

Aus dem Institut für Neurogenetik  
der Universität zu Lübeck

Direktorin: Professorin Dr. med. C. Klein

**Transgenerationelle Suszeptibilität gegenüber einer  
Schädigung des dopaminergen Systems im MPTP-  
Mausmodell**



Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Tamara Vernik

aus Kaspijsk

Lübeck 2020

**1. Berichtstatterin: Professorin Dr. med. Christine Klein**

**2. Berichtstatter/in: Professor Dr. habil. Peter Pramstaller**

**Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2021**

**Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 18.05.2021**

**Promotionskommission der Sektion Medizin**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1</b>	<b>M. Parkinson</b> .....	<b>6</b>
1.1.1	Funktionelle Anatomie.....	8
1.1.2	Ätiopathogenese des M. Parkinson .....	10
<b>1.2</b>	<b>Epigenetik</b> .....	<b>12</b>
1.2.1	Beispiele für epigenetische Vererbung .....	13
<b>1.3</b>	<b>MPTP-Mausmodelle</b> .....	<b>15</b>
<b>1.4</b>	<b>Hypothese / Fragestellung</b> .....	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Tiere und Tierhaltung</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>Eingesetzte Substanzen und Chemikalien</b> .....	<b>19</b>
2.2.1	Behandlung der Mäuse .....	19
2.2.2	Entnahme der Mäusegehirne .....	19
2.2.3	Probenaufbereitung für Komplex-I- und Citrat-Synthase-Aktivitätsbestimmung.....	19
2.2.4	Probenaufbereitung für die HPLC .....	20
2.2.5	Verwendete Lösungen und deren Herstellung .....	21
<b>2.3</b>	<b>Verwendete Geräte</b> .....	<b>21</b>
2.3.1	Verhaltenstestung.....	21
2.3.2	Komplex-I-Messung .....	21
2.3.3	HPLC.....	22
<b>2.4</b>	<b>Intoxikation der Mäuse</b> .....	<b>22</b>
2.4.1	Versuchsaufbau .....	22
2.4.2	Durchführung.....	24
<b>2.5</b>	<b>Verhaltensmessung</b> .....	<b>24</b>

2.5.1	<i>Openfield</i> -Test.....	24
2.5.2	Zylindertest .....	26
<b>2.6</b>	<b>Gewebeentnahme und Aufarbeitung .....</b>	<b>26</b>
<b>2.7</b>	<b>Komplex-I- und Citrat-Synthase-Aktivität .....</b>	<b>26</b>
<b>2.8</b>	<b>Elektrochemische Auswertung mittels HPLC .....</b>	<b>27</b>
2.8.1	Bestimmung von Neurotransmittern und ihrer Metaboliten sowie Hydroxylradikalen mittels elektrochemischer Detektion .....	29
<b>2.9</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Mortalität.....</b>	<b>31</b>
<b>3.2</b>	<b>Verhaltenstestung .....</b>	<b>32</b>
3.2.1	<i>Openfield</i> .....	32
3.2.2	Zylinderversuch.....	37
<b>3.3</b>	<b>Komplex-I-Aktivität.....</b>	<b>39</b>
<b>3.4</b>	<b>Messung der Neurotransmitter.....</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>52</b>
<b>4.1</b>	<b>Diskussion der Methoden .....</b>	<b>52</b>
4.1.1	Diskussion des chronischen MPTP-Modells.....	52
4.1.2	Diskussion der analytischen Aspekte des <i>Openfield</i> .....	53
<b>4.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>53</b>
4.2.1	Diskussion der Mortalität.....	53
4.2.2	Diskussion der <i>Openfield</i> -Ergebnisse in Zusammenhang mit den Ergebnissen der elektrochemischen Auswertung mittels HPLC.....	54
4.2.3	Diskussion des Aufenthaltsortes im <i>Openfield</i> -Käfig .....	57
4.2.4	Diskussion der Zylinderversuch-Ergebnisse .....	58

4.2.5	Diskussion der spektrometrischen Bestimmung der Komplex-I-Aktivität .....	59
4.3	Fazit.....	60
4.4	Ausblick.....	61
5	Zusammenfassung (deutsche Version) .....	63
6	Zusammenfassung (englische Version).....	66
7	Anhang .....	68
7.1	Tierversuchsantrag .....	68
7.2	Übersicht der <i>Openfield</i> -Ergebnisse .....	70
7.3	Abkürzungsverzeichnis .....	73
7.4	Literaturverzeichnis .....	76
7.5	Abbildungsverzeichnis .....	89
7.6	Tabellenverzeichnis .....	90
7.7	Lebenslauf .....	91
7.8	Danksagung .....	92
7.9	Ehrenwörtliche Erklärung .....	93

# 1 Einleitung

## 1.1 M. Parkinson

Der M. Parkinson (Idiopathisches Parkinsonsyndrom, primäres Parkinson-Syndrom) ist eine degenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems mit progredientem Verlauf.

Zu den Kardinalsymptomen des M. Parkinson werden folgende Symptome gezählt: Bradykinese (= Verlangsamung der Willkürmotorik), Rigor (= erhöhter Muskeltonus), Ruhetremor und posturale Instabilität (= Gang-/Standunsicherheit). Neben Störungen der Motorik treten typischerweise auch nicht-motorische Symptome auf. Dazu zählen u. a. Hyposmie, psychische Störungen wie Depression und kognitive Beeinträchtigungen wie eine dementielle Entwicklung (Kalia und Lang 2015).

Weltweit sind etwa 7,5 Millionen Menschen an M. Parkinson erkrankt. Hohes Lebensalter stellt den bedeutendsten Risikofaktor dar. So beträgt die Prävalenz bei 40- bis 49-Jährigen 41/100.000 Einwohner und bei über 80-Jährigen 1903/100.000 Einwohner (Pringsheim *et al.* 2014). Damit stellt der M. Parkinson die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach dem M. Alzheimer dar (Kumari *et al.* 2020). Durch die Veränderung der Altersverteilung in den industrialisierten Ländern wird sich zwischen 2015 und 2040 die Anzahl an Erkrankten global annähernd verdoppeln (Dorsey *et al.* 2018). Männer sind häufiger betroffen als Frauen, wobei die Dominanz für das männliche Geschlecht mit dem Alter zunimmt (Moisan *et al.* 2016).

Ein Charakteristikum des M. Parkinson ist die Degeneration dopaminergener Neurone der Substantia nigra, die zu einem konsekutiven Verlust striatalen Dopamins führt. Diese Degeneration nigrostriataler Bahnen führt zu den beschriebenen motorischen Symptomen. Klinisch manifest werden die Symptome bei einem Zellverlust von etwa 50 % bzw. wenn sich die striatale Dopamin-Konzentration um 70 – 80 % reduziert hat (Nandhagopal *et al.* 2008; Surmeier *et al.* 2017). Histopathologisch finden sich charakteristischerweise Lewy-Körperchen. Das sind

intrazytoplasmatische eosinophile Einschlusskörperchen bestehend aus missgefalteten Proteinen, insbesondere dem Protein  $\alpha$ -Synuclein (Tyson *et al.* 2016).

Der Neuropathologe Heiko Braak beschrieb anhand von 6 pathologischen Stadien das Fortschreiten des M. Parkinson. In Stadium 1 und 2 zeigen Betroffene keine motorischen Veränderungen. Diese Stadien sind gekennzeichnet durch histopathologische Veränderungen in der Medulla oblongata und im Bulbus olfactorius. In Stadium 2 sind vor allem die Raphekerne, also die serotoninerger Kerne des Hirnstamms, betroffen. Das bedeutet, es kommt zum Zelluntergang des serotoninerger Systems noch bevor es in Stadium 3 und 4 zu Zelluntergängen in der Substantia nigra pars compacta ebenso wie in weiteren Teilen des Mittelhirns und basalen Vorderhirns kommt (Politis und Niccolini 2015). Erst zu diesem Zeitpunkt zeigen sich die motorischen Symptome. In Stadium 5 und 6 erreicht die Krankheit den Lobus frontalis und temporalis (siehe Abb. 1) (Goedert und Spillantini 2012).

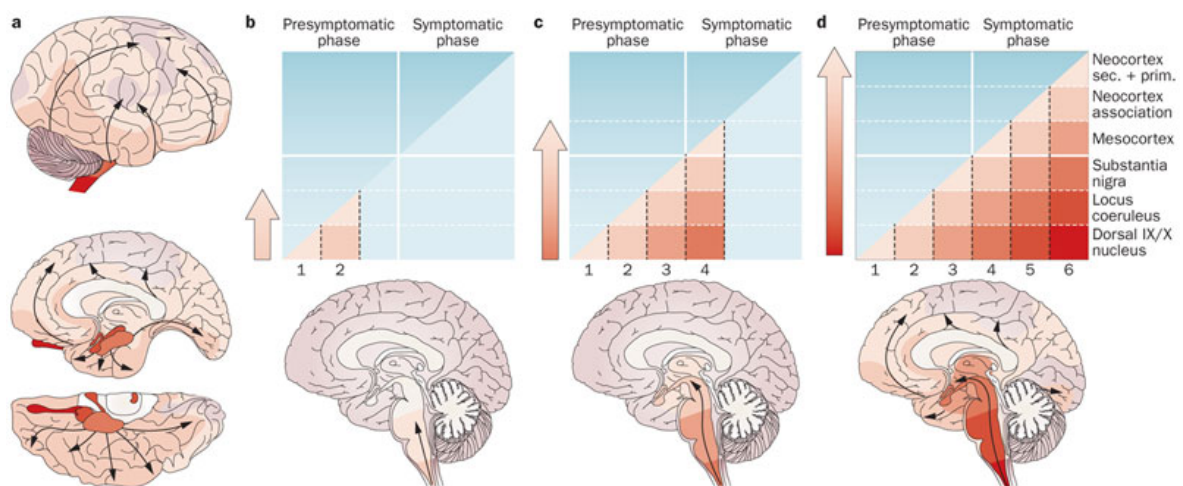


Abbildung 1: Braak-Stadien

Abbildung aus Goedert und Spillantini 2012. Gezeigt werden die 6 pathologischen Stadien des M. Parkinson. a) Die Pfeile symbolisieren das rostrocaudale Fortschreiten der histopathologischen Veränderung. b) Im Stadium 1 sind der

*Bulbus olfactorius und Hirnnervenkerne im Hirnstamm betroffen. Im Stadium 2 wird das Tegmentum pontis erreicht. c) Erste Symptome werden im 3. oder zu Beginn des 4. Stadiums apparent, wenn u. a. die Pars compacta der Substantia nigra, der Hypothalamus, das basale Vorderhirn und der temporale Mesokortex erreicht werden. d) In den letzten beiden Stadien finden sich zunehmend Läsionen im Neokortex.*

Die frühe Degeneration im Hirnstamm erklärt, warum viele M. Parkinson-Patienten erst nicht-motorische Symptome entwickeln, bevor klassische motorische Symptome sichtbar werden. Zu den Frühzeichen des M. Parkinson gehört neben einer Hyposmie das Auftreten von Schlafstörungen (Hughes *et al.* 2019). Beispielsweise kann es zu Traumschlafverhaltensstörungen (*REMSleep behavior disorder*, RBD) schon Jahre vor dem Beginn motorischer Symptome kommen (Schapira *et al.* 2017).

### **1.1.1 Funktionelle Anatomie**

Als Basalganglien werden bestimmte Kerngebiete im Marklager des Großhirns bezeichnet, die wichtig für die Regulation der Motorik sind, indem sie Kraft, Ausmaß, Richtung und Geschwindigkeit einer Bewegung steuern (Turner und Desmurget 2010). Zu den Basalganglien gehören das Striatum (bestehend aus Nucleus caudatus und Putamen) sowie der Globus pallidus (bestehend aus Pars externa (GPe) und Pars interna (GPi)). Daneben gibt es weitere Kerngebiete, die mit den Basalganglien in enger funktioneller Beziehung stehen. Dazu gehört die Substantia nigra (bestehend aus Pars compacta (SNpc) und Pars reticularis (SNpr)) als ein Kerngebiet des Mesencephalons und der Nucleus subthalamicus (NST) als Kerngebiet des Diencephalons (Lanciego *et al.* 2012).

Dopamin ist der zentrale Neurotransmitter des nigrostriatalen Systems. Durch Aufnahme einer Methylgruppe entsteht aus Noradrenalin Adrenalin. Dopamin wird durch die Monoaminoxidase B (MAO-B) und die Catechol-O-methyltransferase (COMT) zu 3,4-Dihydroxyphenylethylsäure (DOPAC) und Homovanillinmandelsäure (HVA) umgewandelt, das mit dem Urin ausgeschieden wird.

Während der Verlust an dopaminergen Neuronen für die motorischen Symptome verantwortlich gemacht wird, wird die Degeneration serotoninerger Neurone mit dem Auftreten von nicht-motorischen Symptomen in Verbindung gebracht (Deusser *et al.* 2015).

#### **1.1.1.1 Verschaltung der Basalganglien und Pathophysiologie des M. Parkinson**

Vom Striatum ausgehend werden zwei striatothalamische Projektionsbahnen unterschieden. Das Striatum selbst erhält zum einen exzitatorische glutamaterge Afferenzen aus dem Neocortex und zum anderen dopaminerge Afferenzen aus der SNpc.

Die efferenten Bahnen werden in eine direkte und eine indirekte Projektionsbahn unterschieden. Die direkte Projektionsbahn verbindet das Striatum über den GPi bzw. über die SNpr direkt mit dem Thalamus und diesen mit dem Cortex. Sie beginnt im Motorik-fördernden Teil des Striatums. Dieser besitzt vor allem D1-Rezeptoren und kann durch Dopamin aktiviert werden. Zu den Neurotransmittern der direkten Projektionsbahn gehören GABA, Dynorphin und Substanz P. Daneben gibt es eine indirekte Projektionsbahn. Sie beginnt im Motorik-hemmenden Teil des Striatums. Dieser besitzt überwiegend D2-Rezeptoren und kann über Dopamin gehemmt werden. Die indirekte Bahn verbindet das Striatum zunächst mit dem GPe und bedient sich dabei der Neurotransmitter GABA und Enkephalin. Der GPe ist seinerseits über eine GABAerge Bahn mit dem NST verbunden. Vom NST ziehen glutamaterge Neurone zum GPi sowie zur SNpr. Der GPi als auch die SNpr haben über GABAerge Neurone wiederum Verbindung zum Thalamus und dieser schließlich zum Cortex (siehe Abb. 2) (Lang und Lozano 1998).

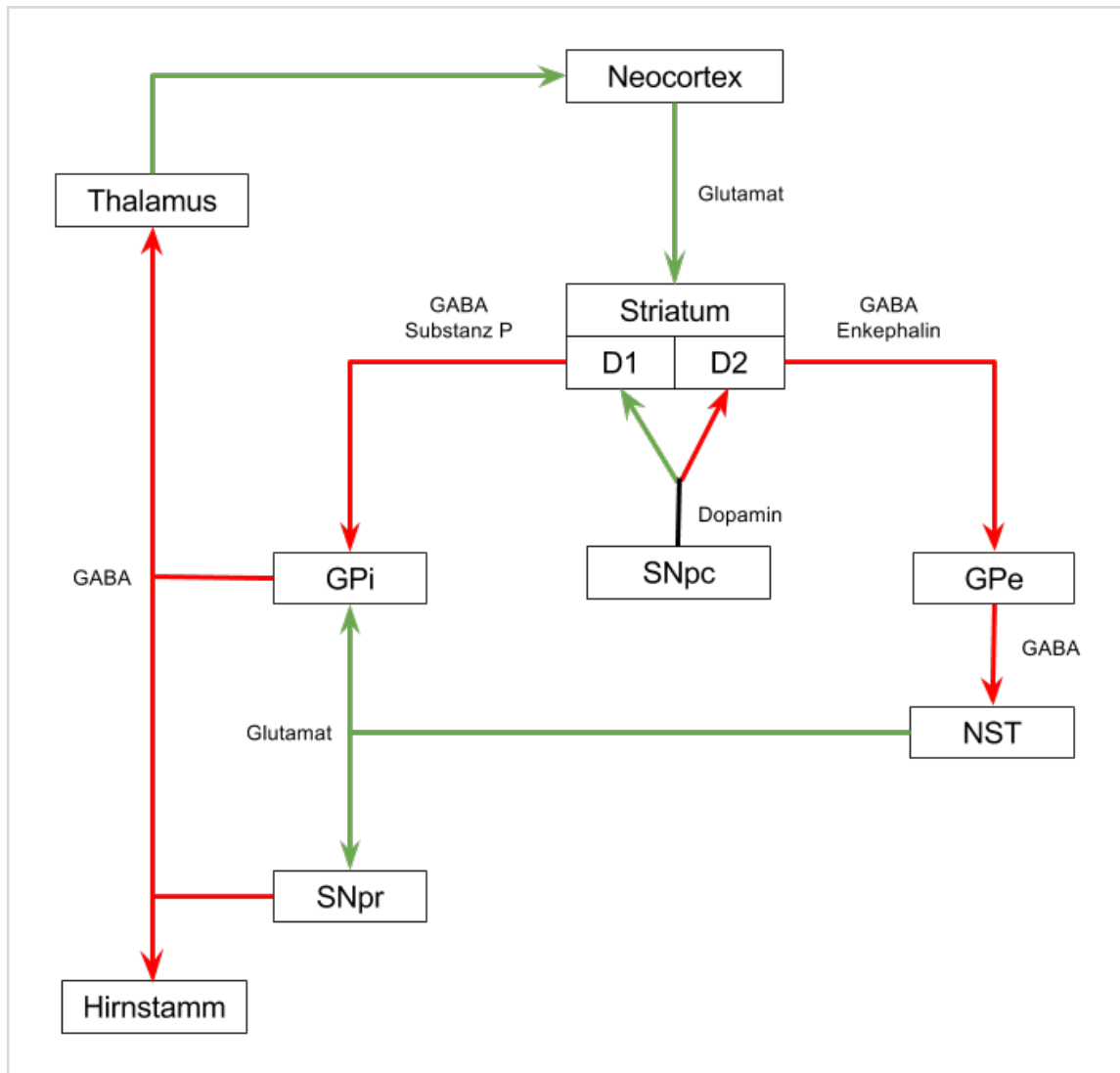


Abbildung 2: Modell der Basalganglienverschaltung bei physiologischer Motorik

Graphik angelehnt an Lang und Lozano 1998. Grüne Pfeile stellen die exzitatorischen und rote Pfeile die inhibitorischen Leitungsbahnen dar. D1: D1-Dopaminrezeptor, D2: D2-Dopaminrezeptor, SNpc: Substantia nigra pars compacta, GPi: Globus pallidus internus, GPe: Globus pallidus externus, NST: Nucleus subthalamicus, SNpr: Substantia nigra pars reticularis.

### 1.1.2 Ätiopathogenese des M. Parkinson

Auch 200 Jahre nach der Erstbeschreibung des M. Parkinson sind die Ursachen der Krankheit immer noch weitestgehend ungeklärt. Eine genetische Komponente

in der Ätiopathogenese ist gesichert. Allerdings erklären bisher bekannte monogene Formen nur etwa 30 % der familiären und 3 – 5 % der sporadischen Fälle des M. Parkinson (Klein und Westenberger 2012). Auffällig ist, dass Personen, bei denen ein Verwandter ersten Grades an M. Parkinson leidet, ein drei- bis viermal höheres Risiko haben, an späteinsetzendem M. Parkinson zu erkranken (Kenborg *et al.* 2015; Shino *et al.* 2010). Genetische Vererbung entsprechend der Mendelschen Regeln bildet für diese Beobachtung eine unzureichende Begründung. Heute geht man von einer multifaktoriellen Entstehungsgenese aus. So konnten neben dem Alter weitere begünstigende Faktoren für die Entstehung des M. Parkinson identifiziert werden. Beispielsweise scheinen erhöhte Konzentrationen an freien Sauerstoffradikalen die Krankheitsentstehung zu begünstigen (Wei *et al.* 2018). Für den Einfluss von freien Radikalen auf die Krankheitsentstehung spricht, dass M. Parkinson-Patienten eine geringere Konzentration an Katalase und Glutathion-Peroxidase in der Substantia nigra aufweisen, beides Enzyme, die freie Radikale inaktivieren (Sian *et al.* 1994; Venkateshappa *et al.* 2012).

Eine Schlüsselrolle bei der Entstehung des M. Parkinson scheint die mitochondriale Dysfunktion einzunehmen. So weisen M. Parkinson-Patienten eine selektive Aktivitätsabnahme um 30 – 40 % des Komplex I der Atmungskette auf (Parker *et al.* 2008; Schapira *et al.* 1990). Die mitochondriale Dysfunktion wiederum ist bei der Einleitung apoptotischer Vorgänge beteiligt (Larsen *et al.* 2018). Die mitochondriale Dysfunktion wurde zum ersten Mal mit der Entstehung des M. Parkinson in Zusammenhang gebracht, als sich bei vier jungen Amerikanern nach intravenösem Drogenabusus ein Parkinson-Syndrom entwickelte. Es stellte sich heraus, dass das Nervengift 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) dafür verantwortlich war. Dank seiner hohen Lipophilie ist MPTP nach systemischer Applikation in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. MPTP entstand als Abbauprodukt bei der Herstellung von 1-Methyl-4-phenyl-4-propion-oxy-piperidin (MPPP), einem Pethidin-Analogon (Langston *et al.* 1983).

## 1.2 Epigenetik

In Familien mit Mutationen in Genen, die mit einem M. Parkinson assoziiert sind, gibt es überproportional häufig erkrankte Mitglieder, die nicht die zum M. Parkinson führende Genmutation tragen. Dieses Phänomen wird als „Phänokopie“ bezeichnet (Klein *et al.* 2011). Bei der Erforschung der Entstehung des M. Parkinson reicht es nicht aus, Genetik und Umwelteinflüsse als unabhängige Faktoren zu betrachten. Auch ihre Interaktion spielt offensichtlich eine Rolle.

Unter Epigenetik werden alle Veränderungen der Genexpression verstanden, die nicht durch Veränderung der DNA-Sequenz zustande kommen. Dazu zählen beispielsweise Veränderungen der Chromatinstruktur. Bekannt sind bislang drei molekulare Mechanismen epigenetischer Genregulation: Histon-Acetylierungen/Deacetylierungen, miRNA-Moleküle und DNA-Methylierungen (Tammen *et al.* 2013).

Histone können durch Acetylierungen und Deacetylierungen ihrer Lysinreste modifiziert werden. Acetylierung bewirkt eine gesteigerte Transkription, wohingegen Deacetylierung die Transkription deaktiviert (Pishva *et al.* 2012).

In der menschlichen DNA finden Methylierungen vor allem an Cytosinresten von CpG-Dinukleotiden statt. Eine Methylgruppe wird von S-adenosyl-L-Methionin (SAM) auf das C5-Atom des Cytosinrings übertragen. Die Methylierung verhindert die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren und bewirkt eine Unterdrückung der Genexpression (*gene silencing*). Außerdem binden methylierte Cytosine Proteine, die mit Korepressoren und Histondeacetylasen interagieren und führen auf diese Weise ebenfalls zu Genrepression (Landgrave-Gómez *et al.* 2015).

Die meisten dieser erworbenen epigenetischen Merkmale werden in den Keimzellen durch Neuprogrammierung eradiziert. Allerdings werden einige der epigenetischen Veränderungen von diesen Dekodierungsphasen nicht erfasst und daher an die nachfolgende Generation weitergegeben.

Der Beweis einer epigenetischen Vererbung ist jedoch schwierig zu erbringen. So sind in einer schwangeren Maus 3 Generationen zur selben Zeit den gleichen Umwelteinflüssen ausgesetzt: die schwangere Maus selbst (F0), ihr Embryo (F1)

sowie die Keimzellen, die bereits im Embryo angelegt sind (F2). Es muss also in der vierten Generation das Vorliegen epigenetischer Veränderung nachgewiesen werden, um von epigenetischer Vererbung sprechen zu dürfen. In einer nicht schwangeren Maus benötigt man mindestens die dritte Generation (Youngson und Whitelaw 2008).

Der Ausgangsgedanke dieser Arbeit beruht darauf, dass der Grund für die erhöhte Wahrscheinlichkeit an M. Parkinson zu erkranken, wenn Verwandte ersten Grades bereits an dieser Krankheit litten, zum Teil epigenetischen Veränderungen zuzuschreiben ist.

### **1.2.1 Beispiele für epigenetische Vererbung**

Es ist wichtig, zwischen „transgenerationalen epigenetischen Effekten“ und „transgenerationaler epigenetischer Vererbung“ zu unterscheiden. Transgenerationale epigenetische Effekte bezeichnen alle Prozesse, die auf nicht genetischem Wege den Phänotyp bestimmen. Von transgenerationaler epigenetischer Vererbung spricht man bei mitotisch und/oder meiotisch vererbaren Veränderungen, die nicht durch Veränderungen der Gensequenz erklärt werden können.

Ein irreführendes und fälschlicherweise häufig herangezogenes Beispiel für epigenetische Vererbung ist das Aufziehverhalten von Ratten. In Zeiten, in denen mehr Feinde anwesend sind, kann weniger Zeit für die Fürsorge der Nachkommen aufgewendet werden. Ratten, die in der ersten Woche nach ihrer Geburt wenig Zuwendung erhalten haben, sind ängstlicher als jene, die viel Zuwendung erhalten haben. Womöglich trägt die erhöhte Ängstlichkeit zu mehr Wachsamkeit und damit zu besseren Überlebenschancen bei. Außerdem zeigen die Ratten bei ihren eigenen Nachkommen ebenfalls weniger Fürsorge. Ratten, die viel Fürsorge als Jungtiere erhalten haben, behandeln ihre Nachkommen ebenfalls mit viel Fürsorge. Dieses Verhalten wird von Generation zu Generation weitergegeben.

