

Aus dem Anatomischen Institut
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. Jobst Sievers)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**NEUROINFLAMMATORISCHE PROZESSE BEIM
IDIOPATHISCHEN PARKINSON-SYNDROM**
*ANTIINFLAMMATORISCHE INTERVENTION ALS MÖGLICHE
THERAPIEOPTION ?*

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

Jan-Hendrik Claasen
aus Flensburg

Kiel 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ralph Lucius

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Günther Deuschl

Tag der mündlichen Prüfung: 09.06.2010

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 09.06.2010

gez. _____

*„Damit das Mögliche entsteht, muss immer wieder das
Unmögliche versucht werden.“*

Hermann Hesse

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Neurodegenerative Erkrankungen	1
1.2	Das Parkinson-Syndrom	1
1.3	Entzündungsvorgänge im ZNS: Neuroinflammation	7
1.3.1	Mikroglia - Schlüsselzellen der Inflammation im ZNS	9
1.3.2	Immunprozesse beim Parkinson-Syndrom	14
1.4	Antiinflammatorische Strategien für das Parkinson-Syndrom	22
1.4.1	Der Periphere Benzodiazepinrezeptor	24
1.4.2	Der selektive MAP-Kinase Inhibitor Semapimod	26
1.5	Fragestellungen	27
2	Material	28
2.1	Reagenzien und Materialien	28
2.2	Antikörper	28
2.3	Wirkstoffe	29
2.4	Zellkulturmaterialien	29
2.5	Lösungen, Puffer und Zellkulturmedien	30
2.6	Zellkultur	31
2.7	Oligonukleotide	31
2.7.1	Primer für RT-PCR	31
2.8	Gebrauchsfertige Kits	31
2.9	Western-Blot	32
2.10	Versuchstiere	32
3	Methoden	33
3.1	Kultivierung von Mikrogliazellen der Ratte	33
3.1.1	Präparation und Kulturbedingungen	33
3.1.2	Immunzytochemie	33
3.1.3	Stimulations- und Inhibitionsversuche	34
3.1.4	ELISA	34
3.1.5	Indirekte Stickstoffmonoxid-Messung	35
3.1.6	RT-PCR	35

3.1.7	Western-Blot	38
3.1.8	Proliferationstest, [³ H]Thymidin-Einbau	40
3.2	Intrazerebrale Injektionen	40
3.2.1	Auswahl des Tiermodelles	40
3.2.2	Synthese und Reinigung von α -Synuclein	41
3.2.3	Operationstechnik und Versuchsgruppen	41
3.2.4	Perfusion und Aufarbeitung	44
3.2.5	Immunhistochemie	44
3.2.6	Auswertung der Neurodegeneration	45
3.3	Berechnungen, Statistiken, Grafik und Ausarbeitung	45
4	Ergebnisse	46
4.1	Studien zum Peripheren Benzodiazepinrezeptor an Mikroglia	46
4.1.1	Mikroglia in Astrozyten-konditioniertem Medium	46
4.1.2	Aktivierung ruhender Mikroglia <i>in vitro</i>	47
4.1.3	Immunzytochemischer Nachweis des PBR	48
4.1.4	Nachweis des PBR mittels RT-PCR	49
4.1.5	Nachweis des PBR im Western-Blot	50
4.1.6	Nachweis des proinflammatorischen Moleküles NO	51
4.1.7	Nachweis des proinflammatorischen Moleküles TNF- α	52
4.1.8	Effekt von Diazepam auf die Mikroglia proliferation	53
4.2	Studien zur Wirkung von α -Synuclein an Mikrogliazellen	54
4.2.1	Auch α -Synuclein aktiviert ruhende Mikroglia	54
4.2.2	Die α -Synuclein-Aktivierung ruhender Mikroglia <i>in vitro</i> lässt sich experimentell reduzieren	55
4.2.3	Nachweis des proinflammatorischen Moleküles NO bei α -Syn aktivierter Mikroglia	56
4.3	Studien am Tiermodell	57
4.3.1	Vorversuche: intrakortikale Injektionen und α -Syn Überexpression	57
4.3.2	Stereotaktische supranigrade Injektion von LPS und α -Syn PF	59
4.3.3	Antiinflammatorische Therapie mit Semapimod	62

5	Diskussion	64
5.1	Kulturstudien	64
5.1.1	Kultivierung von Mikrogliazellen	64
5.1.2	Nachweis des PBR an Mikroglia	66
5.1.3	Freisetzung proinflammatorischer Moleküle und deren Beeinflussung durch PBR-Liganden	67
5.1.4	Einfluss von PBR-Liganden auf die mikrogliale Proliferation	68
5.1.5	Bedeutung des PBR in Neuroinflammation und Neurodegeneration	68
5.2	Studien am Tiermodell	69
5.3	Ausblick	71
6	Zusammenfassung	73
7	Literaturverzeichnis	75
8	Danksagung	93
9	Lebenslauf	94

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Mögliche ätiopathogenetische Faktoren des IPS.	4
Abbildung 2:	Morphologie nicht-aktivierter und aktivierter Mikroglia.	11
Abbildung 3:	Aktivatoren und Amplifikatoren der Mikrogliaaktivität.	14
Abbildung 4:	Neuroinflammation ist beteiligt an der Degeneration dopaminerger Neurone beim IPS.	21
Abbildung 5:	Potenzielle neuroprotektive Strategien gegen entzündungsbedingte Degeneration dopaminerger Neurone beim IPS.	24
Abbildung 6:	Schematische Darstellung der intrazerebralen Injektionsstelle (koronar).	43
Abbildung 7:	Schematische Darstellung der intrazerebralen Injektionsstelle (sagittal).	43
Abbildung 8:	Morphologie der Mikrogliazellen kultiviert in AKM.	47
Abbildung 9:	Die Expressionsdichte des PBR steigt mit dem Grad der Mikrogliaaktivierung.	48
Abbildung 10:	RT-PCR zum Nachweis des PBR an Mikrogliazellen.	49
Abbildung 11:	Western-Blot zum Nachweis des PBR an Mikrogliazellen.	50
Abbildung 12:	Konzentration von Nitrit in Mikrogliaulturen nach 24-stündiger Koinkubation mit LPS und verschiedenen Liganden des PBR.	51
Abbildung 13:	Konzentration von TNF- α LPS-aktivierter Mikroglia nach 24-stündiger Koinkubation mit verschiedenen Liganden des PBR <i>in vitro</i> .	52
Abbildung 14:	Effekt von Diazepam auf die Zellproliferation.	53
Abbildung 15:	Morphologie der Mikrogliazellen nach Exposition mit α -Syn.	54
Abbildung 16:	Morphologische Studie von Mikroglia nach Exposition von α -Syn PF <i>in vitro</i> .	55
Abbildung 17:	Nitrit-Konzentration in Mikrogliaulturen nach 24-stündiger Koinkubation mit α -Syn PF und zwei verschiedenen MAPK-Inhibitoren.	56
Abbildung 18:	Intrakortikale Injektion von α -Syn PF führt zur Mikrogliaaktivierung im Kortex.	57
Abbildung 19:	Supranigrale Injektion von rekombinantem adenoviral-assoziiertem viralen (rAAV) Vektor zur Überexpression von humanen α -Syn PF führt zur Aktivierung der Mikroglia in der SN.	58
Abbildung 20:	Repräsentatives Beispiel von entzündungsbedingtem neuronalen Zelltod <i>in vivo</i> .	60
Abbildung 21:	Injektion von α -Syn PF führt zum Zelltod dopaminerger Neurone.	61

Abbildung 22: Antiinflammatorische Therapie mit Semapimod reduziert den von α -Syn
PF induzierten entzündungsbedingten Untergang dopaminerg
Nigraneurone. 62

Abbildung 23: Quantifizierung der Gesamtzahl TH-positiver Somata in der SNc. 63

Glossarium

α -Syn	α -Synuclein
α -Syn PF	α -Syn Protofibrillen
BZ	Benzodiazepin(e)
CBR	zentraler Benzodiazepinrezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CSF	Liquor cerebrospinalis
COX	Cyclooxygenase
DBI	<i>diazepam-binding inhibitor</i>
GABA	Gammaaminobuttersäure
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IPS	idiopathisches Parkinson-Syndrom
LB	Lewy-Körperchen
LBD	Demenz mit Lewy-Körperchen
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase-Kinase
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MS	Multiple Sklerose (Encephalomyelitis disseminata)
MSA	Multisystematrophie
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
NF- κ B	<i>nuclear factor-κb</i>
NM	Neuromelanin
NO	Stickstoffmonoxid
ODN	Octadecanuropeptid
PBR	peripherer Benzodiazepinrezeptor
PS	Parkinson-Syndrom
SN	Substantia nigra
SNC	SN pars compacta
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α

Nomenklatur der Nukleinsäuren

A	Adenosin
C	Cytidin
G	Guanosin
T	Thymidin

Vorbemerkung

Teile dieser Arbeit wurden auf internationalen Kongressen in Bonn und Würzburg unter dem Titel „*Functional significance of peripheral benzodiazepine receptors on activated microglia*“ vorgestellt und in folgenden Artikeln publiziert:

Wilms, H., J.H. Claasen, C. Röhl, J. Sievers, G. Deuschl, R. Lucius. 2003. Involvement of benzodiazepine receptors in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases: evidence from activated microglial cells in vitro. *Neurobiol Dis* 14:417-24.

Rosenstiel, P., H. Wilms, M. Romero-Ramos, A. Arlt, H. Schäfer, D. Seegert, P.J. Kahle, J.H. Claasen, C. Holzknecht, L.O. Brandenburg, G. Deuschl, J. Sievers, S. Schreiber, D. Kirik, R. Lucius. 2009. Suppression of MAP kinases inhibits microglial activation and neuronal cell death induced by α -Synuclein protofibrils. *Int J Immunopathol Pharmacol* 22:897-909.

1 Einleitung

1.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Neurodegeneration ist definiert als ein nach Entwicklungsabschluss des ZNS einsetzender Untergang von Nervengewebe, insbesondere von Neuronen. Neurodegenerative Erkrankungen sind gekennzeichnet durch die Abwesenheit einer einzelnen Noxe wie Trauma oder Infektion; der degenerative Prozess verläuft eigenständig und ist meist langsam progredient. Während Gliazellen bei adulten Säugern zur Proliferation befähigt und teilweise ersetzbar sind, kann der Verlust von voll differenzierten Nervenzellen nur unbefriedigend kompensiert werden. Mit dem Untergang von Nervenzellpopulationen atrophieren funktionelle Einheiten und anatomische Strukturen, so der Nucleus caudatus und das Putamen bei Chorea Huntington oder das dopaminerge nigrostriatale System bei Morbus Parkinson (Vila und Przedborski, 2003; Bossy-Wetzel et al., 2004). Die pathophysiologischen Mechanismen der Neurodegeneration sind bis zum heutigen Tag nicht abschließend geklärt, jedoch verdichten sich Hinweise, dass genetische (endogene) Faktoren und umweltbedingte (exogene) Faktoren einen Einfluss nehmen. Ein Ungleichgewicht zwischen neuroprotektiven und degenerativen Einflüssen kann so zum Nervenzelltod führen (Vila und Przedborski, 2003; Bossy-Wetzel et al., 2004; Hunter, 2005). Zur Gruppe der neurodegenerativen Erkrankungen zählen verschiedene Krankheitsbilder mit unterschiedlichen klinischen Manifestationen. Die geläufigsten Erkrankungen dieser Gruppe sind die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), Morbus Huntington, Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson (IPS, M. Parkinson) (Vila und Przedborski, 2003; Bossy-Wetzel et al., 2004).

Diese Arbeit konzentriert sich primär auf das idiopathische Parkinson-Syndrom.

1.2 Das Parkinson-Syndrom

Definition: James Parkinson beschrieb diese Krankheit im Jahre 1817 in seiner Schrift „*An assay of the shaking palsy.*“ Es handelt sich um eine klinisch-pathologisch definierte Bewegungsstörung mit den Kardinalsymptomen Akinese, Rigor, Tremor und posturale Instabilität. Pathogenetisch liegt dieser Systematrophie eine Lewy-Körperchen-assoziierte Degeneration umschriebener Nervenzellpopulationen, insbesondere dopaminergere Neurone der Substantia nigra pars compacta (SNc), zugrunde. Lediglich 75 bis 80 Prozent aller Parkinson-Syndrome entsprechen der nach James Parkinson benannten Krankheit (Lotharius und Brundin, 2002; Gerlach et al., 2007).

Das Parkinson-Syndrom kann in vier Gruppen unterteilt werden:

- (1) Familiäres Parkinson-Syndrom (Identifizierte Gene: PARK1 bis PARK8, 10, 11),
- (2) Primäres idiopathisches Parkinson-Syndrom unbekannter Ätiologie (IPS, M. Parkinson),
- (3) Sekundäre symptomatische Parkinson-Syndrome mit bekannter Ätiologie (vaskulär, medikamenteninduziert, tumorbedingt, posttraumatisch, toxininduziert, entzündlich, metabolisch),
- (4) Parkinson-Syndrome als Bestandteil anderer neurodegenerativer Erkrankungen (auch: atypische Parkinson-Syndrome oder Parkinson-plus-Syndrome), wie z.B. die Multisystematrophie (MSA), progressive supranukleäre Blickparese (PSP), kortikobasale Degeneration (CBD), spinocerebelläre Atrophien (diverse Subtypen) und die Demenz vom Lewy-Körper-Typ (LBD) (Gerlach et al., 2007; Diener und Putzki, 2008).

Epidemiologie des IPS: In Deutschland leiden ca. 250 000 Menschen an der Parkinson-Krankheit. Die Prävalenz wird auf 100-200/100 000, die Rate der jährlichen Neuerkrankungen auf 20/100 000 Einwohner geschätzt. Diese Krankheit befällt beide Geschlechter etwa gleich häufig, wobei das Alter der wesentliche Risikofaktor der Parkinson-Krankheit ist. Während die Erkrankung sehr selten vor dem 30. Lebensjahr auftritt, leiden 254/100 000 der 75- bis 84-jährigen an diesem Krankheitsbild. Die Parkinson-Krankheit manifestiert sich meist erst nach dem 65. Lebensjahr. Mit der Veränderung der Altersstruktur der Bevölkerung ist in Zukunft mit einer weiter ansteigenden Zahl von Patienten zu rechnen (Gerlach et al., 2007; Diener und Putzki, 2008).

Symptomatologie des IPS: Das idiopathische Parkinson-Syndrom ist gekennzeichnet durch das Vorliegen einer Akinese (Verminderung der Willkürmotorik) und mindestens einem der folgenden Kardinalsymptome:

- Rigor (Erhöhung des Muskeltonus),
- Ruhetremor (Ruhezittern der Extremitäten),
- Posturale Instabilität (erhöhte Fallneigung).

Fakultative Begleitsymptome sind:

- Sensorische Symptome (Sensibilitätsstörungen und Schmerzen),
- Vegetative Symptome (Störung von Blutdruckregulation, Temperaturregulation, Harnblasenfunktion und sexuellen Funktionen),
- Psychische Symptome (insbesondere Depression),
- Kognitive Symptome (frontale Störungen, Demenz) (Diener und Putzki, 2008).

