellt (Zecca et al., 2001). Daher wird zurzeit davon ausgegangen, dass Neuromelanin in seiner physiologischen Funktion Metalle und Toxine bindet und somit neuroprotektiv wirkt. In der Pathogenese des IPS wird jedoch durch den hohen Grad an oxidativem Stress Eisen aus den Neuromelaninspeichern freigesetzt und somit der neurodegenerative Prozess angetrieben (Fasano et al., 2006).

2.3.2.2. Mitochondriale Dysfunktionen

Mitochondrien sind Zellorganellen, welche im Zellkatabolismus den Hauptanteil des Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP) synthetisieren. Hierzu übertragen sie in der oxidativen Phosphorylierung, auch als Zellatmung bezeichnet, Elektronen und Wasserstoff von hochenergetischen Verbindungen (u.a. Nicotinamidadenindinukleodit, NADH) auf elementaren Sauerstoff und erzeugen somit Wasser. Die hierbei frei werdende Energie wird in die Errichtung eines Protonengradienten investiert, welcher der Synthese von ATP und somit dem Zellstoffwechsel dient (Abb. 6).

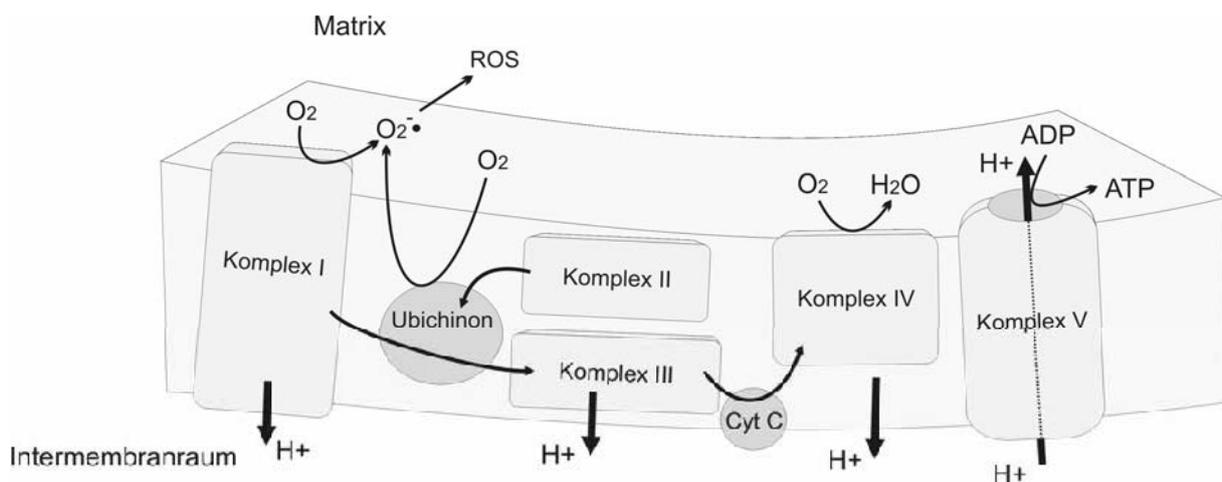


Abb. 6: Schema zur mitochondrialen Atmungskette mit den 5 Enzymkomplexen, eingebettet in die innere Mitochondrienmembran. In Redoxreaktionen frei werdende Energie wird für den Aufbau eines Protonengradienten genutzt und der Rückfluss der Protonen durch den Komplex V dient der Synthese von ATP. Werden bei der Übertragung zwischen den Komplexen Elektronen frei, kann dies zur Bildung von Superoxid-Radikal-Anionen führen (Cyt C: Cytochrom C).

Fünf Proteinkomplexe der oxidativen Phosphorylierung (Atmungskette) sind an der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert: Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase), Komplex II (Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase), Komplex III (Ubihydrochinon-Cytochrom-C-Oxidoreduktase), Komplex IV (Cytochrom C -Oxidoreduktase) und Komplex V (ATP-Synthase). Der Komplex I ist ein sehr großer Enzymkomplex und durchspannt die innere Mitochondrienmembran. Er besteht aus 43 Proteinuntereinheiten, von denen 7 durch die mitochondriale DNA kodiert werden, und enthält katalytische Eisen-Schwefel-Zentren und Flavin-Mononukleotide als prosthetische Gruppen. Als erster Komplex oxidiert er NADH und überträgt die Elektronen auf Ubichinon, wobei jeweils Protonen in den Intermembranraum gepumpt werden. Aufgrund der Abhängigkeit des Zellstoffwechsels von der Funktion der Mitochondrien sind sie häufig primär oder sekundär an degenerativen Vorgängen beteiligt (Hatefi, 1985; Murphy et al., 1999). Ein Zusammenhang zwischen der Neurodegeneration dopaminerger Neurone und Fehlfunktionen der Mitochondrien wurde durch das Toxin MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin) hergestellt. Es führte 1979 in Kalifornien als Bestandteil eines synthetischen Heroinkocktails zu akuten Parkinson-Syndromen bei den betroffenen Drogenkonsumenten. In verschiedenen Modellen (vgl. 2.6.3.3.) wurde der Wirkmechanismus von MPTP untersucht und eine selektive Hemmung des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette postuliert (Nicklas et al., 1985). Post mortem Untersuchungen der Gehirne von Patienten ergaben eine ca. 30%ige Reduktion der Aktivität des Komplex I. Ob es sich hierbei in der Pathogenese des IPS um einen primären Mechanismus handelt und, wenn ja, ob dieser genetisch oder durch Umweltfaktoren ausgelöst wird, kann zurzeit noch nicht beantwortet werden (Schapira et al., 1990). Es liegen widersprüchliche Ergebnisse vor, ob im PD-Patienten eine generelle Komplex I- Dysfunktion vorhanden ist, welche zu einer selektiven Degeneration nigraler dopaminerger Neurone führt, was eher für einen primären mitochondrialen Defekt sprechen würde (DiDonato et al., 1993; Parker et al., 1989). Untersuchungen in Zellkulturen und isolierten Mitochondrien ergaben komplexe Zusammenhänge zwischen mitochondrialen Defiziten und oxidativem Stress. Entlang der Komplexe der Atmungskette werden freie Elektronen über Redoxsysteme auf elementaren Sauerstoff übertragen, wobei hochreaktive Zwischenprodukte entstehen können, die als ROS innerhalb und außerhalb des Mitochondriums oxidativen Stress erzeugen. Bei Fehlfunktionen der Komplexe nimmt die Zahl gebildeter ROS stark zu und führt wiederum zu einer Schädigung der Atmungskette (Abb. 7c). Hinzu kommt der Mangel an ATP bei gestörter oxidativer Phosphorylierung, wodurch ein zelluläres Energiedefizit entsteht. Die

ROS schädigen weiterhin auch die mitochondriale DNA, welche kaum Reparaturmechanismen besitzt und nicht durch Histone geschützt ist. Da wichtige Proteine der Komplexe hier kodiert sind, wird der Prozess weiter vorangetrieben. Ist die Zelle nicht in der Lage diesen Vorgang durch geeignete Antioxidantien zu unterbrechen, entsteht ein Circulus vitiosus der letztlich zum Zusammenbrechen des Energiehaushaltes der Zelle und somit zur Zelldegeneration führen kann (Abb. 7). Die empfindlichste Quelle für oxidativen Stress ist der Komplex I, da bereits eine Hemmung seiner Funktion um 16% einen deutlichen Anstieg an ROS induziert, während der Komplex III bis zu 70% beeinträchtigt werden muss, bevor Veränderungen in der ROS Produktion sichtbar werden. Die hohe Empfindlichkeit des Komplex I ist v.a. für Mitochondrien beschrieben, welche sich in Nervenendigungen befinden (Adam-Vizi, 2005; Schapira et al., 1990; Sherer und Greenamyre, 2005).

Auch Verschiebungen im Kalziumhaushalt, wie sie im folgenden Abschnitt beschrieben werden, haben Auswirkungen auf die Funktion dieser Zellorganellen. So genannte „Permeability Transition Pore“ sind große Proteinkanäle, welche innerhalb der mitochondrialen Membranen sitzen und durch Kalzium (Ca^{2+})- Überladung oder ROS geöffnet werden. Sie werden auch durch den Elektronenfluss im Komplex I reguliert (Fontaine et al., 1998). Aus ihrer Öffnung resultiert eine Depolarisation der Mitochondrien, welche mit nekrotischen aber auch apoptotischen Mechanismen einhergeht. So setzen diese Proteinkanäle z.B. Cytochrom C frei, welches eine apoptotische Signalkaskade aktiviert (Chinopoulos und Adam-Vizi, 2006).

2.3.2.3. Weitere Pathomechanismen

Exzitotoxizität beschreibt die toxischen Effekte bei Übererregung eines postsynaptischen Neurons, welche zur Degeneration der Zelle führen können. Hauptsächlich werden diese Effekte mittels des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat am ionotropen N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)- Rezeptor hervorgerufen. Die Rezeptoraktivierung führt zum Einstrom von Natrium (Na^+) und Ca^{2+} in die Zelle. Hieraus resultiert eine Depolarisation der Zellmembran und eine Verschiebung der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase (Mori und Mishina, 1995). Ca^{2+} führt durch Induktion von Enzymen, wie z.B. der Stickoxidsynthetase (NOS), zu Proteinabbau, Erhöhung der Durchlässigkeit der mitochondrialen Membranpermeabilität und Erzeugung von ROS und schließlich zur Zelldegeneration (Hardingham und Bading, 2003). Ist die Zelle durch ein bioenergetisches Defizit, etwa durch eine gestörte Mitochondrienfunktion, dauerhaft depolarisiert, können auch nicht toxische Glutamat Spiegel bereits neurodegenerative Prozesse auslösen (Abb. 7d) (Novelli et al., 1988).

Im physiologischen Zellstoffwechsel werden falsch gefaltete oder anderweitig geschädigte Proteine durch den **26S-Proteasom-Komplex** zu Peptid-Fragmenten und Aminosäuren abgebaut (Takahashi et al., 2003). Ein Zusammenhang zwischen dem Ubiquitin-Proteasom-Weg und der Pathogenese des IPS wurde durch den Nachweis des Proteins α -Synuclein und Proteasom-Bausteinen in den Lewy-Körperchen der Patienten hergestellt (Kahle et al., 2002). Die Ursache für die Bildung dieser Proteinaggregate könnte zum einen in einer Fehlfunktion des Ubiquitin-Proteasom-Weges liegen, aber auch durch Veränderungen der Struktur oder Menge des α -Synuclein bedingt sein, was z.B. bei PARK1 und PARK4 auftritt (Betarbet et al., 2005; Le und Appel, 2004). Es wird diskutiert ob α -Synuclein oder interagierende Proteine Substrate von Parkin darstellen (Chung et al., 2001), denn Mutationen des Gens, welches für Parkin kodiert, werden als PARK2 bezeichnet und vermitteln eine autosomal rezessive hereditäre Form der Parkinson-Krankheit (Kitada et al., 1998). Gegen eine generelle Zelltoxizität von Lewy-Körperchen spricht, dass sie innerhalb der überlebenden Neuronen gefunden werden. Wahrscheinlich dienen sie vorerst dem Schutz der Zelle, beeinträchtigen aber ab einem bestimmten Ausmaß die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase (Abb. 7e, Betarbet et al., 2005). **Inflammatorische Prozesse** in neuronalen Geweben werden hauptsächlich von den immunkompetenten Gliazellen vermittelt (Rock et al., 2004). Mikrogliazellen sind postnatal aus der Blutbahn in das Gehirn eingewanderte Zellen und entsprechen immunkompetenten Makrophagen. Sind sie phagozytotisch aktiv und präsentieren Antigene, werden sie als aktivierte Mikroglia bezeichnet (Cross und Woodrooffe, 2001). In PD-Patienten wurde ein Anstieg an aktivierter Mikroglia in der SN nachgewiesen (McGeer et al., 1988b). Die höhere Dichte dieser Zellen geht einher mit einer steigenden Expression an proinflammatorischen Zytokinen, wie z.B. dem Tumor-Nekrose-Faktor (Abb. 7f, Nagatsu et al., 2000). Inflammatorische Prozesse scheinen eine Rolle in der Pathogenese der Erkrankung zu spielen. Es wird aber angenommen, dass es sich eher um sekundäre Mechanismen als Reaktion auf bereits stattfindende neurodegenerative Veränderungen handelt, allerdings könnten diese Prozesse zur Progression der Erkrankung beitragen (Langston et al., 1999). Im Prozess der Zelldegeneration werden zwei Wege unterschieden, die **Apoptose** und die **Nekrose**. Apoptotische Prozesse werden auch als programmierter Zelltod bezeichnet und finden unabhängig von endogenen oder exogenen Faktoren innerhalb der Zelle statt (Altman, 1992). Nekrose wird durch Zellschädigung eingeleitet und geht häufig mit inflammatorischen Prozessen einher (Yakovlev und Faden, 2004). Die Mechanismen in der Pathogenese des IPS können apoptotische Prozesse auslösen, wie z.B. eine Hemmung der