Werden Nachkommen von wenig fürsorglichen Tieren von fürsorglichen Zieheltern aufgezogen, zeigen sie im eigenen Aufziehverhalten die Eigenschaften der

Zieheltern und geben diese an ihre Nachkommen von Generation zu Generation weiter. Würde es sich um epigenetische Vererbung handeln, würden sich die Jungtiere entsprechend ihrer biologischen Eltern und nicht der Zieheltern verhalten. Dieses Beispiel demonstriert daher zwar einen transgenerationalen Effekt, aber nicht epigenetische Vererbung.

Tatsächlich konnte epigenetische Vererbung bei Pflanzen und Mehrzellern nachgewiesen werden (Cavalli und Paro 1998; Molinier *et al.* 2006; Radford 2018; Xing *et al.* 2007). Der Wasserfloh *Daphnia* stellt ein anschauliches Beispiel dar. Weibliche Wasserflöhe reagieren auf chemische Reize ihrer Feinde. Ihnen wachsen Helme zum Schutz vor Angreifern. Die Nachkommen der helmtragenden Wasserflöhe haben ebenfalls Helme, unabhängig ob Feinde anwesend sind oder nicht. In der F2-Generation sind die Effekte im Vergleich zur F1-Generation reduziert, aber ebenso nachweisbar (Youngson und Whitelaw 2008).

In den letzten Jahren häufen sich zudem Studien, die das Vorliegen epigenetischer Vererbung beim Säugetier nahelegen. So fanden Dias und Ressler, dass die olfaktorische Erfahrung von Mäusen das Verhalten der nachfolgenden Generationen beeinflusst. F0-Mäuse wurden vor der Empfängnis einem bestimmtem Geruch ausgesetzt. Mäuse der F1- und F2-Generation zeigten eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber diesem Geruch, nicht aber gegenüber anderen Gerüchen. Die Arbeitsgruppe verwendete In-vitro-Fertilisation und ließ die Nachkommen von Zieheltern aufziehen, um auszuschließen, dass es sich um einen transgenerationalen Effekt handelt (Dias und Ressler 2014). Sowohl die Arbeitsgruppe von Anway *et al.* als auch Sadler-Riggelman *et al.* setzten trächtige Ratten einem endokrinen Disruptor während der Zeit der Geschlechterdetermination aus. Beide Gruppen konnten feststellen, dass dies zu einer erhöhten Häufigkeit männlicher Unfruchtbarkeit in den Folgegenerationen führt. Die Auswirkungen auf die Fortpflanzung korrelieren wiederum mit veränderten DNA-Methylierungsmustern in der Keimbahn (Anway *et al.* 2005; Sadler-Riggelman *et al.* 2019). Beim Menschen wird epigenetische Vererbung im Zusammenhang mit dem Prader-Willi- sowie Angelman-Syndrom diskutiert. In einer kleinen Gruppe von

Patienten lässt sich die Krankheit auf eine fehlende Neuprogrammierung epigenetischer Merkmale zurückführen (Buiting *et al.* 2003).

Methylierungsprozesse scheinen auch bei der Entstehung des M. Parkinson eine Rolle zu spielen. Analysen an Gehirnen von M. Parkinson-Patienten zeigten, dass  $\alpha$ -Synuclein-Gene durch Methylierungen reguliert werden (Ai *et al.* 2014; De Boni und Wüllner 2019; Kantor *et al.* 2018; Soldner *et al.* 2016; Tan *et al.* 2014; Wen *et al.* 2016; Wüllner *et al.* 2016). Außerdem legen Studien nahe, dass auch weitere Gene, die mit dem M. Parkinson in Verbindung stehen, einer auf Methylierung basierenden Expressions-Kontrolle unterliegen. Dazu zählen LRRK2 und Parkin (Copped 2012; Habibi *et al.* 2011; Miranda-Morales *et al.* 2017).

Weiterhin zeigte sich bei Analysen von Gehirnproben von M. Parkinson-Erkrankten eine geringere Methylierung des CYP2E1- sowie des ADORA2A-Gens (Kaut *et al.* 2012; Wen *et al.* 2016). Das Enzym CYP2E1 wiederum steht im Zusammenhang mit der durch MPTP induzierten Toxizität (Vaglini *et al.* 2013). Das Gen ADORA2A kodiert für den Adenosin-A2A-Rezeptor, welcher vermehrt im Striatum exprimiert wird. Adenosin-A2A-Rezeptor-Antagonisten sind in der Lage, motorische Symptome des M. Parkinson zu lindern (Rieck *et al.* 2015).

Bekannt ist, dass 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) zu einer Minderung der Expression von Genen führt, die eine Rolle bei zellulären Prozessen wie Alterung spielen. Der Gehalt an 5hmC im Gehirn steigt im Laufe des Lebens allmählich an. Bei Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen sind die Werte beeinträchtigt (Sherwani und Khan 2015). Unklar ist, ob der vermehrte Gehalt an 5hmC Ursache oder Folge des Auftretens neurodegenerativer Erkrankungen ist.

Im Allgemeinen gelang es bis zum heutigen Tag nicht, Beispiele epigenetischer Vererbung im Zusammenhang mit der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen beim Säugetier nachzuweisen.

### **1.3 MPTP-Mausmodelle**

Die Entdeckung, dass MPTP irreversibel Parkinsonismus auslöst, hat man sich bei der Erforschung des M. Parkinson zu Nutze gemacht. So sind MPTP-Mausmodelle

mittlerweile die etabliertesten Toxin-basierten Parkinson-Tiermodelle (Blesa und Przedborski 2014). MPTP wirkt selektiv toxisch auf dopaminerge Zellen der SNpc. Durch MAO-B in Astrozyten wird MPTP zu 1-Methyl-4-phenyl-1,2-dihydroxypyridiniumion (MPDP<sup>+</sup>) umgebaut, welches spontan zum Neurotoxin 1-Methyl-4-phenyl-pyridin (MPP<sup>+</sup>) oxidiert (Winklhofer und Haass 2010). MPP<sup>+</sup> gelangt über den Dopamintransporter (DAT) in die dopaminergen Zellen des nigrostriatalen Systems und akkumuliert dann in den Mitochondrien. Dort hemmt MPP<sup>+</sup> selektiv den Komplex I der Atmungskette. Es kommt zur Energieverarmung der Zelle, da es an Adenosintriphosphat (ATP) fehlt. Zudem entstehen freie Radikale, die zum Zelltod führen (Obata 2002). Daneben wird MPP<sup>+</sup> über den vesikulären Monoamintransporter (VMAT) in die synaptischen Vesikel aufgenommen. Die Folge ist eine Umverteilung von Dopamin in das Zytoplasma, wo es oxidiert wird. Auch dies bewirkt einen Anstieg an freien Radikalen und führt zum Zelluntergang (Jackson-Lewis und Przedborski 2007).

Ein bekanntes Problem ist der plötzliche Tod der Tiere innerhalb der ersten 24 Stunden nach Beginn der Behandlung. Grund dafür ist nicht die ZNS-Schädigung. Am ehesten sind periphere kardiovaskuläre Komplikationen dafür verantwortlich. Auch die Hypothermie, die durch den toxischen Einfluss auf das periphere Dopamin-System zustande kommt, erhöht die Mortalität (Brochard *et al.* 2009).

Unterschieden werden das akute, subchronische und chronische MPTP-Mausmodell. Je nach Fragestellung muss ein geeignetes Modell in Betracht seiner Vorteile und Einschränkungen bei der Abbildung der Erkrankung gewählt werden. Allen Modellen ist gemein, dass der Zellverlust dopaminerger Neurone in der SNpc schnell erfolgt. Dagegen handelt es sich beim M. Parkinson um einen langsam fortschreitenden Verlauf.

Im akuten MPTP-Modell kommt es zu einem besonders schnellen Zelluntergang dopaminerger Zellen in der SNpc. Im Gegensatz zu allen anderen MPTP-Mausmodellen ist es jedoch mit dem akuten Modell möglich, den chronisch inflammatorischen Prozess der Erkrankung, der für die chronische Progredienz verantwortlich gemacht wird, darzustellen (Alvarez-Fischer *et al.* 2008; Jackson-Lewis *et al.* 1995). Nach dem Modell werden 20 mg/kgKG MPTP-Wasserstoffchlorid

(MPTP-HCl) viermal am Tag mit je 2 Stunden Abstand männlichen, mindestens 8 Wochen alten C57Bl/6-Mäusen injiziert (Schumm *et al.* 2012). Folge der Behandlung ist ein selektiver Untergang der dopaminergen Neurone der SNpc der Maus. Der dopaminerge Zellverlust erfolgt durch Nekrose und beträgt etwa 40 %. Bei dem Modell kann es zu einer Regeneration der durch MPTP ausgelösten Schäden kommen (Meredith und Rademacher 2011). Die Mäusesterblichkeit bei dem Modell beträgt je nach Studie 0 – 30 % (Chung *et al.* 2015) oder liegt sogar bei über 50 % (Hallman *et al.* 1985) .

Beim subchronischen Modell wird MPTP an 5 aufeinanderfolgenden Tagen männlichen, mindestens 8 Wochen alten C57Bl/6-Mäusen intraperitoneal verabreicht. Die Einzeldosis beträgt 30 mg/kgKG. Der dopaminerge Zellverlust in der SNpc beträgt hier 30 – 40 % und erfolgt durch Apoptose und nicht durch Nekrose (Meredith und Rademacher 2011). Bei diesem Modell wird keine erhöhte Tiersterblichkeit beobachtet (Sedelis *et al.* 2001).

Der Vorteil des chronischen Modells ist, dass der dopaminerge Zellverlust auch noch ein halbes Jahr nach der Intoxikation nachgewiesen werden kann. Die Regeneration der dopaminergen Neurone ist deutlich geringer als diejenige im akuten oder subchronischen Modell (Petroske *et al.* 2001). Aus diesem Grund wurde MPTP in dieser Arbeit nach dem sogenannten chronischen Modell mit dem Gichtmittel Probenecid verabreicht. Die männlichen, mindestens 8 Wochen alten C57Bl/6-Mäuse erhalten alle 3,5 Tage 5 Wochen lang eine intraperitoneale Injektion. Die Einzeldosis beträgt je 25 mg/kgKG MPTP-HCl und 250 mg/kgKG Probenecid. Dies entspricht insgesamt 10 Injektionen und einer kumulativen Dosis von 250 mg/kgKG MPTP-HCl und 2,5 g/kgKG Probenecid. Der dopaminerge Zellverlust in der SNpc beträgt 40 %. Dieses Modell ermöglicht am ehesten, die histologischen und klinischen Merkmale des M. Parkinson zu reproduzieren (Alvarez-Fischer *et al.* 2008; Chan *et al.* 2007). Genutzt wird dieses Modell vorwiegend, um neuroprotektive Pharmaka zu untersuchen. Bei diesem Modell beträgt die Sterblichkeit etwa 15 % (Meredith und Rademacher 2011).

## **1.4 Hypothese / Fragestellung**

Der Ausgangsgedanke dieser Arbeit ist, dass Risikofaktoren für eine nigrostriatale Schädigung, denen die Eltern ausgesetzt sind, eine erhöhte Suszeptibilität des nigrostriatalen Systems der Nachkommen zur Folge haben. Eine mögliche Erklärung solcher Phänomene könnten epigenetische Veränderungen sein.

### **Unsere Hypothese lautet:**

- Umwelteinflüsse, denen die Elterngeneration ausgesetzt ist, haben messbare Auswirkungen auf die Folgegeneration

Eine solche Entdeckung würde die Theorie von epigenetischer Vererbung beim Säugetier weiter bekräftigen.

### **Wir erwarten daher:**

- bei den intoxikierten Mäusen sowie bei ihren Nachfahren eine gleichgerichtete Veränderung ihres Verhaltens
- bei den intoxikierten Mäusen sowie bei ihren Nachkommen eine Verarmung des serotoninergen, adrenergen, noradrenergen sowie dopaminergen Systems
- bei den intoxikierten Mäusen sowie bei ihren Nachkommen eine Aktivitätsabnahme des Komplex I der Atmungskette

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tiere und Tierhaltung

Für die Studie wurden C57Bl/6 Mäuse (Janvier, Frankreich) verwendet. Die Tierversuchsnummer lautet: V 242-7224.122-20. Die Tiere waren bei Lieferung 7 Wochen alt. Die Haltung erfolgte unter Standardbedingungen (Raumtemperatur  $23 \pm 1$  °C, relative Luftfeuchtigkeit  $55 \pm 5$  %, zwölfständiger Hell-Dunkel-Rhythmus, Licht an von 6 Uhr bis 18 Uhr). Die einzelbelüfteten Käfige (IVC) wurden mit bis zu maximal 6 Tieren besetzt. Zum Trinkwasser aus der Kunststoffflasche und zum Standardfutter (Altromin®) hatten die Tiere freien Zugang.

### 2.2 Eingesetzte Substanzen und Chemikalien

#### 2.2.1 Behandlung der Mäuse

1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin-Wasserstoffchlorid (MPTP-HCl) (M0896)	Sigma-Aldrich
Probenecid (P8761)	Sigma-Aldrich
Natriumchloridlösung (NaCl) 0,9 %	Braun, Melsungen

#### 2.2.2 Entnahme der Mäusegehirne

Perchlorsäure (HClO <sub>4</sub> ), 0.4 N	Fluka
Formaldehyd	Sigma-Aldrich

#### 2.2.3 Probenaufbereitung für Komplex-I- und Citrat-Synthase-Aktivitätsbestimmung

Tromethamin	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich

Saccharose	Sigma-Aldrich
Proteaseinhibitor-Cocktail	Complete™ ULTRA Tablets, Mini, EASYpack
Kaliumphosphatpuffer 25 mM, ph=7,2	Sigma-Aldrich
Nicotinamidadenindinukleotidhydrogen (NADH)	RocheDiagnostics
Kaliumcyanid (KCN)	Sigma-Aldrich
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Ubiquinon	EISAI
Rotenon (C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub> )	Sigma-Aldrich
5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB)	Sigma-Aldrich
Acetyl-CoA	Sigma-Aldrich
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich
Triton-X100	Sigma-Aldrich
Oxalessigsäure (OAA)	Sigma-Aldrich

#### 2.2.4 Probenaufbereitung für die HPLC

Dopamin (DA)	Sigma-Aldrich
5-Hydroxyindolylessigsäure (5-HIAA)	Sigma-Aldrich
5-Hydroxytryptamin (Serotonin, 5-HT)	Sigma-Aldrich
3,4-Dihydroxyphenylessigsäure (DOPAC)	Sigma-Aldrich
Acetonitril HPLC <i>grade</i>	Roth
Perchlorsäure (HClO <sub>4</sub> )	Fluka

## 2.2.5 Verwendete Lösungen und deren Herstellung

Homogenisierungspuffer pH=7,4:

(Ansatz für 50 ml)

1 M Tromethamin	0,5 ml
0,5 M EDTA	0,1 ml
1 M Saccharose	12,5 ml

Mit H<sub>2</sub>O auf 50 ml auffüllen.

5 Tabletten Proteaseinhibitor-Cocktail

Saccharose:

(Ansatz für 50 ml)

Saccharose	17,12 g
------------	---------

Mit H<sub>2</sub>O auf 50 ml auffüllen.

## 2.3 Verwendete Geräte

### 2.3.1 Verhaltenstestung

<i>Tracking</i> -Software	Viewer 3.0.1.442, Biobserve GmbH, Bonn
Infrarot-sensitive Kamera	Biobserve GmbH, Bonn
<i>Openfield</i> -Käfige (50 cm x 50 cm)	Biobserve GmbH, Bonn

### 2.3.2 Komplex-I-Messung

Gen5 Datenanalyse-Software	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall
----------------------------	--

### 2.3.3 HPLC

#### 2.3.3.1 Herstellung der Homogenisate

Ultraschall-Homogenisator	Hielscher, Teltow
Zentrifuge	Hermle, Gosheim
Membranfilter mit 0,2 µm Porenweite	Schleicher & Schuell, Dassel

#### 2.3.3.2 Bestimmung von DA, HVA, 5-HT, 5-HIAA, Adrenalin und Noradrenalin

Pumpe (Ultimate 3000)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Automatischer Probengeber (Ultimate 3000)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Säule Column Nucleosil C-18 125 x 3 mm 100-3	Knauer, Berlin
Elektrochemischer Detektor (Ultimate 3000)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA

## 2.4 Intoxikation der Mäuse

### 2.4.1 Versuchsaufbau

Für die Studie haben wir 10 sieben Wochen alte Brutpaare (F0) verwendet. Die Tiere wurden in 2 Gruppen geteilt. 5 Paare wurden dem „naiven“ und 5 Paare dem „exponierten“ Arm zugeordnet. Die 10 männlichen und 10 weiblichen C57Bl/6-Mäuse wurden nach einer Woche Eingewöhnung im Verhältnis 1:1 verpaart. Nach 4 Wochen wurde die F1-Generation abgesetzt. Sie wuchs 15 Wochen lang heran und wurde anschließend getötet. Die Gehirne wurden entnommen und in beide Hemisphären geteilt. Dann wurde die linke Hemisphäre in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C für eine spätere Analyse aufbewahrt. Das Striatum der rechten Hemisphäre wurde entnommen und zur Bestimmung der Konzentration von Dopamin, DOPAC, Serotonin und 5-HIAA sowie Noradrenalin und Adrenalin

mittels HPLC aufgearbeitet (Crawley und Bailey 2008). Die Mittelhirne wurden mittels 4%igem Formaldehyd fixiert, entwässert und für eine weitere (immunhistochemische) Aufarbeitung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Direkt nach dem Absetzen der F1-Generation, wurde die F0-Generation nach Geschlechtern getrennt. 5 Wochen lang wurde der exponierte Arm mittels des so genannten chronischen MPTP-Modells mit MPTP-HCl (25 mg/kgKG) und Probenecid (250 mg/kgKG) alle 3,5 Tage behandelt (10 Intoxikationen insgesamt). Der naive Arm erhielt die gleiche Menge an Lösungsmittel (0.9%ige NaCl). Alle Injektionen erfolgten intraperitoneal.

Eine Woche nach Behandlung wurden die Mäuse der F0-Generation erneut verpaart.

Geplant waren 4 – 6 männliche Nachkommen (F1') pro F0-Paar. Sowohl die F1'-Mäuse, die der intoxikierten Gruppe abstammen, als auch jene aus der naiven Gruppe, sollten ihrerseits in 2 Gruppen geteilt werden. Die erste Gruppe sollte ohne weitere Intervention 15 Wochen alt werden (F1'-unbehandelt). Die zweite Gruppe sollte ab dem Alter von 8 Wochen nach dem chronischen MPTP-Modell behandelt werden (F1'-behandelt).

Es kam zur Abweichung von diesem Schema aufgrund einer hohen Sterblichkeit in der intoxikierten F0-Generation. Wir behielten sowohl männliche als auch weibliche Mäuse im Versuch bei. Die Tiere der F0-Generation wurden nach Absetzen der F1'-Tiere (erneut 4 Wochen nach Geburt) getötet. Die F1'-Generation wuchs 15 Wochen lang heran und wurde dann getötet. Auf die Intoxikation mit MPTP/Probenecid wurde bei der F1'-Generation ganz verzichtet (siehe Abb. 3). Sowohl der F0- als auch der F1'-Generation wurden die Gehirne ebenfalls entnommen und wie oben beschrieben verarbeitet.

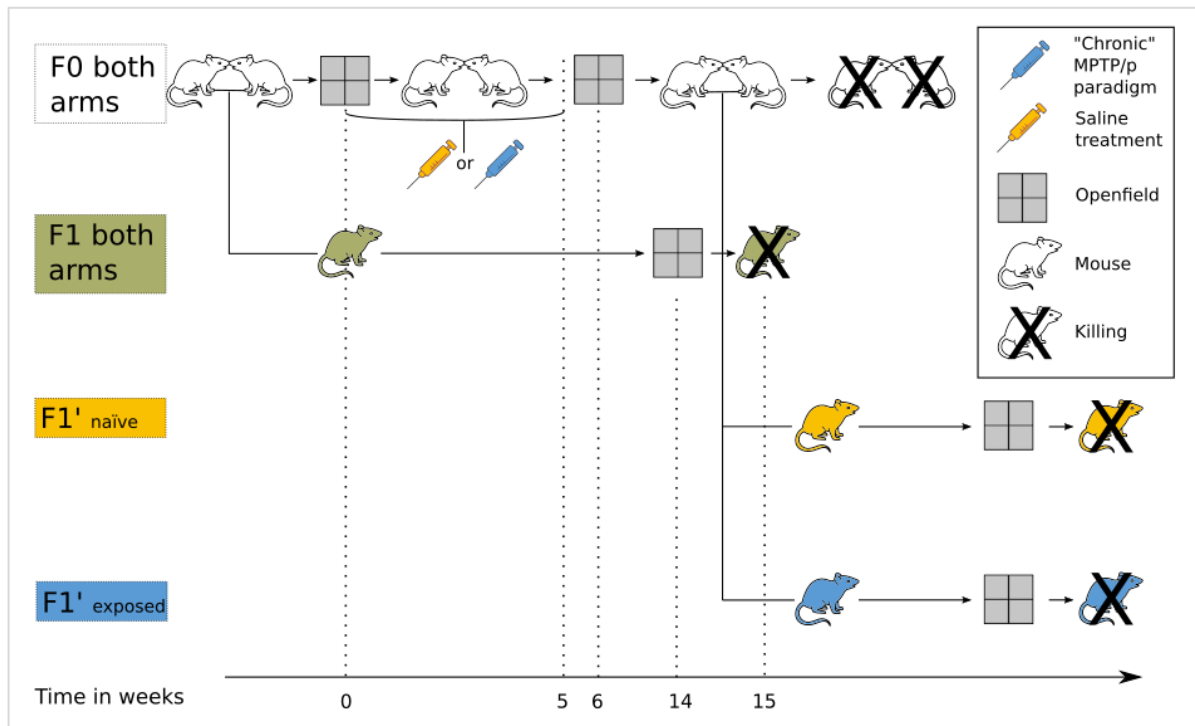


Abbildung 3: Behandlungsplan

## 2.4.2 Durchführung

Die Tiere wurden alle 3,5 Tage (2 x pro Woche), etwa montags um ca. 7 Uhr und donnerstags um ca. 19 Uhr behandelt. Sie erhielten 25 mg/kgKG MPTP-HCl und 250 mg/kgKG Probenecid bzw. 0,9 %iges NaCl über 10 Wochen (insgesamt 10 Behandlungen).

## 2.5 Verhaltensmessung

### 2.5.1 Openfield-Test

Für Verhaltensmessungen im *Openfield* wurde das Computerprogramm Viewer (Biobserve GmbH, Bonn) verwendet. Jede Maus wurde einzeln in eine Plexiglasbox (50 cm x 50 cm) gesetzt. Simultan konnten 8 Mäuse getestet werden. Jeweils eine Videokamera befand sich über 4 Boxen und filmte die 4 Mäuse (siehe Abb. 4). Die Position von Kopf, Körper und Schwanz der Maus wurde registriert. Mit der Software

wurde die zurückgelegte Strecke der Mäuse für jede einzelne Minute des 25-minütigen Beobachtungszeitraumes erfasst.

Alle Tiere durchliefen zuerst eine Habituation, am Folgetag erfolgte eine Erfassung der *Baseline*. Eine Woche nach Behandlung erfolgte eine Verhaltensmessung der F0-Tiere. Die F1- und F1'-Mäuse durchliefen ebenfalls vor der Tötung eine abschließende Verhaltensmessung. Hierfür wurden die Tiere für 25 Minuten in die *Openfield*-Käfige gesetzt.

Außerdem wurden die Daten der unterschiedlichen Generation dahingehend ausgewertet, ob es zwischen den beiden Gruppen einen Unterschied in Bezug auf ihren Aufenthaltsort gab. Nagetiere verbringen mehr Zeit damit, den Randbezirk eines *Openfield*-Käfigs zu erkunden, als sich im Zentrum aufzuhalten. Das vermehrte Aufhalten im ungeschützten Zentrum ist Ausdruck einer verminderten Ängstlichkeit der Tiere (Blesa und Przedborski 2014).

Mit Hilfe des Viewer-Programms wurde ermittelt, wie weit entfernt von der Wand der *Openfield*-Käfige sich die Tiere im Durchschnitt während des 25-minütigen Beobachtungszeitraums aufhalten.



*Abbildung 4: Links: Raum für die Openfield-Messungen, Rechts: Aufsicht auf Käfige mit Kamera*

### 2.5.2 Zylindertest

Die F1'-Mäuse wurden zusätzlich dem Zylindertest unterzogen. Dafür wurden sie einzeln in einen durchsichtigen Zylinder gesetzt, der im Durchmesser 9 cm und in der Höhe 15 cm misst. Eine Kamera war auf 4 nebeneinanderstehende Zylinder gerichtet, d. h. 4 Mäuse wurden simultan gefilmt. Als eine Aufrichtung wurde sowohl gewertet, wenn die Vorderpfoten die Seitenwände des Zylinders berührten als auch wenn die Vorderpfoten frei am Körper blieben.