Neuropathologie des IPS: Das IPS ist charakterisiert durch einen progressiven Verlust von neuromelaninhaltigen dopaminergen Neuronen der zentralen und kaudalen Anteile der Substantia nigra pars compacta (SNc). Makroskopisch imponiert der Verlust dieser Zellen als Depigmentation im Mittelhirn (erstmalig beschrieben durch Tretiakoff, 1919). Dieser Neuronenverlust führt zu den typischen motorischen Symptomen, wenn 50-70 Prozent der dopaminergen Neurone untergegangen sind (Bernheimer et al., 1973; Riederer und Wuketich, 1976). Die Verminderung des Dopaminspiegels korreliert mit dem Grad der Akinese.

Das zweite neuropathologische Kriterium des IPS sind intraneuronale zytoplasmatische Einschlusskörperchen, die sogenannten Lewy-Körperchen (LB), erstmalig 1912 beschrieben durch den Neurologen Friedrich H. Lewy (1885-1950) (Gibb, 1986; Jellinger, 1989; Braak et al., 1995). LB sind eosinophile Proteinaggregate, die in degenerierten Neuronen der SNc, dem Nucleus basalis Meynert, dem Locus coeruleus und im dorsalen Vaguskern nachgewiesen werden können. Interessanterweise scheinen diese Einschlusskörperchen einem Gradienten vom unteren Hirnstamm über die Basalganglien bis zum Kortex zu folgen (Braak et al., 2006).

Zu Beginn der Krankheit ist häufig nur eine Körperseite von der Symptomatik betroffen (Hemisymptomatik), der Zellverlust ist dann auf der kontralateralen SNc stärker ausgeprägt als auf der ipsilateralen Seite. Der Zelltod in der SNc führt zu einer Dopaminverarmung im Corpus striatum, das von der Degeneration beim IPS primär jedoch ausgespart ist (Bernheimer et al., 1973). Neben dem dopaminergen System sind eine Reihe von weiteren Neurotransmittersystemen betroffen: Noradrenalinmangel in frontalen Projektionsfeldern des Locus coeruleus und im Hypothalamus, Serotoninmangel im Hirnstamm (Jellinger, 1989) sowie Neuronengruppen außerhalb des ZNS, wie im Bulbus olfactorius und im enterischen Nervensystem des Verdauungstraktes (Hirsch und Hunot, 2009).

Ätiologie: Die Ätiologie und die Pathogenese des IPS sind unbekannt. Als mögliche Ursachen werden verschiedene Thesen diskutiert (⇒ Abb. 1).

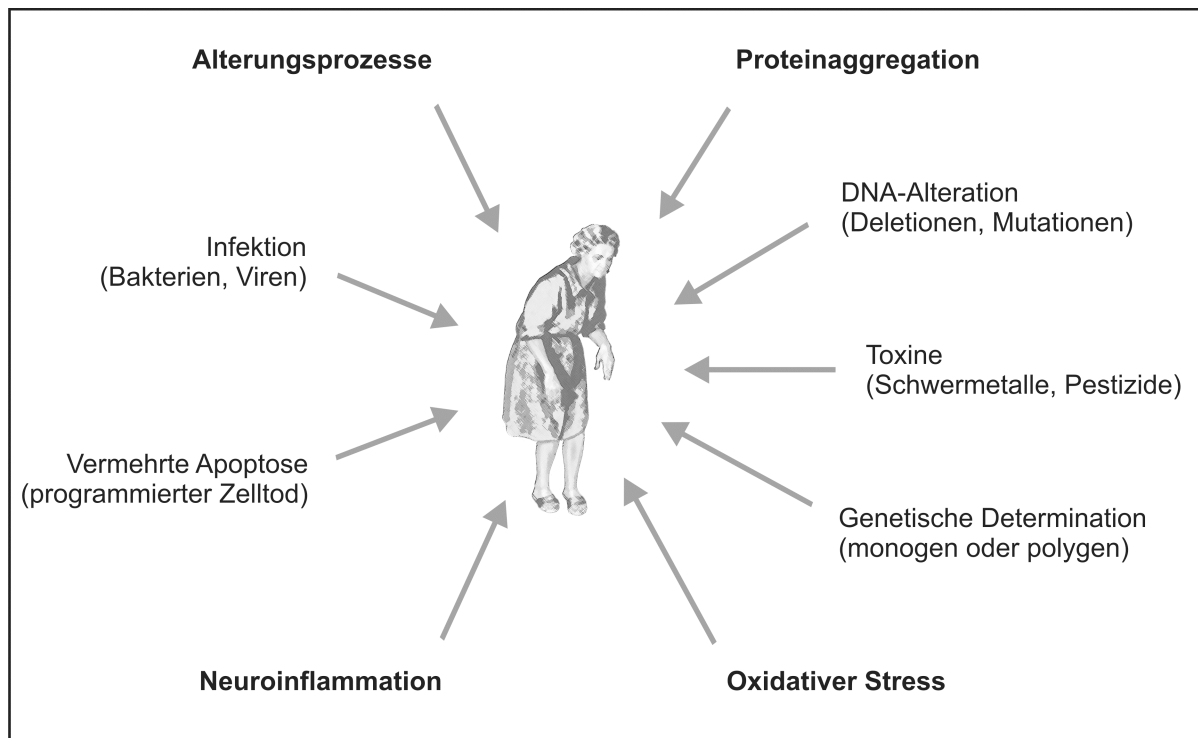


Abb. 1: Mögliche ätiopathogenetische Faktoren des IPS (Gerlach et al., 2007, modifiziert).

Vier bedeutende ätiopathogenetische Auslöser des IPS sollen an dieser Stelle näher beschrieben werden:

(1) Alterungsprozesse: Das Alter gilt als höchster Risikofaktor für das IPS. Die Vorgänge in einer Zelle, die zum Altern führen, überschneiden sich mit Befunden, die beim IPS beschrieben wurden. Altern wird durch Veränderungen im Ionen-Milieu (z.B. Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration), vermehrtes Auftreten reaktiver Sauerstoff-Spezies, oxidative Effekte auf das Zytoskelett und die nukleäre Matrix hervorgerufen. Dies führt zu Veränderungen des Chromatins und der mRNA-Prozessierung sowie zu Veränderungen des Redox-Gleichgewichtes und damit zur Störung der Gen-Expression mit Veränderung des zellulären Milieus. Ein Verlust von dopaminergen Nervenzellen in der SNc mit zunehmendem Alter ist durchaus physiologisch, ohne dass sich ein IPS manifestiert (Zecca et al., 2003). Die Degeneration beim IPS scheint sich jedoch von der physiologischen altersbedingten Degeneration zu unterscheiden: Während sich der Zellverlust beim IPS auf den ventrolateralen und kaudalen Teil der SNc konzentriert, findet die Altersdegeneration im dorsomedialen Abschnitt statt (Paulus und Jellinger, 1991).

(2) Proteinaggregation: Proteine aggregieren intrazellulär, wenn die Kapazität der Zelle Proteine abzubauen eingeschränkt ist. Beim familiären (erblichen) PS sind Gen-Mutationen

entdeckt worden, die mit Proteinaggregationen einhergehen. An dieser Stelle soll exemplarisch eine für diese Arbeit relevante Mutation hervorgehoben werden:

Eine von Polymeropoulos 1997 beschriebene Familie, bei der nicht nur der defekte Genort, sondern bereits auch das Gen-Produkt gefunden wurde, wies eine monogenetisch vererbte Form der Parkinson-Krankheit auf (Polymeropoulos et al., 1997). Das als PARK1 bezeichnete Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 4 (Chromosom 4q21, Ala 53Thr). Es handelt sich um eine Punktmutation, d.h. nur ein Nukleotid in der DNA-Sequenz dieses Gens ist vertauscht. Das Gen kodiert für α -Synuclein (α -Syn), einem wichtigen Bestandteil der oben genannten LB, die vermehrt als intraneuronale Einschlusskörperchen bei Patienten mit IPS gefunden wurden. Die Hypothese, dass die veränderte Aminosäuresequenz zu einem veränderten Protein und somit durch verminderten Abbau zu dessen Aggregation führt, konnte jedoch nicht bestätigt werden. α -Syn wird in allen Neuronen und auch in Gliazellen expremiert, so dass die Spezifität des Neuronen-Unterganges in der SNc dadurch nur schwer zu erklären ist.

An dieser Stelle sollte noch erwähnt werden, dass die sog. α -Synucleinopathien neben der PARK1-Krankheit auch die LBD und die MSA einschließen.

(3) Oxidativer Stress: Ein derzeit favorisiertes Modell für den dopaminergen Zelluntergang wird mit dem Begriff „oxidativer Stress“ verknüpft. Als solcher wird ein Ungleichgewicht zwischen der Produktion freier Radikale und antioxidativen Prozessen bezeichnet (Sies, 1991). Beim IPS scheint sowohl der Entgiftungsmechanismus für vom Sauerstoff ableitbare Radikale als auch die Funktion von Mitochondrien gestört zu sein. Bei Patienten, die an einem IPS erkrankt sind, liegt in der SNc ein Mangel an Komplex-I-Aktivität vor (Reichmann und Riederer, 1989; Janetzky et al., 1994). Der Komplex I ist der erste von fünf Komplexen der Atmungskette, der in der inneren Mitochondrienmembran verankert ist. Am Komplex I wird NADH in NAD und Protonen und Elektronen umgewandelt. Durch den Komplex-I-Defekt kommt es zur vermehrten Bildung von zellschädigenden Hydroxyl-Radikalen ($\cdot\text{OH}$) und letztlich zu einem Einstrom von Ca^{2+} -Ionen mit Aktivierung von Nukleasen und Proteasen, wodurch der Zelltod ausgelöst wird. Außer der vermehrten Radikal-Bildung bedingt der Komplex-I-Mangel auch eine reduzierte ATP-Produktion, so dass der Energiestoffwechsel von SN-Neuronen gestört ist. Der Komplex-I-Defekt ist zudem für eine DNA-Schädigung verantwortlich. Die Bildung von 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosin (8-OHdG) ist ein Marker für DNA-Schäden. In Parkinson-Gehirnen konnte sowohl in der SN als auch im Nucleus caudatus eine Verdreifachung der 8-OHdG-Konzentration nachgewiesen werden,

die insbesondere auf die Schädigung der mitochondrialen DNA (mtDNA) zurückzuführen ist (Alam et al., 1997).

Gegenstand laufender Untersuchungen ist die Annahme, dass eine oxidative Schädigung von α -Syn dessen Aggregation verstärken könnte, wie dies schon 1998 durch Ara und Mitarbeitern in Verbindung mit Peroxynitrit (ONOO⁻) gezeigt werden konnte. Dies würde eine enge Interaktion der beiden zuletzt genannten Hypothesen bedeuten.

(4) Neuroinflammation: Dieser Faktor wird ausführlich in Kapitel 1.3 beschrieben.

Therapie des IPS: Der Nachweis einer verminderten Konzentration von Dopamin und seiner Metaboliten in den Basalganglien bei Parkinson-Patienten durch *post mortem*-Studien führte zur Formulierung der „Dopaminmangel-Hypothese“ (Birkmayer und Hornykiewicz, 1961; Carlsson, 1964), die durch die erfolgreiche Einführung der Levodopa (L-DOPA)-Therapie bestätigt wurde. Mit der Einführung der Dopadecarboxylase-Inhibitoren konnte verhindert werden, dass L-DOPA in der Peripherie zu Dopamin decarboxyliert wird, was sowohl die therapeutischen Dosierungen als auch die peripheren Nebenwirkungen reduzierte. Obwohl die Behandlung mit L-DOPA und Decarboxylasehemmer der Goldstandard der modernen Antiparkinson-Therapie ist, birgt sie entscheidende Probleme: Die anfänglich gute Wirksamkeit lässt nach einigen Jahren nach, und es treten motorische Komplikationen wie Wirkungsschwankungen und Dyskinesien sowie Verwirrheitszustände auf (Gerlach et al., 2007; Diener et al., 2008). Durch die Einführung von Dopaminagonisten, Inhibitoren der Monoaminoxidase-B (MAO-B) und der Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT) zur L-DOPA-Gabe sollte das Auftreten dieser Komplikationen minimiert werden, welches allerdings nur unbefriedigend gelang.

Eine alternative therapeutische Strategie zur L-DOPA Substitution ist die adjuvante Verwendung von Glutamatantagonisten. Diese Wirkstoffe wirken u.a. antagonistisch an N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren und sollen einen neuroprotektiven Effekt haben (Poewe, 2009).

Die auch als Hirnschrittmacher bekannte Tiefe Hirnstimulation entwickelte sich in den letzten Jahren zu einem wesentlichen Fortschritt in der Therapie von neurologischen Bewegungsstörungen. Die Tiefe Hirnstimulation nutzt dabei einen chirurgisch implantierten Stimulator, ähnlich einem Herzschrittmacher, um elektrische Impulse über ein Kabel zu Kontakten zu bringen, die in den Nucleus subthalamicus oder in den Globus pallidus internus implantiert wurden. Die kontinuierliche Stimulation blockiert die durch die nigrostriatale Degeneration bedingte Überaktivität dieser beiden Strukturen, die für die behindernden Krankheitssymptome verantwortlich ist (Benabid et al., 2009).

Regenerative Strategien, die einen Ersatz durch Fremdzellen umfassen, werden als potentielle Therapieoptionen der Zukunft angesehen. Ziel der Transplantation von Neuronen beim IPS ist eine funktionelle Verbesserung durch Wiederherstellung der dopaminergen Übertragung im Striatum. Erste Transplantationsexperimente begannen Anfang der 70er Jahre, als neue immunzytochemische und bildgebende Methoden es ermöglichten, neuronale Transplantate zu untersuchen. Seit den 90er Jahren, als die ersten klinischen Studien mit Neuronen des vorderen Mittelhirns aus menschlichen Föten begannen, erhielten weltweit etwa 350 Patienten eine Transplantation (Deierborg et al., 2008). In zwei klinischen Doppelblind-Studien zeigte allerdings nur ein Teil der Patienten eine signifikante Verbesserung der motorischen Funktionen, einige Patienten erfuhren sogar eine Verschlechterung ihrer Symptomatik (Braak und Del Tredici, 2008). Zwei unabhängige wissenschaftliche Arbeitsgruppen berichteten 2008 von einer Affektion transplanteder fetaler Stammzellen im Sinne einer Lewy-Pathologie bei 11-16 Jahre alten neuronalen Transplantaten (Kordower et al., 2008; Li et al., 2008). Auf ihr therapeutisches Potential untersucht werden derzeit embryonale, fetale, adulte und induzierte pluripotente Stammzellen.