mitochondrialen Atmungskette (Rego und Oliveira, 2003), oxidativer Stress im Zusammenhang mit dem Dopaminmetabolismus (Ziv et al., 1994), Inflammation (Wang et al., 2005) und Exzitotoxizität (Abb. 7g, Thompson, 1995). Das dopaminerge System scheint daher auch für diesen Pathomechanismus prädisponiert zu sein (Ziv und Melamed, 1998). Für eine Beteiligung nekrotischer Prozesse sprechen v.a. entzündliche Reaktionen im Bereich der SN (McGeer et al., 1988b). Wahrscheinlich sind Apoptose und Nekrose an der Neurodegeneration im IPS beteiligt, da die beschriebenen pathogenetischen Mechanismen in beide Transduktionskaskaden eingreifen können. Vermutlich ist die Zelle aber zunächst passiv endogenen und exogenen Vorgängen ausgesetzt, und erst der Verlust der Homöostase und Integrität durch Eingriffe in den Zellstoffwechsel leitet den aktiven Zelltod ein (Li et al., 2003; Sherer et al., 2002). Zum anderen ist die Apoptose ein energieabhängiger Prozess, so dass bei ATP-Mangel apoptotische Prozesse in Nekrose mit inflammatorischen Reaktionen übergehen können (Leist et al., 1999). Die Hemmung des einen Weges kann die Verstärkung des anderen zur Folge haben, wodurch die enge Verzahnung beider Prozesse deutlich wird (Yakovlev und Faden, 2004).

2.3.2.4. Genetik, Umwelt und Alter in der Ätiologie des IPS

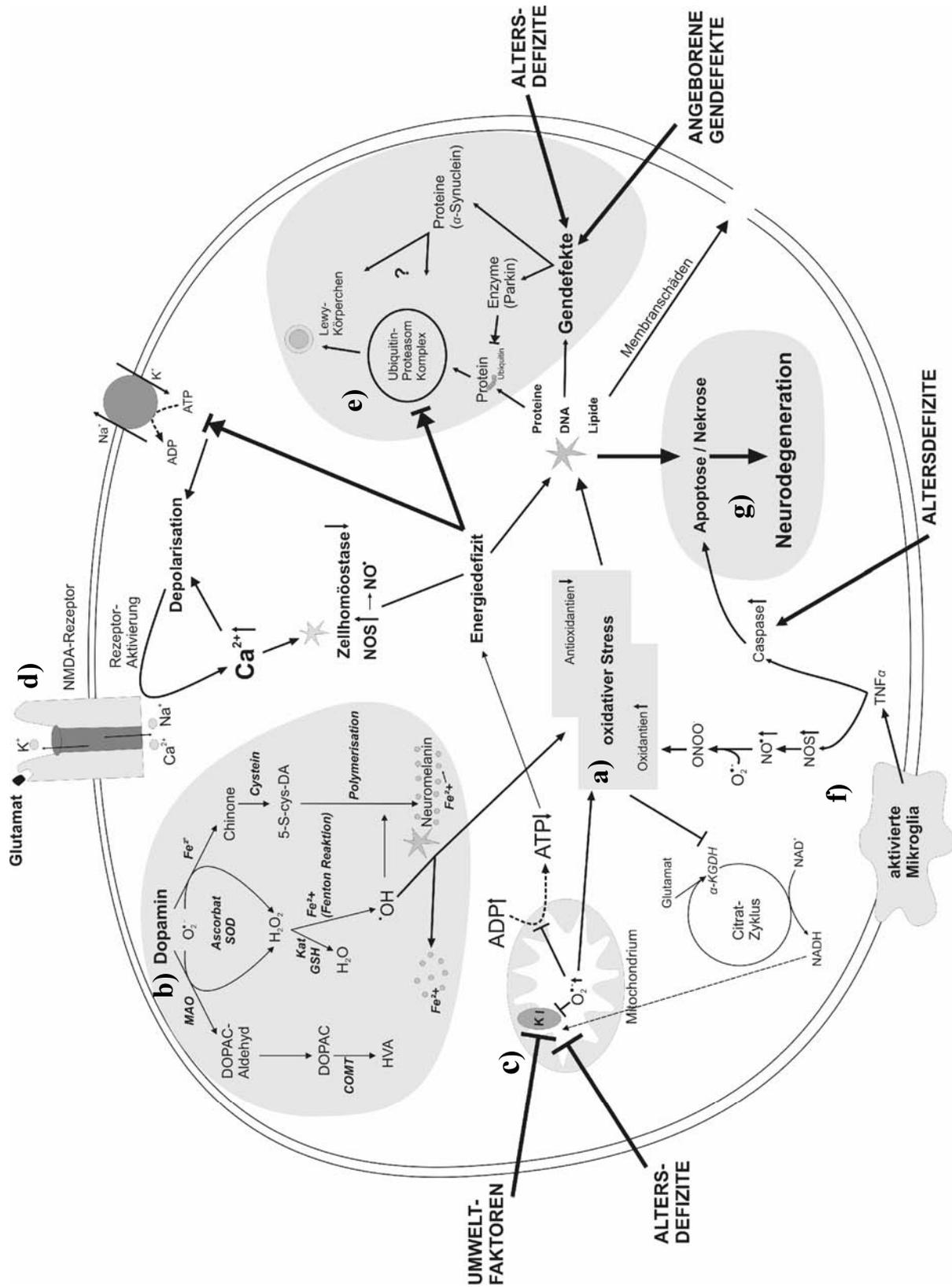
Auch wenn eine Vielzahl von pathogenetischen Mechanismen beschrieben wurde, ist die eigentliche auslösende Ursache des IPS weiterhin ungeklärt. Genetische Veränderungen können angeboren sein, wie für die PARK1-11 Mutationen nachgewiesen, aber auch mangels Reparaturmechanismen im Alter oder unter dem Einfluss mutagener Umweltfaktoren ausgelöst werden (Gasser, 2001; Tanner et al., 1999). Mutationen mitochondrialer Erbsubstanz konnten bisher noch nicht nachgewiesen werden (Le und Appel, 2004; Vieregge, 1994). Unter den epidemiologisch und toxikologisch ermittelten Umweltfaktoren nehmen Kandidaten mit Einfluss auf die mitochondriale Aktivität eine führende Rolle ein. Der Hinweis, dass ein einzelnes Toxin ein Parkinson-Syndrom auslösen kann, ergab sich durch das bereits erwähnte MPTP. Da MPTP keine natürlich verbreitete oder endogene Substanz ist, wurde nach ähnlich strukturierten oder vergleichbar wirkenden Faktoren gesucht. Aktuell werden folgende exogene potentielle Neurotoxine favorisiert: Metalle und Schwermetalle (u.a. Aluminium, Blei, Mangan, Eisen) (Gorell et al., 1999; Hirsch et al., 1991), Lösungsmittel (Seidler et al., 1996) und Pestizide wie Paraquat, Rotenon, Dieldrin (Gorell et al., 1998; Semchuk et al., 1992; Vanacore et al., 2002). Für verschiedene endogene Toxine sind ebenso neurotoxische Eigenschaften beschrieben, wobei die Mechanismen kaum erforscht sind (Gerlach, 2003). Da das IPS global auftritt, muss nach einem Umweltfaktor

gesucht werden, der weltweit eine Rolle spielt (Twelves et al., 2003; Zhang und Roman, 1993). Dies trifft für die Anwendung von Pestiziden zu, so dass diesen exogenen Toxinen zurzeit die bedeutendste Rolle beigemessen wird (Sherer et al., 2001b). In Zellkulturen und Tiermodellen ist für Rotenon und Paraquat bereits eine dopaminerge Neurotoxizität nach chronischer systemischer Exposition nachgewiesen worden (Uversky, 2004). Epidemiologische Studien gaben Hinweise auf eine erhöhte Prävalenz des IPS in der Landbevölkerung (Gorell et al., 1998; Le Couteur et al., 2002). Das Alter hat einen generellen Einfluss auf die Integrität zellulärer Systeme. Apoptotische Degenerationsvorgänge nehmen zu, dagegen sind Reparaturmechanismen und die Regenerationsfähigkeit der Zellen einschließlich der enthaltenden Mitochondrien zunehmend eingeschränkt (Jazwinski, 2000; Manczak et al., 2005). Die Zahl nigraler Neurone nimmt ab und auch der striatale Dopaminspiegel sinkt mit zunehmendem Alter (Fearnley und Lees, 1991; Kish et al., 1992). Diese intrinsischen Alterseinflüsse können durch toxische Faktoren beschleunigt werden, da mit höherem Alter zu genetischen Prädispositionen auch eine längere Exposition gegenüber umweltbedingten Faktoren vorliegen kann (Le Couteur et al., 2002). Hierbei muss keine kontinuierliche bis in die Gegenwart reichende Schädigung vorliegen, da die beschriebenen pathogenetischen Mechanismen in einem Circulus vitiosus auch abgekoppelt von der eigentlichen Ursache fortschreiten können.

Es kann nicht davon ausgegangen werden, dass es eine bestimmte Kombination von Einzelfaktoren ist, welche zu einem IPS führt. Wahrscheinlich stellen mitochondriale Dysfunktionen eher einen primären Effekt da, denn durch eine Komplex I- Hemmung sind die beschriebenen Pathomechanismen auslösbar (Mizuno et al., 1995). Die verschiedenen pathogenetischen Mechanismen sind eng miteinander verflochten und können auf verschiedene Weise die Zelle in den Circulus vitiosus führen, je nachdem welche Angriffspunkte die ätiologischen Faktoren beeinflussen (Abb. 7). Daher ist es von evidenter Bedeutung, dass die degenerativen Veränderungen möglichst frühzeitig diagnostiziert werden, um dann mit neuroprotektiven und regenerativen Therapieansätzen in den progressiven Verlauf eingreifen zu können.