### 2.6 Gewebeentnahme und Aufarbeitung

Die Tiere wurden nach einer Anästhesie durch zervikale Dislokation getötet. Der Schädel wurde mit einer Schere eröffnet, das Gehirn wurde entnommen und in die beiden Hemisphären geteilt. Die beiden Hemisphären wurden in Paraffin eingehüllt, auf Trockeneis zwischengelagert und im Anschluss in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Unter Zuhilfenahme eines Mikroskops wurde aus der rechten Hemisphäre das Striatum herauspräpariert. Anschließend wurde das Striatum gewogen, mit 250  $\mu\text{mol}$  Perchlorsäure versetzt und in ein Eppendorfgefäß gelegt. Das Mesencephalon wurde in Formaldehyd fixiert.

### 2.7 Komplex-I- und Citrat-Synthase-Aktivität

Das Striatum wurde in ein 5 ml fassendes Reagenzröhrchen überführt und 4000  $\mu\text{l}$  kalter Homogenisierungspuffer wurde hinzugefügt. Die Homogenisierung erfolgte bei 1000 rpm (15 x auf und ab). Anschließend wurde der Inhalt des Reagenzröhrchens in ein Falcon-Röhrchen pipettiert und bei 4 °C und 1500 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein zweites Falcon-Röhrchen überführt und bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. So wurden die Nuclei und die Zelltrümmer entfernt.

Der Überstand des Falcon-Röhrchens wurde auf 3 Eppendorfgefäße aufgeteilt. Diese wurden bei 1200 g und 4 °C 15 Minuten lang zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen. Das Mitochondrien-*Pellet* des ersten Eppendorfgefäßes wurde mit 1 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert. Das *Pellet* des zweiten Gefäßes wurde anschließend mit dem Inhalt des ersten

Eppendorfgefäßes resuspendiert. Die Prozedur wurde mit dem dritten Eppendorfgefäß wiederholt. So befanden sich schließlich die in insgesamt 1 ml Homogenisierungspuffer gelösten 3 *Pellets* im dritten Eppendorfgefäß. Dieses wurde bei 14000 rpm (15 min, 4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde entsorgt. Danach wurde das *Pellet* in 15 µl Homogenisierungspuffer gelöst. 3 µl der Lösung wurden in ein weiteres Eppendorfgefäß vorgelegt und dann mit 160 µl Kaliumphosphatpuffer (25 mM, pH=7,2) vermischt. Das Gefäß wurde dreimal erst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach aufgetaut.

Daraufhin wurden die *Wells* der Mikrotiterplatte befüllt. In das Proben-*Well* wurde pipettiert: 6 µl NADH, 2 µl KCN, 10 µl BSA, 7 µl H<sub>2</sub>O, 163 µl *Pellet*.

Das *Well* für den *Blank* unterschied sich nur darin, dass es 16 µl H<sub>2</sub>O und 160 µl Kaliumphosphatpuffer ohne *Pellet* enthielt. Mit einem Mikroplatten-*Reader* wurde die Komplex-I-Aktivität spektrometrisch bestimmt. Danach wurde in das *Well* mit der Probe 6 µl Ubiquinon hinzugefügt und die Platte erneut ausgelesen. Abschließend wurde sowohl in das *Well* mit der Probe als auch mit dem *Blank* 6 µl Rotenon zugefügt, und die Komplex-I-Aktivität wieder bestimmt.

Für die Citrat-Synthase-Aktivität wurden zunächst 100 µl Tromethamin, 4 µl Acetyl-CoA (nicht im *Blank*), 4 µl DTNB + KHCO<sub>3</sub>, 2 µl Triton-X100 und 85 µl H<sub>2</sub>O (90 µl im *Blank*) in die *Wells* pipettiert. In das Proben-*Well* wurde 3 µl des Mitochondrien-*Pellets* hinzugefügt. Dann wurde die Citrat-Synthase-Aktivität im Mikroplatten-*Reader* ausgewertet. Im Anschluss wurde in *Blank* und Proben-*Well* 4 µl OAA hinzugegeben und erneut ausgewertet.

Die Ratio Komplex-I-/Citrat-Synthase-Aktivität wurde errechnet.

## **2.8 Elektrochemische Auswertung mittels HPLC**

Die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde zur Bestimmung von Neurotransmittern sowie ihrer Metaboliten eingesetzt. Bei der HPLC handelt es sich um eine chromatographische Methode zur Auftrennung und Konzentrationsbestimmung von Substanzen, die in einem Probengemisch enthalten sind. Hierbei erfolgt die Auftrennung mit Hilfe einer Säule als stationäre

und eines Lösungsmittels als mobile Phase. Der Trenneffekt in der HPLC beruht auf der unterschiedlichen Polarität beider Phasen. Substanzen, die stark mit der stationären Phase in Wechselwirkung treten, verbleiben länger in der Säule und Substanzen mit einer hohen Affinität zur mobilen Phase wandern schneller hindurch. Wir verwendeten eine Umkehrphasenchromatographie. Das bedeutet, dass die Säule unpolar und das Lösungsmittel polar war. Somit eluierten polare bzw. hydrophile Substanzen schneller als unpolare bzw. hydrophobe.

Am Ende wurde das elektrische Signal aufgezeichnet und in Form einer Gaußkurve dargestellt. Jede Substanz besitzt eine charakteristische Retentionszeit. Das ist die Zeit, die vom Einspritzen des Stoffes vor der Säule bis zur Aufzeichnung des Signals vergeht. An der Position der Kurve im Chromatogramm kann die Substanz identifiziert werden. Die Konzentration entspricht der Fläche unter der Kurve (*area under the curve*) (Alvarez-Fischer et al. 2011; Ferger et al. 1998). Als Detektionsmethode wurde auf ein amperometrisches Verfahren zurückgegriffen. Dabei wird bei einem konstant anliegenden Potential der Elektrodenstrom an einer Arbeitselektrode gemessen. Verwendet wurde eine Platin-Referenzelektrode, die Detektorempfindlichkeit lag bei 2 nA/V und das Oxidationspotential bei 650 mV. Durch den automatischen Probengeber wurden jeweils 20 µl des Homogenisats injiziert. Die Gehaltsbestimmung der jeweiligen Substanz erfolgte über eine externe Kalibriergerade (7-Punkt-Kalibrierung) (Integrationssoftware Chromeleon 6.20 Dionex, Germering) (siehe Abb. 5). Vor jeder Messreihe wurde eine Kalibrierung durchgeführt. Dafür wurden je 20 µl der Eichlösung in einer Konzentration von  $10^{-9}$  bis  $10^{-6}$  mol/l eingespritzt. Das Detektionsminimum lag bei einer Konzentration von  $10^{-9}$  mol/l. Ein Beispielchromatogramm ist in Abbildung 6 eingefügt.

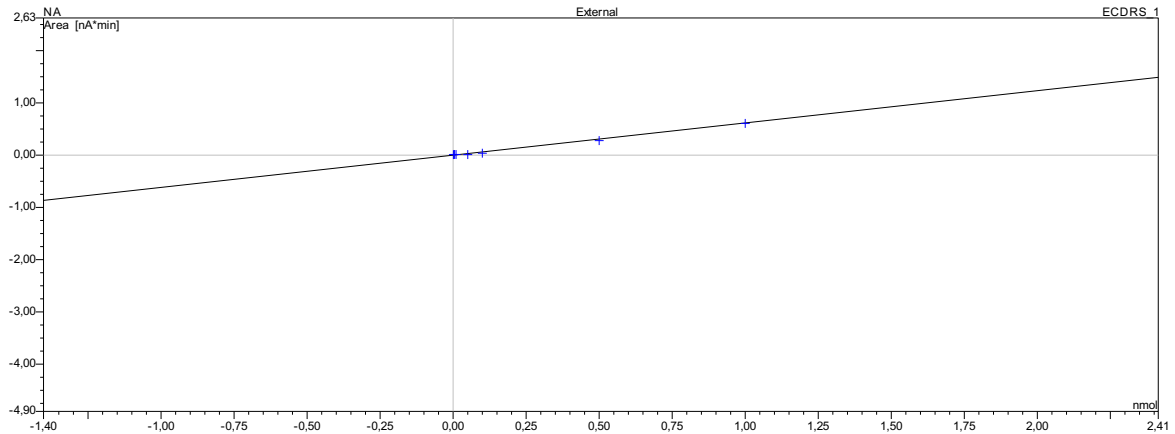


Abbildung 5: Beispiel einer Eichkurve

Die Abbildung zeigt ein Beispiel einer Eichkurve anhand der Bestimmung von Noradrenalin. Dargestellt sind die Eichgrade einer 7-Punkt-Eichung, vergrößert für die niedrigsten 5 Messpunkte.

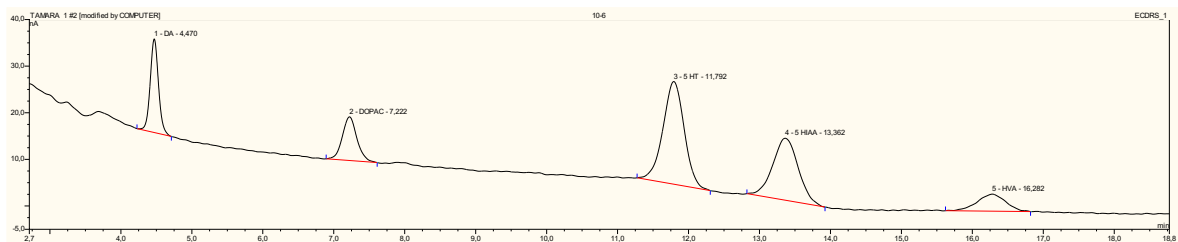


Abbildung 6: Beispielchromatogramm 1

Die Abbildung zeigt ein Beispielchromatogramm der Neurotransmitterbestimmung. Es handelt sich um den Assay zur Bestimmung von Dopamin, Serotonin und der Metabolite.

### 2.8.1 Bestimmung von Neurotransmittern und ihrer Metaboliten sowie Hydroxylradikalen mittels elektrochemischer Detektion

Die Bestimmung von Dopamin und DOPAC, von Adrenalin und Noradrenalin sowie von Serotonin und seinem Metaboliten 5-Hydroxyindolylessigsäure erfolgte mittels elektrochemischer Detektion.

Die mobile Phase für die Bestimmung von Dopamin und HVA enthielt:

Thermo Fisher TEST Mobile Phase (Part No 70-3829) plus 10 % Acetonitril
Column Nucleosil C-18 125 x 3 mm 100-3
EC Potential set bei 650 mV

Die Lösung wurde auf einen pH von 3,0 eingestellt. Das Fließmittel wurde bei 4 °C gelagert und wöchentlich frisch hergestellt.

## 2.9 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer *one-* bzw. *two-way* ANOVA und einem post-hoc Tukey- bzw. Holm-Šídák-Test. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgesetzt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Mortalität

In dem exponierten F0-Arm kam es zu einer hohen Sterblichkeit. Wir begannen mit 5 Paaren in dem exponierten F0-Arm. 7 der 10 Mäuse verstarben. Nur 1 Männchen und 2 Weibchen überlebten. Deshalb wurden 3 weitere Paare in die Gruppe eingefügt. Allerdings verstarben wiederum 5 der 6 Tiere, nur eine männliche Maus überlebte. Insgesamt entsprach die Mortalität in der exponierten F0-Gruppe 75 %. Dies ist deutlich über dem erwarteten Rahmen von 15 % (Jackson-Lewis und Przedborski 2007). Ein Geschlechtseffekt hinsichtlich der Mortalität bestand nicht. Es verstarben gleich viele weibliche und männliche Tiere. In der Kontrollgruppe verstarb ein männliches Tier.

F0-Generation				
	MPTP-Arm		NaCl-Arm	
	♂ (n=8)	♀ (n=8)	♂ (n=5)	♀ (n=5)
Anzahl verstorbenen Mäuse	6	6	1	0
Prozentualer Anteil nach Geschlecht	75 %	75 %	20 %	0 %
Prozentualer Anteil gesamt	75 %		10 %	

Abbildung 7: Mortalität

*Die Injektion von MPTP/Probenecid führte zu einer hohen Sterblichkeit der Mäuse. Den exponierten F0-Tieren (n=16) wurden 25 mg/kgKG MPTP-HCl und 250 mg/kgKG Probenecid intraperitoneal verabreicht. Diese Behandlung überlebten zunächst nur 4 Tiere, was einer Mortalität von 75 % entspricht. Die Sterblichkeit war*

in beiden Geschlechtern gleich hoch. In der mit dem gleichen Volumen physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) behandelten Kontrollgruppe lag die Mortalität bei 10 %.

F0		F1		F1'	
MPTP-Arm	NaCl-Arm	MPTP-Arm	NaCl-Arm	MPTP-Arm	NaCl-Arm
4	9	21	17	8	23

Abbildung 8: Übersicht über die Anzahl der im Openfield untersuchten Mäuse

Zwei weitere Mäuse der intoxikierten F0-Mäuse verstarben noch bevor die Gehirne für die Messung der Komplex-I-Aktivität und für die HPLC-Auswertung gewonnen werden konnten, eine davon im Rahmen der Geburtskomplikation. Infektionen oder aggressives Verhalten der anderen Mäuse als Ursache der Mortalität konnten ausgeschlossen werden, so dass diese am ehesten nur im Rahmen der Intoxikation zu werten ist.

## 3.2 Verhaltenstestung

### 3.2.1 Openfield

#### 3.2.1.1 Verhalten in den Openfield-Käfigen

Die Lokomotion der F0-, F1- sowie der F1'-Generation ist in Form der zurückgelegten Strecke der Mäuse innerhalb eines 25-minütigen Zeitraums wiedergegeben (siehe Methoden). Bei den F0-Tieren wurde die Strecke zusätzlich vor (*Baseline*) und nach Injektion von MPTP/Probenecid bzw. physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) verglichen. Daneben wurde festgestellt, wie weit von der Wand des Openfield-Käfigs sich die Mäuse durchschnittlich aufhielten.

Eine Übersicht über alle Mäuse, die dem Openfield-Versuch unterzogen wurden, sowie über die Ergebnisse der bestimmten Parameter lässt sich der Tabelle 2 im

Anhang entnehmen.

Die Abbildung 9 bis 12 geben die Ergebnisse der *Openfield*-Versuche wieder. Wir verglichen das Verhalten der Elterngeneration (F0) vor und nach Injektion mit MPTP/Probenecid bzw. mit NaCl (siehe Abb. 9). Im NaCl-Arm fand sich kein signifikanter Unterschied. Die Mäuse legten zuerst eine Strecke von  $9643,74 \pm 690,91$  cm zurück. Nachdem ihnen NaCl verabreicht wurde, liefen sie  $8129,17 \pm 408,65$  cm. Dagegen fand sich im MPTP-Arm eine signifikante Zunahme der Strecke von  $7918,15 \pm 867,43$  cm vor der Intoxikation auf  $15061,85 \pm 2315,62$  cm nach der Intoxikation des Giftes. Somit liefen die mit MPTP/Probenecid behandelten F0-Tiere signifikant mehr als die restlichen Mäuse.

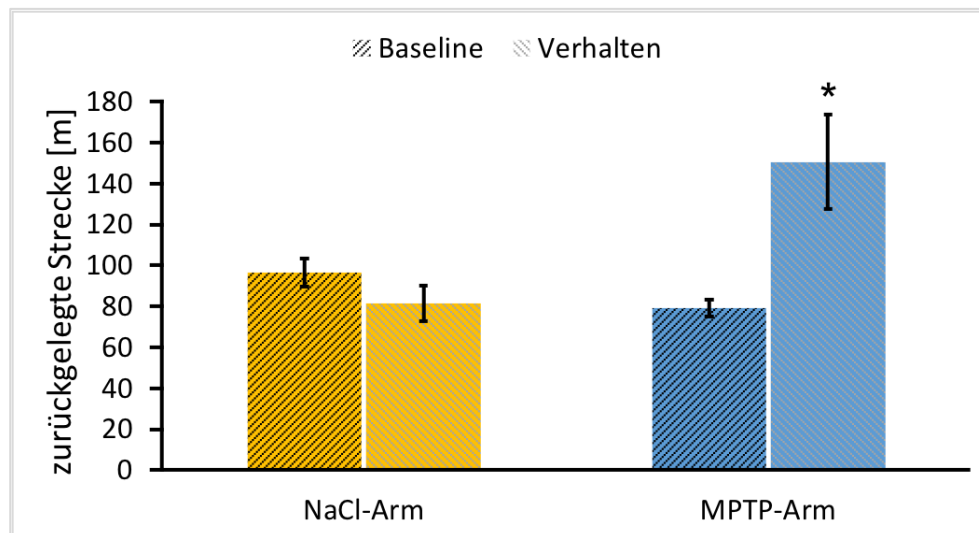


Abbildung 9: Lokomotion der F0-Generation vor (Baseline) vs. nach Injektion von NaCl bzw. MPTP/Probenecid

Vergleich der Lokomotion in Form der zurückgelegten Strecke der F0-Mäuse vor (Baseline) und nach Injektion von physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) bzw. MPTP/Probenecid. Im MPTP-Arm zeigte sich eine signifikante Zunahme der Strecke nach Intoxikation (Mittelwert  $\pm$  SEM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer one-way ANOVA und einem post-hoc Tukey-Test (NaCl-Arm n=9 pro

Gruppe, MPTP-Arm  $n=4$  pro Gruppe, \* für Signifikanz im Vergleich zu allen anderen mit  $p<0,05$ ).

In Abbildung 10 wird die Strecke der F0-Mäuse dargestellt, die nach der Injektion von physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) bzw. MPTP/Probenecid zurückgelegt wurde. In der F0-Generation legten die mit NaCl behandelten F0-Mäuse eine Strecke von  $8129,17 \pm 408,65$  cm zurück. Die F0-Tiere, die mit MPTP/Probenecid intoxikiert wurden, liefen mit  $15061,85 \pm 2315,62$  cm signifikant mehr als alle anderen Tiere. Da die F0-Tiere erst nach Austragung der F1-Generation injiziert wurden, stammen die F1-Mäuse des MPTP-Armes von unbehandelten F0-Mäusen ab. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Armen. Im NaCl-Arm betrug die Strecke der F1-Tiere  $7736,41 \pm 343,89$  cm und im MPTP-Arm  $5946,51 \pm 275,5$  cm. Die F1'-Generation stammt von behandelten F0-Mäusen ab. Die F1'-Tiere der MPTP-Gruppe liefen mit  $10164,74 \pm 794,89$  cm signifikant mehr, als die F1-Tiere der intoxikierten Gruppe und auch als die F1'-Tiere des NaCl-Armes ( $7151,86 \pm 423,69$  cm). Bemerkenswert ist, dass sich die Gesamtstrecke der NaCl-behandelten Tiere zwischen den Kohorten (F0 – F1') kaum unterscheidet ( $8129,17 \pm 408,65$  cm in F0,  $7736,41 \pm 343,89$  cm in F1 und  $7151,86 \pm 423,69$  cm in F1').

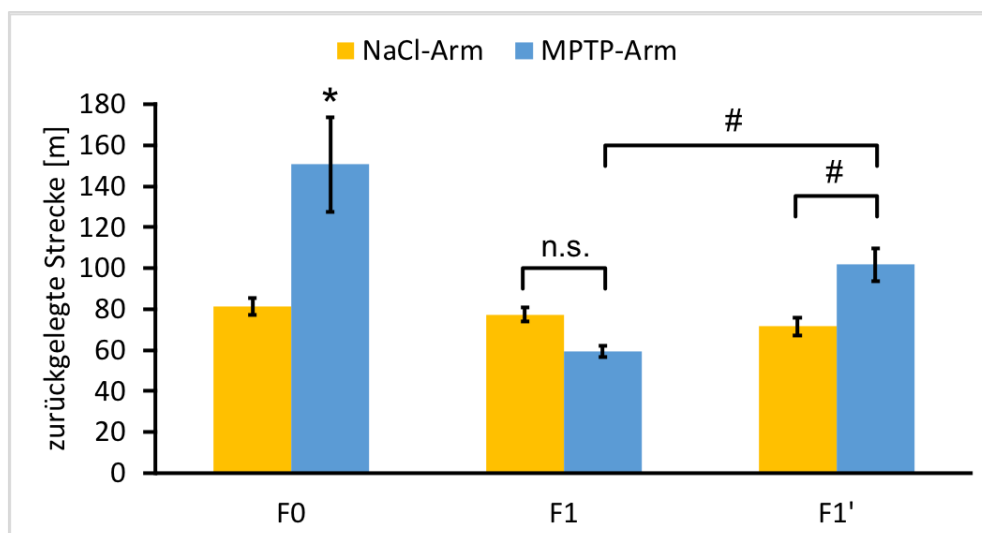


Abbildung 10: Zurückgelegte Strecke im Openfield-Versuch

*Die Injektion der F0-Generation mit MPTP/Probenecid induzierte bei den Mäusen sowie ihren Nachkommen eine Lokomotionszunahme. Zuerst wurde die F0-Generation verpaart und die F1-Generation gewonnen. Danach wurden den F0-Tieren des MPTP-Armes alle 3,5 Tage 10 Wochen lang 25 mg/kgKG MPTP-HCl und 250 mg/kgKG Probenecid intraperitoneal verabreicht. Die F0-Tiere des naiven Armes erhielten eine korrespondierende Menge NaCl. Erfasst wurde die zurückgelegte Strecke in Zentimetern innerhalb eines 25-minütigen Beobachtungszeitraums. In der F0-Generation liefen die Tiere des MPTP-Armes signifikant mehr als die Tiere der restlichen Gruppen. Die Tiere, die der intoxikierten F0-Generation abstammen (F1' blau), zeigten eine signifikante Steigerung ihrer Lokomotion gegenüber den Tieren, die den unbehandelten F0-Tieren abstammen (F1 blau) sowie gegenüber den F1'-Tieren des NaCl-Armes (Mittelwert  $\pm$  SEM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer one-way ANOVA und einem post-hoc Tukey-Test (n=4-23 pro Gruppe, \* für Signifikanz im Vergleich zu allen anderen mit  $p < 0,05$ , # für Signifikanz im paarweisen Vergleich mit  $p < 0,05$ ).*

Um festzustellen, ob es bei der zurückgelegten Strecke geschlechterabhängige Unterschiede gibt, haben wir die Daten nach Geschlechtern sortiert ausgewertet (Abb. 11). Hier zeigte sich allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern. Die intoxikierten Männchen der F0-Generation legten eine Strecke von  $12122,25 \pm 288,75$  cm zurück und damit eine längere Strecke als die naiven F0-Männchen. Hier betrug die Strecke  $7940,03 \pm 871,88$  cm. Vor allem die Weibchen des MPTP-Armes ( $18001,45 \pm 3567,04$  cm) wiesen eine längere Laufstrecke auf als die weiblichen Mäuse des NaCl-Armes ( $8280,48 \pm 210,37$  cm). In der F1-Generation wurden nur die männlichen Nachkommen im Versuch belassen (Ergebnisse s. o.). In der naiven Gruppe liefen in der F1'-Generation die Männchen  $8312,8 \pm 590,33$  cm und die Weibchen  $6087,67 \pm 411,46$  cm, somit vergleichbar viel wie die mit NaCl behandelten Tiere der F0- und der F1-Generation. Es zeigte sich, dass auch in der F1'-Generation die Lokomotionszunahme in der MPTP-Gruppe vor allem auf die Weibchen zurückzuführen ist. Die Strecke der männlichen F1'-Tiere betrug  $9911,22 \pm 473,37$  cm und die der weiblichen  $10587,27 \pm 1943,07$  cm.

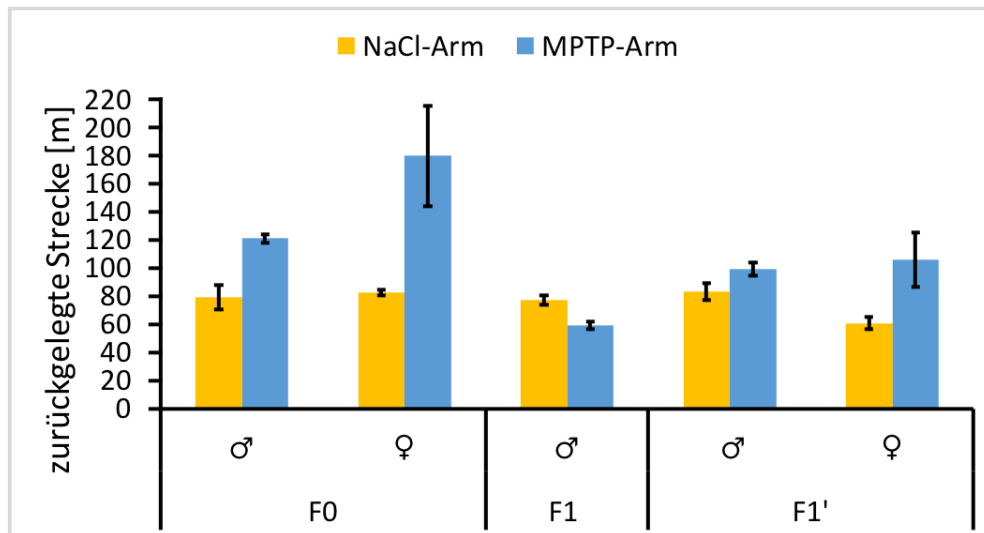


Abbildung 11: Zurückgelegte Strecke im Openfield-Versuch nach Geschlecht sortiert

Erfasst wurde die zurückgelegte Strecke in Zentimetern innerhalb eines 25-minütigen Beobachtungszeitraums. Die Ergebnisse wurden nach Geschlechtern sortiert ausgewertet. Hier zeigte sich, dass die Lokomotionszunahme des MPTP-Armes sowohl in der F0- als auch in der F1'-Generation vor allem auf die Streckenzunahme der Weibchen zurückzuführen ist. Ein signifikanter Geschlechterunterschied ließ sich allerdings nicht feststellen (Mittelwert  $\pm$  SEM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer two-way ANOVA und einem post-hoc Tukey-Test ( $n=2-21$  pro Gruppe).