Die heutige medikamentöse Therapie des IPS ist zwar sehr wirkungsvoll, jedoch nur symptomatisch, d.h. sie kann die Progredienz der Erkrankung nicht aufhalten. Weiterhin mangelt es an geeigneten Methoden, den neuronalen Zelltod frühzeitig festzustellen. Aus diesem Grund ist die Entwicklung von Methoden zum frühdiagnostischen Nachweis des dopaminergen Zelltods notwendig, um bei positivem Ergebnis potenzielle nervenzellschützende (neuroprotektive) Substanzen einzusetzen.

1.3 Entzündungsvorgänge im ZNS: Neuroinflammation

Das ZNS wurde lange Zeit als immunprivilegiertes Organ angesehen, da Immunreaktionen im Vergleich zu anderen Organen des Körpers schwach auszufallen schienen. Diese Sichtweise ist überholt und das ZNS wird nun als immunologisch spezialisiertes Organ angesehen, in dem sehr wohl immunologische Reaktionen stattfinden. Das neuronale Netzwerk ist aufgrund seiner komplexen Struktur und seiner geringen Regenerationskapazität besonders vulnerabel für Immunprozesse. Aus diesem Grund wird die Immunantwort im ZNS wesentlich strenger reguliert als in der Peripherie, um eine permanente Desorganisation zu verhindern (Schwartz et al., 1999).

Das ZNS verfügt aus immunologischer Sicht über folgende Besonderheiten:

(i) Die Blut-Hirn-Schranke ist eine anatomische und physiologische Barriere, die den Ein- und Austritt von Makromolekülen und Abwehrzellen verhindern soll. Diese Barrierefunktion kann jedoch unter pathologischen Zuständen insuffizient sein, so dass nun vermehrt Entzündungszellen und Entzündungsfaktoren in das ZNS gelangen können (Reese und Karnovsky, 1967).

(ii) Das ZNS wird im Vergleich zu anderen Organen nicht von Lymphgefäßen durchzogen, zudem residieren im ZNS keine antigenpräsentierenden dendritischen Zellen (Perry, 1998). Die basale Expression von MHC (*major histocompatibility complex*) Klasse I und II Molekülen ist deutlich schwächer ausgeprägt als in der Peripherie (Matsumoto und Fujiwara, 1986; Wucherpfennig, 1994).

(iii) Immunsupprimierende Faktoren, wie das Zytokin TGF- β 1 (*transforming growth factor- β 1*), lokal produziert von Astrozyten und Neuronen (Cserr und Knopf, 1992), kontrollieren und supprimieren Entzündungsreaktionen. Die verstärkte Expression des Fas-Liganden (FasL, CD95L) im ZNS, verantwortlich für den Fas (CD95) vermittelten Zelltod von ZNS-infiltrierenden Immunzellen, verhindert das Patrouillieren von Lymphozyten (Bechmann et al., 1999; Flügel et al., 2000).

Ein Entzündungsprozess ist, sofern er kontrolliert und limitiert abläuft, in erster Linie positiv für den Organismus zu bewerten, da in diesem Fall der auslösende Faktor der Entzündung (z.B. Mikroorganismen) eliminiert werden kann. Antiinflammatorische Faktoren stoppen die Abwehrreaktion wieder, Wachstumsfaktoren führen zu einer Regeneration des Gewebes. Dieser Zustand findet sich bei einer transienten Entzündungsreaktion. Anders hingegen ist ein chronischer Entzündungsprozess zu werten. Eine Entzündung chronifiziert, wenn die Noxe nicht eliminiert werden kann oder wenn die Reaktion gegen den eigenen Organismus gerichtet ist (auch bekannt als Autoimmunreaktion). Unter diesen Umständen ist die Entzündungsreaktion schädlich und kann dramatische Folgen haben, wie dies bei der rheumatoiden Arthritis und der MS bekannt ist. Ob der neuroentzündliche Prozess, der im Gehirn von Patienten mit IPS entdeckt wurde, als eine Entzündung im klassischen Sinne bezeichnet werden kann, ist noch immer nicht abschließend geklärt. Aus diesem Grund beschreibt hier der Terminus Neuroinflammation das Phänomen einer Immunreaktion ohne Hinweis auf Herkunft, Regulation oder Konsequenz.

In anderen Geweben außerhalb des ZNS spielt die transiente Immunreaktion während des Heilungsprozesses eine wichtige Rolle. Ob das ZNS auf eine Immunreaktion (z.B. nach einem Trauma) angewiesen ist und ob das immunsupprimierende Milieu des ZNS hierfür

kontraproduktiv ist, ist ebenfalls noch Gegenstand gegenwärtiger Diskussionen (Schwartz et al., 2008).

Neuroinflammatorische Prozesse spielen in der Pathogenese bei einer Reihe von neurologischen Erkrankungen eine Rolle, wie z.B. bei der MS, bei M. Alzheimer, der AIDS-Demenz, Trauma und zerebraler Ischämie (Banati und Graeber, 1994; Gehrmann et al., 1995; Gebicke-Haerter et al., 1996; Kreutzberg, 1996; Streit et al., 1999; Minghetti and Levi, 1998; Stoll und Jander 1999). Diese Arbeit konzentriert sich auf die neuronale Entzündungsreaktion beim IPS, die den dopaminergen Zelluntergang begleitet.

1.3.1 Mikroglia – Schlüsselzellen der Inflammation im ZNS

„*There is hardly any pathology in the brain without an involvement of glial cells*“ (Kreutzberg, 1996). Dieses Dogma der Neurowissenschaft gilt insbesondere für die Mikroglia. Die Existenz der Mikroglia und deren Kategorisierung als das „dritte Element“ neben Neuronen und Astrozyten/ Oligodendrozyten, wurde durch del Rio Hortega beschrieben, dessen Namen diese Zellen tragen: Hortega-Zellen (Rio Hortega, 1919). Mikroglia sind die residenten Gewebsmakrophagen des ZNS. Ihr Anteil an allen Zellen des ZNS wird je nach Hirnregion auf 5-20 Prozent geschätzt (Dobrenis et al., 1998). Die SN besitzt im Vergleich zu anderen Regionen des Gehirns eine erhöhte Dichte an Mikrogliazellen (Lawson et al., 1990; Kim et al., 2000).

Die Herkunft der Mikrogliazellen war lange umstritten. Diese Zellen sind mesodermalen Ursprungs und nicht Teil der neuroepithelialen Linie, wie z.B. Neurone und Astrozyten (Ashwell, 1991; Boya et al., 1979). Vorläuferzellen der Mikroglia treten während der Entwicklung *in utero* über den Blutkreislauf, die Meningen und die Ventrikel in das ZNS ein, verteilen sich im Parenchym und differenzieren sich zu den ramifizierten Zellen (Cuadros und Navascues, 1998). Weitere Arbeiten demonstrierten, dass im Erwachsenenalter ein langsamer aber kontinuierlicher Ersatz der Zellen aus dem Knochenmark erfolgt (Priller et al., 2001). Als Hauptaufgabe der Mikroglia wurde die Phagozytose, das Abräumen von Zellschutt, beschrieben. Der Aufgabenbereich der Mikroglia ist jedoch wesentlich umfangreicher und beinhaltet Funktionen bei der Gewebsreparation und der Gewebshomeostase (Schwartz et al., 1999). Mikroglia zeigen physiologischerweise eine ramifizierte (spinnenförmige) Morphologie, die den nicht-aktivierten (vielleicht auch weniger differenzierten) Phänotyp der Zellen widerspiegelt und dem sensiblen Milieu des ZNS angepasst ist. Die ramifizierte Mikroglia zeigt zudem nur eine sehr schwache Expression von Liganden und Rezeptoren, die

für typische Makrophagenfunktionen essentiell sind (Kreutzberg, 1996). Das wohl charakteristischste Merkmal der Mikroglia ist ihre Aktivierung zu einer frühen Phase der gestörten ZNS-Homeostase, so dass diesen Zellen eine Art „Sensorfunktion“ zugeschrieben wird (Kreutzberg, 1996). Mikroglia werden durch ZNS-Infektion, entzündliche Stimuli (z.B. Zellschutt, Dysbalance des Ionenmilieus) oder Interaktion mit peripheren Leukozyten aktiviert. Unter solchen Umständen initiieren diese aktivierten Zellen einen Entzündungsprozess, regulieren die T-Zell-Antwort durch Antigenpräsentation und können so zur Neurozytotoxizität führen (Aloisi, 2001).

Die Aktivierung der Mikroglia verläuft als stufenförmiger Prozess und ist streng abhängig von der Art des jeweiligen Stimulus und dem inflammatorischen Kontext. Im Gegensatz zu den Gewebsmakrophagen in der Peripherie wird die Immunantwort der Mikroglia durch lokale Einflüsse noch stärker reguliert, um immunologisch stabile Verhältnisse zu garantieren (Aloisi, 2001) (\Rightarrow 1.3). Die Mikrogliaaktivierung erfolgt innerhalb von 24 Stunden (meist in den ersten Stunden) durch jegliche Art von Störung des neuronalen Gefüges und beinhaltet die Expression einer Reihe von Molekülen mit immunologischen Funktionen. In einem Laser-induzierten, mechanischen Läsionsmodell, konnten Davalos und Mitarbeiter eine Migration von aktivierten Mikrogliazellen zum Läsionsgebiet innerhalb weniger Minuten nach der Läsion nachweisen und identifizierten extrazelluläres ATP als auslösendes Molekül (Davalos et al., 2005).

Früh aktivierte Mikroglia zeigt eine erhöhte IgG-Reaktivität, eine erhöhte Expression von Komplementrezeptoren und den Zelladhäsionsmolekülen LFA-1 (*leukozyte-function associated antigen-1*), MHC Klasse II, ICAM-1 (*inter-cellular adhesion molecule-1*) und Mac-1 (*macrophage-1 antigen*) (McGeer und McGeer, 2008). Diese erste Phase wird als Stadium der erhöhten Aufmerksamkeit bezeichnet (Kreutzberg, 1996). Wenn der aktivierende Stimulus nicht verschwindet, adhärirt die aktivierte Mikroglia an den kompromittierten Neuronen (Kreutzberg, 1996). Diese Phase wird wahrscheinlich durch Chemokine vermittelt, die von Neuronen expremiert werden. Zu ihnen gehört MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) (Kreutzberg, 1996). Das Zytoskelett der Mikroglia verändert sich in der Weise, dass sich das Soma vergrößert und die Ausläufer verkürzen. In dieser Phase proliferiert die Zelle, um die Zellzahl zu erhöhen (Raivich et al., 1999). Bei weiterer Persistenz des Stimulus erfolgt als nächster Schritt der Transformation die verstärkte Expression von MHC Molekülen und immunassoziierten Glykoproteinen, wie CD40, B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), die als potente Stimuli für eine Immunreaktion gegen ein spezifisches Antigen angesehen werden können (Aloisi et al., 2000). In diesem Stadium der Aktivierung besitzt die Mikroglia ein

immunologisches Potential, das vergleichbar mit antigenpräsentierenden Zellen der Peripherie (z.B. dendritischen Zellen) ist. An jedem Punkt des Aktivierungsprozesses kann die Mikroglia in ihrer Gesamtzahl abnehmen, Aktivierungsmarker verlieren und in den „Standby-Modus“ zurückkehren, wenn das pathologische Signal verschwindet. Bei weiterer Persistenz des Signals erfolgt eine massive Verstärkung der Aktivierungs- und Zelladhäsionsmarker, und die Zellen wandeln sich komplett zu Phagozyten um (Dobrenis, 1998). Während dieser Maximalstufe der Mikrogliaaktivierung setzen die Zellen große Mengen von Zytokinen frei und führen zur Lymphozytenmigration in das Schadensgebiet.

Mikroglia werden durch direkte Neuron-Mikroglia Interaktion beeinflusst. Bei einem neuronalen Schaden ändern die Nervenzellen umgehend ihre Genexpression und stimulieren dabei Astrozyten und Mikroglia zu ihrer Unterstützung (Neumann, 2001). Um die MHC-Expression der Mikroglia aufrechtzuerhalten, werden sowohl positive Signale (z.B. proinflammatorische Zytokine) z.B. von T-Zellen als auch die Elimination von Negativsignalen (z.B. Neurotrophine, antiinflammatorische Zytokine oder andere inhibitorische Faktoren) benötigt, die von Neuronen und Astrozyten entsendet werden (Aloisi, 2000; Neumann und Werkerle, 1998). Wenn die pathologischen Umstände persistieren, produziert die Mikroglia unter dem Einfluss von T-Zellen eine Vielzahl von Molekülen, zu denen reaktive Sauerstoffspezies, proinflammatorische Zytokine und Prostaglandine gehören.

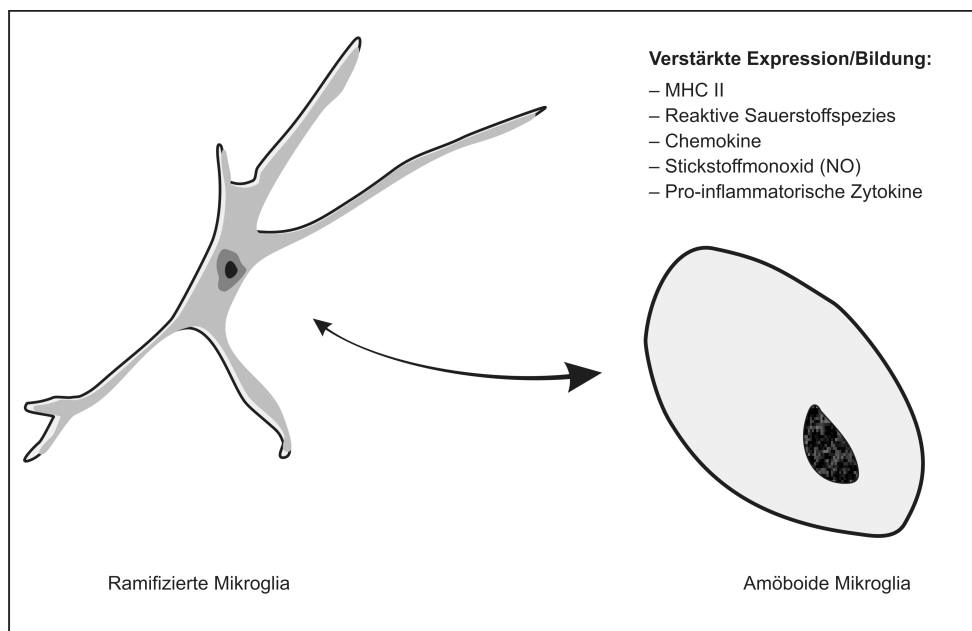


Abb. 2: Morphologie nicht-aktivierter und aktivierter Mikroglia.