Legende zu Abb. 7 auf der folgenden Seite: Ätiopathogenese des IPS. Zusammenfassende Darstellung wichtiger Pathomechanismen (a-g) und einiger Interaktionen im dopaminergen Neuron, welche vermutlich durch Altersdefizite, Umweltfaktoren und angeborene Gendefekte ausgelöst werden. Detaillierte Beschreibungen zu den einzelnen Mechanismen sind in Kapitel 2.3.2. zu finden (Ca²⁺: Kalzium, Na⁺: Natrium, K⁺: Kalium, α -KGDH: Ketoglutaratdehydrogenase, Kat: Katalase, DA: Dopamin, ADP: Adenosindiphosphat, K I: Komplex I der Atmungskette, SOD: Superoxid-Dismutase)

Abb. 7: Ätiopathogenese des IPS (dopaminerges Neuron)



2.4. Klinisches Bild der Parkinson-Krankheit

Die PD ist v.a. gekennzeichnet durch Störungen des motorischen Systems. Als Kardinalsymptome werden Bradykinesie, Rigor und Tremor angesehen, in späteren Stadien auch posturale Instabilität. Bradykinesie ist die Verlangsamung der Initiation von Willkürbewegungen mit progressiver Abnahme von Geschwindigkeit und Amplitude bei repetitiven Aktionen. Sie ist zu unterscheiden von der Hypokinesie, der Reduktion von Bewegungsamplituden und Spontanbewegungen, und der Akinesie, dem völligen Sistieren der Motorik (Gerlach und Riederer, 1996). Rigor ist eine Muskelstarre, welche vom Patienten als schmerzhafte Steifigkeit des gesamten Körpers empfunden wird. Beim Beugen der Gelenke ist eine generelle Tonuserhöhung der Muskulatur festzustellen. Im Gegensatz zu Bewegungsverminderung tritt auch Hyperkinesie, d.h. überschießende Bewegung, auf. Dieses Symptom führte zum Begriff „Schüttellähmung“ (Parkinson, 1817). Es handelt sich um einen Ruhetremor, d.h. in Phasen der Bewegungslosigkeit oder Entspannung einer Gliedmaße beginnt diese zu zittern, was häufig auf einer Körperseite stärker ausgeprägt ist. Posturale Instabilität äußert sich in der Unfähigkeit, auf Einwirkungen von außen (Stoß- und Zugtest) die Körperposition ohne Ausfallschritte zu halten oder sogar zu Fall zu kommen (Kandel, 1995). Die Krankheit beginnt in den meisten Fällen im Bereich der Arme häufig mit Schulterschmerzen, ein bis zwei Jahre später kann ein Nachziehen oder Hinken eines Beines hinzukommen. Das Gangbild wird kleinschrittig und das Schriftbild sehr flach (Mikrographie). Initiation und Termination von Bewegungen sind verzögert, repetitive Bewegungen werden mit verringerter Amplitude und deutlich langsamer ausgeführt. Die Mimik der Patienten wirkt ausdruckslos. Die Patienten weisen eine gebeugte Körperhaltung auf (Kandel, 1995; Lang und Lozano, 1998; Sian et al., 1999). Zu diesen Kardinalsymptomen kommen weitere Symptome. Störungen im Farbsehen und Riechstörungen werden auf einen Dopaminmangel in den betroffenen Nervenbahnen zurückgeführt und zählen zu den Frühsymptomen, die oft übersehen werden. Die Stimme wird leiser und monotoner im Verlauf der Erkrankung. Weiterhin wird als vegetative Symptomatik eine sehr trockene oder sehr fettige Veränderung des Hautbildes beschrieben und starker Speichelfluss, welcher jedoch eher durch Schluckstörungen bedingt ist (Gerlach, 2003).

Kognitive und neuropsychiatrische Störungen wie Demenz und Depression treten nicht selten im Zusammenhang mit dem IPS auf. Eine manifeste Depression entwickeln etwas 40% der PD-Patienten, wobei der Zeitpunkt des Auftretens auch vor der Ausprägung der Kardinalsymptome liegen kann (Poewe und Luginger, 1999). Bei etwa

20-28% der Patienten tritt eine Demenz auf (Aarsland et al., 1996). Ein kausaler Zusammenhang zwischen IPS und Demenz ist in diesen Fällen häufig schwer abzugrenzen, da die eigentliche Ursache der Demenz auch in der Entwicklung anderer neurodegenerativer Erkrankungen liegen kann (Alzheimer, vaskuläre Störungen). Es wird jedoch davon ausgegangen, dass Patienten mit PD im Vergleich zu ihrer Altersgruppe ein zwei- bis dreifach erhöhtes Risiko haben, eine Demenz zu entwickeln. Hinzu kommen in ca. 25-40% der Patienten visuelle Halluzinationen (Fenelon et al., 2000).

2.5. Diagnostik und Therapie der Parkinson-Krankheit

Diagnostik und Therapie des IPS sind eng miteinander verbunden, da der Zeitpunkt der Diagnosestellung die Möglichkeiten therapeutischer Eingriffe in den progressiven Verlauf der Erkrankung entscheidend beeinflusst. Das Nervensystem selbst ist im adulten Lebewesen nicht in der Lage durch Zellteilung oder Differenzierung dopaminerge Neurone der SN zu ersetzen. Therapiemaßnahmen zum Ersatz von Nervenzellen sind noch in der frühen Forschungsphase. Zukunftsweisende Therapiestrategien konzentrieren sich daher auf die Erhaltung der bei Diagnosestellung verbliebenen Neuronenzahl. Ein zukünftiges Ziel ist also nicht nur eine hohe Sicherheit in der Diagnosestellung, sondern v.a. auch eine verbesserte Früherkennung der Erkrankung, wobei moderne bildgebende Verfahren bereits Erfolge zeigen (Tolosa et al., 2006). Die klinische Diagnostik setzt mit dem Auftreten der motorischen Kardinalsymptome ein, wo die Neurodegeneration mit ca. 70-80% bereits weit vorangeschritten ist (Lang und Lozano, 1998; Schapira, 1999). Zumeist ist das Vorhandensein einer Differentialdiagnose (z.B. Multisystematrophie) mit ähnlicher Symptomatik die Ursache für Fehldiagnosen (Tolosa et al., 2006). Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung war nach bisherigen Erkenntnissen bereits seit etwa 5 Jahren eine progressive aktive Neurodegeneration vorhanden, welche in etwa 7 Jahren in einen Neuronenverlust von über 90% mündet, je nach Ausmaß der Progressivität (McGeer et al., 1988a). Für neuronenerrettende Eingriffe bzw. kausale Therapiestrategien verbleibt somit ein kurzes Zeitfenster (Abb. 8).

Die zur Zeit angewandte palliative Pharmakotherapie dient der Transmitter-Substitution, in erster Linie von DA mittels seiner Vorstufe **L-DOPA** (Birkmayer und Hornykiewicz, 2001). L-DOPA, eine Aminosäure, kann im Gegensatz zu DA durch aktiven Transport in das ZNS aufgenommen werden, um in dopaminergen Nervenendigungen via DOPA-Decarboxylase in DA umgewandelt zu werden (Abb. 2).

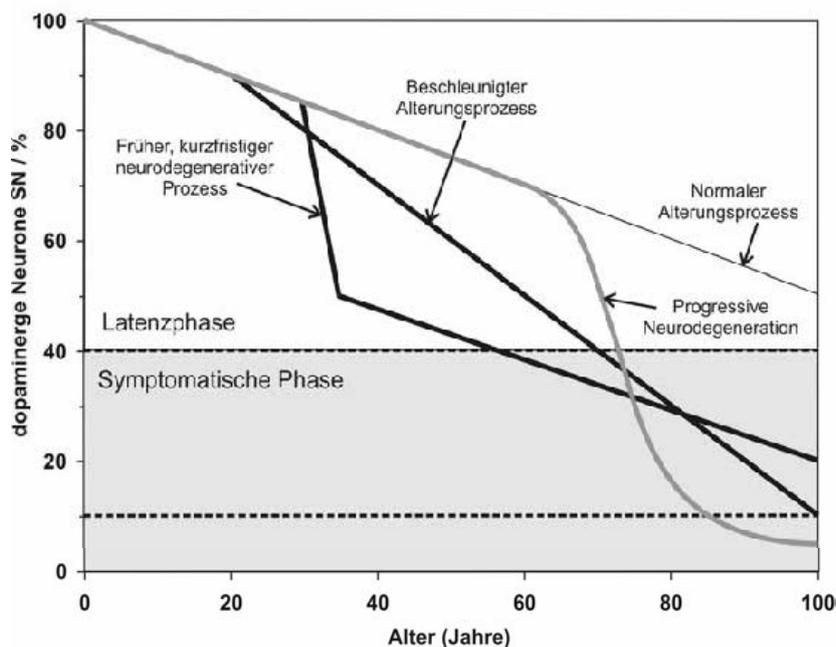


Abb. 8: Hypothetische zeitliche Verläufe der Degeneration dopaminerger Neurone der SN. Der progressive Neuronenverlust im IPS folgt einem exponentiellen Verlauf. Erst bei deutlichen klinischen Symptomen, zumeist erst ab einem Neuronenverlust von 70-80%, ist ein therapeutischer Eingriff möglich. Ab einem Verlust von über 90% der Neurone bieten neuroprotektive Eingriffe kaum eine Verbesserung der Symptomatik. Es bleibt ein Zeitfenster von etwa 7 Jahren (nach McGeer et al., 1988a).

Die Wirksamkeit von L-DOPA setzt daher noch ein Residualaufkommen an Nervenendigungen und funktionstüchtige postsynaptische Rezeptoren voraus. Es gilt als „Goldstandard“ in der Therapie von PD und wirkt v.a. den motorischen Kardinalsymptomen Bradykinesie und Rigor entgegen, verbessert die Lebensqualität und die Überlebensdauer der Patienten (Rajput, 2001). Die schwerste Problematik in der Anwendung von L-DOPA liegt in der Entwicklung von Dyskinesien, d.h. hyperkinetischen motorischen Komplikationen mit choreatischen oder dystonen Bewegungen (Shaw et al., 1980). Der Pathomechanismus ist noch nicht aufgeklärt, beschleunigt wird dieser Prozess jedoch, wenn aufgrund hoher Schwankungen der Wirkspiegel von L-DOPA pulsatile Rezeptorstimulationen auftreten, und die Denervation dopaminerger Nervenfasern im Striatum bereits weit fortgeschritten ist (Obeso et al., 2000).

Zusätzlich ist durch eine **Hemmung der MAO-B**, dem zentralen DA abbauenden Enzym (vgl. Abb. 3), als Monotherapie in der Frühphase der Erkrankung oder als Additivum zu L-DOPA eine Erhöhung des verfügbaren DA möglich (Birkmayer et al., 1975). Durch die beschriebenen Spätkomplikationen von L-DOPA sollte so spät und gering dosiert wie möglich mit dieser Therapie begonnen werden. Daher sollten v.a. in der Frühphase der Erkrankung **Dopaminrezeptoragonisten** eingesetzt werden (Nyholm, 2006). Adamantane mit dem bedeutendsten Wirkstoff Amantadin sind seit 1969 als Therapeutikum mit unbekanntem Wirkmechanismus verwendet worden, bis sie als nichtkompetitive **NMDA-Rezeptorantagonisten** identifiziert wurden. Sie zeigen nicht nur moderate positive Effekte auf Bradykinesie und Rigor, sondern vermindern auch den Schweregrad von L-DOPA-

induzierten Dyskinesien bei gleichzeitiger Senkung der L-DOPA Dosierung (Del Dotto et al., 2001). Die antidyskinetischen Effekte von Amantadin sind nur für etwa 8 Monate zu erwarten (Thomas et al., 2004). Antagonisten mit Affinität zum muscarinergen Acetylcholinrezeptor sind die ältesten der heute noch verwendeten Therapeutika der Parkinson-Krankheit, wobei Belladonna-Alkaloide (u.a. Atropin aus der Tollkirsche, Atropa Belladonna) bereits im 19. Jahrhundert verabreicht wurden. Vermutlich wirken sie dem Ungleichgewicht zwischen cholinerg und dopaminerg Neurotransmission im Striatum beim IPS entgegen (Katzenschlager et al., 2003).