Um Aussagen über den Aufenthaltsort der Mäuse machen zu können, wurde ermittelt, wie weit von der Wand der *Openfield*-Käfige sich die Tiere im Durchschnitt aufhielten (siehe Abb. 12). Hier fanden sich nur geringe nicht signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. In der F0-Generation hielten sich die Tiere des NaCl-Armes durchschnittlich  $6 \pm 0,18$  cm von der Wand entfernt auf. Im MPTP-Arm betrug der Abstand  $5 \pm 0,16$  cm. Der Wandabstand in der F1-Generation maß  $5,55 \pm 0,25$  cm für die naive und  $5,89 \pm 0,24$  cm für die intoxikierte Gruppe. Ähnliches galt für die F1'-Tiere mit einem Wandabstand von  $5,95 \pm 0,16$  cm für den NaCl- und  $5,54 \pm 0,57$  cm für den MPTP-Arm.

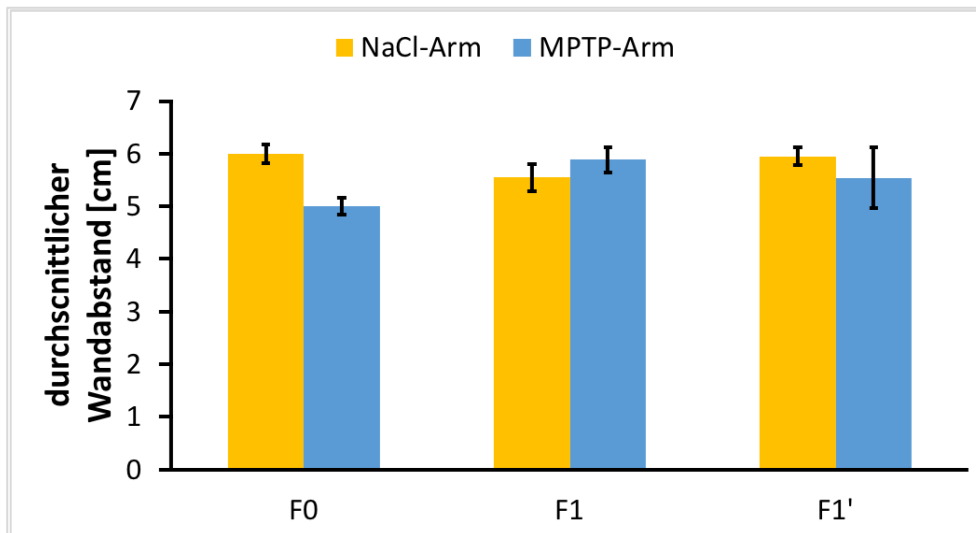


Abbildung 12: Durchschnittlicher Wandabstand [cm]

Um Unterschiede in Bezug auf den Aufenthaltsort der Tiere festzustellen, wurde ermittelt, wie weit sich die Mäuse im Durchschnitt von der Wand der Käfige aufhielten. Das vermehrte Aufhalten im Randbereich, also ein geringer Abstand zur Wand, ist Ausdruck einer vermehrten Ängstlichkeit der Tiere. Es fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Mittelwert  $\pm$  SEM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer one-way ANOVA und einem post-hoc Tukey-Test ( $n=4-23$  pro Gruppe).

### 3.2.2 Zylinderversuch

Die F1'-Mäuse wurden dem Zylindertest unterzogen. Erfasst wurde, wie häufig sich jede Maus innerhalb eines 5-minütigen Beobachtungszeitraumes aufrichtete (siehe Abb. 13). Als Aufrichtung wurde sowohl gewertet, wenn die Maus die Seitenwand mit den Vorderpfoten berührte als auch wenn die Vorderpfoten frei am Körper blieben.

Die F1'-Tiere des NaCl-Armes richteten sich  $21 \pm 2$  Mal auf. Bei den F1'-Tieren des MPTP-Armes lag die Zahl der Aufrichtungen bei  $27 \pm 4$ . Die gemessenen Unterschiede erreichten nicht das Signifikanzniveau ( $p < 0,05$ ), was am ehesten auf die zu kleine Gruppengröße zurückzuführen ist. Die Power betrug hier 0,37. Ein

signifikanter Unterschied konnte hierbei nicht festgestellt werden, allerdings zeigte sich auch hierbei eine höhere Aktivität der Mäuse des MPTP-Armes.

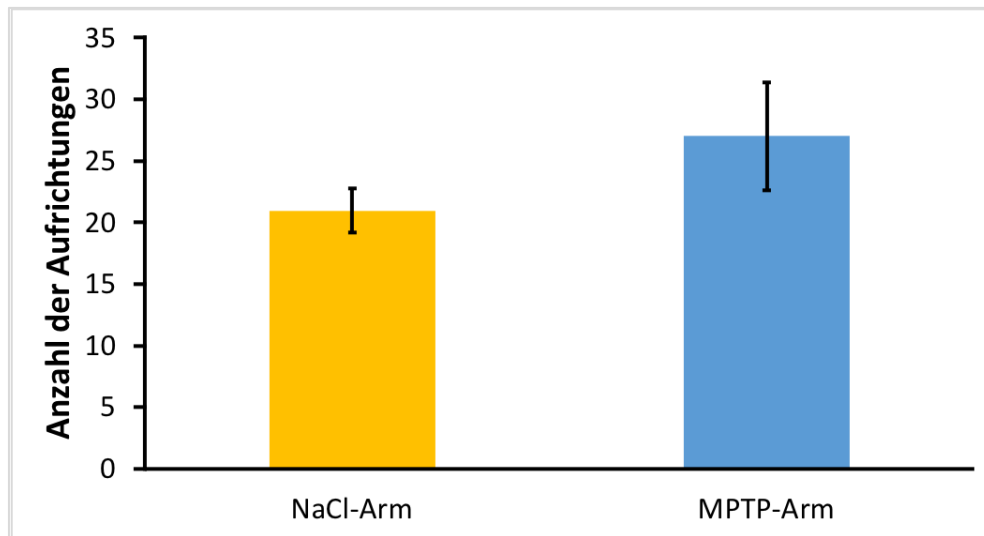


Abbildung 13: Zylindertest 1

*Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Aufrichtungen zwischen den F1'-Mäusen des exponierten (blau) und des naiven Armes (gelb). Erfasst wurde, wie häufig sich die F1'-Tiere innerhalb eines 5-minütigen Beobachtungszeitraumes aufrichteten. Dafür wurden die F1'-Mäuse einzeln in einen durchsichtigen Zylinder gesetzt (9 cm breit, 15 cm hoch). Als eine Aufrichtung wurde sowohl gewertet, wenn die Vorderpfoten die Seitenwände des Zylinders berührten als auch wenn die Vorderpfoten frei am Körper blieben (Mittelwert  $\pm$  SEM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer one-way ANOVA und einem post-hoc Tukey-Test (NaCl-Arm  $n=23$ , MPTP-Arm  $n=8$ ).*

Ebenso wurde der Zeitraum erfasst, in dem die F1'-Tiere im Vierpfotenstand (grau) oder in aufgerichteter Position (schwarz) verbrachten (siehe Abb. 14). Hierbei wurden die Mäuse 15 Minuten lang beobachtet. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den 2 Gruppen. Die F1'-Tiere des NaCl-Armes befanden sich  $97,16 \pm 0,47$  % des Beobachtungszeitraumes im Vierpfotenstand und  $2,84 \pm 0,47$  % im Hinterpfotenstand. Bei den F1'-Mäusen des MPTP-Armes lag der Wert im

Vierpfotenstand bei  $97,19 \pm 0,94 \%$  und im aufgerichteten Zustand bei  $2,81 \pm 0,94 \%$ .

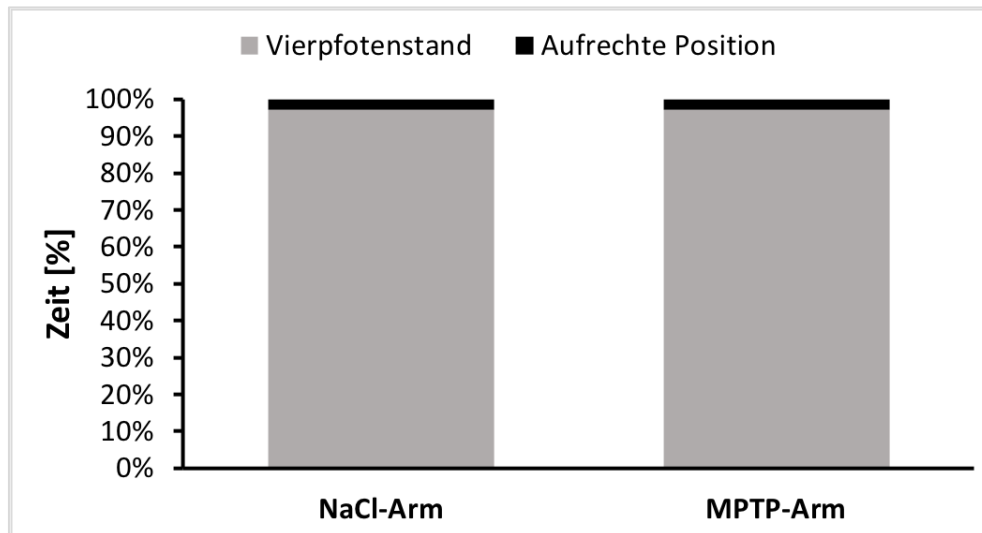


Abbildung 14: Zylindertest 2

Die F1'-Mäuse beider Gruppen verbrachten den gleichen Zeitraum in aufgerichteter Position. Erfasst wurde der prozentuale Anteil, in dem sich die F1'-Tiere innerhalb eines 15-minütigen Beobachtungszeitraumes im Vierpfotenstand (grau) bzw. im Hinterpfotenstand (schwarz) befanden (Mittelwert) (NaCl-Arm  $n=23$ , MPTP-Arm  $n=8$ ).

### 3.3 Komplex-I-Aktivität

Um den Einfluss vom MPTP/Probenecid auf die Atmungskette zu beurteilen, wurde spektrometrisch die Komplex-I-Aktivität in striatalen Gewebeproben der Mäuse bestimmt (siehe Abb. 15). Um den unterschiedlichen Mitochondriengehalt der Proben auszugleichen, wurde die Enzymaktivität zur Aktivität der Citrat-Synthase normiert, da diese pro Mitochondrium in etwa gleich bleibt und kaum reguliert ist. In keiner Generation zeigte sich zwischen den Gruppen ein signifikanter Unterschied in den Aktivitäten. Die Enzymaktivität in der F0-Generation lag bei  $100 \pm 9,13$  nmol/min\*ml in der mit NaCl behandelten Gruppe und bei  $93,8 \pm 3,28$  nmol/min\*ml in der mit MPTP/Probenecid behandelten Gruppe. In der F1-Generation ergaben

sich für den naiven Arm  $86,94 \pm 3,12$  nmol/min\*ml und für den exponierten Arm  $95,35 \pm 8,05$  nmol/min\*ml. Ähnlich wie in der F0-Generation lagen die Enzymaktivitäten des MPTP-Armes auch in der F1'-Generation unter denen des NaCl-Armes. So betrug der Wert für die naiven F1'-Mäuse  $92,96 \pm 7,98$  nmol/min\*ml und für die exponierten F1'-Tiere  $84,59 \pm 6,94$  nmol/min\*ml.

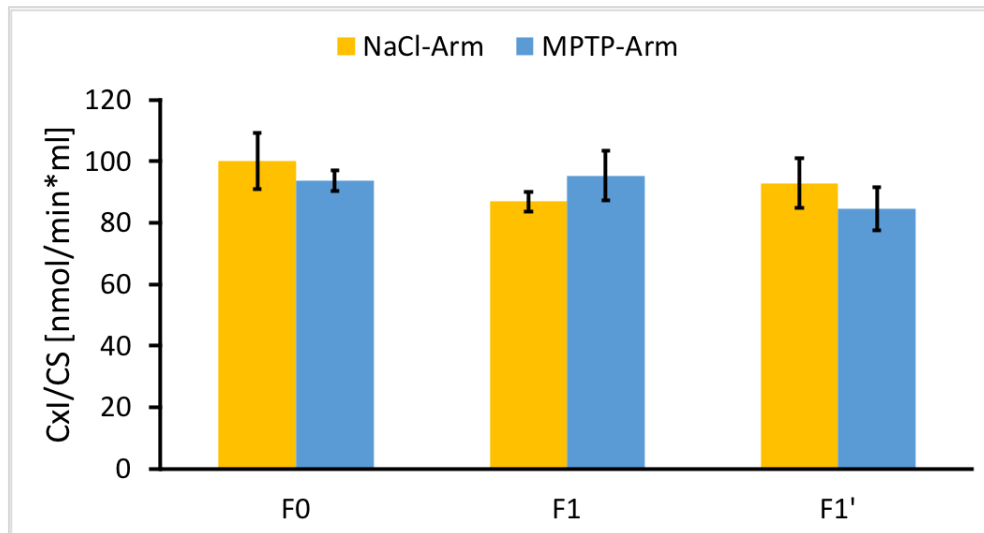


Abbildung 15: Komplex-I-Aktivität

Die MPTP/Probenecid-Intoxikation zeigte keinen Effekt auf die striatale Komplex-I-Aktivität (CxI): Die Daten wurden spektrometrisch ermittelt und auf die Citrat-Synthase-Aktivität (CS) normiert (Angaben in nmol/min\*ml). Zwischen dem exponierten (blau) und dem naiven (gelb) Arm zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Mittelwert  $\pm$  SEM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer one-way ANOVA und einem post-hoc Tukey-Test ( $n=2-22$  pro Gruppe).

### 3.4 Messung der Neurotransmitter

Mittels HPLC wurde der striatale Gehalt an den Neurotransmittern Serotonin, 5-Hydroxyindolessigsäure, Dopamin, DOPAC, Noradrenalin sowie Adrenalin bestimmt. Die Ergebnisse der F1'-Generation wurden zusätzlich nach Geschlecht sortiert ausgewertet.

HPLC-Proben	Naiver Arm (49)	MPTP-Arm (31)
F0	9	2
F1	17	21
F1'	23	8

*Tabelle 1: Proben, die der HPLC-Messung zugeführt wurden*

Im striatalen Hirnlysat der Mäuse wurden Dopamin-Konzentrationen bestimmt (siehe Abb. 16). Im Striatum der F0-Mäuse der NaCl-Gruppe betrug die Dopamin-Konzentration  $16,27 \pm 1,09$  ng/mg Feuchtgewebe. Bei den F0-Tieren, die direkt MPTP/Probenecid ausgesetzt waren, fand sich ein signifikanter Abfall der striatalen Dopamin-Konzentration auf einen Wert von  $8,21 \pm 2,94$  ng/mg Feuchtgewebe. In der F1-Generation unterschieden sich die Ergebnisse beider Arme nur geringfügig voneinander. Hier wurde im NaCl-Arm elektrochemisch eine Dopamin-Konzentration von  $13,97 \pm 0,85$  ng/mg Feuchtgewebe und im MPTP-Arm eine Konzentration von  $14,44 \pm 0,74$  ng/mg Feuchtgewebe ermittelt. In der naiven F1'-Gruppe betrug die Dopamin-Konzentration  $13,06 \pm 0,79$  ng/mg Feuchtgewebe. Auch im exponierten Arm der F1'-Generation fand sich ein signifikanter Dopaminabfall auf einen Wert von  $11,31 \pm 0,81$  ng/mg Feuchtgewebe gegenüber der naiven F0-Gruppe.

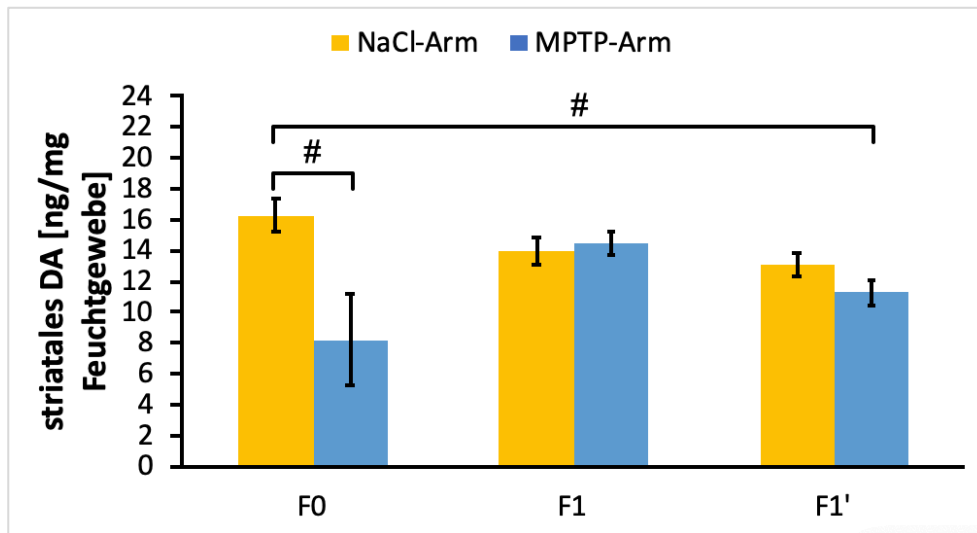


Abbildung 16: Striatale Dopamin-Konzentration

MPTP/Probenecid bewirkte einen signifikanten Abfall der Dopamin-Konzentration in der F0-Generation. Ebenso zeigten die Nachfahren der intoxikierten Mäuse (F1' blau) ebenfalls einen signifikanten Dopaminabfall gegenüber der naiven Elterngeneration. Die Ergebnisse sind angegeben in ng/mg Feuchtgewebe (Mittelwert  $\pm$  SEM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer one-way ANOVA und einem post-hoc Holm-Šídák-Test ( $n=2-23$  pro Gruppe, # für Signifikanz im paarweisen Vergleich mit  $p<0,05$ ).

Die striatale Dopamin-Konzentration ergab in der geschlechterspezifischen Auswertung der F1'-Generation keinen signifikanten Unterschied (siehe Abb. 17). Für die Männchen des NaCl-Armes ergaben sich eine Dopamin-Konzentration von  $11,96 \pm 0,98$  ng/mg Feuchtgewebe und für die Männchen des MPTP-Armes eine Konzentration von  $12,49 \pm 0,9$  ng/mg Feuchtgewebe. Bei den Weibchen betrug der Wert  $13,09 \pm 1,22$  ng/mg Feuchtgewebe in der Kontroll-Gruppe und  $9,33 \pm 0,57$  ng/mg Feuchtgewebe in der exponierten Gruppe.

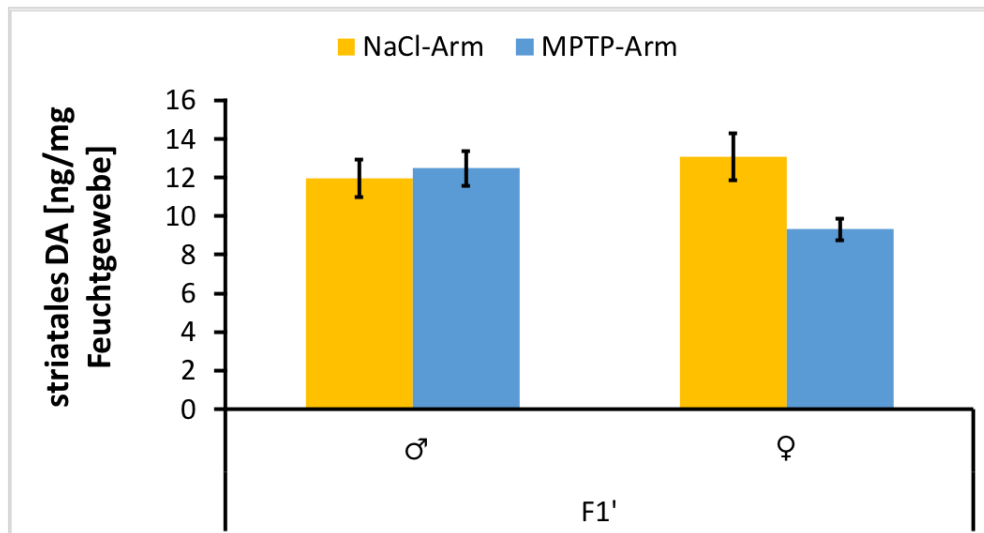


Abbildung 17: Striatale Dopamin-Konzentration der F1'-Generation nach Geschlecht sortiert

Das geschlechterübergreifende Ergebnis der striatalen Abnahme der Dopamin-Konzentration in der F1'-Generation (siehe Abb. 16) ließ sich auf die Ergebnisse des weiblichen Geschlechts zurückführen. Allerdings ließ sich kein signifikanter geschlechterspezifischer Unterschied bezüglich der striatalen Dopamin-Konzentration ausmachen. Die Ergebnisse sind angegeben in ng/mg Feuchtgewebe (Mittelwert  $\pm$  SEM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer two-way ANOVA und einem post-hoc Tukey-Test ( $n=3-12$  pro Gruppe).

Ebenfalls wurde die striatale Konzentration von DOPAC, einem Dopamin-Metaboliten, ermittelt. Danach wurde der DOPAC/Dopamin-Quotient errechnet, dieser zeigt den Dopaminumsatz an. Im NaCl-Arm wurde ein DOPAC/Dopamin-Quotient von  $0,06 \pm 0,002$  ng/mg Feuchtgewebe für die F0-Generation ermittelt. Demgegenüber zeigte sich ein nicht signifikant höherer Umsatz im MPTP-Arm dieser Generation mit  $0,09 \pm 0,005$  ng/mg Feuchtgewebe. Der Dopaminumsatz der F1-Generation lag für den naiven Arm bei  $0,07 \pm 0,003$  ng/mg Feuchtgewebe und für den exponierten Arm bei  $0,08 \pm 0,005$  ng/mg Feuchtgewebe. In der F1'-Generation lag der Dopaminumsatz in der Kontroll-Gruppe bei  $0,07 \pm 0,003$  ng/mg Feuchtgewebe. Es fand sich ein erhöhter Dopaminumsatz bei den Tieren der F1'-Generation des exponierten Armes, dieser war mit  $0,08 \pm 0,009$  ng/mg allerdings

nicht signifikant. Jedoch fand sich sowohl in der intoxikierten Elterngeneration als auch in den nach Intoxikation entstandenen Tieren eine Tendenz zu einem höheren Dopaminumsatz. Wenn man die unbehandelte Elterngeneration (F0 gelb) mit den Nachfahren, die nach Natriumchlorid-Behandlung entstanden sind (F1' gelb), gruppiert und gegen F1' blau vergleicht, zeigt sich eine Signifikanz.

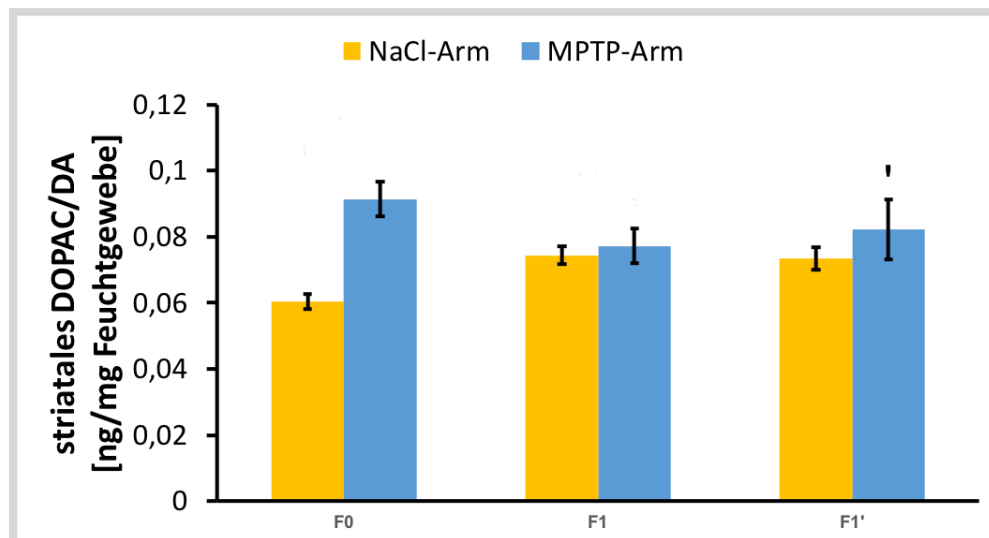


Abbildung 18: Striatale DOPAC/Dopamin-Konzentration

Die Injektion von MPTP/Probenecid bewirkte einen erhöhten striatalen Dopaminumsatz bei den F0- und F1'-Tieren. Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Wenn man die Elterngeneration zusammen mit den Nachfahren, die nach Natriumchlorid-Behandlung entstanden sind, gegen F1' blau vergleicht, zeigt sich eine Signifikanz ( $p < 0,05$ ). Die Ergebnisse sind angegeben in ng/mg Feuchtgewebe (Mittelwert  $\pm$  SEM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer one-way ANOVA und einem post-hoc Tukey-Test ( $n=2-23$  pro Gruppe).

Für den striatalen Dopaminumsatz ergab sich in der geschlechterspezifischen Auswertung der F1'-Generation kein signifikanter Unterschied (siehe Abb. 19). Für die Männchen des NaCl-Armes ergaben sich ein DOPAC/Dopamin-Quotient von  $0,07 \pm 0,006$  ng/mg Feuchtgewebe und für die Männchen des MPTP-Armes ein

Quotient von  $0,08 \pm 0,002$  ng/mg Feuchtgewebe. Bei den Weibchen betrug der Umsatz  $0,07 \pm 0,003$  ng/mg Feuchtgewebe für den naiven Arm und  $0,09 \pm 0,02$  ng/mg Feuchtgewebe für den exponierten Arm.