In dieser Arbeit wurde der Fokus auf zwei proinflammatorische Moleküle gelegt, die von aktivierter Mikroglia freigesetzt werden:

(1) Stickstoffmonoxid (NO) ist neurotoxisch, weil es Komplex I und II der Atmungskette hemmt (Dawson et al., 1993). Des Weiteren bildet NO mit Superoxidanionen (O_2^-) Peroxinitrit (ONOO⁻), ein hoch reaktives Molekül, das zur Oxidation von verschiedenen Proteinen [z.B. Tyrosinhydroxylase (Ara et al., 1998)], Lipiden und DNA führen kann (Reynolds et al., 2007) und zur striatalen Neurodegeneration in einem Mausmodell des PS *in vivo* geführt hat (Mihm et al., 2001). 3-Nitrotyrosin, ein durch NO katalysiertes Radikal, wurde immunhistochemisch verstärkt in LB bei Parkinson-Patienten nachgewiesen (Good et al., 1998). Die Dichte von Mikrogliazellen, die die induzierbare Form der Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) exprimieren, ist in der SN bei Patienten mit IPS im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erhöht (Hunot et al., 1996). Erhöhte Konzentrationen des NO-Metaboliten Nitrit wurden im Liquor cerebrospinalis (CSF) von IPS-Patienten im Vergleich zur gesunden Vergleichsgruppe nachgewiesen (Pennathur et al., 1999), ein Befund der experimentell in MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin) intoxikierten Mäusen ebenfalls nachgewiesen wurde (Schulz et al., 1995).

(2) Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) ist ein wichtiges Zytokin zur Steuerung inflammatorischer Prozesse und zur Regulation des programmierten Zelltodes. TNF- α produzierende Astrozyten und Mikroglia wurden in der SNc bei IPS-Patienten in unmittelbarer Nachbarschaft von degenerierenden dopaminergen Neuronen nachgewiesen (Hunot et al., 1999). Eine verstärkte Immunreaktivität von TNF-Rezeptoren zeigte sich an Perikaryen und Zellausläufern vieler dopaminergener Neurone in Gehirnen von Patienten mit IPS (Boka et al., 1994; Mogi et al., 2000). *In vitro*- und *in vivo*-Studien, in denen Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNF-R) 1 und TNF-R2 Knockout-Mäuse verwendet wurden, zeigten, dass die Aktivierung von TNF-R1 einen neurotoxischen und die Aktivierung von TNF-R2 einen neuroprotektiven Effekt hat (Fontaine et al., 2002; Kassiotis und Kollias, 2001). Eine verstärkte Expression von TNF-R1 konnte in der SN bei Parkinson-Patienten ebenfalls nachgewiesen werden (Mogi et al., 2000). Diese Erkenntnis legt die Vermutung nahe, dass TNF- α über diesen Rezeptor bei dopaminergen Nigra-Neuronen den programmierten Zelltod auslösen könnte. TNF- α führte bei Primärkulturen von dopaminergen Zellen von Ratten zum Zelltod. Die dabei verwendeten Konzentrationen waren ähnlich hoch wie die, die von LPS aktivierten Mikrogliaulturen produziert werden können (Clarke und Branton, 2002), und die neurotoxische Wirkung des Mediums Lipopolysaccharide (LPS)

aktivierter Mikroglia auf dopaminerge Neurone konnte um 50% durch neutralisierende Anti-TNF- α Antikörper reduziert werden (Gayle et al., 2002).

Proinflammatorische Faktoren können zur Neurodegeneration führen und einen Kreislauf aus Nervenzelldegeneration mit erneuter lokalisierter Mikrogliaaktivierung unterhalten. Es handelt sich hier also um ein Wechselspiel von lokal inhibierenden und stimulierenden Einflüssen, die die Mikrogliareaktion lenken (Orr et al., 2002). Die konstante Lokalisation aktivierter Mikroglia in Arealen andauernder Neurodegeneration ist ein Merkmal des IPS. Unter bestimmten Bedingungen bilden Mikrogliazellen jedoch einen Phenotyp aus, der in abgeschwächter Form TNF- α und verstärkt neurotrophe Faktoren wie z.B. IGF-I (*insuline-like growth factor-I*) freisetzt (Zhao et al., 2006). Die Induktion ZNS-spezifischer Immunreaktionen durch eine T-Zell basierte Impfbehandlung mit Glatirameracetat (Copaxone®) zeigte in einem transgenen Mausmodell der Alzheimer-Krankheit eine abgeschwächte Plaquebildung und verbesserte die Leistung der behandelten Tiere im Lernmodell (Morris water maze) (Butovsky et al., 2006, 2007). Butovsky und Mitarbeiter konnten zeigen, dass aus dem Knochenmark in das ZNS infiltrierende CD11c⁺ Zellen die Plaquebildung reduzierten und postulierten, dass aktivierte Mikrogliazellen diese Rekrutierung induziert haben könnten. Copaxone® ist ein Oligopeptid aus vier Aminosäuren und induziert die Bildung von neurotrophen Faktoren in T-Lymphozyten, ein Effekt, der bereits therapeutisch bei der Multiplen Sklerose angewendet wird (Wiendl und Hohlfeld, 2009).

Diese Befunde bieten einen Erklärungsansatz, weshalb Studien mit antiinflammatorischen und immunsuppressiven Wirkstoffen keinen positiven Effekt oder bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen sogar einen nachteiligen Effekt hatten (Gao et al., 2003c; Masters et al., 2008).

Lipopolysaccharide (LPS; ZNS-Infektion):	TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS/NO (...)
Interferon-γ (IFN- γ ; ZNS-Infektion):	\uparrow CD40, \uparrow LPS ind. NO und TNF- α (...)
β-Amyloid-Peptid (A β ; M. Alzheimer):	O $_2^-$, TNF- α , CD40-CD40L Bindung (...)
Tat (HIV Kernprotein; AIDS-Demenz):	iNOS/NO, Zytokine, Chemokine (...)
Prion Protein Fragment (PrP106-126; CJD):	TNF- α , IL-1 β , IL-6 (...)

Abb. 3: Aktivatoren und Amplifikatoren der Mikrogliaaktivität. Eine große Zahl von Molekülen führt zur Aktivierung der Mikroglia. Hier sollen nur die (krankheitsrelevanten) wichtigsten Faktoren mit der jeweiligen Reaktion der Mikroglia genannt werden (Nakamura, 2002) CJD = Creutzfeld-Jakob-Krankheit.

1.3.2 Immunprozesse beim Parkinson-Syndrom

Seit vielen Jahren ist bekannt, dass bei Patienten mit IPS Veränderungen des Immunsystems auftreten. Abweichungen der Lymphozytenpopulation im CSF und im Blut, Veränderungen der Immunglobulinsynthese, der Zytokinbildung und der Synthese von Akute Phase Proteinen wurden bei Patienten mit IPS nachgewiesen (Czlonkowska et al., 2002). In diesem Zusammenhang scheint auch die Beobachtung zu stehen, dass Parkinson-Patienten seltener an Infektionen oder Krebs erkranken (Czlonkowska et al., 2002). Eine generalisierte Stimulation des Immunsystems wird sowohl im ZNS als auch in der Peripherie vermutet (Fischer et al., 1994).

(1) Peripheres Immunsystem: Patienten mit IPS zeigen Abweichungen ihres zellulären und humoralen Immunsystems. Die Gesamtzahl der Lymphozyten ist vermindert, die Population der T-Zellen (CD3⁺) und B-Zellen (CD19⁺) insbesondere der T-Helferzellen (CD4⁺) sind beim IPS reduziert (Fischer et al., 1994; Bas et al., 2001). Im Gegensatz dazu ist die Fraktion aktivierter T-Helferzellen erhöht (Fischer et al., 1994). Lymphozyten von Patienten mit IPS weisen eine verminderte Proliferationskapazität zu Mitogenen *in vitro* auf, was auf eine eingeschränkte zelluläre Immunantwort schließen lässt (Fischer et al., 1991). Die Subpopulation der $\gamma\delta^+$ -Lymphozyten spielt eine Rolle bei der Immunantwort gegen Infektionen und bei Autoimmunerkrankungen. Beim IPS ist die $\gamma\delta^+$ -Subpopulation im CSF erhöht (Fischer et al., 1994). Zudem haben immunhistochemische Studien außer den o.g. Komplementfaktoren Interferon induzierte MxA (eine GTPase, die an der Immunabwehr gegen RNA-Viren beteiligt ist) in LB und degenerierten neuronalen Ausläufern nachgewiesen

(Takahashi et al., 1999). Diese Befunde stützen die Hypothese, dass die Ätiologie des IPS infektiöser Genese sein könnte, jedoch war der Antikörpernachweis auf verschiedene neurotrope Viren bzw. der Nachweis viraler Antigene in Gehirnen von Patienten mit IPS bisher negativ (Schwartz et al., 1979; Kristensson et al., 1992). Gestützt wird die Hypothese einer infektiösen Genese des IPS durch die Entdeckung, dass die Pandemie der von-Economo-Enzephalitis (Encephalitis lethargica) während des frühen 20. Jahrhunderts mit Parkinsonismus assoziiert war (von Economo, 1917). Bis heute hat man das verantwortliche Virus für die von-Economo-Krankheit nicht gefunden, es könnte sich aber um ein Grippe-Virus gehandelt haben, da die Krankheit im Rahmen der Grippe-Pandemie zur Zeit des Ersten Weltkrieges auftrat. Es ist möglich, dass ein neues bzw. weniger intensiv studiertes infektiöses Pathogen an der Entstehung des IPS beteiligt ist.

Eine Autoimmunreaktion könnte ebenfalls ein ätiologischer Faktor beim IPS sein: Ungefähr 30% der Patienten mit IPS produzieren Antikörper, die an Neurone des Nucleus caudatus binden (Abramsky et al., 1978). Spezifisches IgG, das an dopaminerge Neurone der SN bindet, wurde im CSF, und Autoantikörper gegen andere neuronale Antigene wurden im Serum von Patienten mit IPS nachgewiesen (Dahlstrom et al., 1990). Viele Studien haben die Produktion von Autoantikörpern bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. M. Huntington, M. Alzheimer und Schizophrenie, nachgewiesen. Das häufige Auftreten von Autoantikörpern bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen lässt ebenfalls eine sekundäre Reaktion auf die Freisetzung von neuronalen Antigenen über die Blut-Hirn-Schranke während des Krankheitsprozesses vermuten. Die Produktion von Autoantikörpern beim IPS ist am ehesten als sekundär einzustufen, jedoch besitzen diese Autoantikörper die Fähigkeit synaptische Verbindungen zu verändern, den axonalen Transport zu stören, die Proteinsynthese zu verändern, Rezeptoren zu blockieren und die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke zu erhöhen, was in verschiedenen *in vitro-* und *in vivo-*Modellen gezeigt werden konnte. Diese Entdeckungen legen den Verdacht nahe, dass humorale Autoimmunmechanismen an der Progression des IPS beteiligt sein könnten.

(2) Zentrales Nervensystem: Im Jahr 1988 demonstrierte die Arbeitsgruppe um McGeer die Präsenz von T-Lymphozyten und MHC Klasse II Antigen positiver, aktivierter Mikroglia in der geschädigten SNc von Patienten, die sowohl an einem IPS erkrankt waren (McGeer et al., 1988) als auch bei Patienten mit MPTP induziertem Parkinsonismus (Langston et al., 1999) (⇒ Punkt (5)). Die Expression von MHC Klasse II Antigen spielt eine entscheidende Rolle bei der Antigenpräsentation zu T-Zellen und initiiert bzw. unterhält so den Entzündungsprozess. Diese Entdeckung war Grundlage für die Annahme, dass es sich beim

IPS um einen fortlaufenden Prozess handeln könnte, der durch die begleitende Entzündungsreaktion unterhalten wird. Eine antiinflammatorische Strategie geriet so mehr und mehr in den Fokus der Wissenschaft.

Zahlreiche *post mortem* Studien bestätigten diese Vermutung und wiesen einen aktiven Entzündungsprozess in der SNc mit der Mikroglia im Mittelpunkt nach (McGeer und McGeer, 2008). Diese Mikroglia zeigte alle Merkmale einer Aktivierung: verstärkte Expression der iNOS, der Cyclooxygenase (COX)-1 und Ausbildung einer amoeboiden Morphologie (McGeer und McGeer, 2008; Liu und Hong, 2003). Die Aktivierung von Mikrogliazellen in der SNc beim IPS ist keine generalisierte Entzündungsreaktion im Gehirn, sondern streng lokalisiert. Die anatomisch diskrete Erhöhung der Mikroglia beschränkt sich beim IPS auf das Gebiet des neuronalen Zelltodes. Weder die Degeneration neuronaler Terminalen der Nigraneurone noch die LB-Ablagerung in anderen Neuronen (z.B. kortikale Neurone) verursachen diesen Prozess (Mirza et al., 2000; Shepherd et al., 2002). Der dopaminerge Nervenzelltod steht somit in direkter Verbindung zur erhöhten Mikrogliaaktivität. Geschätzt wird ein Zellverlust von etwa 100-200 dopaminergem Neurone pro Tag in der SNc bei Parkinson-Patienten (Clarke et al., 2000; Hardman et al., 2002). Nach McGeer geht dieser neuronale Zellverlust mit einem sechsfachen Anstieg der Mikroglia einher (McGeer et al., 1988).

Ein weiterer Hinweis für inflammatorische Prozesse beim IPS sind signifikant erhöhte Zytokinspiegel im Striatum und CSF von Patienten mit IPS im Vergleich zu Kontrollpersonen des gleichen Alters. Erhöht sind sowohl die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , Interleukin (IL)-1 β , IL-6 und IL-2, als auch antiinflammatorische Zytokine (IL-4) und Wachstumsfaktoren, wie EGF (*epidermal growth factor*), bFGF (*basic fibroblast growth factor*), TGF- α (*transforming growth factor- α*) und TGF- β 1 (Nagatsu et al., 2000). Im Parenchym sind die erhöhten Zytokinspiegel spezifisch für den nigrostriatalen Pfad und wurden nicht in anderen Regionen, wie z.B. dem Kortex gefunden. Diese Befunde stützen die These, dass die Zytokinproduktion auf die Region, in der Neurodegeneration stattfindet, limitiert ist (Nagatsu et al., 2000).

Ein weiterer Hinweis für eine Beteiligung von Immunprozessen ist der Nachweis von Komplementproteinen mit allen Komponenten des membranangreifenden Komplexes (MAC) in LB und auf Oligodendroglia beim IPS (Yamada et al., 1992; McGeer und McGeer 2005; Löffler et al., 2006). Der MAC bildet in der Zellmembran eine Pore, die zur Lyse und somit zum Untergang der attackierten Zelle führt. Welcher Auslöser letztlich zur Aktivierung des Komplementsystems mit der nachfolgenden Formation des MAC führt, ist noch unklar. Der

Nachweis von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen zusammen mit einer verstärkten Expression von MHC Klasse I und II Molekülen hauptsächlich durch Mikroglia beim IPS legt zudem den Verdacht eines „*cross talks*“ zwischen der Mikroglia und T-Zellen nahe (McGeer et al., 1987).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Immunprozess beim IPS nicht hochspezifisch, jedoch streng lokalisiert und mit einer chronischen Komponente versehen ist. Die inflammatorische Reaktion in der SN und dem Striatum beim IPS ist als Reaktion auf den initial stattfindenden dopaminergen Zelltod zu verstehen. Ein *circulus vitiosus* wird initiiert: Die Entzündungsreaktion unterhält das progrediente Absterben der Neurone, welches wiederum die Entzündung unterhält.