Zukunftsweisende Therapiestrategien sollten in den progressiven Verlauf der Neurodegeneration eingreifen, und die verbliebenen Neurone schützen. Tab. 1 listet potentiell **neuroprotektive Substanzen** auf, welche z.T. bereits in Tiermodellen angewendet wurden, in klinischen Studien jedoch noch keine durchschlagenden Erfolge erzielen konnten (Meissner et al., 2004; Olanow und Jankovic, 2005; Schapira, 2005).

Wirkungsbereich	Substanzen, Wirkstoffgruppen
Pro-mitochondrial	Coenzym Q10, Kreatin, Nikotinamid, Riboflavin, essentielle Fettsäuren
Anti-exzitotoxisch	NMDA-Rezeptorantagonisten, Antagonisten/Agonisten metabotroper Glutamatrezeptoren, Inhibitoren der Glutamat-Ausschüttung und -Wiederaufnahme, Kalziumkanal-Blocker, NO-Inhibitoren
Anti-oxidativ	MAO-B-Inhibitoren, Radikalfänger (Antioxidantien, Vitamin C, E), Eisen-Chelatoren, Dopaminagonisten
Anti-apoptotisch	Propargylamine, Caspase-Inhibitoren, Cyclosporin, c-Jun-N-terminal-Kinase (JNK)-Inhibitoren, Dopaminagonisten, MAO-B-Inhibitoren
Anti-inflammatorisch	Steroide, Nichtsteroidale Antiphlogistika, Minocyclin
Pro-neurotrophisch	BDNF (brain-derived neurotrophic factor), FGF (fibroblast growth factor), GDNF (glial-derived neurotrophic factor), Östrogene

Tab. 1: Auflistung potentiell neuroprotektiver Substanzen sortiert nach den Angriffspunkten im Pathomechanismus des IPS (nach Olanow und Jankovic, 2005; Schapira, 2005).

Einen aktuellen Therapieansatz bieten möglicherweise Neurosteroiden wie Dehydroepiandrosteron (DHEA), welche unabhängig von peripheren Steroidhormonen im Gehirn aus Cholesterol gebildet werden. Sie zeigten im akuten MPTP-Modell bereits neuroprotektive Effekte (D'Astous et al., 2003).

Chirurgische Verfahren werden angewandt, wenn die Erkrankung pharmakologisch nicht mehr zu einem für den Patienten vertretbaren Maß behandelt werden kann. Es werden

stereotaktische operative Verfahren (Thermokoagulation, Tiefenhirnstimulation) angewandt (Benabid et al., 1994; Lozano und Mahant, 2004). Die Transplantation von Stammzellen in das nigrostriatale System (Bjorklund et al., 2003) und die Gentherapie (Dunnett und Bjorklund, 1999) sind noch in der experimentellen Phase.

Zusammenfassend ist die Therapie des IPS zurzeit symptomatisch, obgleich sie rational auf dem Ersatz des fehlenden Transmitters DA basiert. Das Aufhalten oder zumindest Verlangsamten des fortschreitenden Neuronenverlustes als pathologisches Hauptkriterium der Erkrankung wird durch die bisherige Therapie nicht ermöglicht. Um mögliche neuroprotektive Therapieansätze zu erforschen, müssen akute und chronische Effekte von potentiell neuroprotektiven Substanzen in gut charakterisierten Tiermodellen an progressiven Neuronenverlusten gemessen werden, um prospektive Aussagen über die Wirkung im Humanpatienten treffen zu können, denn im Menschen scheint ein selbstunterhaltender Degenerationsprozess vorzuliegen, der keiner äußeren Einwirkung mehr bedarf (Meissner et al., 2004; Schober, 2004). Für keines der im folgenden Kapitel vorgestellten Tiermodelle ist bislang eine progressive Neurodegeneration beschrieben worden, und Neuronenverluste sind an die stetige Einwirkung einer neurotoxischen Substanz gebunden.

2.6. Tiermodelle der Parkinson-Krankheit

Tiermodelle sind zur präklinischen Erforschung der Ätiopathogenese und zur Testung von Therapiestrategien unverzichtbar, denn ein komplexes neuronales Netzwerk kann durch Zellkulturen nicht modelliert werden. Um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit zur Erkrankung des Menschen zu gewährleisten, sollten Tiermodelle die pathologischen, klinischen und therapeutischen Merkmale des IPS widerspiegeln (Gerlach und Riederer, 1996).

Im Tier konnte bisher kein spontan auftretendes Parkinson-Syndrom beobachtet werden. Es existieren jedoch einige Spontanmutanten, welche in Maus- und Ratten-Inzuchtlinien auftraten, in denen Veränderungen des dopaminergen Systems und motorische Defizite beschrieben sind. Hierzu gehören z.B. die *weaver*-Maus, welche jedoch zu degenerativen Veränderungen im dopaminergen System v.a. auch Kleinhirnveränderungen zeigt, die im IPS nicht beschrieben sind (Ebadi et al., 2005). Die *AS/AGU*-Ratte besitzt eine rezessive Mutation für eine Isoform der Proteinkinase C, einem sehr wichtigen Protein der Signaltransduktion, und zeigt neurodegenerative Veränderungen im dopaminergen und serotonergen System,

welche mit einem Transmittermangel beginnen und mit motorischen Defiziten einhergehen (Al-Fayez et al., 2005). Die ursächlichen Mutationen sind in Formen der Parkinson-Krankheit nicht beschrieben, dennoch können diese Modelle Einblicke in pathologische Prozesse des dopaminergen Systems geben.

Es ist andererseits möglich, mittels pharmakologischer, experimenteller und gentechnischer Eingriffe im Tierversuch verschiedene Merkmale der Erkrankung zu erzeugen. Verwendet werden hierfür verschiedene Spezies vom Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*) und der Taufliege (*Drosophila melanogaster*) über Maus, Ratte und Katze bis hin zu niederen Primaten (Betarbet et al., 2002b; Link, 2001).

2.6.1. Genetische Tiermodelle

Die beschriebenen monogenetisch kausalen Parkinson-Syndrome führten zu dem Versuch, durch gezielte Ausschaltung von Genen (knock-out) oder den Einbau von humanen Defekt-Genen im Erbgut von Tieren (transgen) ein Tiermodell mit vergleichbaren Charakteristika zu erzeugen. Weiterhin lassen molekularbiologische Eingriffe in Gene mit bekannten Produkten Aussagen über deren Funktion und Bedeutung in der Pathogenese des IPS treffen (Miller und Federoff, 2005; Morris, 2005). Gentechnische Tiermodelle im eigentlichen Sinne können bisher nur in Invertebraten und in der Maus erzeugt werden.

Tab. 2 zeigt eine Übersicht bedeutender genetischer Tiermodelle in der Maus und ihre Charakteristika. Keines dieser genetischen Tiermodelle auf Basis der PARK-Mutationen im Menschen erfüllt bislang die Kriterien eines Parkinson-Modells, v.a. wurde kein Verlust dopaminergener Neurone der SN erreicht. Unter Beachtung der Annahme, dass in der Ätiopathogenese des IPS wahrscheinlich eine Kombination von genetischen Defekten mit Umwelteinflüssen und Altersdefiziten wirksam ist, können diese Modelle jedoch zur Erforschung dieser Zusammenhänge dienen. Die Erforschung therapeutischer Strategien dagegen muss kritisch betrachtet werden (Farrer, 2006; Fleming et al., 2005; Link, 2001).

PARK	Alter/ Jahre	Gen/Mutation	Produkt	Funktion	Pathologie im Mausmodell	Klinik im Mausmodell
1 / 4	24-65	SNCA/dominant/ Du-/Triplikation	α -Synuclein	TH-Inhibitor, Membrantransport, Signaltransduktion	Lewy- Körperchen, striatale Defizite (DA, TH, DAT)	reduzierte lo- komotorische Aktivität und Koordination
2	ca.30	PARK2/rezessiv/ Deletion	Parkin	E3-Ubiquitin- Ligase	striatale Defizite (DAT, AK), DA erhöht	reduzierte lo- komotorische Aktivität
5	55-58	UCH-L1	UCH-L1- Protein	Ubiquitin- Rückgewinnung	kein Modell vorhanden	
6	20-40	PINK1/rezessiv/ Deletion	PINK1 (Kinase)	mitochondriale Funktion	kein Modell vorhanden	
7	20-40	DJ1/rezessiv/ Deletion	DJ1-Protein	exprimiert bei oxidativem Stress	naiv unauffällig; erhöhter Effekt bei Läsionierung	reduzierte lo- komotorische Aktivität
8	50-70	LRRK2/dominant e Substitutionen	LRRK2- Protein	Kinase	kein Modell vorhanden	
keine hereditäre Ätiologie; experimentelle Eingriffe in die Entwicklung des dopaminergen Systems		Nurr1-heterozygot /Depletion	Nurr1- Protein	nucleärer Rezeptor	striatales DA- Defizit, altersab- hängig nigrale Degeneration	reduzierte lo- komotorische Aktivität, Koordination
		Pitx3/Depletion	Pitx3- Protein	Transkriptions- faktor	nigrale Degene- ration, 90% DA- Defizit striatal	reduzierte lo- komotorische Aktivität

Tab. 2: Gendefekte und genetische Mausmodelle der Parkinson-Krankheit. Übersicht der monogenetisch determinierten Formen der Parkinson-Krankheit, die sich im genannten Alter manifestieren, und für die das zugehörige Genprodukt und dessen Funktion identifiziert wurden, mit Pathologie und Klinik im genetischen Mausmodell. Zusätzlich sind zwei genetische Mausmodelle aufgeführt, welche durch Eingriffe in die Regulation der Entwicklung des dopaminergen Systems erzeugt wurden. Auf den PARK-Mutationen basierende Mausmodelle sind ätiologisch verwandt mit den Humanpatienten, zeigen jedoch nicht die im Menschen gefundene Pathologie. Eingriffe in die Entwicklung des dopaminergen Systems sind ätiologisch noch nicht begründbar, führen jedoch zu einer nigralen Degeneration (nach Fleming et al., 2005).

2.6.2. Pharmakologisch induzierte Tiermodelle

In pharmakologisch induzierten Tiermodellen können durch den Eingriff eines Wirkstoffes in das nigrostriatale dopaminerge Transmittersystem motorische Störungen transient erzeugt werden. Die Effekte sind nicht von morphologisch erkennbaren neurodegenerativen Veränderungen begleitet, wodurch die Eignung dieser Modelle zur Erforschung von Therapiestrategien und Pathomechanismen stark eingeschränkt ist. Der Zusammenhang zwischen der motorischen Symptomatik und dem dopaminergen System wurde bereits 1957 durch die Applikation von Reserpin hergestellt, wobei ein akinetischer Zustand induziert wurde, der mit einer Abnahme von Katecholaminen im ZNS einher ging und nach Gabe von L-DOPA reversibel war (Carlsson et al., 1957; Hornykiewicz, 1963). Auf diesen Untersuchungen basieren alle weiteren Erkenntnisse über die Pathophysiologie der

Erkrankung. Reserpin führt zu einer Depletion der Transmitter katecholaminerger Neurone, indem es den VMAT-2 hemmt und somit die Speicherung der Katecholamine in intrazellulären Vesikel unterbindet (Metzger et al., 2002). Dopaminrezeptorantagonisten (z.B. Haloperidol) lösen im Ratten- und Mausmodell dosisabhängig Katalepsie aus (Sanberg, 1980). Ein kataleptischer Zustand entsteht aus Akinesie und Rigor, wodurch die Korrektur unphysiologischer Körperhaltungen verzögert ist (Lorenc-Koci et al., 1996; Sanberg et al., 1988). Diese Modelle werden verwendet, um Wirkstoffe mit potentiellen Einflüssen auf das dopaminerge Transmittersystem zu untersuchen, wobei beachtet werden muss, dass Reserpin auch andere Katecholamine (v.a. Noradrenalin) beeinflusst (Dekundy et al., 2006; Gossel et al., 1995).