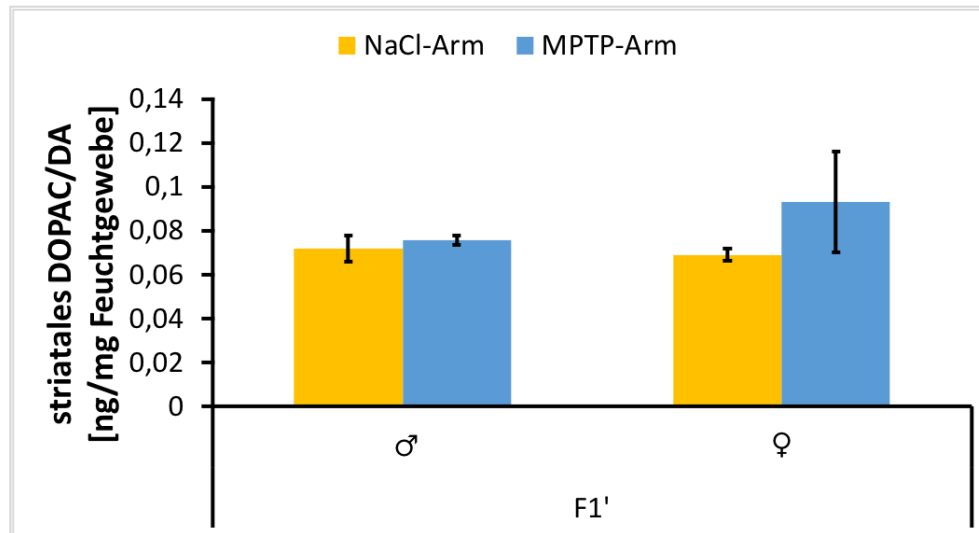


Abbildung 19: Striataler DOPAC/Dopamin-Quotient der F1'-Generation nach Geschlecht sortiert

Der erhöhte Dopaminumsatz des MPTP-Armes der F1'-Generation (siehe Abb. 18) ließ sich stärker auf die Ergebnisse des weiblichen Geschlechts zurückführen. Allerdings ließ sich kein signifikanter geschlechterspezifischer Unterschied bezüglich der striatalen DOPAC/Dopamin-Konzentration ausmachen. Die Ergebnisse sind angegeben in ng/mg Feuchtgewebe (Mittelwert  $\pm$  SEM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer two-way ANOVA und einem post-hoc Tukey-Test ( $n=3-12$  pro Gruppe).

Bei der Serotonin-Konzentration ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Gruppen (siehe Abb. 20). Die höchste Serotonin-Konzentration wurde im Hirnlysat der naiven F0-Tiere mit  $0,68 \pm 0,03$  ng/mg Feuchtgewebe bestimmt. Die restlichen Serotonin-Konzentrationen lagen allerdings nah beieinander. So lag die Konzentration im MPTP-Arm bei den F0-Tieren bei  $0,64 \pm 0,01$  ng/mg Feuchtgewebe. Bei den F1-Tieren betrug die 5-HT-Konzentration der

naiven Gruppe  $0,57 \pm 0,03$  ng/mg Feuchtgewebe und die der exponierten Tiere  $0,59 \pm 0,04$  ng/mg Feuchtgewebe. Im NaCl-Arm der F1'-Generation fand sich eine Serotonin-Konzentration von  $0,61 \pm 0,02$  ng/mg Feuchtgewebe. Für den MPTP-Arm betrug der Wert  $0,62 \pm 0,05$  ng/mg Feuchtgewebe.

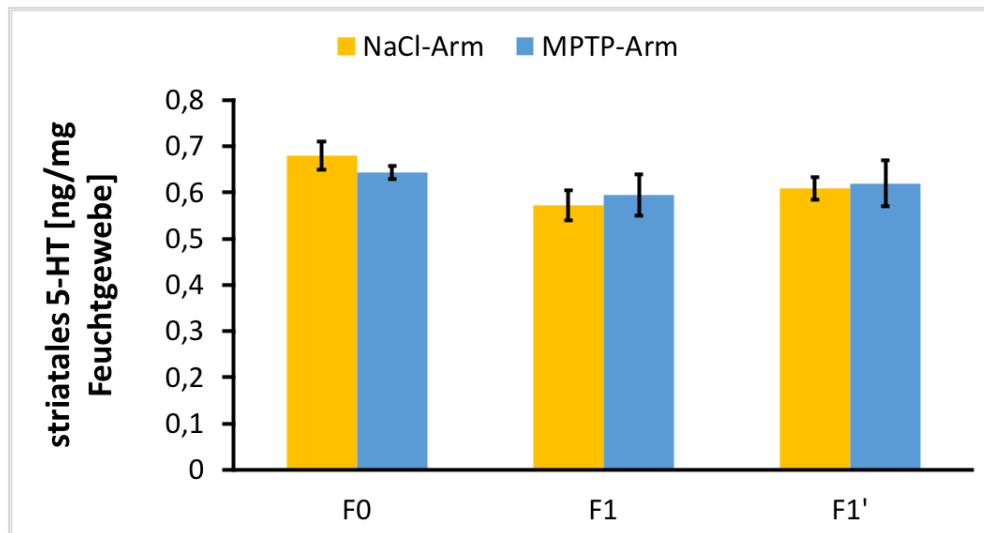


Abbildung 20: Striatale 5-HT-Konzentration

Die MPTP/Probenecid-Intoxikation zeigte keinen signifikanten Effekt auf die striatale 5-HT-Konzentration. Die Ergebnisse sind angegeben in ng/mg Feuchtgewebe (Mittelwert  $\pm$  SEM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer one-way ANOVA und einem post-hoc Tukey-Test ( $n=2-23$  pro Gruppe).

Die geschlechterspezifische Auswertung der F1'-Generation bezüglich der striatalen 5-HT-Konzentration ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied (siehe Abb. 21). So lagen die Werte für die Männchen des NaCl-Armes bei  $0,54 \pm 0,04$  ng/mg Feuchtgewebe und die des MPTP-Armes bei  $0,59 \pm 0,06$  ng/mg Feuchtgewebe. Bei den Weibchen betrug der Wert  $0,63 \pm 0,03$  ng/mg Feuchtgewebe in der naiven und  $0,67 \pm 0,07$  ng/mg Feuchtgewebe in der exponierten Gruppe.

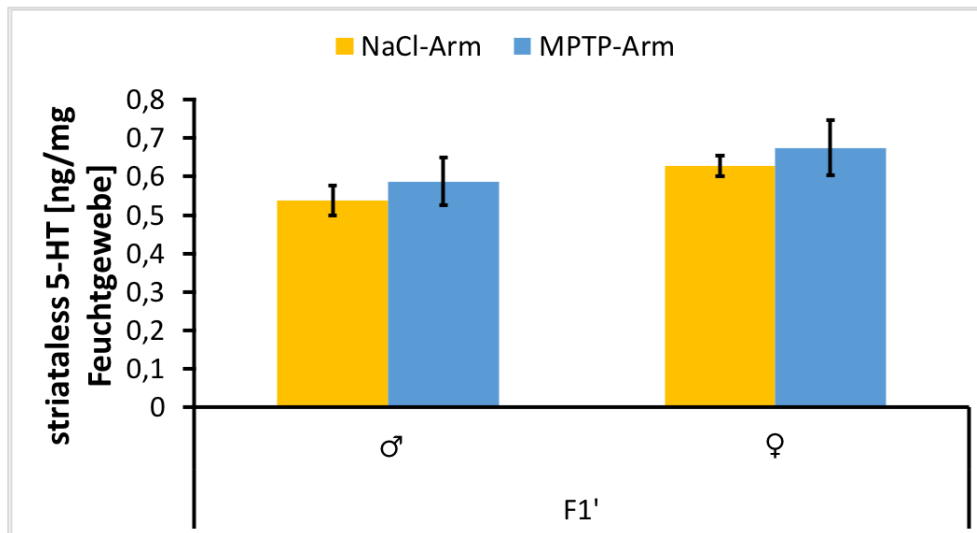


Abbildung 21: Striatale 5-HT-Konzentration der F1'-Generation nach Geschlecht sortiert

Die MPTP/Probenecid-Intoxikation zeigte keinen signifikanten geschlechter-spezifischen Unterschied bezüglich der striatalen 5-HT-Konzentration. Die Ergebnisse sind angegeben in ng/mg Feuchtgewebe (Mittelwert  $\pm$  SEM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer two-way ANOVA und einem post-hoc Tukey-Test ( $n=3-12$  pro Gruppe).

Auch die striatale Konzentration von 5-Hydroxyindolessigsäure, des Hauptmetaboliten von Serotonin, wurde ermittelt (siehe Abb. 22). Danach wurde der 5-HIAA/5-HT-Quotient errechnet, dieser zeigt den Serotoninumsatz an. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Im NaCl-Arm wurde ein 5-HIAA/5-HT-Quotient von  $0,38 \pm 0,03$  ng/mg Feuchtgewebe für die F0-Generation ermittelt. In dieser Generation fand sich im MPTP-Arm ein Quotient von  $0,36 \pm 0,14$  ng/mg Feuchtgewebe. Der Serotoninumsatz der F1-Generation lag bei  $0,46 \pm 0,06$  ng/mg Feuchtgewebe für die naiven Tiere und bei  $0,5 \pm 0,09$  ng/mg Feuchtgewebe für die exponierten Tiere. Ähnliche Werte bestimmten wir auch in der F1'-Generation. So betrug der Quotient im NaCl-Arm  $0,52 \pm 0,04$  ng/mg Feuchtgewebe und im MPTP-Arm  $0,49 \pm 0,07$  ng/mg Feuchtgewebe.

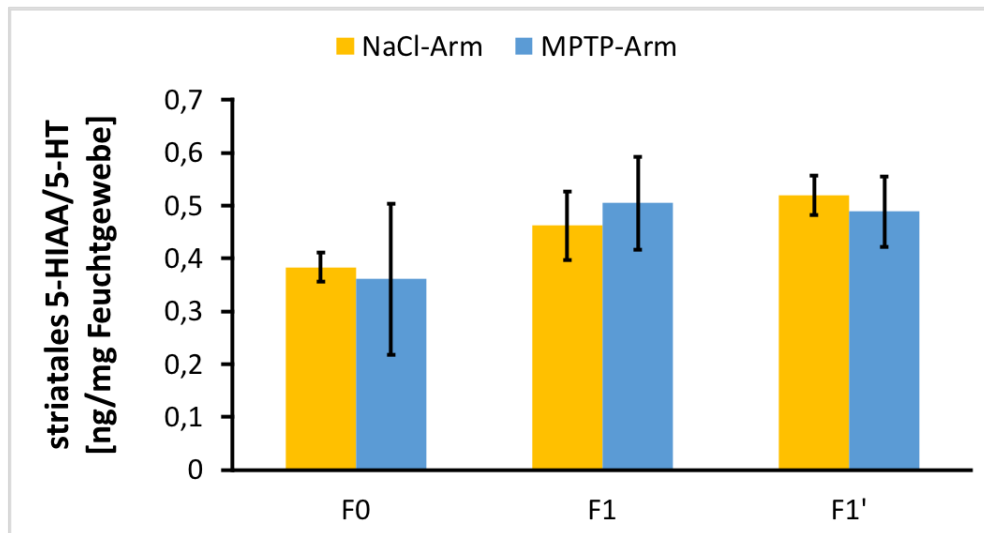


Abbildung 22: Striatale 5-HIAA/5-HT-Konzentration

Die MPTP/Probenecid-Intoxikation zeigte keinen signifikanten Effekt auf den Serotoninsatz. Die Ergebnisse sind angegeben in ng/mg Feuchtgewebe (Mittelwert  $\pm$  SEM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer one-way ANOVA und einem post-hoc Tukey-Test ( $n=2-23$  pro Gruppe).

Die striatale 5-HIAA/5-HT-Konzentration ergab in der geschlechterspezifischen Auswertung der F1'-Generation keinen signifikanten Unterschied (siehe Abb. 23). Für die Männchen ergaben sich Werte von  $0,4 \pm 0,04$  ng/mg Feuchtgewebe für die Tiere des NaCl-Armes und  $0,53 \pm 0,1$  ng/mg Feuchtgewebe für die des MPTP-Armes. Bei den Weibchen betrug der Wert  $0,6 \pm 0,05$  ng/mg Feuchtgewebe in der naiven und  $0,42 \pm 0,05$  ng/mg Feuchtgewebe in der exponierten Gruppe.

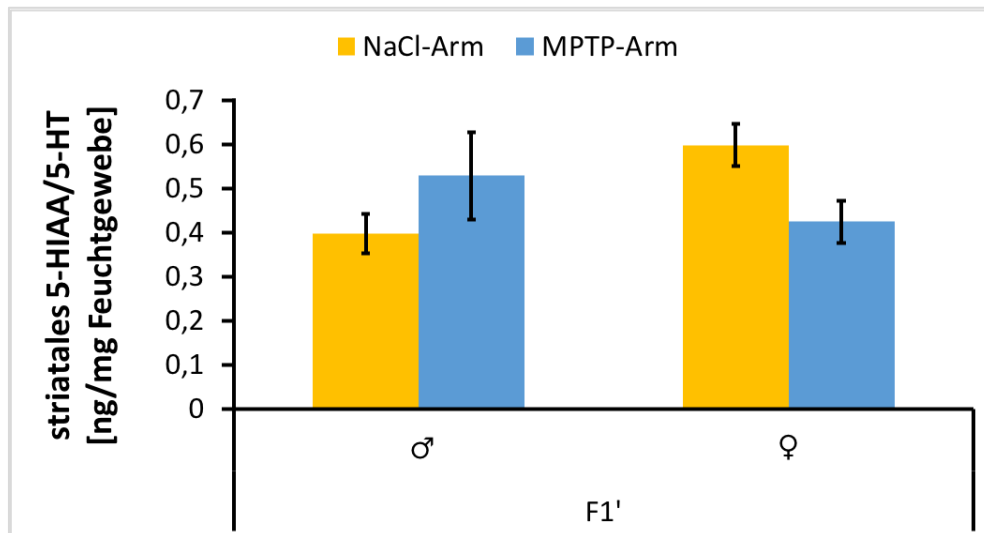


Abbildung 23: Striatale 5-HIAA/5-HT-Konzentration der F1'-Generation nach Geschlecht sortiert

Das geschlechterübergreifende Ergebnis der striatalen Abnahme der 5-HIAA/5-HT-Konzentration in der F1'-Generation (Abb. 22) ließ sich auf die Ergebnisse des weiblichen Geschlechts zurückführen. Allerdings ließ sich kein signifikanter geschlechterspezifischer Unterschied bezüglich der striatalen 5-HIAA/5-HT-Konzentration ausmachen. Die Ergebnisse sind angegeben in ng/mg Feuchtgewebe (Mittelwert  $\pm$  SEM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer two-way ANOVA und einem post-hoc Tukey-Test ( $n=3-12$  pro Gruppe).

Ebenso wurde mittels HPLC die striatale Noradrenalin-Konzentration untersucht (siehe Abb. 24). In der F0-Generation lag die Noradrenalin-Konzentration in beiden Gruppen nah beieinander mit  $15,84 \pm 1,73$  ng/mg Feuchtgewebe in der naiven und  $16,35 \pm 4,43$  ng/mg Feuchtgewebe in der exponierten Gruppe. In der F1-Generation betrug die Konzentration  $17,64 \pm 0,99$  ng/mg Feuchtgewebe im NaCl-Arm und  $20,02 \pm 2,2$  ng/mg Feuchtgewebe im MPTP-Arm. Ebenfalls fand sich in der F1'-Generation kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.  $19,44 \pm 1,69$  ng/mg Feuchtgewebe ergab sich für die naiven Tiere und  $20,24 \pm 2,33$  ng/mg Feuchtgewebe für die exponierten Tiere.

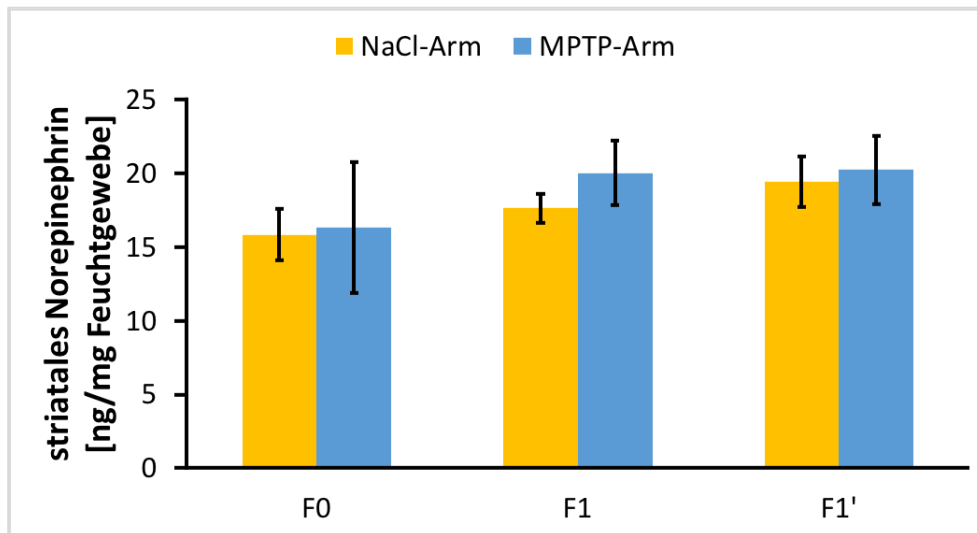


Abbildung 24: Striatale Noradrenalin-Konzentration

*Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse sind angegeben in ng/mg Feuchtgewebe (Mittelwert  $\pm$  SEM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer one-way ANOVA und einem post-hoc Tukey-Test (n=2-23 pro Gruppe).*

Schließlich wurde auch die striatale Adrenalin-Konzentration bestimmt (siehe Abb. 25). In der naiven F0-Gruppe lag die Konzentration bei  $10,7 \pm 2,01$  ng/mg Feuchtgewebe. In der exponierten Gruppe dieser Generation lag die striatale Adrenalin-Konzentration im Vergleich zu allen Gruppen signifikant höher und betrug  $24,85 \pm 1,63$  ng/mg Feuchtgewebe. In der F1-Generation ergab sich für die naive Gruppe eine Adrenalin-Konzentration von  $5,9 \pm 0,38$  ng/mg Feuchtgewebe und für die exponierte Gruppe eine Konzentration von  $7,53 \pm 0,48$  ng/mg Feuchtgewebe. Im NaCl-Arm der F1'-Generation lag die Konzentration bei  $6,82 \pm 0,75$  ng/mg Feuchtgewebe. Die niedrigste Adrenalin-Konzentration fand sich im MPTP-Arm der F1'-Generation mit einem Wert von  $5,68 \pm 0,1$  ng/mg Feuchtgewebe.

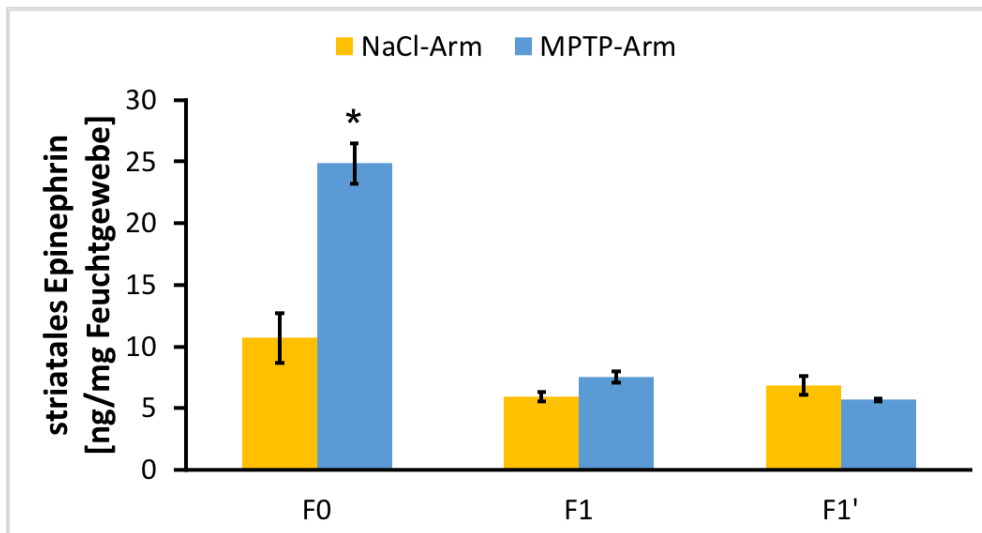


Abbildung 25: Striatale Adrenalin-Konzentration

Die Injektion von MPTP/Probenecid bewirkte eine erhöhte striatale Adrenalin-Konzentration bei den F0-Tieren (\* $p < 0,05$ ). Die Ergebnisse sind angegeben in ng/mg Feuchtgewebe (Mittelwert  $\pm$  SEM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer one-way ANOVA und einem post-hoc Tukey-Test ( $n = 2-23$  pro Gruppe, \*  $p < 0,05$ ).

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Methoden

#### 4.1.1 Diskussion des chronischen MPTP-Modells

Neurodegenerative Erkrankungen finden sich in der Tierwelt nur in Ausnahmefällen wie zum Beispiel bei Delphinen oder Pavianen. Dementsprechend ist es schwierig, ein passendes Modell zu kreieren (Gunn-Moore *et al.* 2018; Lowenstine *et al.* 2016). In der vorliegenden Arbeit wurde das chronische MPTP-Modell an der Maus angewendet. Da die MPTP-Wirkung u. a. vom Stamm der Mäuse abhängt, führten wir die Versuche an C57Bl/6-Mäusen durch, die für MPTP sensitiv sind (Smeyne *et al.* 2005). Das chronische MPTP-Modell hat gegenüber dem akuten und subchronischen Modell den Vorteil, dass es nur zu einer geringfügigen Regeneration der dopaminergen Neurone kommt (Petroske *et al.* 2001). Das dabei verwendete Gichtmittel Probenecid wirkt selbst toxisch und potenziert die Wirkung von MPTP. Wie MPTP bewirkt auch Probenecid eine Abnahme der intrazellulären ATP-Konzentration (Alvarez-Fischer *et al.* 2013a).

Beim M. Parkinson handelt es sich um eine langsam fortschreitende Erkrankung. Dementsprechend wählten wir ein Modell, das diesem Verlauf möglichst nahekommt. Beim akuten und subchronischen MPTP-Modell kommt es zu einem schnellen Untergang der dopaminergen Zellen. Dagegen wird beim chronischen Modell die Maus über Wochen intoxikiert und der Zelluntergang findet fortschreitend statt und zwar auch nach Beendigung der Intoxikationsphase (Meredith *et al.* 2008). Trotzdem haben alle diese Modelle gemeinsam, dass motorische Einbußen nicht gut mit der verabreichten MPTP-Dosis, der striatalen Dopamin-Konzentration oder dem Ausmaß des dopaminergen Zellunterganges korrelieren (Rousselet *et al.* 2003). Außerdem hängt das Ausmaß der nigrostriatalen Schädigung neben dem Mäuse-Stamm auch vom Geschlecht und Alter der Tiere ab (Przedborski *et al.* 2001).

#### **4.1.2 Diskussion der analytischen Aspekte des *Openfield***

Die *Openfield*-Untersuchung ist eine der etablierten Methoden zur Untersuchung der Lokomotion von Mäusen. Allerdings existieren eine Vielzahl unterschiedlicher Protokolle, so dass der Vergleich mit anderen Studien erschwert wird (Stanford 2007). Die Ergebnisse sind außerdem anfällig und können durch unterschiedliche Tageszeiten oder Lichtverhältnisse verfälscht werden (Seibenhener und Wooten 2015).

Auch wird kritisiert, dass das Verfahren nicht sensitiv genug sei, um das Ausmaß des striatalen Dopaminverlustes zu erfassen (Luchtman *et al.* 2009).

### **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

#### **4.2.1 Diskussion der Mortalität**

Die hohe Mäusesterblichkeit, vor allem in den ersten 24 Stunden nach Beginn der MPTP-Injektion, ist ein bekanntes Problem des MPTP-Modells (Meredith und Rademacher 2011). Auch in unserer Studie verzeichneten wir eine hohe Sterblichkeit, nur 4 von insgesamt 16 intoxikierten Mäusen der F0-Generation überlebten (75 % Mortalität). Damit war die Mortalität deutlich höher als bei anderen Studien, die eine Sterblichkeit von etwa 15 % berichteten (Jackson-Lewis und Przedborski 2007). 2 weitere Mäuse der intoxikierten F0-Mäuse verstarben noch bevor die Gehirne für die Messung der Komplex-I-Aktivität und für die HPLC-Auswertung gewonnen werden konnten. Somit ist die hohe Mortalität in der F0-Generation eine Beeinträchtigung dieser Studie. Ursächlich dafür sehen wir unter anderem das hohe Alter der Mäuse zu Beginn der Intoxikation. Wir entschieden, von unserem ursprünglichen Plan abzuweichen, und auf die Intoxikation der F1'-Generation zu verzichten, um keine weiteren Mäuse zu verlieren.