Die Triggerfaktoren, die die Mikrogliose beim IPS induzieren und unterhalten, konnten noch nicht vollständig identifiziert werden. Verschiedene Moleküle stehen im Verdacht, Mikrogliazellen zu aktivieren. Exemplarisch soll hier auf die wichtigsten Moleküle für das (experimentelle) PS eingegangen werden:

(i) Lipopolysaccharide (LPS): Dieser auch als Endotoxin bezeichnete Molekülkomplex ist Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien und ein potentieller Aktivator von Mikrogliazellen (Liebermann et al., 1989). LPS bindet an einen Membranrezeptorkomplex von Mikrogliazellen und aktiviert den Transkriptionsfaktor NF- κ B (*nuclear factor- κ b*) mit der darauf folgenden Transkription proinflammatorischer Gene (Orr et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass eine intranigrale Injektion von LPS zu einer starken Mikrogliaaktivierung und einer Degeneration von dopaminergen Neuronen in der SN und dem Striatum im Tiermodell führt (Hererra et al., 2000). Eine Injektion der gleichen LPS-Dosis in andere Hirngebiete, wie Hippocampus und Kortex, scheint zu keinem neuronalen Zellverlust zu führen (Kim et al., 2000). Interessanterweise ist die Schädigung der dopaminergen Neurone auch noch ein Jahr *post injectionem* präsent, was für die Tatsache spricht, dass eine transiente Exposition mit einer proinflammatorischen Substanz über eine Reaktionskette zu einer permanenten Neurodegeneration, wie sie beim PS stattfindet, ausgelöst werden kann (Hererra et al., 2000). Insbesondere für das PS ist wichtig, dass die LPS induzierte Neurotoxizität selektiv für dopaminerge Neurone zu gelten scheint. Verluste von GABA (Gammaaminobuttersäure)ergen oder serotoninerger Neurone konnte nach Injektion gleicher LPS-Dosierungen nicht festgestellt werden (Hererra et al., 2000).

(ii) 6-Hydroxydopamin (6-OHDA)-Modell: Durch eine unilaterale lokale Injektion des Neurotoxins 6-OHDA in die SN oder das mittlere Vorderhirnbündel werden selektiv dopaminerge Neurone zerstört. Daraus resultiert eine Erhöhung der Zahl dopaminenger

Rezeptoren im ipsilateralen Striatum. Bei so behandelten Ratten erzeugen direkte Dopaminagonisten wie Apomorphin und Lisurid bzw. Substanzen die endogenes Dopamin freisetzen, wie Amphetamin, ein charakteristisches Rotationsverhalten, das durch Dopaminantagonisten aufgehoben werden kann. Das Modell eignet sich sehr gut zur pharmakologischen Testung neuer symptomatischer Therapien (Rodriguez et al., 2001).

6-OHDA führt zur Apoptose von nigrostriatalen dopaminergen Zellen, ein Effekt, der teilweise auch durch die Aktivierung von Mikrogliazellen hervorgerufen wird. Eine intrazerebrale Injektion von 6-OHDA in die SN von Mäusen erhöht dort die Anzahl aktivierter Mikroglia mit einem darauf folgenden Verlust von dopaminergen Neuronen eine Woche nach dem Insult (He et al., 2001). Zudem zeigten mit 6-OHDA behandelte Ratten erhöhte Spiegel von TNF- α in der SN und im Striatum (Mogi et al., 1999). Der Verlust dopaminergener Neurone nach intrastriataler Injektion von 6-OHDA in Ratten konnte über die Positronemissionstomografie (PET) verfolgt werden (Cicetti et al., 2002). Die Autoren entdeckten eine progressive striatale und nigrale Neurodegeneration gefolgt von einer zunächst fokalen und nach vier Wochen weitläufigen Mikrogliaaktivierung (Cicetti et al., 2002). Aus diesem Befund schlossen die Autoren, dass Neuroinflammation ein signifikanter Faktor für den 6-OHDA bedingten neurodegenerativen Prozess ist. Nagatsu und Sawada bestätigten 2006 diese These und berichteten sowohl von einer verstärkten Expression proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-1 β und IL-6) als auch von einer verminderten Expression neurotropher Faktoren z.B. BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) im Liquor von Patienten mit IPS und in der Nigrostriata von 6-OHDA behandelten Ratten.

(iii) 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP)-Modell: Das MPTP erzeugt nach systemischer Exposition am Menschen, subhumanen Primaten und Nagern ein neurologisches Syndrom, welches in seiner Symptomatik, den neuropathologischen und neurobiochemischen Veränderungen dem IPS in nahezu allen Aspekten entspricht (Langston et al., 1999). MPTP kann die Blut-Hirn-Schranke passieren und wird im ZNS durch die Monoaminoxidase zu MPP⁺ umgewandelt. Über den Aufnahmemechanismus für Dopamin (DA) gelangt MPP⁺ in die dopaminergen Terminalen, in denen es vesikulär gespeichert und an Neuromelanin (NM) gebunden wird. Direkt nach Aufnahme oder nach Freisetzung aus den Speichern hemmt MPP⁺ in den Mitochondrien den Komplex I der Atmungskette und führt zum dopaminergen Zelltod (Jenner, 2008). MPTP führt ebenfalls zu einer chronischen Entzündungsreaktion bei Menschen und subhumanen Primaten, die noch über Jahre nach MPTP Exposition anhält (Langston et al., 1999; McGeer und McGeer, 2004). Ko-Kulturen von dopaminergen Neuronen mit Mikrogliazellen führen nach Gabe von MPTP im Vergleich

zur neuronalen Monokultur zu einem verstärkten MPTP-induzierten Nervenzelltod (Gao et al., 2003a). Eine verstärkte Expression von MHC Klasse I und II Antigen und eine verstärkte iNOS-Aktivität konnte im Striatum und SNc (Kukowska-Jatrzebska et al., 1999) ebenso wie eine erhöhte Expression anderer proinflammatorischer Gene, wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α (Nagatsu et al., 2000a,b; Mandel et al., 2003) nachgewiesen werden. MPTP und sein aktiver Metabolit scheinen Mikroglia nicht direkt zu aktivieren (Gao et al., 2003a). Die MPTP-Toxizität ist signifikant geringer bei Knockout-Mäusen, die eine defiziente Produktion proinflammatorischer Moleküle wie Superoxid (Wu et al., 2003), Prostaglandinen (Feng et al., 2002; Teismann et al., 2003a, b) und TNF- α (Sriram et al., 2002) aufweisen. An dieser Stelle sei noch zu erwähnen, dass LPS über eine verstärkte Mikrogliaaktivität den MPTP induzierten Zelltod zusätzlich amplifizieren kann (Gao et al., 2003b). Diese Befunde sprechen dafür, dass aktivierte Mikrogliazellen eine Schlüsselrolle in der MPTP induzierten Neurotoxizität spielen.

Den experimentell eingesetzten Induktionsmolekülen für eine Mikrogliaaktivierung bei PS-Tiermodellen stehen α -Syn und NM als endogene Induktoren für eine Mikrogliose beim IPS gegenüber:

(i) Neuromelanin (NM): Die Analyse des neuronalen Zelltodes im Mesenzephalon von PS-Patienten zeigte, dass diese nicht uniform ist, jedoch in höherem Maße mit NM haltigen Neuronen vergesellschaftet ist (Gibb et al., 1992; Kastner et al., 1992). NM wurde in Gehirnen von Patienten, die an juvenilem (Ishikawa et al., 1998), idiopathischem und MPTP-induziertem PS (MPTP \Rightarrow 1.3.2.5) (Langston et al., 1999) erkrankt waren, nachgewiesen. Eine Autopsiestudie an Patienten mit MPTP-induziertem Parkinsonismus wies extraneuronales NM in direkter Nachbarschaft zu aktivierten Mikrogliazellen noch bis zu 12 Jahre nach Exposition mit dem Neurotoxin nach (Langston et al., 1999). Die Vermutung liegt nah, dass extraneuronales NM Mikrogliose, Chemotaxis und Aktivierung von Mikrogliazellen auslösen und so zur Freisetzung von neurotoxischen Mediatoren führen könnte. Exposition von Mikrogliazellkulturen mit humanem NM wirkt Chemotaxis induzierend und aktiviert den proinflammatorischen Transkriptionsfaktor NF- κ B *via* Phosphorylierung und Degradation des Inhibitor Protein κ B (I κ B) mit anschließender verstärkter Synthese von TNF- α und NO (Wilms et al., 2003). Diese Befunde demonstrieren eine wichtige Rolle des NM in der Pathogenese des PS. In einem *circulus vitiosus* könnte NM zur Aktivierung von Mikrogliazellen beitragen, diese führen zum entzündungsbedingten neuronalen Zelltod,

womit zusätzlich erneut NM freigesetzt werden würde und den Prozess chronifizieren ließe (Zecca et al., 2003, 2008).

(ii) α -Synuclein (α -Syn): Verschiedene Gendefekte sind bei familiären Formen des PS identifiziert worden. Der erste Gendefekt, der mit dem PS in Verbindung gebracht wurde, war PARK1, das für das synaptische Vesikelprotein α -Syn kodiert (George, 2002). Drei Missense-Mutationen (einfacher Basenpaarwechsel) in diesem Gen führen zum frühzeitig auftretenden autosomal-dominanten PS, das bei wenigen europäischen, nicht verwandten Familien auftrat (Kruger et al. 1998; Polymeropoulos et al. 1997). Patienten mit einer Mutation im α -Syn Gen zeigen das typische PS mit Ansprechbarkeit auf L-DOPA und LB, jedoch ist das Alter bei Ausbruch der Krankheit niedriger und die Progression beschleunigt. Die Rolle des α -Syn war lange unbekannt. Hinweise verdichten sich, dass dieses Protein eine Rolle in der Regulation der Membranstabilität/-turnover spielt (Clayton und George, 1998). Daten von α -Syn-Knockout Mäusen zeigten zudem eine Regulatorfunktion bei der dopaminergen Transmission (Abeliovich et al., 2000). Unter pathologischen Zuständen wird α -Syn als Antwort auf chronisch oxidativen Stress verstärkt exprimiert und könnte so mit einem neuroprotektiven Effekt assoziiert sein (Chandra et al., 2005; Quilty et al., 2006). α -Syn Aggregate sind ein Hauptbestandteil von senilen Plaques (Goedert, 2001) und LB (Goedert et al., 1998) und spielen eine zentrale Rolle bei einer Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen, den Synucleinopathien. Der Begriff Synucleinopathie fasst Erkrankungen wie das IPS, M. Alzheimer, LBD und die MSA zusammen. Diese Erkenntnisse warfen die Frage auf, ob und wie α -Syn den dopaminergen Zelltod in der SN verursachen könnte. Ungefaltete oder fehlgefaltete Proteine führen generell zu starkem Zellstress und Zelltod. Ein insuffizienter Proteinabbau über das Proteasom ist beispielsweise ein Merkmal der alternden Zelle. Proteine mit abnormaler Konformation sowie defekte oder oxidierte Proteine, die nicht abgebaut werden können, aggregieren zu Einschlusskörperchen, wie zum Beispiel zu den LB beim PS (Surguchov, 2008).

α -Syn aktiviert Mikroglia und führt zur Freisetzung mikroglialer extrazellulärer Superoxide (Zhang et al., 2005) sowie NO und TNF- α (Rosenstiel et al., 2009). Die Aktivierung der Mikroglia erfolgt wahrscheinlich über die Phagozytose des α -Syn (Zhang et al., 2005). Aktivierte Mikroglia, unmittelbar gelegen neben degenerierten Neuronen mit α -Syn positiven LB wurde *post mortem* im Kortex und der Amygdala von Patienten gefunden, die an einer LBD erkrankt waren (Iseki et al., 2000; Togo et al., 2001). Eine Freisetzung von α -Syn aus

degenerierenden Neuronen könnte über die Aktivierung von Mikrogliazellen den neuronalen Zelltod potenzieren (Block und Hong, 2005).

Eine zusammenfassende Darstellung der komplexen Interaktionen von dopaminergen Neuronen mit Mikrogliazellen sowie Astrozyten vor dem Hintergrund des neuronalen Zellverlustes beim IPS zeigt folgende Abbildung (⇒ Abb. 4).

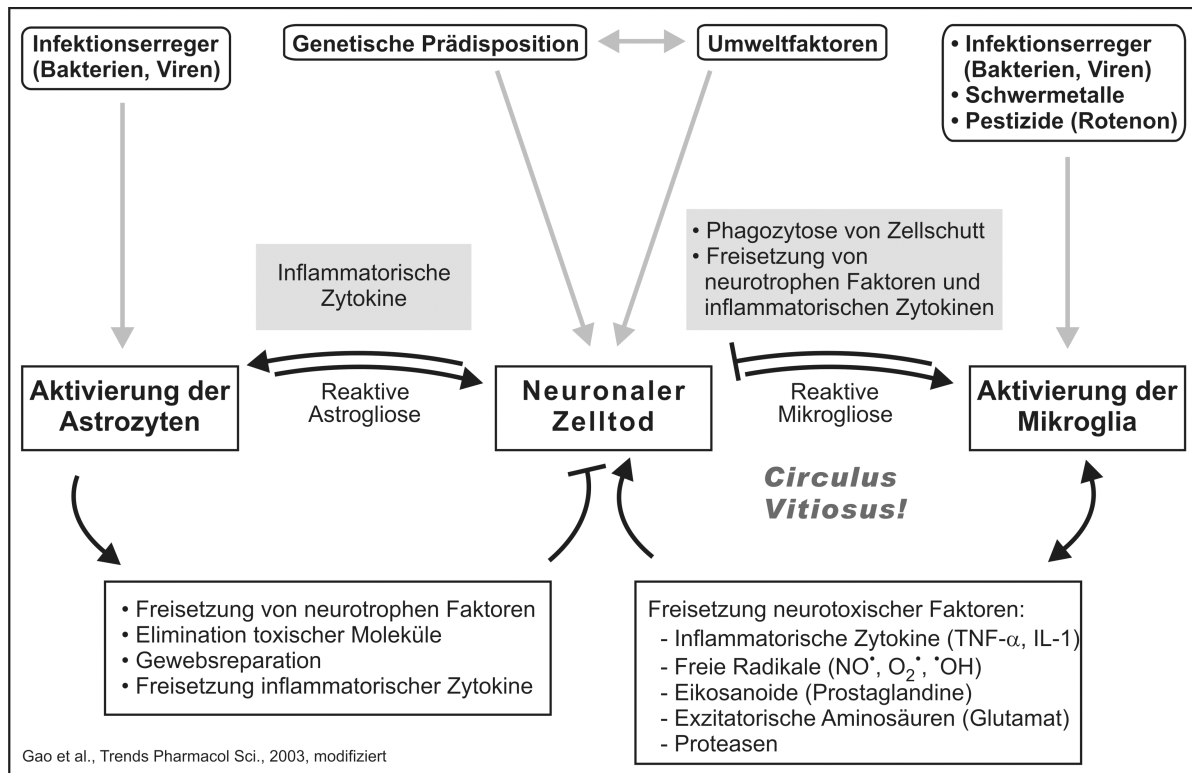


Abb. 4: Neuroinflammation ist beteiligt an der Degeneration dopaminergischer Neurone beim IPS. Infektionserreger (Bakterien, Viren) und Umweltgifte (Schwermetalle, Pestizide) können direkt die Mikroglia aktivieren. Aktivierte Mikrogliazellen setzen eine Reihe von neurotoxischen Faktoren frei und induzieren so den entzündungsbedingten neuronalen Zelltod. Eine genetische Prädisposition und Umweltfaktoren können direkt den neuronalen Zelltod herbeiführen. Absterbende Neurone induzieren eine Entzündungsreaktion (Neuroinflammation) mit reaktiver Astroglie und Mikroglie. Die Mikroglie führt zu weiterem neuronalen Zellverlust, die Astroglie kann ebenfalls zur Freisetzung von proinflammatorischen Faktoren führen. Die neuronale Schädigung und die Neuroinflammation verstärken sich gegenseitig und induzieren einen *circulus vitiosus*. Umgekehrt sind einige Aspekte der Entzündungsreaktion von Vorteil: Elimination von toxischen Molekülen, Freisetzung von neurotrophen Faktoren durch aktivierte Astrozyten,

Phagozytose von Zellschutt abgestorbener Neurone und Freisetzung von neurotrophen Faktoren durch aktivierte Mikroglia (PGE₂ = Prostaglandin E₂; ROS = reaktive Sauerstoffspezies) (Gao et al., 2003c).