2.6.3. Experimentell induzierte Neurodegeneration in Tiermodellen

Unter Verwendung von Neurotoxinen wird eine möglichst selektive Degeneration nigraler dopaminergener Neurone herbeigeführt. Die Verwendung der Toxine Rotenon, 6-Hydroxydopamin (6-OHDA), MPTP und Paraquat im Tiermodell sind für die Aufklärung beteiligter Pathomechanismen und Therapieansätze im IPS von großer Bedeutung (Betarbet et al., 2002b).

2.6.3.1. Rotenon-Rattenmodell

Rotenon ist eine natürlich vorkommende Substanz und kann aus subtropischen Pflanzen (Leguminosen, Gattung: Derris oder Lonchocarpus) gewonnen werden. Es wird als Pestizid in der Landwirtschaft und insbesondere in der Fischzucht als bestandsregulierendes Gift eingesetzt (Uversky, 2004). Die Exposition mit Pestiziden wird im Zusammenhang mit einer erhöhten Prävalenz der Landbevölkerung an IPS zu erkranken als potentieller Risikofaktor in der Ätiologie der Erkrankung betrachtet (Gorell et al., 1998; Kamel et al., 2001; Le Couteur et al., 1999). Als hoch potenter und spezifischer Hemmstoff des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette (vgl. Abb. 6) wird es auch seit längerem in der Forschung verwendet. Da Rotenon als Pestizid und Umweltgift an der Ätiologie des IPS beteiligt sein könnte (Kamel et al., 2001), und zum anderen mitochondriale Dysfunktionen in der Pathogenese der Erkrankung wahrscheinlich eine bedeutende Rolle spielen (Schapira et al., 1990), ist Rotenon ein potentieller Kandidat zur Entwicklung eines Toxinmodells (Uversky, 2004). Rotenon zerfällt innerhalb weniger Tage nahezu vollständig, wenn es Sonnenlicht ausgesetzt ist, und in 1-3 Tagen im Erdboden oder in Wasser (Hisata, 2002). Daher ist eher die direkte Exposition

und Inhalation oder die Aufnahme über Nahrungsmittel epidemiologisch von Bedeutung, als eine Grundwasserbelastung. Nach oraler Aufnahme wird Rotenon jedoch kaum resorbiert und die Leber baut die Substanz effizient ab, wie in Toxizitätsstudien an Ratten und Hunden über bis zu 24 Monate gezeigt wurde. In diesen Untersuchungen wurden keine neuropathologischen Effekte im Gehirn oder Verhaltensauffälligkeiten beschrieben (Gorell et al., 1998; Marking, 1988). Als hochlipophile Substanz ist eine Passage biologischer Membranen und der BHS durch Rotenon gegeben (Abb. 9).

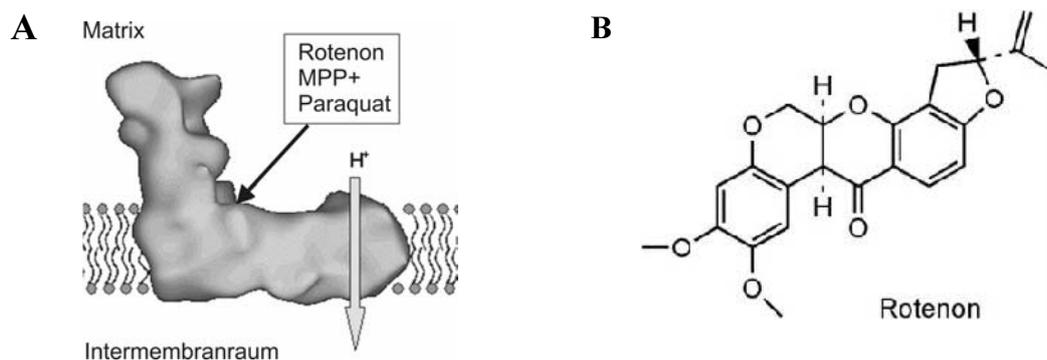


Abb. 9: Der mitochondriale Komplex I und Rotenon. (A) Der mitochondriale Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase) schematisch nach elektronenmikroskopischen Daten. Dieser große Enzymkomplex durchspannt die innere Mitochondrienmembran und reduziert mittels Reduktionsäquivalenten v.a. aus dem Citratcyclus Ubichinon zum Ubihydrochinon. Dabei werden Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum transportiert. Der entstehende Protonengradient wird für die Synthese von ATP genutzt. Der Angriffspunkt dreier Inhibitoren ist gekennzeichnet (modifiziert nach Guenebaut et al., 1997). (B) Chemische Formel von Rotenon mit hoch-lipophiler Struktur (Bove et al., 2005).

Ein radioaktiv markiertes Analogon von Rotenon zur Darstellung der Komplex I-Bindung erreicht nach intravenöser (i.v.) Applikation innerhalb von 15 Minuten (min) maximale Gewebespiegel im Gehirn, welche v.a. in den ersten 6 Stunden (h) schnell abfallen und nach 24 h kaum noch messbar sind. Es verteilt sich entsprechend der oxidativen Aktivität des Nervengewebes heterogen, wobei es innerhalb der Basalganglien eine höhere Bindung im Striatum als in der SN zeigt. Diese Bindung konnte durch eine i.v. Injektion von Rotenon stark reduziert werden (Talpage et al., 2000). In einer weiteren Studie wurde Rotenon im Gehirn der Ratte und der Maus nach systemischer Applikation bestimmt und die Passage der BHS nachgewiesen (Caboni et al., 2004; Ilivicky und Casida, 1969). Im Gehirn passiert es zelluläre Membranen und kann in Zellorganellen, wie z.B. Mitochondrien, eindringen (Schuler und Casida, 2001). Weiterhin depolymerisiert Rotenon Mikrotubuli in Tubulinmonomere. Tubulinmonomere wurden als Substrate der Protein-Ubiquitin-Ligase Parkin des Proteasom-Komplexes identifiziert, die in einer monogenetisch determinierten

Form von PD fehlt. Ihr Mangel könnte den Abbau dieser sich unter Einfluss von Rotenon anhäufenden Proteine verlangsamen und somit Proteinaggregate fördern (Ren et al., 2003). Bevor Rotenon in Tiermodellen eingesetzt wurde, lagen bereits Daten aus Zellkulturexperimenten vor. So wurde z.B. eine höhere Sensibilität dopaminerger Neurone für die Toxizität von Rotenon und eine Reduktion der Transmitter-Wiederaufnahme im Vergleich zu GABAergen Neuronen festgestellt (Marey-Semper et al., 1995). Im Rahmen der Untersuchungen mitochondrialer Toxizität von MPP⁺ wurde Rotenon stereotaktisch in das nigrostriatale System der Ratte appliziert, was eine DA- und Serotonindepletion im Striatum zur Folge hatte (Nicklas et al., 1985). Erste **systemische Applikationen** bei der Ratte ergaben nach i.v. Injektion von 10-18 mg/kg Rotenon täglich über eine Woche eine selektive Läsionierung des Striatums und des GPi/e mit Neuronenschädigung und Gliose. In dieser Untersuchung waren nigrale dopaminerge Neurone nicht betroffen (Ferrante et al., 1997). Subkutane (s.c.) Injektionen von 15 mg/kg einmalig oder 1,5 mg/kg Rotenon dreimal wöchentlich über 3 Wochen in der Maus führten nicht zu einer Abnahme des striatalen Dopamingehaltes, erhöhten jedoch akut den Dopaminmetabolismus (Thiffault et al., 2000). Erste selektive Schädigungen des nigrostriatalen Systems nach systemischer Applikation von Rotenon wurden nach kontinuierlicher chronischer (28 Tage) i.v. Injektion von 2-3 mg/kg täglich in der Ratte qualitativ beschrieben (Betarbet et al., 2000; Greenamyre et al., 1999). Im Gehirn wird bei dieser Dosierung ein Gehalt an Rotenon von etwa 20-30 nM erreicht. Basierend auf Daten aus Zellkulturexperimenten wird dadurch eine partielle Hemmung des Komplex I, nicht aber eine Störung der ATP-Synthese verursacht. Daraus resultierende Mechanismen wie oxidativer Stress, Exzitotoxizität, Proteinaggregation und Apoptose spielen wahrscheinlich auch in vivo eine größere Rolle als ein ATP-Mangel (Sherer et al., 2002; Sherer et al., 2001c). Bei kontinuierlicher chronischer (28-56 Tage) s.c. Injektion der gleichen Dosis wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, jedoch zeigten die Tiere einen besseren allgemeinen Gesundheitszustand. Die Letalität betrug in diesem Modell 36%. Nur ca. 50% der überlebenden Tiere zeigten Läsionen des nigrostriatalen Systems (Sherer et al., 2003b). Die Degeneration beginnt bilateral symmetrisch im Striatum und je nach Ausprägung und Ausweitung der läsionierten Fläche resultiert ein Verlust nigraler Neurone (keine Quantifizierung in dieser Studie). Weitere dopaminerge Systeme (VTA, olfaktorischer Bulbus, N. accumbens) und postsynaptische GABAerge striatale Neurone schienen nicht betroffen zu sein. Es wurden Rigor, Bradykinesie und Tremor beobachtet, wobei sowohl läsionierte als auch nichtläsionierte Tiere Störungen des motorischen Verhaltens zeigten. In den verbliebenen dopaminergen Neuronen der SN wurden eosinophile zytoplasmatische