Die akute Mortalität wird nicht auf den Untergang des dopaminergen Systems zurückgeführt. Vielmehr wird als Ursache der schädliche Einfluss von MPTP auf das kardiovaskuläre System vermutet. MPTP beeinträchtigt autonome Herz-Kreislauf-Funktionen wie den Baroreflex und die Herzfrequenzvariabilität (Liu *et al.* 2020). Außerdem bewirkt MPTP am Herzen einen Untergang der sympathischen

Innervation und führt zur Abnahme der kardialen Noradrenalin- und Dopamin-Konzentration (Joers und Emborg 2014).

Zudem kann MPTP die Körperkerntemperatur der Mäuse drastisch herabsetzen. Die daraus resultierende Hypothermie hat ebenfalls einen negativen Einfluss auf das Überleben der Tiere. Da dieser Effekt sich auch nach MPP+-Gabe beobachten lässt, wird die Abnahme der Körperkerntemperatur nicht mit dem Einfluss des Giftes auf die dopaminergen Zellen des ZNS zurückgeführt. Schließlich ist MPP+ nicht in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren. Jiao *et al.* intoxikierten C57BL/6-Mäuse mit MPTP bei  $20.1 \pm 0.3$  °C Käfigtemperatur. Hierbei konnten sie nach MPTP-Injektion eine Abnahme der Körpertemperatur um 31 % feststellen. Alle Mäuse in dieser Gruppe verstarben. Ein anderer Teil der Mäuse hatte für den gesamten Behandlungszeitraum Zugang zu einer externen Wärmequelle. Die Käfigtemperatur lag hier bei  $24.6 \pm 0.3$  °C. Erstaunlicherweise lag die Mortalität hier nur bei 20 % (Jiao *et al.* 2015). Bereits Przedborski *et al.* behaupteten, dass sich die Mortalität nach MPTP-Behandlung durch die Verwendung von Wärmematten reduzieren ließe (Przedborski *et al.* 2001). Luchtman *et al.* erhöhten eine Woche vor der ersten MPTP-Injektion die Umgebungstemperatur auf 24 °C, um eine MPTP-induzierte Hypothermie zu vermeiden. In dieser Studie überlebten alle Mäuse (Luchtman *et al.* 2009). In unserem Versuchsaufbau lag die Umgebungstemperatur bei  $23 \pm 1$  °C.

#### **4.2.2 Diskussion der *Openfield*-Ergebnisse in Zusammenhang mit den Ergebnissen der elektrochemischen Auswertung mittels HPLC**

##### **4.2.2.1 Diskussion der zurückgelegten Strecke**

Unsere Ergebnisse zeigen eine signifikante Zunahme der zurückgelegten Strecke im *Openfield*-Käfig nach MPTP-Intoxikation und sind damit einheitlich mit anderen Arbeitsgruppen, die eine Hyperaktivität oder eine überschießende Regeneration nach MPTP-Intoxikation beschreiben (Chia *et al.* 1996; Ferguson *et al.* 2015; Luchtman *et al.* 2009; Willis und Donnan 1987).

So konnten wir eine Zunahme der Strecke für die F0-Mäuse feststellen, die direkt dem Gift ausgesetzt waren. Nach MPTP-Intoxikation liefen die F0-Tiere des MPTP-

Armes signifikant mehr als während der *Baseline*-Aufzeichnung, also vor der Intoxikation. Diese Gruppe legte eine größere Strecke zurück als jede andere Gruppe. Ein leichter, nicht signifikanter Rückgang der Strecke im NaCl-Arm der F0-Generation wird als Habituation gedeutet (Belovicova *et al.* 2017; Platel und Porsolt 1982).

Auch in der nachfolgenden Generation des MPTP-Armes zeigte sich eine signifikante Lokomotionszunahme bei Mäusen, die den intoxikierten Vorfahren abstammen (F1') gegenüber den Tieren, deren Vorfahren nicht intoxikiert waren (F1). Luchtman *et al.* beschrieben eine Hyperaktivität nach MPTP-Intoxikation insbesondere, wenn chronische oder kumulativ hohe Dosen verwendet werden (Luchtman *et al.* 2009; Luchtman *et al.* 2012). Chia *et al.* fanden bei MPTP-Dosen von 20 und 30 mg/kgKG zwar keinen signifikanten Verhaltensunterschied zu der Kontrollgruppe. Sie konnten aber feststellen, dass sich die Lokomotion dosisabhängig steigerte, wenn MPTP-Dosen zwischen 35 und 45 mg/kgKG verabreicht wurden (Chia *et al.* 1996).

Wir vermuten, dass die von uns festgestellte Hyperaktivität im *Openfield*-Versuch, durch kompensatorische Mechanismen der dopaminergen Neurone zustande kommt, die nicht untergegangen sind. Als Folge des MPTP-induzierten nigrostriatalen Untergangs kommt es zur Hochregulation postsynaptischer Dopaminrezeptoren (Quinn *et al.* 2006; Schroeder *et al.* 1997). Passend zu dieser Annahme fanden wir eine signifikant erniedrigte striatale Dopamin-Konzentration in der intoxikierten F0-Gruppe (siehe Abb. 16). Zudem fand sich ein erhöhter, allerdings nicht signifikanter, striataler Dopaminsatz dieser Tiere (siehe Abb. 18). Auch in der F1'-Generation zeigten die Tiere des MPTP-Armes eine erniedrigte Dopamin-Konzentration. Bemerkenswert ist, dass diese Tiere ebenfalls einen erhöhten, wenngleich nicht signifikanten, Dopaminsatz hatten. Nimmt man die unbehandelte Elterngeneration zusammen mit den Nachfahren, die nach Natriumchlorid-Behandlung entstanden sind, und vergleicht sie mit F1' blau, zeigt sich eine Signifikanz (siehe Abb. 18). Dies ist ein Anhalt dafür, dass obwohl vermutlich aufgrund der geringen Gruppengröße das Signifikanzniveau nicht

erreicht wurde, trotzdem ein Unterschied zwischen der naiven F1'- und der exponierten F1'-Gruppe existiert.

Zudem existieren weitere Mechanismen, die den dopaminergen Untergang ausgleichen können. So wird die Dopaminaufnahme der Dopamintransporter herunter- und die Aktivität der postsynaptischen Dopaminrezeptoren heraufreguliert (Rousselet *et al.* 2003).

Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass auch andere Neurotransmitter bei den kompensatorischen Mechanismen eine Rolle spielen. Nicht nur Dopamin, sondern auch Serotonin haben einen Einfluss auf die motorische Aktivität der Tiere. MPTP bzw. MPP+ bewirkt eine Zunahme der striatalen 5-HT-Konzentration, woraus wiederum eine Zunahme der Lokomotion resultiert. Im subakuten sowie chronischen MPTP-Modell ließ sich ein erhöhter 5-HIAA/5-HT-Quotient, also ein erhöhter Serotoninumsatz, feststellen. Die Zunahme der 5-HT-Konzentration wurde als Kompensationsmechanismus für die dopaminerge Verarmung gewertet (Chia *et al.* 1996; Luchtman *et al.* 2009). In unserer Studie fand sich jedoch kein Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich der striatalen Serotonin-Konzentration oder des Serotoninumsatzes.

Andere Autoren vermuten wiederum, dass die Lokomotionssteigerung durch einen frontobasalen hypodopaminergen Zustand verursacht wird (Espejo und Miñano 2001) oder in Zusammenhang mit einer erhöhten Nor-/Adrenalin-Ausschüttung steht (Alvarez-Fischer *et al.* 2013b). In Einklang mit letzterer Hypothese steht, dass wir eine signifikant erhöhte striatale Adrenalin-Konzentration bei den intoxikierten F0-Mäusen fanden, also bei jenen Tieren, welche die deutlichste Hyperaktivität im *Openfield* zeigten. Allerdings fanden wir keinen Unterschied bezüglich der striatalen Noradrenalin-Konzentration zwischen den Gruppen. Noradrenalin erleichtert die Dopaminausschüttung aus den nigrostriatalen Nervenendigungen und spielt daher eine wichtige Rolle im nigrostriatalen dopaminergen System (Rommelfanger *et al.* 2007). Bezüglich der Noradrenalin-Konzentration finden sich in der Literatur uneinheitliche Ergebnisse. Bei Verwendung des akuten MPTP-Regimes konnte eine Abnahme der Noradrenalin-Konzentration im Striatum festgestellt werden. Im

subakuten Modell fand sich eine Zunahme und im chronischen Modell eine Abnahme der kortikalen Noradrenalin-Konzentration (Luchtman *et al.* 2009).

#### 4.2.3 Diskussion des Aufenthaltsortes im *Openfield*-Käfig

Bei etwa 31 Prozent der M. Parkinson-Patienten lässt sich eine Zunahme der Ängstlichkeit beobachten (Broen *et al.* 2016). Es wird angenommen, dass eine dopaminerge sowie serotonerge Dysfunktion dafür verantwortlich ist. Nach MPTP-Injektion kommt es in mehreren Hirnregionen zur Abnahme von Serotonin (Vučković *et al.* 2008; Xia *et al.* 2018). MPTP verursacht jedoch auch Läsionen im ventralen tegmentalen Areal (VTA), was zu einer Abnahme der Dopamin-Konzentration im präfrontalen Kortex und einer Hyperaktivität sowie verminderten Ängstlichkeit führt (Hu *et al.* 2020; Rousset *et al.* 2003).

Neben der Aufzeichnung der zurückgelegten Strecke wurden die Daten auch dahingehend ausgewertet, ob es zwischen der intoxikierten und der naiven Gruppe einen Unterschied in Bezug auf ihren Aufenthaltsort gibt. Hierfür wurde der durchschnittliche Wandabstand innerhalb des 25-minütigen Beobachtungszeitraumes ermittelt. Nagetiere haben eine Aversion gegenüber ungeschützten offenen Bereichen und halten sich daher vorwiegend am Randbezirk eines *Openfield*-Käfigs auf. Mäuse verwenden ihre Schnurrhaare, um die Wände des *Openfield*-Käfigs zu ertasten. Das Aufhalten im Randbereich ist Ausdruck der Ängstlichkeit der Tiere und wird als Thigmotaxis bezeichnet (Bouwknegt und Paylor 2008). Ängstliches Verhalten wird unter anderem dadurch ausgelöst, dass die Mäuse von den anderen Tieren getrennt in den *Openfield*-Käfig gesetzt werden. Außerdem sind die *Openfield*-Käfige deutlich größer als die Käfige, in denen die Mäuse aufwachsen und an die sie gewöhnt sind. Dagegen ist das vermehrte Aufhalten im ungeschützten Zentrum Ausdruck einer verminderten Ängstlichkeit der Tiere (Stanford 2007).

Der C57Bl/6-Mäusestamm ist der am meisten verwendete Stamm in Studien, die sich mit Ängstlichkeit befassen. Im Vergleich zu anderen Mäusestämmen gilt dieser als weniger ängstlich (Bouwknegt und Paylor 2008).

Wie bei Luchtman *et al.* fanden wir bezüglich des Aufenthaltsortes keinen Unterschied zwischen den Gruppen. Somit lässt sich die ermittelte Hyperaktivität nicht durch die vermehrte Ängstlichkeit nach MPTP-Injektion erklären (Luchtman *et al.* 2012). Bouwknecht und Paylor wiesen darauf hin, dass diese Ergebnisse missinterpretiert werden können. Setzt man die Maus zu Beginn des Experiments in die Mitte des Käfigs, so kann es sein, dass die Maus zunächst aus Angst an diesem Ort verharrt. Der Aufenthalt in der Mitte würde dann fälschlicherweise als angstfreies Verhalten interpretiert werden (Bouwknecht und Paylor 2008). Auch andere Gruppen scheiterten daran, nach MPTP-Injektion eine vermehrte Ängstlichkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe festzustellen (Vučković *et al.* 2008). Wie Abbildung 20 zeigt, fand sich bei uns keine nennenswerte Serotonin-Abnahme nach MPTP-Injektion. Womöglich erklärt dies, weshalb sich keine vermehrte Ängstlichkeit im MPTP-Arm feststellen ließ. Außerdem lässt sich dieses Symptom bei Menschen erst in späteren Stadien der Erkrankung beobachten. Vermutlich können Unterschiede in Bezug auf den Aufenthaltsort erst zu einem späteren Zeitpunkt erfasst werden (Vučković *et al.* 2008).

#### **4.2.4 Diskussion der Zylinderversuch-Ergebnisse**

Neben der horizontalen Aktivität lässt sich auch die vertikale Aktivität als Maß für die Lokomotion analysieren. Die vertikale Aktivität, also das Aufrichten, dient der besseren Orientierung und Erkundung der Umgebung. Mittels des Zylindertestes wurde die Anzahl an Aufrichtungen erfasst. Als Aufrichtung galt sowohl, wenn die Vorderpfoten die Seitenwände des Zylinders berührten als auch (abweichend vom konventionellen Zylindertest (Fleming *et al.* 2013)) wenn die Vorderpfoten frei am Körper blieben.

Der Zylindertest eignet sich, um den Zelluntergang in der Substantia nigra vorherzusagen (Iancu *et al.* 2005), denn er ist sensitiv für das Ausmaß der nigrostriatalen dopaminergen Dysfunktion (Hwang *et al.* 2005).

Nagetiere benutzen ihre Vorderpfoten für die meisten Alltagsaktivitäten. Der Basalganglien-Schaltkreis ist vor allem für die Vorderpfoten- und weniger für die Hinterpfoten-Beweglichkeit verantwortlich (Meredith und Rademacher 2011). Zwar

konnten wir in der F1'-Gruppe im MPTP-Arm eine gesteigerte vertikale Aktivität feststellen, jedoch konnte nicht das Signifikanzniveau von 5 % erreicht werden. Bei dem Vergleich des Zeitraums, während dem sich die Mäuse im Vierpfotenstand oder in aufgerichteter Position befanden, ließ sich kein Unterschied zwischen den 2 Gruppen feststellen. Vermutlich reichte der MPTP-induzierte dopaminerge Zelluntergang nicht aus, um Unterschiede des Explorationsverhaltens zu bewirken.

#### **4.2.5 Diskussion der spektrometrischen Bestimmung der Komplex-I-Aktivität**

Die mitochondriale Dysfunktion wird mit der Entstehung vieler neurodegenerativer Erkrankungen in Zusammenhang gebracht (Dupuis 2014; Hasegawa *et al.* 2016) und so auch im Falle von M. Parkinson (Bose und Beal 2016). Unklar ist, ob die mitochondriale Dysfunktion tatsächlich die Ursache oder Folge neurodegenerativer Erkrankungen ist (Polyzos und McMurray 2017). Tatsache ist jedoch, dass sich bei M. Parkinson-Patienten eine veränderte Komplex-I-Aktivität feststellen lässt (Holper *et al.* 2019). Im MPTP-Mausmodell lässt sich dies simulieren, denn das Neurotoxin MPP+ akkumuliert in den Mitochondrien der dopaminergen Zellen und ist in der Lage, den Komplex I der Atmungskette selektiv zu hemmen (Luchtman *et al.* 2009). Ebenfalls bewirkt Probenecid eine Abnahme der Komplex-I-Aktivität. Alvarez-Fischer *et al.* konnten durch Versuche an Zellen feststellen, dass Probenecid im gleichen Maße wie Rotenon die Komplex-I-Aktivität reduziert. Wurden jedoch isolierte Mitochondrien verwendet, konnte kein Einfluss von Probenecid auf den Komplex I festgestellt werden. Somit wurde geschlussfolgert, dass Probenecid nicht wie MPP+ direkt als Komplex-I-Inhibitor fungiert (Alvarez-Fischer *et al.* 2013a). In unserer Studie ließ sich zwar eine Abnahme der Komplex-I-Aktivität im MPTP-Arm sowohl in der F0- als auch in der F1'-Generation nachweisen, allerdings war dieses Ergebnis nicht signifikant. Zum einen verwendeten wir isolierte Mitochondrien, so dass wir von keinem inhibitorischen Einfluss von Probenecid ausgehen können. Die Anzahl der überlebenden Mäuse reichte womöglich nicht aus, um das Signifikanzniveau zu erreichen. Die Power betrug lediglich 0,13. Somit ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass wir einen Typ-II-Fehler begehen und in unserer

Versuchsgruppe keinen Unterschied feststellen können, tatsächlich aber ein Unterschied in der Grundgesamtheit vorliegt.

#### **4.3 Fazit**

Ziel der Arbeit war es, zu untersuchen, ob Umwelteinflüsse, denen die Elterngeneration ausgesetzt war, messbare Auswirkungen auf die Folgegeneration haben. Wir konnten Hinweise finden, dass es auch in dem von uns gewählten Paradigma zu einer erhöhten Suszeptibilität des nigrostriatalen Systems nach Exposition gegenüber einem dopaminergen Neurotoxin kommen kann.

**1. Bei den intoxikierten Mäusen sowie bei ihren Nachfahren erwarteten wir eine gleichgerichtete Veränderung ihres Verhaltens.**

Tatsächlich konnten wir eine signifikante Zunahme der Lokomotion bei den intoxikierten F0-Tieren sowie bei ihren Nachfahren feststellen, wenn diese nach der Intoxikation gezeugt worden sind.

**2. Bei den intoxikierten Mäusen sowie bei ihren Nachkommen erwarteten wir eine Verarmung des serotoninergen, adrenergen, noradrenergen sowie dopaminergen Systems.**

Wir stellten eine signifikante Abnahme der striatalen Dopamin-Konzentration bei den intoxikierten F0-Mäusen fest. Damit einhergehend fand sich bei diesen Tieren ein erhöhter striataler Dopaminsatz. Hier konnte das Signifikanzniveau nicht erreicht werden. Verglichen mit den naiven F0-Tieren ließ sich ein signifikant höherer striataler Dopaminsatz der intoxikierten F1'-Tiere feststellen. Signifikante Unterschiede in der striatalen Serotonin- oder Noradrenalin-Konzentration ließen sich nicht messen. Allerdings fand sich eine signifikant erhöhte Adrenalin-Konzentration im MPTP-Arm der F0-Generation.

**3. Bei den intoxikierten Mäusen sowie bei ihren Nachkommen erwarteten wir eine Aktivitätsabnahme des Komplex I der Atmungskette.**

Wir konnten zwar eine Abnahme der Komplex-I-Aktivität im MPTP-Arm sowohl in der F0- als auch in der F1'-Generation feststellen, dieser erreichte

jedoch vermutlich aufgrund der geringen Gruppengröße nicht das Signifikanzniveau.

#### **4.4 Ausblick**

Derzeit sind unsere Ergebnisse nur deskriptiv und hypothesengenerierend. Sie erklären allerdings nicht mögliche epigenetische Mechanismen. Um die hinter unseren Beobachtungen stehenden Mechanismen, wie beispielsweise Methylierungen, festzustellen, sind weitere Studien notwendig.

Eine Erweiterung des Versuchsaufbaus sollte die Beobachtung beinhalten, wie sich exponierte Mäuse im Gegensatz zu den naiven Mäusen um ihre Nachkommen kümmern. Wie in dieser Arbeit erläutert, kann es hier zu Verwechslungen zwischen transgenerationalen Effekten und epigenetischer Vererbung kommen.

Aufgrund der hohen Mortalität werden wir uns in Zukunft eines subchronischen MPTP-Modells bedienen. Bei diesem Modell ließ sich in anderen Studien keine erhöhte Tiersterblichkeit beobachten (Sedelis *et al.* 2001). Zudem wurde bei der Erforschung von epigenetischer Vererbung beim M. Parkinson bislang vorwiegend Gehirngewebe verwendet, um eine Korrelation zwischen Symptomen und dem Methylierungsgrad nachzuweisen. Neuere Studien zeigen in Blut- und Gehirngewebe konkordante Ergebnisse in Bezug auf die Methylierung (Henderson-Smith *et al.* 2019). Diese Entdeckung erleichtert die Entwicklung von Studienmodellen, da peripheres Blut deutlich leichter zugänglich ist als Gehirnproben.

Der Nachweis epigenetischer Vererbung im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen kann zur Entdeckung früher Biomarker führen. Inwiefern zum Beispiel 5-Hydroxymethylcytosin als diagnostischer Marker verwendet werden kann, ist noch unklar (Sherwani und Khan 2015). Die Erkenntnis darüber, welche Umwelteinflüsse zur Pathogenese beitragen oder als protektiver Faktor fungieren, hat wiederum Einfluss auf die Therapie. Bislang ist die Therapie des M. Parkinson rein symptomatisch. Ein weiterführender Schritt wäre die Verwendung von Medikamenten, die epigenetische Mechanismen beeinflussen. Beispielsweise wurde die therapeutische Bedeutung von Histon-Deacetylasen bei

neurodegenerativen Erkrankungen bereits diskutiert (Lardenoije *et al.* 2015; Xu *et al.* 2012). Diese Entwicklungen lassen hoffen, dass für einen Teil der Erkrankten in Zukunft eine Kausal- anstelle einer reinen Symptomtherapie vorhanden sein wird.

## 5 Zusammenfassung (deutsche Version)

Der M. Parkinson ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung. Da ein hohes Lebensalter einen wichtigen Risikofaktor darstellt, wird sich durch die Veränderung der Altersverteilung in den industrialisierten Ländern die Prävalenz in Europa weiterhin erhöhen. Obwohl die Erstbeschreibung des M. Parkinson bereits 200 Jahre zurückliegt, ist die Ätiopathogenese immer noch nicht vollständig geklärt. Gesichert ist, dass genetische Komponenten bei der Krankheitsentstehung eine Rolle spielen. Eine wichtige Beobachtung für die Arbeit ist, dass Personen, bei denen ein Verwandter ersten Grades an M. Parkinson leidet, ein drei- bis viermal höheres Risiko haben, an späteinsetzendem M. Parkinson zu erkranken. Genetische Vererbung allein kann diese Beobachtung nicht hinreichend erklären, daher gehen wir davon aus, dass epigenetische Veränderungen einen Einfluss auf die Krankheitsentstehung haben. Unter Epigenetik werden alle Veränderungen der Genexpression verstanden, die nicht durch Veränderung der DNA-Sequenz zustande kommen. Bis zum heutigen Tag gelang es jedoch nicht, epigenetische Vererbung beim Menschen nachzuweisen.

Einer der etabliertesten Modelle bei der Erforschung des M. Parkinson stellt das MPTP-Mausmodell dar. MPTP führt nicht nur zu einer dopaminergen Verarmung in der SNpc, sondern inhibiert auch selektiv den Komplex I der Atmungskette und eignet sich daher gut, um den M. Parkinson zu imitieren. Jedoch ist ein bekanntes Problem des Modells, dass es zum plötzlichen Tod der Tiere innerhalb der ersten 24 Stunden nach Beginn der Behandlung kommen kann. Auch unsere Studie litt entschieden unter diesem Problem, denn wir verzeichneten eine Mortalität von 75 % unter den intoxikierten Tieren. Dies zwang uns von unserem ursprünglichen Plan, die F1'-Generation zu intoxikieren, abzuweichen. Eine hohe Sterblichkeit kann zu einem systematischen Fehler führen, weil die überlebenden Mäuse eventuell eine nicht repräsentative Subgruppe darstellen.

In dieser Arbeit wurde das chronische MPTP-Modell verwendet. Es wurden die Elterngeneration (F0) sowie ihre vor (F1) und nach (F1') Intoxikation gezeugten Nachkommen in Bezug auf ihre Lokomotion in Form der zurückgelegten Strecke, ihrer Aufrichtungshäufigkeit sowie ihres Aufenthaltsortes untersucht. Ebenfalls

wurden die Dopamin-Konzentration sowie der Dopaminumsatz, die Serotonin-Konzentration sowie dessen Umsatz und die Adrenalin- und Noradrenalin-Konzentration im Striatum gemessen. Schließlich wurde auch die Komplex-I-Aktivität spektrometrisch bestimmt. Dabei zeigte sich, dass eine signifikante Lokomotionszunahme nicht nur bei den intoxikierten F0-Tieren, sondern auch bei ihren nach Intoxikation gezeugten Nachfahren feststellbar ist. Diese Ergebnisse passen zu der Hypothese, dass es durch die MPTP-induzierte nigrostriatale Schädigung zu Kompensationsmechanismen kommt. Beispielsweise kommt es zur Hochregulation postsynaptischer Dopaminrezeptoren. Außerdem wird die Dopaminaufnahme der Dopamintransporter herunter- und die Aktivität der postsynaptischen Dopaminrezeptoren heraufreguliert. Diese Hypothese bekräftigen auch unsere Ergebnisse bezüglich der Dopamin-Konzentration und des striatalen Dopaminumsatzes. So stellten wir eine signifikante Abnahme der striatalen Dopamin-Konzentration bei den intoxikierten F0-Mäusen fest. Bei ihren Nachfahren in der F1'-Generation fand sich ebenfalls eine Abnahme der Dopamin-Konzentration, allerdings erreichte diese nicht das Signifikanzniveau gegenüber der naiven F1'-Gruppe. Sowohl in der intoxikierten Elterngeneration als auch in den nach Intoxikation geborenen Mäusen fand sich eine Tendenz zu einem höheren Dopaminumsatz. Die gleichgerichteten Ergebnisse des MPTP-Armes in der F0- sowie in der F1'-Generation stützen darüber hinaus unsere Hypothese, dass Umwelteinflüsse, denen die Elterngeneration ausgesetzt sind, eine messbare Auswirkung auf die Folgegeneration haben.

Wir fanden zudem eine signifikant erhöhte Adrenalin-Konzentration im MPTP-Arm der F0-Generation. Dies bekräftigt die Annahme, dass die Lokomotionssteigerung in Zusammenhang mit einer erhöhten Nor-/Adrenalin-Ausschüttung steht.