1.4 Antiinflammatorische Strategien für das Parkinson-Syndrom

Das IPS ist die einzige neurodegenerative Krankheit, bei der eine pharmakologische Therapie zu einer drastischen Abnahme der Morbidität und Verzögerung der Mortalität führt. Diese Therapie ist jedoch rein symptomatisch und kann die Progression der Erkrankung nicht stoppen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Neuroinflammation ein wichtiger Faktor für den chronisch neurodegenerativen Prozess in experimentellen Modellen des PS ist (⇒ 1.3.2). Diese Studien demonstrierten, dass eine Inhibition des Entzündungsprozesses mit einer verminderten Degeneration der dopaminergen Neurone einhergeht (Gao et al., 2003c). Verschiedene Wirkstoffe wurden in experimentellen Modellen des PS auf ihr antiinflammatorisches Potential hin untersucht:

(i) Dexamethason ist ein stark antientzündliches Steroid, das in einer durch LPS induzierten intranigralen Entzündungsreaktion die Mikrogliaaktivität und die Produktion von proinflammatorischen Molekülen hemmte und so den entzündungsbedingten Untergang dopaminergener Neurone verminderte (Castano et al., 2002). Ein ähnlicher Effekt konnte im MPTP-Modell nachgewiesen werden. Kukowska-Jatrzzebka und Mitarbeiter zeigten 1999, dass Dexamethason über die Blockade von NF-κB die Produktion mikroglialer proinflammatorischer Zytokine und NO verminderte (Kukowska-Jatrzzebka et al. 1999). Ob Dexamethason auch einen direkten neuroprotektiven Effekt in diesem Modell hatte, ist umstritten.

(ii) Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) gerieten in den Blickmittelpunkt, weil eine Therapie mit Steroiden aufgrund der starken Nebenwirkungen eine Langzeiteinnahme verbietet. Der nichtselektive COX-Inhibitor Acetylsalicylsäure zeigte eine signifikante Verminderung des dopaminergen Zelltods *via* COX-1/2- und NF-κB-Inhibition in einem MPTP-Mausmodell (Aubin et al., 1998). Dieser Effekt ist unabhängig von der Prostaglandinproduktion, jedoch assoziiert mit der Inaktivierung von Hydroxylradikalen. Andere Inhibitoren der COX-1/2 wie Paracetamol, Diclofenac oder Ibuprofen hatten jedoch keinen neuroprotektiven Effekt in diesem Modell (Aubin et al., 1998). Auch selektive COX-2-Inhibitoren bewiesen einen neuroprotektiven Effekt im MPTP-Modell, wobei dieser Effekt nicht der reduzierten Mikrogliaaktivität, sondern einer verminderten COX-induzierten DA-

Oxidation zugeschrieben wurde (Teismann et al., 2003). Eine große Kohortenstudie zeigte, dass Patienten, die zum kardiovaskulären Schutz regelmäßig NSAR einnahmen im Vergleich zur Vergleichsgruppe, die diese nicht regelmäßig einnahmen, ein bis zu 45% vermindertes Risiko hatten, an einem IPS zu erkranken (Chen et al., 2003). Der neuroprotektive Effekt von COX-2-Inhibitoren beim IPS konnte jedoch in klinischen Studien nicht reproduziert werden. Folgestudien zeigten, dass der neuroprotektive Effekt der NSAR bei der Alzheimer-Krankheit nicht das Resultat einer COX-2-Inhibition ist, da hohe Dosierungen einiger NSAR die Produktion von β -Amyloid ($A\beta$ 1-42) unabhängig von der COX-2-Inhibition reduzierten (Weggen et al., 2001). Die Befunde zeigen, dass die Rolle der COX und ihrer Produkte an der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen zukünftig noch weiter geklärt werden muss.

(iii) PPAR- γ (*peroxisome proliferator activated receptor- γ*) Agonisten: PPAR- γ ist ein Mitglied der Nuklear Rezeptor Familie und inhibiert proinflammatorische Eigenschaften in Monozyten (Jiang et al., 1998) und Mikrogliazellen *in vitro* (Combs et al., 2000) und *in vivo* (Heneka et al., 2000). Pioglitazon, ein als Insulinsensitizer eingesetztes Antidiabetikum mit spezifischer Bindung am PPAR- γ verminderte die MPTP induzierte Mikrogliaaktivierung und verhinderte somit den dopaminergen Zelltod in der SN (Breidert et al., 2002).

(iii) Minozyklin ist ein semisynthetisches Antibiotikum zweiter Generation aus der Gruppe der Tetracycline und ein potenter Inhibitor der Mikrogliaaktivierung. Der antientzündliche Wirkungsmechanismus von Minozyklin ist komplett unabhängig von seiner antimikrobiellen Wirkung. Die Blockade der Mikrogliaaktivität konnte sowohl im MPTP- als auch im 6-OHDA-Maus Modell des PS nachgewiesen werden (Du et al., 2001; He et al., 2001). Minozyklin reduzierte die Produktion von IL-1 β , inhibierte die iNOS und die NADPH-Oxidase im Tiermodell (Wu et al., 2002) und hemmte somit drei wichtige, Mikroglia-assoziierte neurotoxische Effektormoleküle. Obwohl der komplette Wirkmechanismus von Minozyklin noch nicht identifiziert werden konnte, wird dieser Wirkstoff aktuell in klinischen Studien beim IPS und Morbus Huntington getestet.

Die komplexen Wechselwirkungen zwischen neuronalen Zelltod und Aktivierung der Mikroglia sowie mögliche therapeutische Ansatzpunkte beim IPS sind zusammenfassend im folgenden Schaubild (\Rightarrow Abb. 5) dargestellt.

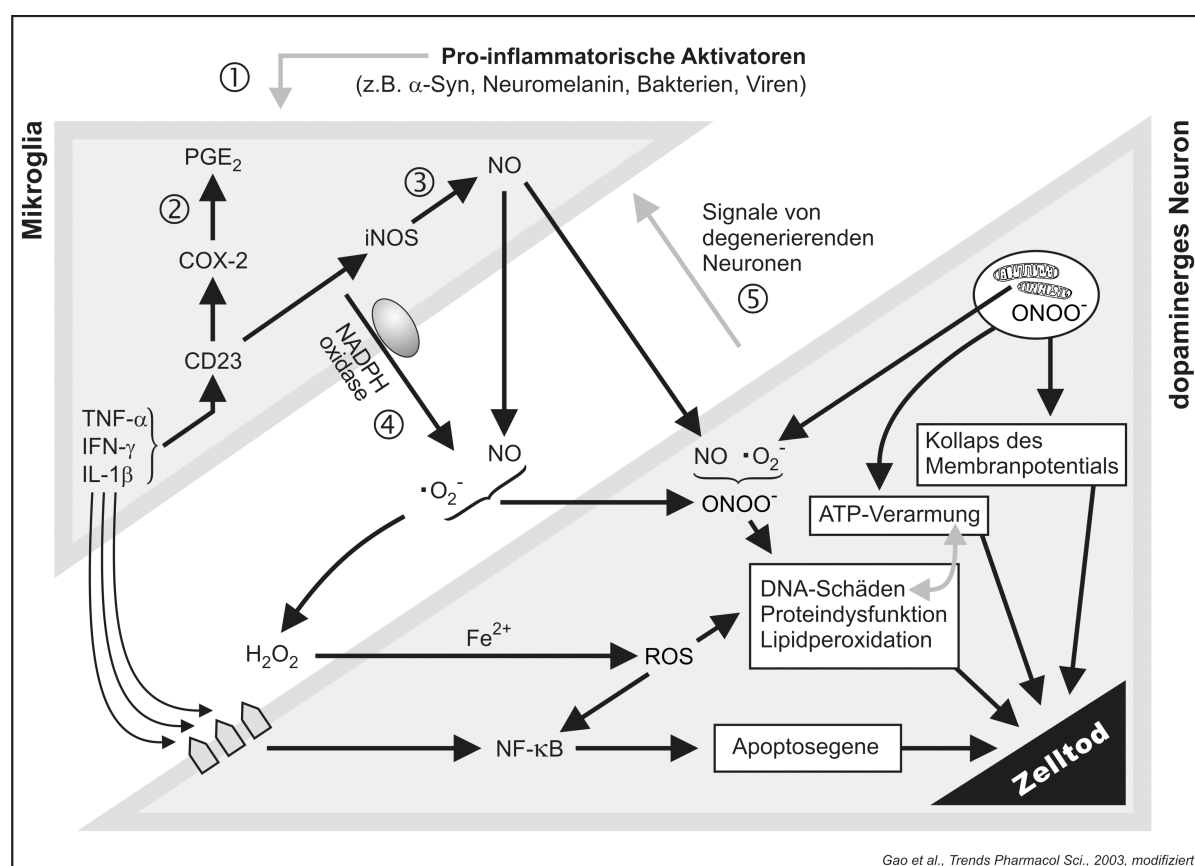


Abb. 5: Potenzielle neuroprotektive Strategien gegen entzündungsbedingte Degeneration dopaminerger Neurone beim IPS. Der Fokus ist auf folgende Angriffspunkte gerichtet: (1) Inhibition der durch proinflammatorische Faktoren induzierten Mikrogliaaktivierung; (2) Blockade der COX-2; (3) Blockade der iNOS; (4) Blockade der NADPH-Oxidase; (5) direkte Beeinflussung der neuronalen Degeneration durch Substitution von neurotrophen Faktoren und Zelltransplantation, um den *circulus vitiosus* aus direkter Nervenzelldegeneration, reaktiver Entzündung und entzündungsbedingtem Nervenzelltod zu unterbrechen. Diese Strategien könnten die Progression des IPS verzögern oder gar stoppen (Gao et al., 2003c, modifiziert).

Bei den Überlegungen für weitere pharmakologisch aktive Substanzen, die für das IPS als neuroprotektive Strategien in Frage kommen, fokussierten wir uns auf die Benzodiazepine.

1.4.1 Der Periphere Benzodiazepinrezeptor

Benzodiazepine (BZ) sind als Tranquilizer, Muskelrelaxantien, Anxiolytika, Antikonvulsiva und Hypnotika im medizinischen Gebrauch weit verbreitet. Diese Effekte werden hauptsächlich über den zentralen Benzodiazepinrezeptor (CBR) im ZNS vermittelt (Braestrup

and Squires, 1977; Tallmann et al., 1980). Der CBR ist Teil eines Rezeptorkomplexes, der einen GABA-Rezeptor und einen Chloridkanal umfasst (DeLorey und Olsen, 1992). Nach Bindung eines BZ am CBR wird der inhibitorische Effekt der GABA verstärkt (DeLorey und Olsen, 1992). Rezeptoren für BZ kommen unabhängig vom ZNS in verschiedenen Organen, wie z.B. den Nieren (Pedigo et al., 1985) und den endokrinen Drüsen (De Souza et al., 1985) vor und wurden als periphere Benzodiazepinrezeptoren (PBR) dem CBR gegenübergestellt. Der PBR unterscheidet sich vom CBR in seiner abweichenden Spezifität zu bestimmten Liganden. Während das BZ Clonazepam mit hoher Affinität an den CBR bindet, bindet das BZ Ro5-4864 (4'-chlorodiazepam) sowie das Nicht-BZ PK11195 (ein Isoquinolon Carboxamid Derivat) nur schwach an den CBR. Im umgekehrten Fall gilt dies für die Bindung an den PBR (Benavides et al., 1983). Der PB-Rezeptor besteht aus mindestens drei Untereinheiten: einer Bindungsstelle für Isoquinolone (z.B. PK11195), einem spannungsgesteuerten Anionenkanal und einem Adenin Nukleotidtransporter. Alle diese drei Untereinheiten binden BZ (McEnery et al., 1992). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass der PBR mitochondrial in Zellen des ZNS, den Nebennieren, Hoden, Lunge, Skelettmuskulatur und Leber lokalisiert ist (Antkiewicz-Michaluk et al., 1988). Andere Arbeiten berichteten, dass der PBR ebenfalls von Erythrozyten expremiert wird, die jedoch keine Mitochondrien besitzen (Olson et al., 1988). Als endogener (körpereigener) Ligand für den PBR wurde das Neuropeptid DBI (*diazepam binding inhibitor*) isoliert, das die Bindung von Diazepam an den PBR blockierte (Corda et al., 1984). Nach enzymatischer Spaltung von DBI entstand das Oktadekaneuropeptid (ODN), das mit [³H]Diazepam um die Rezeptorstelle konkurrierte und die Wirkung der BZ im Rattenmodell antagonisierte (Alho et al., 1985). Die meist geäußerte Vermutung zur Funktion des PBR ist die Regulation der Steroidsynthese (Papadopoulus et al., 1990) und die Regulation von Zellwachstum und Zelldifferenzierung (Wang et al., 1984). Unter physiologischen Bedingungen zeigt das ZNS nur eine schwache Bindung des PBR Liganden PK11195, wohingegen nach einem neuronalen Schaden die Expression von PBR stark ansteigt. Eine verstärkte Bindung von radioaktiv markiertem [³H][R]-PK11195 am PBR gilt somit als Marker für eine Schädigung des ZNS. Die zelluläre Quelle der verstärkten [³H][R]-PK11195 Bindung wurde lange kontrovers diskutiert. Mikroaudiographie und PET Studien bewiesen, dass aktivierte, jedoch nicht ruhende Mikroglia Quelle der verstärkten Bindung von [³H][R]-PK11195 *in vitro*, *in vivo* sowie bei Patienten, die an M. Alzheimer (Cagnin et al., 2001), PSP (Gerhard et al., 2006) oder an MS leiden (Vorwinckel et al., 1997; Banati et al., 2000) ist. Die Stärke des [³H][R]-PK11195

Signals korreliert hier unmittelbar mit der Krankheitsaktivität, erlaubt jedoch keine Aussagen über eine mögliche antiinflammatorische Wirkung von PBR-Liganden. Weiterhin ist unklar, ob eine verstärkte Expression von PBR mit erhöhter Bindung des Radioliganden positiv oder negativ für den Krankheitsverlauf ist.