Einschlusskörperchen gefunden, welche α -Synuclein enthielten und in ihrer Struktur den Lewy-Körperchen stark ähnelten (Sherer et al., 2003b). Weiterhin wurden in diesem Modell aktivierte Mikroglia im Striatum und der SN nachgewiesen (Sherer et al., 2003a). Die hohe Selektivität für das dopaminerge System im Gegensatz zu den vorangegangenen Studien wurde durch die geringere Dosis und die besonders hohe Empfindlichkeit des Rattenstammes „Lewis“ im Gegensatz zu „Sprague-Dawley“ und „Wistar“ diskutiert (Sherer et al., 2003b). Eine weitere Studie zeigte nach chronischer intraperitonealer (i.p.) Injektion von 1,5-2,5 mg/kg Rotenon in „Sprague-Dawley“ Ratten eine signifikante Verringerung der DA- und Dopaminmetabolitspiegel im Striatum. Neurodegenerative Veränderungen in der SN wurden nicht untersucht, das Körpergewicht der Tiere war in diesen Dosierungen nicht vermindert (Alam und Schmidt, 2002). Unter Verwendung der beschriebenen Methodik von Betarbet et al. (2000) wurde in einer Folgestudie die selektive Toxizität von Rotenon für das dopaminerge System nicht bestätigt. Quantitative Analysen zeigten eine Reduktion der dopaminergen Neurone der SNc um 28% und eine um 55% geringere Dichte striataler dopaminergener Nervenfasern in Rotenon-behandelten Ratten. Wie bereits in diesem Modell auch zuvor beschrieben, variierte die Morphologie der striatalen Läsion von zentral und kreisförmig umschrieben bis diffus. Hinzu kam jedoch auch eine um 35% reduzierte Dichte des Serotonintransporters, eine um 25% reduzierte Anzahl GABAerger Projektionsneurone und eine um 22% reduzierte Anzahl cholinergener Interneurone (Höglinger et al., 2003). Diese nichtspezifischen striatalen Läsionen wurden in einer weiteren Studie basierend auf der von Sherer et al. (2003b) beschriebenen s.c. Applikation ebenso nachgewiesen. Hier wurden die Tiere auch auf periphere Schädigungen weiterer Organsysteme untersucht, wobei bereits nach wenigen Tagen deutliche Hinweise z.B. einer Lebernekrose gefunden wurden. Die in Rotenon-behandelten Ratten beschriebenen motorischen Verhaltensdefizite wurden zumindest z.T. darauf zurückgeführt (Lapointe et al., 2004). Aktuelle Untersuchungen zum Rotenon-Modell bestätigen nach i.v. und s.c. Injektion in der Ratte die beschriebene Letalität von ca. 40%. Der Vergleich zwischen Rotenon-behandelten und Kontrolltieren in der Anzahl dopaminergener Neurone der SNc und der Dichte striataler dopaminergener Nervenfasern zeigte keinen signifikanten Unterschied. Eine Aufteilung der Tiergruppe nach Abweichung vom Kontrollwert ergaben jeweils in etwa 50% der behandelten Tiere eine Reduktion der nigralen Neuronenzahl von 10% und der optischen Nervenfaserdichte von 30-63%, allerdings bestand kein Zusammenhang zwischen Neuronenzahl und Faserdichte (Fleming et al., 2004; Zhu et al., 2004). Der Einfluss von L-DOPA auf die beschriebenen Verhaltenseffekte wurde nur

nach lokaler stereotaktischer Applikation von Rotenon in das mediale Vorderhirnbündel der Ratte untersucht, was eine deutliche Verbesserung der akinetischen und kataleptischen motorischen Defizite hervorrief (Alam und Schmidt, 2004). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass nach den beschriebenen Injektionsschemata etwa 40% der Ratten sterben, und von den verbliebenen Tieren 50% eine in der Ausprägung innerhalb des dopaminergen Systems und der Ausweitung auf andere Systeme variierende Läsionierung durch Rotenon zeigen. Die systemische Toxizität und das Auftreten von Verhaltenseffekten in neuropathologisch unauffälligen Tieren ließen Zweifel am Zusammenhang der motorischen Defizite mit den zentralen Läsionen aufkommen (Zhu et al., 2004). Daher erscheint das Rotenon-Modell noch nicht ausreichend etabliert und validiert, um Effekte neuroprotektiver Substanzen ausreichend gesichert untersuchen zu können. Dennoch schädigt Rotenon offensichtlich dopaminerge Neurone in der Ratte, beginnend im Striatum und abhängig von der Zeitdauer der Exposition und der individuellen Suszeptibilität. Dies und das Auftreten von den Lewy-Körperchen ähnlichen Einschlüssen bieten interessante neue Aspekte im Vergleich zu 6-OHDA und MPTP (s. folgende Kap.) in der Erforschung der Pathogenese des IPS, denn diese Charakteristika finden sich auch in der Erkrankung des Menschen wieder (Perier et al., 2003; Uversky, 2004). Rotenon wurde in der Direktive 98/8/EC der Europäischen Kommission als bioaktive Substanz in den Annex I aufgenommen, und ist daher seit dem 1. 9. 2006 in der Europäischen Union nicht mehr zugelassen. In Norwegen war in der Vergangenheit noch ein Produkt auf dem Markt, welches in großen Mengen zur Bekämpfung von Fischparasiten der Lachspopulation in Gewässer geleitet wurde. Die hohe Toxizität der Substanz auf die Fischpopulation, bekannte Einflüsse auf Reproduktionsmechanismen, ein kanzerogenes Potential und auch die Zusammenhänge mit PD führten zu einer Verweigerung des Ausnahmeantrages der norwegischen Regierung¹. In der Schweiz ist Rotenon dagegen noch als Pflanzenschutzmittel zugelassen².

¹[[http://forum.europa.eu.int/Public/irc/env/biocides_uses/library?l=/rotenone_160506&vm=detailed&sb=Title.](http://forum.europa.eu.int/Public/irc/env/biocides_uses/library?l=/rotenone_160506&vm=detailed&sb=Title)]

²[http://www.swissfruit.ch/saio_wirkstoffe_2006_d-2.pdf]

2.6.3.2. 6-OHDA-Modell

6-OHDA war das erste Neurotoxin, welches einen spezifischen Effekt auf katecholaminerge Neurone zeigte, da es über die jeweiligen Monoamintransporter (DAT, vgl. Abb. 3) in die Zellen gelangt und neurodegenerative Prozesse einleitet (Sachs und Jonsson, 1975; Ungerstedt, 1968). Bei zusätzlicher Gabe eines Inhibitors des Noradrenalintransporters (z.B. Desipramin) kann die Selektivität für das dopaminerge System weiter erhöht werden

(Thoenen und Tranzer, 1973). 6-OHDA kann als hydrophiles Molekül (s. Abb. 10) die BHS nicht überwinden und muss daher stereotaktisch injiziert werden. Es wird intrazisternal, intraventrikulär und intrazerebral appliziert. Injektionen in den Liquor führen zu unspezifischer Verteilung der Substanz, erhöhen somit die Auswirkungen auf nichtdopaminerge Neuronensysteme und führen durch ausgeprägte bilaterale Läsionen zu einer starken Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens. Die intrazerebrale Injektion bietet die Möglichkeit das Toxin gezielt lokal und unilateral oder bilateral zu applizieren (Perese et al., 1989; Schwarting und Huston, 1996).

Der Pathomechanismus, welcher zum Absterben dopaminergener Neurone durch 6-OHDA führt, ist auch heute noch nicht vollständig geklärt. Die strukturelle Ähnlichkeit von 6-OHDA zu DA bedingt gleiche Abbauwege, so dass der hierdurch ausgelöste oxidative Stress messbar erhöht wird (Graham, 1978; Heikkila und Cohen, 1972; Sachs und Jonsson, 1975). Bei der Metabolisierung von 6-OHDA wird ähnlich wie im Dopaminstoffwechsel H_2O_2 frei (Abb. 10), welches eisenkatalysiert Hydroxylradikale bildet (Fenton-Reaktion). Diese Vorgänge sind an den Eisengehalt der Neurone gekoppelt und lassen sich durch eisenbindende Substanzen reduzieren oder durch eine Injektion von Eisen vergleichbar auslösen (Ben-Shachar und Youdim, 1991). Des Weiteren verringert 6-OHDA den Gehalt an intrazellulären Antioxidantien (Perumal et al., 1992). 6-OHDA selbst scheint auch direkt an der mitochondrialen Atmungskette anzugreifen (Glinka und Youdim, 1995). Zudem führen freie Radikale und ROS zu einer weiteren Hemmung des Komplex I, wodurch wiederum oxidativer Stress entsteht (Cleeter et al., 1992). Auch immunreaktive Mechanismen spielen im Pathomechanismus von 6-OHDA eine neurotoxische Rolle (Stromberg et al., 1986).

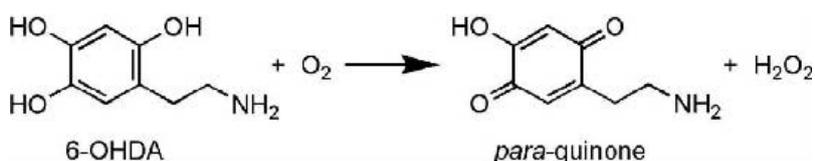


Abb. 10: Oxidation von 6-OHDA und Entstehung von reaktiven Molekülen, wodurch oxidativer Stress gefördert wird (Przedborski und Ischiropoulos, 2005).

Bei direkter lokaler Applikation des Toxins in die SN oder in nigrostriatale Bahnen (v.a. in das mediale Vorderhirnbündel) beginnt die Neurodegeneration innerhalb von 24 h, wodurch in 2-3 Tagen eine Depletion des Dopamingehaltes im Striatum hervorgerufen wird. Möglich ist diese direkte Toxizität, da der DAT auch auf den Dendriten dopaminergener Neurone exprimiert ist (Faull und Laverty, 1969). Bei Applikation von 6-OHDA in das Striatum wird es über den DAT in die dopaminergen Nervenendigungen aufgenommen und erzeugt eine

langsamere retrograde nigrale Neurodegeneration, welche nach ca. einer Woche beginnt und mehrere Wochen anhält (Przedborski et al., 1995). In diesem Fall sind auch apoptotische Mechanismen der Degeneration nachweisbar, so dass dieses Modell pathogenetisch eher dem IPS entspricht. Die striatale Applikation wird daher bei der Testung therapeutischer Strategien häufiger herangezogen. Die Dopamindepletion im Striatum und die nigrale Degeneration sind jedoch weniger ausgeprägt. Eine 60-70%ige striatale Depletion und eine 50-60%ige nigrale Degeneration muss erreicht sein, bevor Verhaltenseffekte sichtbar werden. Bei einmaliger Applikation kann dies nur gewährleistet werden, indem mehrfach über das Striatum verteilt injiziert wird (Kirik et al., 1998; Przedborski et al., 1995). Es besteht zudem die Möglichkeit, das Toxin unilateral oder bilateral zu applizieren. Das erste und am häufigsten verwendete 6-OHDA-Modell ist das so genannte unilaterale Rotationsmodell in der Ratte nach Ungerstedt (Ungerstedt, 1968). Die einseitige Läsionierung des dopaminergen Systems (SN, mediales Vorderhirnbündel, Striatum) führt durch die unterschiedlich aktiven Hemisphären zu einem charakteristischen Drehverhalten nach Injektion von Dopaminagonisten (Apomorphin) oder Substanzen, welche DA aus den striatalen Nervenendigungen freisetzen („Release“, z.B. Amphetamin). Bilateral injizierte Ratten wären für die Testung neuroprotektiver Therapiestrategien geeigneter, da sie eher der Pathomorphologie der Parkinson-Krankheit entsprechen, und mögliche Interaktionen zwischen den Hemisphären protektive Einflüsse nicht maskieren oder verstärken können. Die Tiere entwickeln jedoch eine ausgeprägte Akinesie und eine hohe Mortalität (Gerlach und Riederer, 1996; Roedter et al., 2001). Auch Mäuse, Katzen, Hunde und Affen zeigen neurodegenerative Veränderungen nach Injektion von 6-OHDA, sind aber aufgrund der größeren ethischen Problematik, des höheren Aufwandes oder der weniger gut etablierten stereotaktischen Methoden selten verwendet worden (Gerlach und Riederer, 1996). Das 6-OHDA-Modell wird durch akute Applikation eines Neurotoxins induziert und zeigt nicht die progressive Neurodegeneration über einen langen Zeitraum des IPS im Menschen. Des Weiteren wurden in diesem Modell keine den Lewy-Körperchen ähnlichen zytoplasmatische Einschlüsse beschrieben (Schober, 2004). Trotz dieser Nachteile wurde das Modell in der Erforschung pathogenetischer Zusammenhänge zum oxidativen Stress und zur Testung pharmakologischer Strategien erfolgreich eingesetzt (Bove et al., 2005; Schwarting und Huston, 1996). Aussagen über den Erfolg neuroprotektiver Substanzen sind im akuten 6-OHDA-Modell nur eingeschränkt möglich, so war z.B. die Applikation von Vitamin E in diesem Modell sehr erfolgreich, was sich in klinischen Studien jedoch nicht bestätigen ließ (Group, 1993).