Signifikante Unterschiede in der striatalen Serotonin- oder Noradrenalin-Konzentration ließen sich nicht messen. Auch die gemessene Abnahme der Komplex-I-Aktivität im MPTP-Arm sowohl in der F0- als auch in der F1'-Generation erreichte nicht das Signifikanzniveau, was vermutlich auf die geringe Gruppengröße zurückzuführen ist.

Zusammenfassend zeigten wir, dass die toxininduzierte Störung des nigrostriatalen Signalwegs auf die nächste Generation übertragen wird. Zwar ist dieses Ergebnis rein deskriptiv, es gibt jedoch Anreiz für weitere Studien, die hinter unseren Beobachtungen stehenden Mechanismen herauszufinden. Die Ergebnisse unserer Studie bekräftigen, dass es sich lohnt, weiterhin an epigenetischen Vererbungen im Zusammenhang mit M. Parkinson zu forschen. Dies kann zur Entdeckung früher diagnostischer Marker, protektiver Umweltfaktoren und somit auf lange Sicht zu einer grundlegenden Änderung der Therapie dieser Erkrankung führen.

## **6 Zusammenfassung (englische Version)**

Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disease. As age is an important risk factor, changes in the age distribution in industrialized countries will continue to increase prevalence in Europe. Although the initial description of Parkinson's disease dates back 200 years, aetiopathogenesis is still not fully understood. While a genetic contribution has been clearly established, an important observation for our study is that people in whom a first-degree relative suffers from Parkinson's disease have a three to four times higher risk of developing Parkinson's disease. Genetic inheritance alone cannot sufficiently explain this observation and we assume that epigenetic changes have an influence on the development of the disease. Epigenetics refers to all changes in gene expression that are not caused by changes in the DNA sequence. Until today, however, it has not been possible to detect epigenetic inheritance in humans.

The MPTP mouse model is one of the most established models to study Parkinson's disease. MPTP not only leads to dopaminergic impoverishment in the SNpc, but also selectively inhibits complex I of the respiratory chain and is therefore well suited to imitate Parkinson's disease. However, a known problem of the model is that the animals may die suddenly within the first 24 hours after the start of treatment. Our study also suffered severely from this problem. The mortality rate was 75 % among intoxicated animals. This forced us to deviate from our original plan to intoxicate the F1' generation. A high mortality rate can lead to a systematic error because the surviving mice may not be a representative subgroup.

In our study the chronic MPTP model was used. The parental generation (F0) and its offspring produced before (F1) and after (F1') intoxication were investigated in regard to their locomotion (travelled distance, erection frequency, exact location within openfield). Dopamine concentration and dopamine turnover, serotonin concentration and serotonin turnover and adrenaline and noradrenaline concentrations in the striatum were also measured. Finally, complex I activity was spectrometrically determined. A significant increase in locomotion was observed not only in intoxicated F0 animals but also in their offspring produced after intoxication. These results fit the hypothesis that MPTP-induced nigrostriatal decline leads to

compensatory mechanisms. For example, post-synaptic dopamine receptors are upregulated. In addition, the dopamine uptake of the dopamine transporters is reduced and the activity of the postsynaptic dopamine receptors is increased. This hypothesis also supports our results regarding dopamine concentration and striatal dopamine turnover. We found a significant decrease in striatal dopamine concentration in intoxicated F0 mice. Their descendants in the F1' generation also showed a decrease in dopamine concentration but did not reach the significance level compared to the naive F1' group. In the intoxicated parent generation, as well as in the mice born after intoxication, a tendency to higher dopamine turnover was found. The parallel results of the MPTP arm in both the F0 and F1' generations also support our hypothesis that environmental influences to which the parent generation is exposed have a measurable effect on the subsequent generation.


We also found a significantly increased adrenalin concentration in the MPTP arm of the F0 generation. This supports the assumption that locomotion increase is associated with increased nor/adrenaline release.

Significant differences in the striatal serotonin or noradrenaline concentration could not be measured. Also, the measured decrease of complex I activity in the MPTP arm in both the F0 and F1' generations did not reach the significance level, probably due to the small group size.

In summary, we showed that the toxin-induced disturbance of the nigrostriatal pathway is transferred to the next generation. While this result is only descriptive, it provides an incentive for further studies to identify the mechanisms behind our observations. The results of our study confirm that it is valuable to continue research on epigenetic inheritance in the context of Parkinson's disease. This could lead to the discovery of early diagnostic markers, protective environmental factors and in the long term a fundamental change in the treatment of this disease.

## 7 Anhang

### 7.1 Tierversuchsantrag

		<b>Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein</b>	
		Ihr Antrag vom: 25.10.2013	
Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume   Postfach 71 51   24171 Kiel		Mein Zeichen: V 242-7224.122-20 (145-11/13)	
<b>Herrn Dr. Daniel Alvarez Fischer Institut für Neurogenetik Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Lübeck Maria-Goeppert Str. 1 23562 Lübeck</b>		Herr Buttchereit	
		Telefon: 0431 988-7128 Telefax: 0431 988-7042	
<u>nachrichtlich:</u> Herrn Dr. B. Schmelting Gemeinsame Tierhaltung der Universität zu Lübeck Ratzeburger Allee 160 23538 Lübeck			
		13. Dezember 2013	
<b>Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren</b>			
Sehr geehrter Herr Dr. Alvarez Fischer,			
gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206), zuletzt geändert durch Gesetz vom 4. Juli 2013 (BGBl. I S. 2182), erteile ich Ihnen die Genehmigung, im Rahmen des Versuchsvorhabens			
Epigenetische Veränderungen in einem murinen Toxin basierten Tiermodell des Morbus Parkinson			
zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.			
Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:			
1. Es dürfen bis zu 104 Mäuse verwendet werden.			
2. Die Genehmigung ist bis zum 31. Dezember 2016 befristet. Sie kann auf formlosen, hinreichend begründeten Antrag um ein Jahr verlängert werden, sofern keine wesentlichen Änderungen der Genehmigungsvoraussetzungen eingetreten sind.			
<small>Dienstgebäude Mercatorstraße 3, 5, 7, 24106 Kiel   Adolf-Westphal-Str. 4, 24143 Kiel   Telefon 0431 988-0   Telefax 0431 988-7239   poststelle@melur.landsh.de   www.schleswig-holstein.de   E-Mail-Adressen: Kein Zugang für elektronisch signierte oder verschlüsselte Dokumente. Das Landeswappen ist gesetzlich geschützt.</small>			

3. Leiter des Versuchsvorhabens:  
Herr Dr. Daniel Alvarez Fischer
4. Seine Stellvertreterin:  
Frau MSc Franca Vulinović
5. Wechselt der Leiter des Versuchsvorhabens oder seine Stellvertreterin, so ist mir diese Änderung unverzüglich anzuzeigen; die Genehmigung gilt weiter, wenn sie nicht innerhalb eines Monats widerrufen wird.
6. Verantwortlicher Tierarzt nach § 9 Abs. 2 Nr. 8 Tierschutzgesetz:  
Herr Dr. B. Schmelting
7. Weitere Nebenbestimmungen:  
Keine.

Die im Antrag gemachten Angaben sind Bestandteil dieser Genehmigung. Sofern vorstehend abweichende Nebenbestimmungen getroffen wurden, gehen diese den Angaben im Antrag vor.

Die Bestimmungen des § 8 des Tierschutzgesetzes, der Tierschutz-Versuchstierverordnung vom 1. August 2013 (BGBl. I S. 3125) sowie der §§ 116 und 117 des Landesverwaltungsgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. Juni 1992 (GVOBl. Schl.-H. S. 243) sind zu beachten.

Ich weise insbesondere darauf hin, dass Tierversuche nur durch den in § 16 der Tierschutz-Versuchstierverordnung genannten Personenkreis durchgeführt werden dürfen.

**Rechtsbehelfsbelehrung**

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Zustellung schriftlich oder zur Niederschrift des Urkundsbeamten der Geschäftsstelle Klage beim Verwaltungsgericht Schleswig-Holstein in 24837 Schleswig, Brockdorff-Rantzau-Straße 13, erhoben werden.

Mit freundlichen Grüßen

  
Buttchereit

## 7.2 Übersicht der *Openfield*-Ergebnisse

Maus-ID	Generation	Arm	Geschlecht	Strecke Baseline [cm]	Strecke [cm]	Wandab- stand [cm]
058795	F0	MPTP	Männlich	10300,9	11713,9	5,4
058778	F0	MPTP	Weiblich	6850,3	12956,9	5,2
052463	F0	MPTP	Männlich	8736,6	12530,6	4,8
058780	F0	MPTP	Weiblich	5784,8	23046	4,6
058782	F0	NaCl	Weiblich	15160,4	8039,3	6,1
052470	F0	NaCl	Männlich	9504,7	9150,4	7
052471	F0	NaCl	Männlich	9447,3	6846,9	5,5
052472	F0	NaCl	Männlich	8823,2	5702,4	6,7
058794	F0	NaCl	Männlich	9999,3	10060,4	5,6
052480	F0	NaCl	Weiblich	8807,6	8548,1	5,8
052481	F0	NaCl	Weiblich	8434,3	8954,8	5,6
052482	F0	NaCl	Weiblich	7400,9	7558,4	6,3
058777	F0	NaCl	Weiblich	9216	8301,8	5,4
064463	F1	MPTP	Männlich		5181,2	7,5
064464	F1	MPTP	Männlich		6067,3	7,3
064465	F1	MPTP	Männlich		6442,3	6,4
064468	F1	MPTP	Männlich		6738,4	6,5
064469	F1	MPTP	Männlich		4416,3	4,7
064470	F1	MPTP	Männlich		5820,1	6
060651	F1	MPTP	Männlich		6254,3	6,1
060647	F1	MPTP	Männlich		5707,8	7,6
060650	F1	MPTP	Männlich		5158,9	5,7
060648	F1	MPTP	Männlich		3728,8	6,4
060649	F1	MPTP	Männlich		4950,8	3,9
066600	F1	MPTP	Männlich		5803,9	6,5
066601	F1	MPTP	Männlich		5503,7	3,6
066602	F1	MPTP	Männlich		6821,2	7,4
066603	F1	MPTP	Männlich		6586,6	5,6
066590	F1	MPTP	Männlich		6409,1	6,1
066591	F1	MPTP	Männlich		9672,6	5,6

065493	F1	MPTP	Männlich		7773,9	4,2
066587	F1	MPTP	Männlich		6634,8	4,8
066588	F1	MPTP	Männlich		4749,3	6,1
066589	F1	MPTP	Männlich		4455,3	5,6
062743	F1	NaCl	Männlich		9044,7	7,3
062744	F1	NaCl	Männlich		8190,4	5,7
064477	F1	NaCl	Männlich		5627,3	3,6
064478	F1	NaCl	Männlich		8795,2	6,5
064479	F1	NaCl	Männlich		8339,3	4,7
064475	F1	NaCl	Männlich		7508,9	4,6
064472	F1	NaCl	Männlich		8784,7	5,1
062732	F1	NaCl	Männlich		8546,6	4,1
062733	F1	NaCl	Männlich		9407,1	6,1
062734	F1	NaCl	Männlich		9299,5	6,3
062735	F1	NaCl	Männlich		7552,2	4,8
062736	F1	NaCl	Männlich		8135,8	6,1
062737	F1	NaCl	Männlich		8093,2	6,5
064471	F1	NaCl	Männlich		7191,9	4,6
064473	F1	NaCl	Männlich		5611	6
064476	F1	NaCl	Männlich		3989,6	5,1
062745	F1	NaCl	Männlich		7401,5	7,2
076130	F1'	MPTP	Männlich		10240,5	5,9
076131	F1'	MPTP	Männlich		11554,3	8,3
076132	F1'	MPTP	Männlich		10240,5	7,5
076133	F1'	MPTP	Männlich		8625,2	5,1
080689	F1'	MPTP	Weiblich		11051,8	5,2
080690	F1'	MPTP	Weiblich		14457,2	5
080691	F1'	MPTP	Weiblich		6252,8	2,7
080688	F1'	MPTP	Männlich		8895,6	4,6
074131	F1'	NaCl	Männlich		9335,2	5,9
074132	F1'	NaCl	Männlich		8882,1	6,6
074133	F1'	NaCl	Männlich		7020,3	7,1
074135	F1'	NaCl	Männlich		7709,2	7,1

074123	F1'	NaCl	Männlich		13180,5	5,5
074124	F1'	NaCl	Männlich		8812,2	5,6
074125	F1'	NaCl	Männlich		7215,2	5,8
074126	F1'	NaCl	Männlich		9689,3	5,1
074130	F1'	NaCl	Weiblich		3555,4	4,2
074134	F1'	NaCl	Weiblich		4588,5	7
074137	F1'	NaCl	Weiblich		6123,5	4,9
078788	F1'	NaCl	Weiblich		6353,5	5,2
078789	F1'	NaCl	Weiblich		8565	6,9
078790	F1'	NaCl	Weiblich		7314,8	5,8
078793	F1'	NaCl	Weiblich		5825,4	5,9
078794	F1'	NaCl	Weiblich		7104,1	6,4
078795	F1'	NaCl	Weiblich		7681,7	6,8
078787	F1'	NaCl	Männlich		7745,7	5,9
078791	F1'	NaCl	Männlich		5918,8	5,4
078792	F1'	NaCl	Männlich		5932,3	6,3
074127	F1'	NaCl	Weiblich		6576,1	5,2
074128	F1'	NaCl	Weiblich		4389,7	5,4
074129	F1'	NaCl	Weiblich		4974,3	6,9

*Tabelle 2: Übersicht Openfield*

*Im Openfield-Versuch wurden folgende Parameter bestimmt: Zurückgelegte Strecke der F0-Mäuse vor Injektion von MPTP/Probenecid bzw. physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) (Baseline [cm]), zurückgelegte Strecke der F0-Mäuse nach Injektion von MPTP/Probenecid bzw. physiologischer Kochsalzlösung (NaCl), zurückgelegte Strecke der restlichen Mäuse (Strecke [cm]) sowie durchschnittlicher Abstand der Mäuse zur Wand des Openfield-Käfigs (Wandabstand [cm]).*

### 7.3 Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Alpha
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ADORA2A	Adenosin-A2A-Rezeptor
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ATP	Adenosintriophosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Kohlenstoff
ca.	circa
$C_{23}H_{22}O_6$	Rotenon
cm	Zentimeter
CoA	Coenzym A
COMT	Catechol-O-methyltransferase
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CS	Citrat-Synthase
CYP2E1	Cytochrom P450 2E1
CxI	Komplex I
D1 bzw. D2	D1- bzw. D2-Dopaminrezeptor
DA	Dopamin
DAT	Dopamintransporter
d. h.	das heißt
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DOPAC	<i>3,4-Dihydroxyphenylacetic acid</i>
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

F	Filialgeneration
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
Gpe	Globus pallidus externus
Gpi	Globus pallidus internus
HCl	Wasserstoffchlorid
HClO <sub>4</sub>	Perchlorsäure
5hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5-HIAA	<i>5-Hydroxyindoleacetic acid</i>
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
5-HT	Serotonin, 5-Hydroxytryptamin
HVA	Homovanillinmandelsäure
IVC	<i>Individually ventilated cage</i>
KCN	Kaliumcyanid
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHCO <sub>3</sub>	Kaliumhydrogencarbonat
l	Liter
LRRK2	<i>Leucine-rich repeat kinase 2</i>
μ	Mikro-
m	Meter
m	Milli-
M	Molar
M.	Morbus
MAO-B	Monoaminoxidase B
min	Minute

miRNA	microRNA
MPDP+	1-Methyl-4-phenyl-1,2-dihydroxypyridiniumion
MPP+	1-Methyl-4-phenyl-pyridin
MPPP	1-Methyl-4-phenyl-4-propion-oxy-piperidin
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
n	Anzahl
n	Nano-
N	Stoffmenge
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotidhydrogen
NST	Nucleus subthalamicus
OAA	<i>Oxaloacetic acid</i>
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
p-Wert	Signifikanzwert
RBD	<i>Rapid eye movement sleep behavior disorder</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SNpc	Substantia nigra pars compacta
SNpr	Substantia nigra pars reticularis
s. o.	siehe oben
u. a.	unter anderem
V	Volt
VMAT	Vesikulärer Monoamintransporter
vs.	versus
VTA	Ventrales tegmentales Areal
ZNS	Zentralnervensystem

#### 7.4 Literaturverzeichnis

- Ai, S. X., Xu, Q., Hu, Y. C., Song, C. Y., Guo, J. F., Shen, L., Wang, C. R., Yu, R. L., Yan, X. X. und Tang, B. S. (2014). **Hypomethylation of SNCA in blood of patients with sporadic Parkinson's disease**. *J Neurol Sci* 337, 123–128.
- Alvarez-Fischer, D., Fuchs, J., Castagner, F., Stettler, O., Massiani-Beaudoin, O., Moya, K. L., Bouillot, C., Oertel, W. H., Lombès, A., Faigle, W., Joshi, R. L., Hartmann, A. und Prochiantz, A. (2011). **Engrailed protects mouse midbrain dopaminergic neurons against mitochondrial complex I insults**. *Nat Neurosci* 14, 1260–1266, doi:10.1038/nn.2916.
- Alvarez-Fischer, D., Guerreiro, S., Hunot, S., Saurini, F., Marien, M., Sokoloff, P., Hirsch, E. C., Hartmann, A. und Michel, P. P. (2008). **Modelling Parkinson-like neurodegeneration via osmotic minipump delivery of MPTP and probenecid**. *J Neurochem* 107, 701–711.
- Alvarez-Fischer, D., Noelker, C., Grünewald, A., Vulinović, F., Guerreiro, S., Fuchs, J., Lu, L., Lombès, A., Hirsch, E. C., Oertel, W. H., Michel, P. P. und Hartmann, A. (2013a). **Probenecid potentiates MPTP/MPP+ toxicity by interference with cellular energy metabolism**. *J Neurochem* 127, 782–792.
- Alvarez-Fischer, D., Noelker, C., Vulinović, F., Grünewald, A., Chevarin, C., Klein, C., Oertel, W. H., Hirsch, E. C., Michel, P. P. und Hartmann, A. (2013b). **Bee Venom and Its Component Apamin as Neuroprotective Agents in a Parkinson Disease Mouse Model**. *PLoS One* 8, 2–9.
- Anway, M. D., Cupp, A. S., Uzumcu, N. und Skinner, M. K. (2005). **Toxicology: Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility**. *Science* (80- ) 308, 1466–1469.
- Belovicova, K., Bogi, E., Csatlosova, K. und Dubovicky, M. (2017). **Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats**. *Interdiscip Toxicol* 10, 40–43, doi:10.1515/intox-2017-0006.
- Blesa, J. und Przedborski, S. (2014). **Parkinson's disease: Animal models and dopaminergic cell vulnerability**. *Front Neuroanat* 8, 155,

doi:10.3389/fnana.2014.00155.

- Bose, A. und Beal, M. F. (2016). **Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease.** *J Neurochem* 216–231.
- Bouwknicht, J. A. und Paylor, R. (2008). **Pitfalls in the interpretation of genetic and pharmacological effects on anxiety-like behaviour in rodents.** *Behav Pharmacol* 19, 385–402.
- Brochard, V., Combadière, B., Prigent, A., Laouar, Y., Perrin, A., Beray-Berthet, V., Bonduelle, O., Alvarez-Fischer, D., Callebert, J., Launay, J.-M., Duyckaerts, C., Flavell, R. A., Hirsch, E. C. und Hunot, S. (2009). **Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease.** *J Clin Invest* 119, 182–192, doi:10.1172/JCI36470.
- Broen, M. P. G., Narayan, N. E., Kuijff, M. L., Dissanayaka, N. N. W. und Leentjens, A. F. G. (2016). **Prevalence of anxiety in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis.** *Mov Disord* 31, 1125–1133.
- Buiting, K., Groß, S., Lich, C., Gillessen-Kaesbach, G., El-Maarri, O. und Horsthemke, B. (2003). **Epimutations in Prader-Willi and Angelman syndromes: A molecular study of 136 patients with an imprinting defect.** *Am J Hum Genet* 72, 571–577.
- Cavalli, G. und Paro, R. (1998). **The Drosophila Fab-7 chromosomal element conveys epigenetic inheritance during mitosis and meiosis.** *Cell* 93, 505–518.
- Chan, C. S., Guzman, J. N., Ilijic, E., Mercer, J. N., Rick, C., Tkatch, T., Meredith, G. E. und Surmeier, D. J. (2007). **„Rejuvenation“ protects neurons in mouse models of Parkinson's disease.** *Nature* 447, 1081–1086, doi:10.1038/nature05865.
- Chia, L. G., Ni, D. R., Cheng, L. J., Kuo, J. S., Cheng, F. C. und Dryhurst, G. (1996). **Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 5,7-dihydroxytryptamine on the locomotor activity and striatal amines in**

- C57BL/6 mice.** *Neurosci Lett* 218, 67–71.
- Chung, E. S., Lee, G., Lee, C., Ye, M., Chung, H., Kim, H., Bae, S. S., Hwang, D.-S. und Bae, H. (2015). **Bee Venom Phospholipase A 2 , a Novel Foxp3 + Regulatory T Cell Inducer, Protects Dopaminergic Neurons by Modulating Neuroinflammatory Responses in a Mouse Model of Parkinson's Disease** . *J Immunol* 195, 4853–4860, doi:10.4049/jimmunol.1500386.
- Copped, F. (2012). **Genetics and epigenetics of Parkinson's disease.** *Sci World J* 2012, 1–12, doi:10.1100/2012/489830.
- Crawley, J. und Bailey, K. (2008). **Anxiety-Related Behaviors in Mice.** *Methods Behav Anal Neurosci* 77–101, doi:10.1201/noe1420052343.ch5.
- De Boni, L. und Wüllner, U. *Epigenetic analysis in human neurons: Considerations for disease modeling in PD.* *Frontiers in Neuroscience.* (2019)., doi:10.3389/fnins.2019.00276.
- Deusser, J., Schmidt, S., Ettle, B., Plötz, S., Huber, S., Müller, C. P., Masliah, E., Winkler, J. und Kohl, Z. (2015). **Serotonergic dysfunction in the A53T alpha-synuclein mouse model of Parkinson's disease.** *J Neurochem* 135, 589–597, doi:10.1111/jnc.13253.
- Dias, B. G. und Ressler, K. J. (2014). **Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations.** *Nat Neurosci* 17, 89–96.
- Dorsey, E. R., Sherer, T., Okun, M. S. und Bloem, B. R. (2018). **The emerging evidence of the Parkinson pandemic.** *J Parkinsons Dis* 8, S3–S8.
- Dupuis, L. (2014). **Mitochondrial quality control in neurodegenerative diseases.** *Biochimie* 100, 177–183, doi:10.1016/j.biochi.2013.07.033.
- Espejo, E. F. und Miñano, J. (2001). **Adrenergic hyperactivity and metanephrine excess in the nucleus accumbens after prefrontocortical dopamine depletion.** *J Neurophysiol* 85, 1270–1274, doi:10.1152/jn.2001.85.3.1270.
- Ferger, B., Spratt, C., Teismann, P., Seitz, G. und Kuschinsky, K. (1998). **Effects of cytosine on hydroxyl radicals in vitro and MPTP-induced dopamine**

- depletion in vivo.** *Eur J Pharmacol* 360, 155–163.
- Ferguson, S. A., Law, C. D. und Sarkar, S. (2015). **Chronic MPTP treatment produces hyperactivity in male mice which is not alleviated by concurrent trehalose treatment.** *Behav Brain Res* 292, 68–78, doi:10.1016/j.bbr.2015.05.057.
- Fleming, S. M., Ekhtor, O. R. und Ghisays, V. (2013). **Assessment of Sensorimotor Function in Mouse Models of Parkinson's Disease.** *J Vis Exp* 1–7, doi:10.3791/50303.
- Goedert, M. und Spillantini, M. G. (2012). **100 years of Lewy pathology.** *Nat Rev Neurol* 9, 13–24, doi:10.1038/nrneurol.2012.242.
- Gunn-Moore, D., Kaidanovich-Beilin, O., Gallego Iradi, M. C., Gunn-Moore, F. und Lovestone, S. (2018). **Alzheimer's disease in humans and other animals: A consequence of postreproductive life span and longevity rather than aging.** *Alzheimer's Dement* 14, 195–204.
- Habibi, E., Masoudi-Nejad, A., Abdolmaleky, H. M. und Haggarty, S. J. (2011). **Emerging roles of epigenetic mechanisms in Parkinson's disease.** *Funct Integr Genomics* 11, 523–537.
- Hallman, H., Lange, L., Olson, L., Strömberg, I. und Jonsson, G. (1985). **Neurochemical and Histochemical Characterization of Neurotoxic Effects of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine on Brain Catecholamine Neurones in the Mouse.** *J Neurochem* 44, 117–127.
- Hasegawa, K., Yasuda, T., Shiraishi, C., Fujiwara, K., Przedborski, S., Mochizuki, H. und Yoshikawa, K. (2016). **Promotion of mitochondrial biogenesis by necdin protects neurons against mitochondrial insults.** *Nat Commun* 7, 1–15, doi:10.1038/ncomms10943.
- Henderson-Smith, A., Fisch, K. M., Hua, J., Liu, G., Ricciardelli, E., Jepsen, K., Huentelman, M., Stalberg, G., Edland, S. D., Scherzer, C. R., Dunckley, T. und Desplats, P. (2019). **DNA methylation changes associated with Parkinson's disease progression: outcomes from the first longitudinal genome-wide**

- methylation analysis in blood.** *Epigenetics* 14, 365–382.
- Holper, L., Ben-Shachar, D. und Mann, J. (2019). **Multivariate meta-analyses of mitochondrial complex I and IV in major depressive disorder, bipolar disorder, schizophrenia, Alzheimer disease, and Parkinson disease.** *Neuropsychopharmacology* 44, 837–849, doi:10.1038/s41386-018-0090-0.
- Hu, S., Hu, M., Liu, J., Zhang, B., Zhang, Z., Zhou, F. H., Wang, L. und Dong, J. (2020). **Phosphorylation of tau and  $\alpha$ -synuclein induced neurodegeneration in MPTP mouse model of Parkinson's disease.** *Neuropsychiatr Dis Treat* 16, 651–663.
- Hughes, K. C., Gao, X., Molsberry, S., Valeri, L., Schwarzschild, M. A. und Ascherio, A. (2019). **Physical activity and prodromal features of Parkinson disease.** *Neurology* 93, E2157–E2169, doi:10.1212/WNL.00000000000008567.
- Hwang, D. Y., Fleming, S. M., Ardayfio, P., Moran-Gates, T., Kim, H., Tarazi, F. I., Chesselet, M. F. und Kim, K. S. (2005). **3,4-Dihydroxyphenylalanine reverses the motor deficits in Pitx3-deficient Aphakia mice: Behavioral characterization of a novel genetic model of Parkinson's disease.** *J Neurosci* 25, 2132–2137, doi:10.1523/JNEUROSCI.3718-04.2005.
- Iancu, R., Mohapel, P., Brundin, P. und Paul, G. (2005). **Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice.** *Behav Brain Res* 162, 1–10.
- Jackson-Lewis, V., Jakowec, M., Burke, R. E. und Przedborski, S. (1995). **Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine.** *Neurodegeneration* 4, 257–269, doi:10.1016/1055-8330(95)90015-2.
- Jackson-Lewis, V. und Przedborski, S. (2007). **Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease.** *Nat Protoc* 2, 141–151, doi:10.1038/nprot.2006.342.
- Jiao, Y., Dou, Y., Lockwood, G., Pani, A. und Jay Smeyne, R. (2015). **Acute Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) or paraquat on**

**core temperature in C57BL/6J mice.** *J Parkinsons Dis* 5, 389–401, doi:10.3233/JPD-140424.

Joers, V. und Emborg, M. E. (2014). **Modeling and imaging cardiac sympathetic neurodegeneration in Parkinson's disease.** *Am J Nucl Med Mol Imaging* 4, 125–159, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24753981> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3992208> [Stand Februar 2018].