1.4.2 Der Selektive MAP-Kinase Inhibitor Semapimod

Auch intrazelluläre Signalwege kommen als therapeutische Ziele in Betracht. Semapimod, auch bekannt unter der Bezeichnung CNI-1493, ist ein TNF- α -Synthesehemmer. Semapimod blockiert die Phosphorylierung der p38-Mitogen aktivierten Proteinkinase Kinase (MAPK) (Bianchi et al., 1995; Björk et al., 1997) und hemmt so die Translation der TNF- α -mRNA (Cohen et al., 1996). Ein weiterer Effekt von Semapimod ist die Syntheseblockade anderer Zytokine und Chemokine, wie IL-1 β , MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein-1 α*) und MIP-1 β (Bianchi et al., 1996). Semapimod unterdrückt die Produktion von TNF- α und IL-1 β auch in Gegenwart von IFN- γ (Bianchi et al., 1996), was im Kontrast zur Makrophagen hemmenden Aktion der Kortikosteroide steht. Kortikoide haben nur einen antiinflammatorischen Effekt bei Abwesenheit von IFN- γ (Luedke et al., 1990). Die Behandlung mit Semapimod in einem Rattenmodell einer polymikrobiellen Sepsis mit ZNS-Affektion reduzierte signifikant die Serumspiegel von TNF- α und erhöhte die Überlebensrate der Tiere (Villa et al., 1996). Semapimod ist *in vivo* relativ gut verträglich und zeigte in einer kleinen unkontrollierten klinischen Studie bei Patienten mit schwerem Morbus Crohn, einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung, eine signifikante Reduktion der Entzündungssymptomatik (Hommes et al., 2002; Lowenberg et al., 2005). Der Wirkstoff wurde zudem erfolgreich in Tiermodellen der rheumatoiden Arthritis (Larsson et al., 2005) und der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einem Tiermodell analog zur MS beim Menschen (Martiney et al., 1998), eingesetzt.

1.5 Fragestellungen

Ausgehend von den in der Einleitung geschilderten Überlegungen zur Neuropathologie des IPS sollten *in vitro*- (Mikroglia-Zellkultur) und *in vivo*-Experimente (Läsionsmodell der Substantia nigra) durchgeführt werden, um Aufschluss über folgende Fragen zu erhalten:

I. *In vitro*-Experimente:

- **Können Benzodiazepine die Aktivierung von Mikrogliazellen modulieren?**
- **Kommt α -Synuclein als Mikroglia-aktivierender, endogener Auslöser einer Neuroinflammation beim IPS in Betracht?**
- **Welche mikroglialen Funktionen werden durch α -Syn Protofibrillen auf zellbiologischer Ebene beeinflusst?**

II. *In vivo*-Experimente:

- **Führt die stereotaktische intrazerebrale supranigrale Injektion von α -Syn PF zu einer Aktivierung der Mikroglia mit konsekutiver Entzündungsreaktion?**
- **Führt der durch die intrazerebrale Injektion von α -Syn PF entstandene neuroinflammatorische Prozess zu einem Verlust von dopaminergen Neuronen?**
- **Kann der Verlust der dopaminergen Neurone durch eine antiinflammatorische Therapie mittels des MAP-Kinase Inhibitors Semapimod reduziert werden?**

2 Material

2.1 Reagenzien und Materialien

Alle verwendeten Chemikalien genügten mindestens dem analytischen Reinheitsgrad.

Aceton	Merck, Darmstadt
Coomassie Blau	Biorad, Hercules, USA
DMSO	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Roth, Darmstadt
Griess Reagenz	Sigma, Deisenhofen
[³ H]Thymidin	Sigma, Deisenhofen
LPS (E.coli)	Sigma, Deisenhofen
Natriumnitrit (NaNO ₂)	Merck, Darmstadt
Natriumpentobarbital	Sigma, Deisenhofen
TNF- α -Elisa-Kit, Ratte	Bender, Wien, Österreich
Trichloressigsäure	Sigma, Deisenhofen
α -Synuclein	wurde freundlicherweise von Prof. Dr. P. Kahle, Universität Tübingen überlassen.

2.2 Antikörper

(1) Primäre Antikörper:

Anti-GFAP	Dakopatts, Hamburg
Anti-Iba1	Wako Chemicals, Neuss
Anti-OX42	Seralab, Asbach
Anti-PBR	Santa Cruz, USA
Anti-Tyrosinhydroxylase	Chemicon, Hampshire, UK

(2) Sekundäre Antikörper:

Ziege anti-Kaninchen IgG	Vector, Burlingame, USA
--------------------------	-------------------------

Die sekundären Antikörper waren gekoppelt an alkalische Phosphatase (Dako, Hamburg und Dianova, Hamburg).

2.3 Wirkstoffe

Clonazepam	Sigma, Deisenhofen
Diazepam	Sigma, Deisenhofen
Midazolam	Sigma, Deisenhofen
Flumazenil	Sigma, Deisenhofen
Octadecaneuropeptid (ODN)	Sigma, Deisenhofen
PK11195	Sigma, Deisenhofen
Ro5-4864 (4'-chlorodiazepam)	Sigma, Deisenhofen
SB203580	Sigma, Deisenhofen
Semapimod (CNI-1493)	wurde freundlicherweise von Dr. Vidal F. de la Cruz, Cytokine Pharmasciences, King of Prussia, USA überlassen.
UO126	Calbiochem, Nottingham, UK

2.4 Zellkulturmaterialien

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Karlsruhe
Fibrinogen	Sigma, Deisenhofen
HEPES	Invitrogen, Karlsruhe
Hydroluma-Szintillationsflüssigkeit	Wallac, Turku, Finnland
Kollagenase	Sigma, Deisenhofen
Kulturschalen, 100 mm Durchmesser	Sarstedt, Nürnberg
6 well-Kulturschalen	Costar, Bodenheim
24 well-Kulturschalen	Costar, Bodenheim
96 well-Kulturschalen	Costar, Bodenheim
Laminin	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	Sigma, Deisenhofen
Leibowitz (L)-15 Medium	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Sigma, Deisenhofen
Thrombin (Topostasin™)	Hoffm. La Roche, Schweiz

Trypsin

Sigma, Deisenhofen

2.5 Lösungen, Puffer, Zellkulturmedien

PBS (pH 7,4)	KCl	0,5g
	KH ₂ PO ₄	0,5g
	Na ₂ HPO ₄	5,4g
	NaCl	20g
	H ₂ O	ad 2500ml
4% Paraformaldehyd (pH 7,3-7,4)	Paraformaldehyd	40g
	Natriumhydroxid	4 Tbl.
	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 0,2M	320ml
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 0,2M	180ml
	H ₂ O	ad 1000ml
Griess-Reagenz	0,5% Sulfanilamid	
	0,05% Naphtylethylenamin-Dichlorid	
	0,25% Phosphorsäure	
Zellablöselösung	EDTA	0,030g
	Trypsin	0,003g
	PBS (Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -frei)	25ml
Dissoziationslösung	HEPES	0,024g
	Trypsin	0,020g
	EDTA	0,002g
	DNase (1mg/ml)	35µl
	DMEM	10ml
Einfriermedium	DMSO	10ml
	Standard-Kulturmedium	90ml
Kulturmedium Mikroglia	DMEM (4,5g Glucose/l)	86ml

FKS (bei 44-53°C inaktiviert)	10ml
L-Glutamin (200mM)	3ml
Penicillin	10 000U/ml
Streptomycin	10mg

Astrozyten-konditioniertes Medium (AKM):

Das Kulturmedium von Astrozyten-Primärkulturen wird während des Passagierens filtriert (0,2µm Porengröße), um Zellen und Zelldebris zu entfernen. Bis zum Gebrauch kann das AKM bei -20°C konserviert werden. Mikrogliazellen nehmen nach drei Tagen Kulturdauer eine ramifizierte Zellmorphologie ein, die der ruhenden (inaktivierten) Zellform *in vivo* entspricht.

2.6 Zellkultur

Mikroglia: Für die Herstellung einer primären Mikroglia-Zellkultur wurden Ratten vom Stamm Wistar herangezogen. Verwendet wurden Tiere vom postnatalen Tag zwei oder drei (P2-P3), wobei der Tag der Geburt als postnataler Tag null (P0) gilt.

2.7 Oligonukleotide

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Oligonukleotide von der Firma Biometra, Göttingen synthetisiert.

2.7.1 Primer für RT-PCR

PB-Rezeptor <i>upstream</i> Primer	5'-CCT CGC CGA CCA GAG TTA TCA C-3'
PB-Rezeptor <i>downstream</i> Primer	5'-GGC TCC TAC ATA ATC TGG AAA GAG-3'

2.8 Gebrauchsfertige Kits

"RNeasy MiniKit"	Quiagen, Hilden
------------------	-----------------

2.9 Western-Blot

Elektrodenpuffer (Laufpuffer)	57,6g Glycin 4g SDS (Sodiumdodecylsulfat) auf 4l <i>aqua dest.</i> (pH 8,2)
Gelpuffer I:	1,5M Tris HCl 0,4% SDS (pH 8,8)
Gelpuffer II:	0,5M Tris HCl 0,4% SDS (pH 6,8)
Probenpuffer:	0,23g SDS 1,25ml Gelpuffer II 1ml Glycerin 0,5ml 2-Mercapto-Ethanol 7,25ml <i>aqua dest.</i>
Lauffrontanzeiger:	Bromphenolblau, gesättigte Lösung
Transferpuffer:	25mM Tris 192mM Glycin 10% Methanol (pH 9,0)
BST (Tris-buffered Saline Tween):	50mM Tris 150mM NaCl 1mM EDTA 0,1% Tween (pH 7,5)

2.10 Versuchstiere

Für alle *in vivo* Versuche wurden männliche Ratten des Stammes Wistar mit einem Gewicht zwischen 300-330g verwendet. Alle verwendeten Tiere wurden unter einem 12 Stunden hell/dunkel Zyklus mit freiem Zugang zu Futter und Wasser im Tierhaus der Christian-Albrechts-Universität Kiel gehalten. Die Experimente erfolgten gemäß der Richtlinien der Direktive der Europäischen Union 86/609/EEC. Ein genehmigter Tierversuchsantrag lag vor. Gewebe von α -Syn PF und grün-fluoreszierendes Protein (GFP) überexprimierenden Tieren wurde freundlicherweise von Dr. Deniz Kirik (Wallenberg Neuroscience Center, Universität Lund, Schweden) überlassen.

3 Methoden

3.1 Kultivierung von Mikrogliazellen der Ratte

3.1.1 Präparation und Kulturbedingungen

Das Gehirn neugeborener Ratten (P2-P3) wird nach der Tötung entnommen, in sterilem PBS gespült und unter der sterilen Werkbank präpariert. Die beiden Großhirnhemisphären werden von ihren Meningen befreit, in kleine Stücke zerschnitten und enzymatisch dissoziiert (2x 15min bei 37°C, Dissoziationslösung \Rightarrow 2.5). Nach erfolgter mechanischer Dissoziation durch eine feuerpolierte Pasteurpipette wird die Zellsuspension durch einen Nylonfilter (20 μ m Maschenweite) getrieben. Mittels Trypanblau-Ausschluss erfolgt darauf die Bestimmung der Lebendzellzahl. Je 5×10^6 Zellen werden in Kulturflaschen (25cm² Grundfläche) ausgesät, mit 8ml Kulturmedium (Kulturmedium \Rightarrow 2.5) befüllt und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Das Kulturmedium wird nach 24 Stunden gewechselt, danach folgt ein zweimaliger Wechsel pro Woche. Etwa nach dem zehnten Kulturtag (ca. 20 Tage lang) proliferiert in den angelegten Kulturen die Mikroglia und kann als frei schwimmender Zellrasen mit dem Kulturmedium abgesaugt werden. Die so abgesaugte Zellsuspension wird bei 500x g fünf Minuten lang zentrifugiert. Anschließend kann das Zellpellet in 1ml AKM (AKM \Rightarrow 2.5) aufgelöst und in der gewünschten Dichte in 35mm-Kulturschalen ausgesät werden. Die Mikroglia wird weiterhin in AKM kultiviert.

Um die Homogenität der primären Mikrogliakultur zu bestimmen, wird die Kultur mit einem polyklonalen Anti-GFAP Antikörper (1:200) gefärbt, um so eine Durchmischung mit Astrozyten auszuschließen. Die immunzytochemische Darstellung der Mikroglia erfolgt mit dem Anti-OX42 Antikörper (1:200; Robinson et al., 1986) (Antikörper \Rightarrow 2.2).

3.1.2 Immunzytochemie

Für den immunzytochemischen Nachweis des PBR an Mikroglia werden 5×10^4 Zellen auf Glaträgern kultiviert und nach 24 Stunden mit eiskaltem Aceton (fünf Minuten) fixiert, eine Stunde mit dem Erstantikörper (polyklonaler Anti-PBR Antikörper, 1:200) und danach mit dem Zweitantikörper (Ziege anti-Kaninchen IgG, 1:300) ebenfalls eine Stunde lang inkubiert. Die Färbung des Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers erfolgt mit der ABC-Technik gemäß den Herstellerangaben (Vector) (Antikörper \Rightarrow 2.2).

3.1.3 Stimulations- und Inhibitionsversuche

Um Mikrogliazellen in einen Zustand erhöhter Aktivität zu versetzen, werden LPS (200ng/ml in PBS), das Endotoxin gramnegativer Bakterien, dem Medium der Experimental- und Kontrollgruppen hinzugefügt. LPS sind ein akzeptierter Induktor der Mikrogliaaktivierung. Nichtaktivierte Kontrollgruppen erhalten das äquivalente Volumen an PBS. Die Experimentalgruppen werden zusätzlich mit Wirkstoffen behandelt, die (i) CBR, (ii) am CBR und PBR oder (iii) nur am PBR spezifisch wirken. Die CBR-Agonisten Midazolam und Clonazepam wurden in Konzentrationen von 1-100 μ M und der CBR-Antagonist Flumazenil in Konzentrationen von 5-20 μ M verwendet. Diazepam (1-100 μ M) und der selektive PBR-Ligand 1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquino-linecarboxamide (PK11195, 50-100 μ M) dienten als Agonisten für den PBR. Um den Effekt von endogenen Benzodiazepinen (Endozepine) auf Mikrogliafunktionen zu untersuchen, wurde der Ligand ODN in Konzentrationen von 1nM-100 μ M verwendet. ODN ist ein Spaltprodukt des endogenen DBI.