2.6.3.3. MPTP- und Paraquat-Modell

Ein bedeutender Schritt in der Erforschung der Pathogenese des IPS war die Erkenntnis, dass ein persistierendes Parkinson-Syndrom durch die Injektion des Toxins **MPTP** (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin) im Menschen induziert werden kann (Davis et al., 1979; Jakowec und Petzinger, 2004; Langston et al., 1983). Da MPTP als hochlipophile Substanz die BHS leicht überwindet, kann es systemisch appliziert werden. Die Giftung findet durch Biotransformation in Astrozyten mittels der MAO-B statt. Das daraus entstehende 1-Methyl-4-phenyl-pyridiniumion (MPP^+) wird über den DAT in dopaminerge Neurone aufgenommen, woraus sich die Selektivität der Toxizität erklärt. In dopaminergen Neuronen reichert es sich in den Mitochondrien an und hemmt den Komplex I der Atmungskette (Schapira et al., 1990). Diese Erkenntnisse führten schließlich zu den Hypothesen, dass im IPS mitochondriale Dysfunktionen und weitere vergleichbare Pathogenesemechanismen vorhanden sein könnten, welche bestätigt werden konnten (Markey et al., 1984; Schapira et al., 1990). Ratten sind aus noch ungeklärter Ursache resistenter gegenüber der Toxizität von MPP^+ als Mäuse oder Primaten (Giovanni et al., 1994). Im Mausmodell führt MPTP schnell und ausgeprägt zu einer Dopamindepletion, und 1-3 Tage nach akuter Injektion ist die Neurodegeneration abgeschlossen. Eine progressiv voranschreitende Neurodegeneration ohne weitere Applikationen des Toxins ist im MPTP-Modell nicht erreichbar. Zudem fehlen Lewy-Körperchen, ein Hauptkriterium des IPS, sowie robuste Verhaltenseffekte in der Maus (Gerlach und Riederer, 1996; Jakowec und Petzinger, 2004). Da MPTP für den Experimentator ein akut wirkendes Neurotoxin darstellt, ist v.a. die chronische Applikation bei Versuchstieren mit einem nicht zu unterschätzenden Gefahrenpotential verbunden (Przedborski et al., 2001). **Paraquat** (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium) wurde aufgrund seiner dem MPP^+ verwandten Struktur und seiner weit verbreiteten Nutzung als Herbizid ein Kandidat für die Induktion eines Parkinson-Modells (Di Monte et al., 1986). Im Gegensatz zu MPP^+ wurde für Paraquat in der Ratte in einigen Studien eine langsame und begrenzte Passage der BHS mit anschließender Anreicherung in Nervenzellen postuliert (Shimizu et al., 2001; Tawara et al., 1996). Es wurde keine Reduktion des Dopamingehaltes im Striatum belegt, dagegen jedoch eine erhöhte Aktivität der TH, was von den Autoren als ein Hinweis auf kompensatorische Hochregulation der Dopaminsynthese in den verbliebenen Nervenfasern interpretiert wurde (McCormack et al., 2002). Beachtet werden muss die systemische Toxizität von Paraquat, v.a. auf das Lungengewebe, was für den Menschen und im Nager nachgewiesen wurde. Insbesondere Ratten zeigen schon bei geringen Dosierungen

Lungenschäden (Corasaniti et al., 1998). Paraquat ist ein schwacher Inhibitor des Komplex I (Richardson et al., 2005). Ein messbarer Anstieg der Expression von α -Synuclein nach systemischer Injektion von Paraquat in der Maus führt zu der Ausbildung von Lewy-Körperchen ähnlichen Proteinaggregaten (Manning-Bog et al., 2002). Das Fungizid Mangan-ethylen-bis-dithiocarbamat (Maneb) (Meco et al., 1994) konnte nach chronischer systemischer Applikation im Mausmodell in Kombination mit Paraquat dessen pathomorphologische Effekte erhöhen und eine verminderte motorische Aktivität erzeugen (Thiruchelvam et al., 2000). Die pathomorphologischen Veränderungen durch systemische Applikation einer Paraquat/Maneb-Kombination in der Maus werden deutlicher, wenn die Tiere bei Versuchsbeginn bereits 18 Monate alt sind (Thiruchelvam et al., 2003). Die Pathomechanismen von Paraquat und Maneb müssen detaillierter untersucht werden, um dieses Modell für die Testung pharmakologischer Strategien nutzen zu können. Es muss nachgewiesen werden, dass die v.a. unter Maneb-Zugabe erreichbaren Verhaltenseffekte auf der relativ moderaten Schädigung der nigrostriatalen Transmission beruhen und nicht auf systemischer Toxizität oder einer unspezifischen Neuronenschädigung (Bove et al., 2005; Cicchetti et al., 2005).

2.7. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

2.7.1. Zielstellung und Arbeitshypothese

Die Progression der Neurodegeneration wird durch heutige Therapieverfahren nicht aufgehalten, und die chronische Gabe von L-DOPA führt zu verschiedenen Komplikationen, wie Dyskinesien (Obeso et al., 2000). Daher sind neuroprotektive Therapiestrategien, welche den Kreislauf der Pathomechanismen unterbrechen oder abschwächen können, zukunftsweisend. Hierzu ist die Entwicklung und Etablierung von Tiermodellen mit progressiven nigralen Neuronenverlusten unverzichtbar. In der Ätiopathogenese des IPS wird derzeit von einer Kombination aus Altersdefiziten, Umwelteinflüssen und genetischen Prädispositionen ausgegangen, was sich im Modell wieder finden sollte. Ein Tiermodell für die Erforschung neuroprotektiver Strategien sollte zudem möglichst viele Pathomechanismen der Erkrankung widerspiegeln und vergleichbare klinische Defizite entwickeln. Kein zurzeit etabliertes Tiermodell der Parkinson-Krankheit erfüllt diese Kriterien und zeigt eine progressive Neurodegeneration (Meissner et al., 2004; Schober, 2004). Aktuell konnte kein in Tiermodellen untersuchter Wirkstoff klinisch erfolgreich zur Neuroprotektion eingesetzt

werden (Meissner et al., 2004). Hierdurch wird deutlich, dass Effekte in Tiermodellen an progressiven Neuronenverlusten gemessen werden müssen, um prospektive Aussagen über die Wirkung im Humanpatienten treffen zu können. Progressive Neurodegeneration ist nach den bisherigen Erfahrungen aus Tiermodellen eher bei subchronischer und chronischer Applikation eines Toxins zu erwarten. Die Etablierung eines Toxinmodells in genetisch prädisponierten Tieren, welche zudem bereits ein höheres Alter erreicht haben, wäre geeignet, die Hypothese der Ätiopathogenese zu untersuchen, sowie bei Erreichen progressiver pathologischer und klinischer Defizite, neuroprotektive Strategien zu testen. Da die Methodik des Gentransfers bisher kaum in Ratten durchgeführt werden kann, sind genetische Prädispositionen bislang nur durch transgene Mausmodelle vertreten. Diese Modelle zeigen ohne weitere äußere Einflüsse keine neurodegenerativen Veränderungen (s. 2.6.1.). Toxinmodelle dagegen (6-OHDA- und Rotenon-Modell) sind bislang v.a. in der Ratte beschrieben. Das wichtigste in Mäusen akut angewendete Toxin MPTP wird teils mit dem Harn ausgeschieden und kann daher zur Kontamination der Umgebung führen (Przedborski et al., 2001). Da es z.B. per Inhalation aufgenommen wird und beim Menschen ein Parkinsonsyndrom induzieren kann, besteht für den Experimentator v.a. bei Langzeitexposition im Rahmen chronischer Applikationen beim Tier ein nicht zu unterschätzendes Gefahrenpotential. In dieser Arbeit sollten daher erste Untersuchungen zur Entwicklung eines subchronischen und chronischen Mausmodells auf Basis des etablierten akuten 6-OHDA- und des chronischen Rotenon-Rattenmodells an genetisch noch unveränderten Mäusen unterschiedlichen Alters vorgenommen werden.

Zur Testung neuroprotektiver Effekte werden v.a. Wirkstoffe herangezogen, die bekannte Pathomechanismen attenuieren oder aufheben können. Von Vorteil ist es hierbei, wenn für diese Substanzen ein Mangel im PD-Patienten nachgewiesen werden konnte. Trotz einer nicht vollständig geklärten Ätiopathogenese ist der Einfluss des Alters unumstritten. Daher sind auch im Alter reduzierte endogene Botenstoffe oder Enzyme von großem Interesse. Diese Kriterien erfüllen die Neurosteroiden, welche in dieser Arbeit bei Erreichen neurodegenerativer Veränderungen in einem der zu entwickelnden Tiermodelle auf neuroprotektive Effekte untersucht werden sollten, um erste Einblicke in das Wirkungsspektrum dieser Substanzen zu gewinnen (Baulieu, 1998; Compagnone und Mellon, 2000; di Michele et al., 2003; Mellon und Griffin, 2002).

2.7.2. Entwicklung eines Mausmodells für die Parkinson-Krankheit

2.7.2.1. Auswahl und Applikationsregime der Neurotoxine Rotenon und 6-OHDA

Die Auswahl der applizierten Substanzen basiert auf Erfahrungen aus den etablierten experimentell induzierten Toxinmodellen der PD. Das MPTP-Mausmodell sowie das Paraquat/Maneb-Mausmodell sind aufgrund der in Kap. 2.6.3.3. beschriebenen Sachverhalte wenig geeignet um neuroprotektive Substanzeffekte zu untersuchen; v.a. zeigen sie keine permanente Verhaltenseffekte korreliert mit progressiver und im Fall von Paraquat/Maneb selektiver Neuropathologie. Weiterhin muss für MPTP die Gefährdung der Arbeitssicherheit insbesondere bei chronischer Applikation unterstrichen werden, denn es kann auch im Menschen ein Parkinson-Syndrom hervorrufen (Jakowec und Petzinger, 2004).