Kalia, L. V und Lang, A. E. (2015). **Parkinson's disease.** *Lancet* (London, England) 386, 896–912, doi:10.1016/S0140-6736(14)61393-3.

Kantor, B., Tagliafierro, L., Gu, J., Zamora, M. E., Ilich, E., Grenier, C., Huang, Z. Y., Murphy, S. und Chiba-Falek, O. (2018). **Downregulation of SNCA Expression by Targeted Editing of DNA Methylation: A Potential Strategy for Precision Therapy in PD.** *Mol Ther* 26, 2638–2649.

Kaut, O., Schmitt, I. und Wüllner, U. (2012). **Genome-scale methylation analysis of Parkinson's disease patients' brains reveals DNA hypomethylation and increased mRNA expression of cytochrome P450 2E1.** *Neurogenetics* 13, 87–91.

Kenborg, L., Lassen, C. F., Ritz, B., Andersen, K. K., Christensen, J., Schernhammer, E. S., Hansen, J., Wermuth, L., Rod, N. H. und Olsen, J. H. (2015). **Lifestyle, family history, and risk of idiopathic Parkinson disease: a large Danish case-control study.** *Am J Epidemiol* 181, 808–816, doi:10.1093/aje/kwu332.

Klein, C., Chuang, R., Marras, C. und Lang, A. E. (2011). **The curious case of phenocopies in families with genetic Parkinson's disease.** *Mov Disord* 26, 1793–1802.

Klein, C. und Westenberger, A. (2012). **Genetics of Parkinson's disease.** *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a008888, doi:10.1101/cshperspect.a008888.

Kumari, R., Kumar, R., Kumar, S., Singh, A. K., Hanpude, P., Jangir, D. und Maiti, T. K. (2020). Amyloid aggregates of the deubiquitinase OTUB1 are neurotoxic,

suggesting that they contribute to the development of Parkinson's disease.

- Lanciego, J. L., Luquin, N. und Obeso, J. A. (2012). **Functional neuroanatomy of the basal ganglia**. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a009621, doi:10.1101/cshperspect.a009621.
- Landgrave-Gómez, J., Mercado-Gómez, O. und Guevara-Guzmán, R. (2015). **Epigenetic mechanisms in neurological and neurodegenerative diseases**. *Front Cell Neurosci* 9.
- Lang, A. E. und Lozano, A. M. (1998). **Parkinson's disease: Second of two parts**. *N Engl J Med* 339, 1130–1143, doi:10.1056/NEJM199810153391607.
- Langston, J., Ballard, P., Tetrud, J. und Irwin, I. (1983). **Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis**. *Science* (80- ) 219, 979–980, doi:10.1126/science.6823561.
- Lardenoije, R., Iatrou, A., Kenis, G., Kompotis, K., Steinbusch, H. W. M., Mastroeni, D., Coleman, P., Lemere, C. A., Hof, P. R., van den Hove, D. L. A. und Rutten, B. P. F. (2015). **The epigenetics of aging and neurodegeneration**. *Prog Neurobiol* 131, 21–64, doi:10.1016/j.pneurobio.2015.05.002.
- Larsen, S. B., Hanss, Z. und Krüger, R. (2018). **The genetic architecture of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease**. *Cell Tissue Res* 373, 21–37, doi:10.1007/s00441-017-2768-8.
- Liu, X., Wei, B., Bi, Q., Sun, Q., Li, L., He, J., Weng, Y., Zhang, S., Mao, G., Bao, Y., Wan, S., Shen, X. Z., Yan, J. und Shi, P. (2020). **MPTP-Induced Impairment of Cardiovascular Function**. *Neurotox Res*.
- Lowenstine, L. J., McManamon, R. und Terio, K. A. (2016). **Comparative Pathology of Aging Great Apes: Bonobos, Chimpanzees, Gorillas, and Orangutans**. *Vet Pathol* 53, 250–276, doi:10.1177/0300985815612154.
- Luchtman, D. W., Meng, Q. und Song, C. (2012). **Ethyl-eicosapentaenoate (E-EPA) attenuates motor impairments and inflammation in the MPTP-probenecid mouse model of Parkinson's disease**. *Behav Brain Res* 226, 386–396, doi:10.1016/j.bbr.2011.09.033.

- Luchtman, D. W., Shao, D. und Song, C. (2009). **Physiology & Behavior Behavior , neurotransmitters and in fl ammation in three regimens of the MPTP mouse model of Parkinson ’ s disease.** *Physiol Behav* 98, 130–138, doi:10.1016/j.physbeh.2009.04.021.
- Meredith, G. E. und Rademacher, D. J. (2011). **MPTP mouse models of Parkinson’s disease: An update.** *J Parkinsons Dis* 1, 19–33, doi:10.3233/JPD-2011-11023.
- Meredith, G. E., Sonsalla, Æ. P. K., Chesselet, M. und Alpha-synuclein, R. Á. L. P. S. Á. E. Á. (2008). *Animal models of Parkinson ’ s disease progression.* 385–398.
- Miranda-Morales, E., Meier, K., Sandoval-Carrillo, A., Salas-Pacheco, J., Vázquez-Cárdenas, P. und Arias-Carrión, O. (2017). **Implications of DNA methylation in Parkinson’s disease.** *Front Mol Neurosci* 10, 225, doi:10.3389/fnmol.2017.00225.
- Moisan, F., Kab, S., Mohamed, F., Canonico, M., Le Guern, M., Quintin, C., Carcaillon, L., Nicolau, J., Duport, N., Singh-Manoux, A., Boussac-Zarebska, M. und Elbaz, A. (2016). **Parkinson disease male-to-female ratios increase with age: French nationwide study and meta-analysis.** *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 87, 952–957, doi:10.1136/jnnp-2015-312283.
- Molinier, J., Ries, G., Zipfel, C. und Hohn, B. (2006). **Transgeneration memory of stress in plants.** *Nature* 442, 1046–1049.
- Nandhagopal, R., McKeown, M. J. und Stoessl, A. J. (2008). **Invited Article: Functional imaging in Parkinson disease.** *Neurology* 70, 1478–1488, doi:10.1212/01.wnl.0000310432.92489.90.
- Obata, T. (2002). **Dopamine efflux by MPTP and hydroxyl radical generation.** *J Neural Transm* 109, 1159–1180, doi:10.1007/s00702-001-0683-2.
- Parker, W. D., Parks, J. K. und Swerdlow, R. H. (2008). **Complex I deficiency in Parkinson’s disease frontal cortex.** *Brain Res* 1189, 215–218, doi:10.1016/j.brainres.2007.10.061.

- Petroske, E., Meredith, G. E., Callen, S., Totterdell, S. und Lau, Y. S. (2001). **Mouse model of Parkinsonism: A comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/probenecid treatment.** *Neuroscience* 106, 589–601, doi:10.1016/S0306-4522(01)00295-0.
- Pishva, E., Kenis, G., Lesch, K. P., Prickaerts, J., Steinbusch, H. M. W., La Van Den Hove, D., Van Os, J. und Rutten, B. P. (2012). **Epigenetic epidemiology in psychiatry: A translational neuroscience perspective.** *Transl Neurosci* 3, 196–212, doi:10.2478/s13380-012-0024-y.
- Platel, A. und Porsolt, R. D. (1982). *Oii iii*. 346–352.
- Politis, M. und Niccolini, F. (2015). **Serotonin in Parkinson's disease.** *Behav Brain Res* 277, 136–145, doi:10.1016/j.bbr.2014.07.037.
- Polyzos, A. A. und McMurray, C. T. (2017). **The chicken or the egg: mitochondrial dysfunction as a cause or consequence of toxicity in Huntington's disease.** *Mech Ageing Dev* 161, 181–197, doi:10.1016/j.mad.2016.09.003.
- Pringsheim, T., Jette, N., Frolkis, A. und Steeves, T. D. L. (2014). **The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis.** *Mov Disord* 29, 1583–1590, doi:10.1002/mds.25945.
- Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Naini, A. B., Jakowec, M., Petzinger, G., Miller, R. und Akram, M. (2001). **The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety.** *J Neurochem* 76, 1265–1274, doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00183.x.
- Quinn, L. P., Stean, T. O., Chapman, H., Brown, M., Vidgeon-Hart, M., Upton, N., Billinton, A. und Virley, D. J. (2006). **Further validation of LABORAS™ using various dopaminergic manipulations in mice including MPTP-induced nigro-striatal degeneration.** *J Neurosci Methods* 156, 218–227.
- Radford, E. J. (2018). **Exploring the extent and scope of epigenetic inheritance.** *Nat Rev Endocrinol* 14, 345–355, doi:10.1038/s41574-018-0005-5.
- Rieck, M., Schumacher-Schuh, A. F., Callegari-Jacques, S. M., Altmann, V., Schneider Medeiros, M., Rieder, C. R. M. und Hutz, M. H. (2015). **Is there a**

**role for ADORA2A polymorphisms in levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease patients?** *Pharmacogenomics* 16, 573–582.

Rommelfanger, K. S., Edwards, G. L., Freeman, K. G., Liles, L. C., Miller, G. W. und Weinshenker, D. (2007). **Norepinephrine loss produces more profound motor deficits than MPTP treatment in mice.** *Proc Natl Acad Sci* 104, 13804–13809, doi:10.1073/pnas.0702753104.

Rousselet, E., Joubert, C., Callebert, J., Parain, K., Tremblay, L., Orioux, G., Launay, J. M., Cohen-Salmon, C. und Hirsch, E. C. (2003). **Behavioral changes are not directly related to striatal monoamine levels, number of nigral neurons, or dose of parkinsonian toxin MPTP in mice.** *Neurobiol Dis* 14, 218–228.

Sadler-Riggelman, I., Klukovich, R., Nilsson, E., Beck, D., Xie, Y., Yan, W. und Skinner, M. K. (2019). **Epigenetic transgenerational inheritance of testis pathology and Sertoli cell epimutations: generational origins of male infertility.** *Environ Epigenetics* 5, 1–18.

Schapira, A. H. V., Chaudhuri, K. R. und Jenner, P. (2017). **Non-motor features of Parkinson disease.** *Nat Rev Neurosci* 18, 435–450, doi:10.1038/nrn.2017.62.

Schapira, A. H. V., Cooper, J. M., Dexter, D., Clark, J. B., Jenner, P. und Marsden, C. D. (1990). **Mitochondrial Complex I Deficiency in Parkinson's Disease.** *J Neurochem* 54, 823–827, doi:10.1111/j.1471-4159.1990.tb02325.x.

Schroeder, U., Kreutz, M. R., Schroeder, H. und Sabel, B. A. (1997). **Amphetamine induces hypermotility in MPTP-lesioned mice.** *Pharmacol Biochem Behav* 56, 281–285.

Schumm, S., Sebban, C., Cohen-Salmon, C., Callebert, J., Launay, J.-M., Golmard, J.-L., Boussicault, L., Petropoulos, I., Hild, A., Rousselet, E., Prigent, A., Friguet, B., Mariani, J. und Hirsch, E. C. (2012). **Aging of the dopaminergic system and motor behavior in mice intoxicated with the parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine.** *J Neurochem* 122, 1032–1046, doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07837.x.

- Sedelis, M., Schwarting, R. K. W. und Huston, J. P. (2001). **Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease.** *Behav Brain Res* 125, 109–125, doi:10.1016/S0166-4328(01)00309-6.
- Seibenhener, M. L. und Wooten, M. C. (2015). **Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice.** *J Vis Exp* 1–6, doi:10.3791/52434.
- Sherwani, S. I. und Khan, H. A. (2015). **Role of 5-hydroxymethylcytosine in neurodegeneration.** *Gene* 570, 17–24, doi:10.1016/j.gene.2015.06.052.
- Shino, M. Y., McGuire, V., Van Den Eeden, S. K., Tanner, C. M., Popat, R., Leimpeter, A., Bernstein, A. L. und Nelson, L. M. (2010). **Familial aggregation of Parkinson's disease in a multiethnic community-based case-control study.** *Mov Disord* 25, 2587–2594, doi:10.1002/mds.23361.
- Sian, J., Dexter, D. T., Lees, A. J., Daniel, S., Agid, Y., Javoy-Agid, F., Jenner, P. und Marsden, C. D. (1994). **Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia.** *Ann Neurol* 36, 348–355, doi:10.1002/ana.410360305.
- Smeyne, M., Jiao, Y., Shepherd, K. R. und Smeyne, R. J. (2005). **Glia cell number modulates sensitivity to MPTP in mice.** *Glia* 52, 144–152.
- Soldner, F., Stelzer, Y., Shivalila, C. S., Abraham, B. J., Latourelle, J. C., Barrasa, M. I., Goldmann, J., Myers, R. H., Young, R. A. und Jaenisch, R. (2016). **Parkinson-associated risk variant in distal enhancer of  $\alpha$ -synuclein modulates target gene expression.** *Nature* 533, 95–99.
- Stanford, S. C. (2007). **The Open Field Test: Reinventing the wheel.** *J Psychopharmacol* 21, 134–135.
- Surmeier, D. J., Obeso, J. A. und Halliday, G. M. (2017). **Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease,** *Nature Reviews Neuroscience* 18 (2) S.101–113, doi:10.1038/nrn.2016.178.
- Tammen, S. A., Friso, S. und Choi, S. W. (2013). **Epigenetics: The link between nature and nurture.** *Mol Aspects Med* 34, 753–764,

doi:10.1016/j.mam.2012.07.018.

- Tan, Y. yan, Wu, L., Zhao, Z. bo, Wang, Y., Xiao, Q., Liu, J., Wang, G., Ma, J. fang und Chen, S. di (2014). **Methylation of  $\alpha$ -synuclein and leucine-rich repeat kinase 2 in leukocyte DNA of Parkinson's disease patients.** *Park Relat Disord* 20, 308–313.
- Turner, R. S. und Desmurget, M. (2010). **Basal ganglia contributions to motor control: A vigorous tutor.** *Curr Opin Neurobiol* 20, 704–716, doi:10.1016/j.conb.2010.08.022.
- Tyson, T., Steiner, J. A. und Brundin, P. (2016). **Sorting out release, uptake and processing of alpha-synuclein during prion-like spread of pathology.** *J Neurochem* 275–289.
- Vaglini, F., Viaggi, C., Piro, V., Pardini, C., Gerace, C., Scarselli, M. und Corsini, G. U. (2013). **Acetaldehyde and parkinsonism: Role of CYP450 2E1.** *Front Behav Neurosci* 7, 1–8, doi:10.3389/fnbeh.2013.00071.
- Venkateshappa, C., Harish, G., Mythri, R. B., Mahadevan, A., Srinivas Bharath, M. M. und Shankar, S. K. (2012). **Increased Oxidative Damage and Decreased Antioxidant Function in Aging Human Substantia Nigra Compared to Striatum: Implications for Parkinson's Disease.** *Neurochem Res* 37, 358–369, doi:10.1007/s11064-011-0619-7.
- Vučković, M. G., Wood, R. I., Holschneider, D. P., Abernathy, A., Togasaki, D. M., Smith, A., Petzinger, G. M. und Jakowec, M. W. (2008). **Memory, mood, dopamine, and serotonin in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse model of basal ganglia injury.** *Neurobiol Dis* 32, 319–327.
- Wei, Z., Li, Xiaowan, Li, Xixi, Liu, Q. und Cheng, Y. (2018). **Oxidative Stress in Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis.** *Front Mol Neurosci* 11, 1–7.
- Wen, K. X., Milic, J., El-Khodori, B., Dhana, K., Nano, J., Pulido, T., Kraja, B., Zaciragic, A., Bramer, W. M., Troup, J., Chowdhury, R., Arfam Ikram, M.,

- Dehghan, A., Muka, T. und Franco, O. H. (2016). **The role of DNA methylation and histone modifications in neurodegenerative diseases: A systematic review.** *PLoS One* 11.
- Willis, G. L. und Donnan, G. A. (1987). *Histochemical , biochemical and behavioural consequences of MPTP treatment in C-57 black mice.* 402, 269–274.
- Winklhofer, K. F. und Haass, C. (2010). **Mitochondrial dysfunction in Parkinson’s disease,** *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1802 (1) S.29–44, doi:10.1016/j.bbadis.2009.08.013.
- Wüllner, U., Kaut, O., deBoni, L., Piston, D. und Schmitt, I. (2016). **DNA methylation in Parkinson’s disease.** *J Neurochem* 139, 108–120.
- Xia, Y., Ye, S., Shi, J. und Huang, H. (2018). **Relationship Between the Anxious Symptoms and the Neurotransmitter in Parkinson’s Mice with Different Dosages of MPTP.** *Brazilian Arch Biol Technol* 61, 1–9.
- Xing, Y., Shi, S., Le, L., Lee, C. A., Silver-Morse, L. und Li, W. X. (2007). **Evidence for transgenerational transmission of epigenetic tumor susceptibility in Drosophila.** *PLoS Genet* 3, 1598–1606.
- Xu, Z., Li, H. und Jin, P. (2012). **Epigenetics-Based Therapeutics for Neurodegenerative Disorders.** *Curr Geriatr Reports* 1, 229–236.
- Youngson, N. A. und Whitelaw, E. (2008). **Transgenerational Epigenetic Effects.** *Annu Rev Genomics Hum Genet* 9, 233–257.

## 7.5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Braak-Stadien .....	7
Abbildung 2: Modell der Basalganglienverschaltung bei physiologischer Motorik.....	10
Abbildung 3: Behandlungsplan .....	24
Abbildung 4: Links: Raum für die <i>Openfield</i> -Messungen, Rechts: Aufsicht auf Käfige mit Kamera .....	25
Abbildung 5: Beispiel einer Eichkurve .....	29
Abbildung 6: Beispielchromatogramm 1 .....	29
Abbildung 7: Mortalität .....	31
Abbildung 8: Übersicht über die Anzahl der im <i>Openfield</i> untersuchten Mäuse .....	32
Abbildung 9: Lokomotion der F0-Generation vor ( <i>Baseline</i> ) vs. nach Injektion von NaCl bzw. MPTP/Probenecid .....	33
Abbildung 10: Zurückgelegte Strecke im <i>Openfield</i> -Versuch .....	34
Abbildung 11: Zurückgelegte Strecke im <i>Openfield</i> -Versuch nach Geschlecht sortiert.....	36
Abbildung 12: Durchschnittlicher Wandabstand [cm] .....	37
Abbildung 13: Zylindertest 1.....	38
Abbildung 14: Zylindertest 2.....	39
Abbildung 15: Komplex-I-Aktivität.....	40
Abbildung 16: Striatale Dopamin-Konzentration.....	42
Abbildung 17: Striatale Dopamin-Konzentration der F1'-Generation nach Geschlecht sortiert .....	43
Abbildung 18: Striatale DOPAC/Dopamin-Konzentration .....	44
Abbildung 19: Striatale DOPAC/Dopamin-Quotient der F1'-Generation nach Geschlecht sortiert .....	45
Abbildung 20: Striatale 5-HT-Konzentration.....	46
Abbildung 21: Striatale 5-HT-Konzentration der F1'-Generation nach Geschlecht sortiert.....	47
Abbildung 22: Striatale 5-HIAA/5-HT-Konzentration .....	48
Abbildung 23: Striatale 5-HIAA/5-HT-Konzentration der F1'-Generation nach Geschlecht sortiert .....	49
Abbildung 24: Striatale Noradrenalin-Konzentration .....	50
Abbildung 25: Striatale Adrenalin-Konzentration.....	51

## 7.6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Proben, die der HPLC-Messung zugeführt wurden .....	41
Tabelle 2: Übersicht <i>Openfield</i> .....	72

## 7.7 Lebenslauf

### Tamara Vernik

geboren am 31.10.1991 in Kaspijsk, Russland



#### Bildungsweg

2011 – 2017 Humanmedizin an der Universität zu Lübeck  
2002 – 2011 Trave-Gymnasium Lübeck

#### Praktisches Jahr

03.07.2017 – 22.10.2017 Innere Medizin, UKSH Lübeck  
08.05.2017 – 02.07.2017 Allgemein Chirurgie, Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, Salzburg, Österreich  
13.03.2017 – 07.05.2017 Allgemein Chirurgie, Rambam Helath Care Center, Haifa, Israel  
21.11.2016 – 12.03.2017 Neurochirurgie, KRK Klinikum Nordstadt, Hannover

#### Engagement

WS13/14, WS14/15, WS15/16 Neurotutorin am Institut für Anatomie

#### Stipendien

10/2015 – 12/2017 ELES-Stipendium

#### Beruflicher Werdegang

seit 03/2018 Assistenzärztin am Universitätsklinikum Erlangen, Klinik für Neurochirurgie

#### Promotion

seit 05/2014 Doktorarbeit am Institut für Neurogenetik an der Universität zu Lübeck, Arbeitsgruppe Animal Models of Movement Disorders

#### Publikation

25.09.2019 Posterpräsentation auf dem DGN-Kongress 2019  
Veröffentlichung des Abstracts im E-Book auf der DGN-Kongresswebsite

## 7.8 Danksagung

Parkinsonforschung interessiert mich nicht nur als Medizinerin, sondern berührt mich auch in persönlicher Hinsicht. Daher möchte ich mich an erster Stelle bei meinem Betreuer, Dr. med. Daniel Alvarez-Fischer, für die Themastellung bedanken. Ebenso danke ich ihm für seine Hilfe bei der Durchführung der Arbeit und die Beantwortung meiner zahlreichen Fragen.

Ebenfalls gilt mein Dank Frau Professorin Dr. med. Christine Klein, einer hervorragenden Doktormutter, die mir die Möglichkeit gab, meine Dissertation an dem Institut für Neurogenetik der Universität zu Lübeck zu erstellen. Ich danke ihr für die stets rasche Rückmeldung sowie ihre Ratschläge. Meine Vorstellung, was hinter dem Begriff „Forschung“ steckt, formte sich während ich in ihrem Institut Einblicke in die Arbeitsabläufe anderer Arbeitsgruppen erhalten sowie ihren Vorträgen zuhören durfte.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. rer. nat. Franca Vulinovic sowie Karin Wiegers für Ihre Unterstützung im Labor sowie Anne Herrmann für ihre Hilfe bei der Tierhaltung.

Ebenso danke ich Hans-Peter Kistner, der seine Erfahrung als Lektor genutzt hat, mir bei den Korrekturen des Manuskriptes zu helfen.

Niemals wäre diese Arbeit zu Ende gebracht worden ohne Severin Kistner. Ich danke ihm, dass er unermüdlich darin war, mich anzutreiben und meinen Kampfgeist wiederzubeleben.

Mein innigster Dank richtet sich an meine Großeltern, denen meine Bildung besonders am Herzen lag. Der Wissensdurst meiner Oma hat mich seit der Kindheit inspiriert.

Insbesondere dankbar bin ich meiner Mutter, Regina Vernik, die mein gutes Gewissen ist, für ihre Liebe und ihren Beistand in allen Lebenslagen. Alles, was ich bin, und alle Möglichkeiten, die ich habe, verdanke ich ihr.

## **7.9 Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Universität zu Lübeck zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Transgenerationelle Suszeptibilität gegenüber einer Schädigung des dopaminergen Systems im MPTP-Mausmodell“ im Institut für Neurogenetik unter Leitung von Frau Professorin Dr. med. Christine Klein mit Unterstützung von Dr. Daniel Alvarez-Fischer ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischem Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

München, den 25.01.2021

Tamara Vernik