Daher sollte in dieser Arbeit vorerst an genetisch unveränderten Mäusen eine chronische Applikation von Rotenon basierend auf dem Rotenon-Rattenmodell vorgenommen werden, und neuropathologische Effekte auf das nigrostriatale dopaminerge System sowie Einflüsse auf das motorische Verhalten untersucht werden. Hierbei wurden verschiedene Altersgruppen verwendet, um den Einfluss von Altersdefiziten zu ermitteln, wie sie im Paraquat-Mausmodell beschrieben sind (Thiruchelvam et al., 2003). Rotenon ist in in-vitro Modellen umfangreich untersucht und zeigt Auswirkungen auf alle für das IPS postulierte Pathomechanismen, was nicht zuletzt auch auf die selektive Hemmung des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette zurückführbar ist (Uversky, 2004). Im Rattenmodell zeigt Rotenon neurodegenerative Effekte, deren Selektivität jedoch umstritten ist, und die mit gezeigten Verhaltenseffekten nicht immer korrelieren. Durch die systemische Toxizität von Rotenon und hohe interindividuelle Varianz in der Suszeptibilität der Ratten sind nur etwa ein Drittel der injizierten Tiere letztlich als Modell verwendbar. Diese Tiere zeigen jedoch die Ausbildung von Lewy-Körperchen ähnlichen Einschlüssen und eine im Striatum beginnende und sich auf die SNc ausbreitende Neurodegeneration, vergleichbar mit Beobachtungen im PD-Patienten. Es wird von den Autoren betont, dass diese Effekte an eine kontinuierliche chronische Applikation von Rotenon gebunden sind (Betarbet et al., 2000). In der Maus wurde das Toxin bislang lediglich akut und subchronisch s.c. appliziert. Nach akuter Applikation von 10 mg/kg Rotenon wurde ein Anstieg der Dopaminmetaboliten und des Laktatspiegels im Striatum beobachtet, der 7 Tage nach der Injektion nicht mehr vorhanden war (Thiffault et al., 2000). Da dieses Modell in der Maus erst entwickelt werden musste, dienten als Versuchstiere eine genetisch unveränderte Inzuchtlinie. Es wurde die C57Bl/6-Maus-Inzuchtlinie gewählt, da für sie die höchste Suszeptibilität für Eingriffe in das

dopaminerge System beschrieben ist (Gerlach und Riederer, 1996; Sedelis et al., 2000). Das *Applikationsregime* für Rotenon wurde in Anlehnung an das Rotenon-Rattenmodell gewählt. Im Rattenmodell wurde Rotenon s.c., i.v. oder i.p. injiziert oder über Minipumpen kontinuierlich perfundiert, in der Maus bislang nur s.c. appliziert. Auch ist nach s.c. Injektion ein besserer allgemeiner Gesundheitsstatus in der Ratte beschrieben. Die s.c. Injektion wurde der i.p. Injektion vorgezogen, da eine möglichst kontinuierliche Anflutung des Toxins gegeben sein sollte, und da mit einer stärkeren peripheren Toxizität (insbesondere für die Bauchorgane) bei i.p. Injektion gerechnet werden muss. Die Injektionsdauer wurde in Anlehnung an das Rattenmodell (28-56 Tage) täglich über 45 Tage gewählt (Alam und Schmidt, 2002; Betarbet et al., 2000; Sherer et al., 2003b). Thiffault et al. (2000) applizierten in ihren Untersuchungen akut *Dosierungen* von 5, 10 und 15 mg/kg und subchronisch (3 mal wöchentlich über 3 Wochen) 1,5 mg/kg s.c. in C57Bl/6 Mäusen. Nach 15 mg/kg starben die Tiere innerhalb von 24 h. Die Dosis, bei welcher 50% der Mäuse nach i.p. Injektion sterben (LD50), ist in der Literatur mit 5,4 mg/kg angegeben (Ellenhorn und Barceloux, 1988). Basierend auf diesen Daten wurde in dieser Arbeit ein Dosisbereich von 2,5-5,0 mg/kg Rotenon appliziert.

Sollte sich das Rotenon-Mausmodell als nicht geeignet herausstellen, war in einer zweiten Versuchsreihe die Untersuchung des Einflusses subchronischer Injektionen von 6-OHDA in der Maus vorgesehen. 6-OHDA wird v.a. im unilateralen Rotationsmodell in der Ratte verwendet. Auch wenn es sich um ein stereotaktisch appliziertes Toxin handelt, ist es für die Fragestellung interessant, denn es kann auch endogen als Reaktion des Dopaminmetabolismus auf andere Toxine und im Rahmen des L-DOPA-Metabolismus gebildet werden (Graham, 1978; Maharaj et al., 2005; Seiden und Vosmer, 1984). Allerdings sollte für die Testung von Neuroprotektiva eine bilaterale Läsionierung beider Hemisphären vorliegen, da ansonsten protektive Einflüsse der nichtläsionierten Seite nicht ausgeschlossen werden können (Roedter et al., 2001). Im 6-OHDA-Modell wurde bislang nur akut läsioniert. Erfahrungen über subchronische Applikationen liegen weder in der Maus noch in der Ratte vor (Betarbet et al., 2002b), könnten jedoch den progressiven Verlauf der Neurodegeneration im PD-Patienten besser widerspiegeln. Dabei ist die intrastriatale Applikation der Injektion in die SN oder in das mediale Vorderhirnbündel vorzuziehen, da eine retrograde langsamere Degeneration resultiert, die dem Verlauf im PD-Patienten eher entspricht (Schober, 2004). Bei bilateraler striataler Applikation ist in der Ratte eine hohe Morbidität und Mortalität beschrieben, was auch in der Maus erwartet werden muss, daher sollte die Injektion jeweils

nur in einer partiellen Läsionierung resultieren. Dies könnte einem frühen Stadium des Parkinson-Syndrom entsprechen und sich daher durchaus zur Testung neuroprotektiver Strategien eignen (Deumens et al., 2002; Gerlach und Riederer, 1996). Daher soll eine subchronische Applikation von 6-OHDA bilateral striatal mit partieller Läsion des nigrostriatalen Systems in der Maus entwickelt und neuropathologische Effekte sowie Einflüsse auf das motorische Verhalten untersucht werden. Es liegen bislang nur wenige Studien mit striataler Applikation von 6-OHDA in der Maus vor, wobei 6-OHDA in allen Fällen akut und unilateral injiziert wurde. In dieser Arbeit sollte erstmals 6-OHDA nach subchronischem *Applikationsregime* über 5 Tage und aufgrund der daraus resultierenden Daten erweitert für 7 Tage appliziert werden und die Effekte mit einer akuten, einmaligen Applikation derselben Dosierung verglichen werden. Wie oben begründet, sollte eine *Dosierung* gewählt werden, durch die eine bilaterale partielle Läsionierung des dopaminergen Systems erreicht wird.

Es muss beachtet werden, dass 6-OHDA durch autooxidative Prozesse in Lösung zerfällt und daher häufig mit einem Zusatz von Ascorbat stabilisiert wird. In der Maus verwendete Dosierungen und Ascorbatkonzentrationen mit den zugehörigen Literaturstellen sind in Tab. 3 zusammengefasst.

6-OHDA Dosis (total)	Ascorbat-Lösung	Injektionsvolumen	Tötung nach Injektion (Tage)	striatale Defizite	Defizite in der SN	Literaturstelle
18 µg	-	4 µl	7	keine Angabe	34% (Neurone)	(He et al., 2001)
8 µg	0,2%	4 µl	10	35% (DA)	keine Angabe	(Von Voigtlander und Moore, 1973)
16 µg	0,2%	4 µl	10	84% (DA)		
16 µg	0,2%	2 µl	14	90% (DA)	86% (TH) 44% (DA)	(Cunningham und Su, 2002)
2 x 6 µg	0,02%	2 x 2 µl	112	75% (DAT)	keine Angabe	(Lundblad et al., 2004)
4 µg	0,02%	2 µl	18	40% (DA)	keine Angabe	(Perez et al., 2005)
8 µg	0,02%	2 µl	18	40% (DA)		

Tab. 3: Literaturstellen mit Dosierungsangaben zur intrastriatalen Injektion von 6-OHDA bei der Maus. Es handelt sich um einmalige und unilaterale Injektionen. Die Angaben zu Defiziten des dopaminergen Systems in der SN und im Striatum wurden im Verhältnis zur nichtläsionierten Seite berechnet.

Ascorbat selbst könnte als Radikalfänger neuroprotektive Effekte entwickeln bzw. neuroprotektive Strategien beeinflussen (Ehrhart und Zeevalk, 2003). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich untersucht, ob auf diesen Zusatz bei entsprechenden Schutzmaßnahmen gegen eine frühzeitige Oxidation von 6-OHDA auch verzichtet werden

könnte. Unter Beachtung einer bilateralen Injektion über mehrere Tage sollten in Versuchen an einzelnen Tieren eine Dosis von 4-8 µg pro Hemisphäre und ein geeignetes Injektionsvolumen von 0,5-4 µl bestimmt werden. In der Literatur ist beschrieben, dass 7 Tage nach striataler Injektion von 6-OHDA die retrograde Degeneration bereits fortgeschritten ist und etwa 14 Tage anhält (Przedborski et al., 1995). Der Zeitraum bis zur Tötung der Tiere sollte daher mindestens 7-14 Tage nach der ersten Injektion umfassen, abhängig vom allgemeinen Gesundheitsstatus der Tiere und der verwendeten Methodik.

Sind im chronischen Rotenon-Mausmodell oder im subchronischen 6-OHDA-Mausmodell neurodegenerative Effekte nachweisbar, sollten erste Versuche mit dem Neurosteroid Dehydroepiandrosteron (DHEA) hinsichtlich seiner neuroprotektiven Eigenschaften ergänzt werden.

2.7.2.2. Auswahl der motorischen Verhaltenstests

Ein geeignetes Modell für die Parkinson-Krankheit muss die klinischen und die pathomorphologischen Kriterien der Erkrankung widerspiegeln.

Mittels *Verhaltenstests* sollen Defizite des motorischen Verhaltens untersucht werden. Im PD-Patienten sind 4 Kardinalsymptome beschrieben: Bradykinesie, Rigor, Tremor und posturale Instabilität. Aussagen über die Motorik im Nagermodell wurden durch die Messung der horizontalen und vertikalen Bewegungsaktivität im Open field und im Activity cage getroffen. Weiterhin wurde im Rotarod-Test ermittelt, ob eine gestörte Koordination vorliegt. Im Katalapsie-Test sowie in Ganganalysen wurde u.a. bestimmt, ob die Initiation der Bewegung vermindert ist. Da motorische Defizite zentral neurologisch und nicht durch die Abnahme der Muskelkraft bedingt sein müssen, wurde diese ebenfalls im sogenannten Hanging wire und im Grip strength-Test bestimmt. Diese Untersuchungen erfolgten gemäß verschiedener Literaturangaben (Andringa et al., 2000; Crawley, 1999; Ellenbroek et al., 1987; Hamann et al., 2003; Rozas et al., 1998; Sanberg PR et al., 1996; Sedelis et al., 2001).

2.7.2.3. Immunhistochemische Markierung von TH-immunreaktiven Neuronen

Pathomorphologisch ist die Degeneration dopaminergener Neurone der SN ein Hauptkriterium der Parkinson-Krankheit. Die Neurotoxine Rotenon und 6-OHDA sollten daher einen Neuronenverlust in der SN und eine damit einhergehende Nervenfaserverreduktion im Striatum verursachen. Die immunhistochemische Markierung dopaminergener Neurone sollte diese pathomorphologischen Kriterien quantifizierbar darstellen. Die Immunhistochemie ist eine

Technik, bei der immunologische und histologische Methoden miteinander verbunden werden. Der immunologische Anteil der Methode basiert auf einer spezifischen Bindung eines Antikörpers an ein Antigen, welches in den nachzuweisenden Strukturen vorhanden ist. Der entstandene Komplex wird anschließend histologisch markiert und durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht (Coons und Kaplan, 1950). Hiermit ist es möglich, Strukturen sowohl qualitativ, z.B. auf morphologische Kriterien, als auch quantitativ beurteilen zu können. Das dopaminerge System zeichnet sich durch die TH aus, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Dopaminsynthese (s. Abb. 2). Daher wird diese durch einen spezifischen Antikörper markiert (Curzon, 1977). Dargestellt werden im nigrostriatalen System somit die dopaminergen Nervenfasern im Striatum und die Nervenzellkörper in der SN. Diese Methode ist somit geeignet, neurodegenerative Effekte im Parkinson-Modell aufzuzeigen (Jackson-Lewis et al., 1995). Ein weiteres wichtiges Kriterium ist die Ausbildung von Lewy-Körperchen ähnlichen Einschlüssen. Daher sollten geeignete *histologische Färbungen*, wie die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Schneider et al., 2002), angefertigt werden. Um einen Überblick zu den unspezifischen und systemischen Effekten des Toxins Rotenon zu erhalten, sollten Gehirnschnitte und Präparate peripherer Organe histologisch auf degenerative Veränderungen untersucht werden, vergleichbar zu früheren Untersuchungen im Rotenon-Rattenmodell (Höglinger et al., 2003; Lapointe et al., 2004).