Analog zu den mit LPS behandelten Gruppen wurden Mikrogliazellen mit α -Syn PF (10ng/ml) aktiviert und je nach Gruppeneinteilung mit den Wirkstoffen SB203580 (1 μ M) und UO126 (10 μ M) behandelt. Nach 24 Stunden Stimulation/ Inhibition wurden die Konzentrationen der beiden proinflammatorischen Faktoren NO und TNF- α im Kulturmedium bestimmt. Für jeden Wirkstoff wurde die Konzentration mit den stärksten modulatorischen Effekten bestimmt. Alle Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂-Begasung im Brutschrank kultiviert.

3.1.4 ELISA

Die Produktion und Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins TNF- α wird als Parameter für die Aktivierung von Mikrogliazellen angesehen und dient in dieser Versuchsreihe beispielhaft als Faktor, der eine Aktivierung oder Inaktivierung der Mikroglia anzeigt. Das verwendete TNF- α -ELISA Kit (\Rightarrow 2.1) beruht auf dem Prinzip der Sandwich-Enzym-Immunoassay-Technik: Eine Mikrotiterplatte ist mit dem gegen das TNF- α gerichteten Antikörper beschichtet. Ist in einer Probe TNF- α enthalten, so bindet dieses an die Antikörper. In einem weiteren Schritt bindet der enzymgekoppelte Zweitantikörper an ein anderes Epitop des gebundenen TNF- α . Nach Zugabe eines Enzymsubstrates entsteht ein farbiges Reaktionsprodukt. Die Intensität der Färbung ist in einem bestimmten Messbereich

proportional zur Konzentration des TNF- α in der Probe und wird photometrisch bestimmt. Parallel inkubierte TNF- α -Standards erlauben die Bestimmung der TNF- α -Konzentration der Probe. Die Durchführung des ELISA erfolgt nach den Vorgaben des Herstellers an Zellkulturüberständen, die nach 24 Stunden Inkubation von 2×10^5 Mikrogliazellen in 96-Well-Kulturschalen mit LPS (200ng/ml) in Präsenz oder Nichtpräsenz verschiedener PBR-Liganden gewonnen werden. Die Extinktion der Färbelösung wird bei 450nm (Referenzwellenlänge 550nm) mit einem Mikrotiterplatten-Photometer (SLT Reader 340 ATTC) abgelesen.

3.1.5 Indirekte Stickstoffmonoxid - Messung

NO ist ein proinflammatorisches Molekül, das von aktivierter Mikroglia freigesetzt wird und ebenso wie TNF- α als Parameter zur Untersuchung des Aktivierungszustandes dient. Das Prinzip des Nachweises beruht darauf, dass NO_2^- mit Sulfanilamid (1. Komponente des Griess-Reagenz) zu einem Komplex reagiert, der anschließend mit Naphtylethylendiamin (2. Komponente) zu einem violett gefärbten Reaktionsprodukt umgewandelt wird (\Rightarrow 2.5). Ungefähr 2×10^5 Mikroglia pro Well werden in 96-Well-Kulturschalen mit LPS (200ng/ml) in Kombination mit verschiedenen PBR-Liganden inkubiert. Die alleinige Inkubation mit LPS (200ng/ml) dient als Kontrolle.

Im zweiten Satz von Experimenten werden die Wirkstoffe SB203580 (1 μ M) und UO126 (10 μ M) zu den mit α -Syn PF (10ng/ml) aktivierten Mikrogliazellen hinzugefügt.

Nach 24 Stunden wird 100 μ l des Kulturüberstandes von jedem Well mit dem gleichem Volumen Griess-Reagenz gemischt und für fünf Minuten inkubiert. Der Farbumschlag wird bei 540nm (Referenzwellenlänge 620nm) im Mikrotiterplatten-Photometer (SLT Reader 340 ATTC) gemessen. Natriumnitrit (NaNO_2) wurde genutzt um eine Standardkurve zur Quantifizierung zu generieren.

3.1.6 RT-PCR

RNA-Isolierung: Vor Durchführung der RT-PCR muss die RNA aus den Mikrogliazellen isoliert werden: Die Isolierung der zellulären Gesamt-RNA erfolgt durch die Trizolmethode, die auf einem von Chomczynski und Sacchi im Jahre 1987 eingeführten Protokoll basiert (Chomczynski und Sacchi, 1987). Verwendet wird das „RNeasy MiniKit“ (\Rightarrow 2.8) der Firma Qiagen. 500 000 Mikrogliazellen aus einer Primärkultur werden in zwei 9,6cm² großen Kulturschalen für 24 Stunden mit/ ohne LPS kultiviert. Die Zellen werden entsprechend ihrer

Anzahl und gemäß den Herstellerangaben in der entsprechenden Menge des Lysepuffers lysiert. Das Lysat wird durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipettenspitze homogenisiert und mit dem gleichen Volumen an 70%igem Ethanol versetzt, um die Bindungseigenschaften der RNA zu erhöhen. Das Gemisch wird mit einer Silikagelmembran in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben, anschließend bei 8000x g (10 000rpm) zentrifugiert und danach mit dem Enzym DNase I bei 21°C für 15 Minuten inkubiert. In den folgenden Schritten wird die RNA mit verschiedenen Pufferflüssigkeiten gewaschen, indem der Puffer auf die RNA bindende Membran pipettiert wird, um anschließend abzentrifugiert zu werden. Die RNA wird zum Abschluss mit 50µl RNase freiem Wasser eluiert. Bei -70°C kann die RNA für mehrere Wochen gelagert werden.

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren: Die Konzentration der gewonnenen Nukleinsäuren wird photometrisch bestimmt. Die optische Dichte wurde bei 260nm in einem UV-Photometer gemessen und anschließend anhand einer Standardkurve kalkuliert.

Reverse Transkription: Zur Synthese komplementärer DNA (cDNA) werden 5µg Gesamt-RNA unter einem Vakuum bis zur Trocknung eingedampft und mit 1µl oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primern und 11µl DEPC-behandeltem Wasser versetzt. Die Proben werden für 10min bei 70°C und anschließend für 2min auf Eis inkubiert. Zu jeder Probe werden 7µl einer aus 1x Puffer (500mM KCl, 200mM Tris-HCl, pH 8,4), MgCl₂-Lösung (25mM), dNTP (10mM), und DTT (0,1M) bestehenden Mischung hinzugegeben und diese für 5min bei 42°C vortemperiert. Nach Zugabe von 1µl SuperScript II RTTM (200 Einheiten) werden die Proben bei 42°C für 50min inkubiert. Die Reaktion wird durch Erhitzen (70°C für 15min) beendet, die Proben für 2min auf Eis gelagert. Anschließend werden RNA-Rückstände durch RNase Behandlung (1µl für 20min bei 37°C) beseitigt. Bis zur weiteren Verwendung erfolgt die Lagerung bei -20°C.

Polymerasekettenreaktion (PCR): Diese von K. Mullis eingeführte Methode stellt eine effektive Methode zur Synthese definierter DNA-Sequenzen dar. Mit ihrer Hilfe gelingt es, RNA, die zuvor revers transkribiert wurde, zu detektieren, auch wenn die gesuchte Sequenz in nur sehr geringer Kopieanzahl vorliegt. Unter der katalytischen Wirkung der hitzestabilen Taq (*thermophilus aquaticus*)-DNA-Polymerase und unter Verwendung zweier spezifischer Oligonukleotide (Primer), die an den beiden komplementären DNA-Strängen hybridisieren, werden mehrere PCR-Zyklen durchlaufen. Am Anfang eines jeden Zyklus wird die als Matritze dienende doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf 95°C vollständig in die beiden Einzelstränge aufgespalten („Denaturation“), die anschließende Bindung der spezifischen Oligonukleotide erfolgt in einem Temperaturbereich zwischen 45-60°C („Annealing“). Den

letzten Schritt bildet die Synthese des jeweils komplementären Stranges durch die Taq-Polymerase bei ihrem Temperaturoptimum von 72°C. Nach Durchlaufen der Zyklen, wobei die Anzahl u.a. von der Stärke der Expression und den gewählten Reaktionsbedingungen abhängt, erfolgt eine abschließende Temperierung auf 72°C für 5 bis 10min, um noch unvollständige DNA-Stränge zu komplettieren. Die Amplifikation der β -Aktin cDNA dient als Kontrolle.

Durchführung: Es wurden für die analytische RT-PCR gleiche Mengen (0,5-2 μ g) RNA eingesetzt und die erhaltene cDNA bei -20 °C gelagert.

dNTP-Mix:	je 10mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP
PCR-Ansatz:	cDNA (aus RT-Ansatz) 2 μ l
	MgCl ₂ 1,5mM
	dNTPs je 0,2mM
	5'-Primer 0,5 μ M
	3'-Primer 0,5 μ M
	Taq-DNA-Polymerase 1,0U
	H ₂ O ad 20 μ l

Als Annealingparameter für die PB-Rezeptor cDNA Detektion werden gewählt:

95°C 2min

95°C 1min, 54°C 30sec, 72°C 30sec für 25 Zyklen

72°C 10min

Anschließend wurden die Proben auf 4°C gekühlt und bei -20°C gelagert.

DNA-Gelelektrophorese: Gelelektrophoresen zur Auftrennung von DNA wurden nach Sambrook und Mitarbeitern (1989) durchgeführt. Zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNA wurden 0,8 - 1,5%ige Agarosegele mit Ethidiumbromid (5 μ g/ml) verwendet. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen Proben-Puffer versetzt, aufgetragen und bei 70-120V elektrophoretisch aufgetrennt.

Verwendete Puffer:

Elektrophorese-Laufpuffer (1x TBE)	Tris-Borat	90mM
	EDTA (pH 8,0)	1mM
Proben-Puffer (10x)	Glycerol	50%
	Bromphenol-Blau	0,025%
	Xylencyanol	0,025%

3.1.7 Western-Blot

Die Western Blot Analyse wird angewendet, um Proteingemische aufzutrennen. Hierbei werden Proteine durch das Elektrophoreseverfahren SDS-PAGE (Natrium-Dodecyl-Sulfat-Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese), auf einem Trärgel nach Anlegen eines elektrischen Feldes, ihrer Wanderungsgeschwindigkeit gemäß aufgetrennt. Vor der Elektrophorese wird das Proteingemisch mit der negativ geladenen Detergens SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat) behandelt. SDS „maskiert“ die Eigenladung der Proteine, so dass die Proteine ausschließlich aufgrund ihres Molekulargewichtes getrennt werden können. Das Ergebnis der Elektrophorese sind im Gel sichtbare Banden (Ansammlungen gleich gewanderter und damit identischer Moleküle). Nach der Gelelektrophorese erfolgt das „Blotting“, mit der man das Bandenbild durch einen Abklatsch des Gels auf eine Membran überträgt. Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden auf PVDF-Membranen übertragen. In der nachfolgenden Immundetektion wird die Membran zunächst mit dem primären Antikörper gegen das untersuchte Protein (PBR), dann mit dem sekundären, Peroxidase gekoppelten Antikörper und anschließend mit einem Chemilumineszenz-Substrat inkubiert.

Proteintransfer: Für den Transfer wird das *semidry*-Verfahren unter Nutzung einer Graphitkammer (Biorad) angewendet. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wird das Sammelgel entfernt, das Trennungsgel für 10-15 Minuten im Puffer geschwenkt. Eine PVDF-Membran in der Größe des Trenngels wird mit Methanol befeuchtet, mit *aqua dest.* gewaschen und im Puffer für 10-15 Minuten inkubiert. Für die Schichtung des Blots wird zuerst ein Stück Whatman-Papier in Anodenpuffer 2 getaucht und auf die Anodenplatte aufgebracht. Es folgt ein Stück in Anodenpuffer 1 getauchtes Stück Whatmann-Papier, die PVDF-Membran, das PAA-Gel und abschließend zwei in Kathodenpuffer getränkte Stücke Whatman-Papier. Die Luftblasen werden vorsichtig entfernt und die Kathodenplatte aufgelegt. Bei $1,25\text{mA}/\text{cm}^2$ Gelfläche erfolgt der Proteintransfer für 30 Minuten. Um den Transfer zu überprüfen und Gelreste zu entfernen, wird die PVDF-Membran mit Ponceau-S gefärbt, anschließend mit *aqua dest.* gespült und so lange mit TBS (0,05% Tween) gewaschen, bis eine vollständige Entfärbung erfolgt ist.

Verwendete Lösungen und Puffer:

Anodenpuffer 2:	Tris	300mM	36,34g/l
	Methanol		20% (v/v) pH 11,0
Anodenpuffer 1:	Tris	25mM	3,03g/l
	Methanol		20% (v/v) pH 10,6

Kathodenpuffer:	Tris	25mM	36,34g/l	
	Methanol		20% (v/v)	
	SDS		0,1% (v/v)	pH 8,8
Ponceau-Färbelösung:	Ponceau-S		1,25g	
	Essigsäure		15% (v/v)	
	Methanol		40% (v/v)	
TBS (1x):	Tris	20mM	2,42g/l	
	NaCl	140mM	8,18g/l	pH 7,6
ad 500ml mit Wasser, filtrieren				

Immundetektion: Zur Immundetektion wird die PVDF-Membran für eine Stunde mit Blockierungspuffer gesättigt und anschließend für 1 Stunde bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer mit dem primären Antikörper (Anti-PBR 1:1000, New England Biolabs) inkubiert. Danach wird die Membran 1h, 10min und 2x 5min mit dem Blockierungspuffer gewaschen und mit dem sekundären Konjugat-Antikörper (1:1000-Verdünnung) in Blockierungspuffer 45min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde wieder 10min und 2x 5min mit dem Blockierungspuffer bei Raumtemperatur gewaschen. Die Membran wurde zweimal 5min mit 1x Waschpuffer gewaschen und mit CDP-Star-Substrat in Assay-Puffer (New England Biolabs) 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran einem ECL-Hyperfilm exponiert.

Verwendete Puffer:

Blockierungspuffer:	PBS	1x
	Magermilchpulver	5%
	Tween 20	0,1%
Waschpuffer (10x):	Tris-HCl (pH 9,5)	100mM
	NaCl	100mM
	MgCl ₂	10mM

3.1.8 Proliferationstest, [³H]Thymidin-Einbau

Der [³H]Thymidin-Einbau liefert ein Maß für die Teilungsaktivität von Zellen, da dieses radioaktiv markierte Analogon eines DNA-Bausteins innerhalb der Zellteilung in das Genom eingebaut wird. Je nach Menge des eingebauten radioaktiven Basenanalogs lassen sich so Rückschlüsse auf das Proliferationsverhalten der untersuchten Zellen ziehen.

Für 24 Stunden werden $2,5 \times 10^5$ Mikrogliazellen in frischem Medium mit (i) LPS und (ii) LPS und Diazepam inkubiert. Sechs Stunden vor Ablauf der Stimulationsphase erfolgt die Zugabe von 25 µl einer 1:100-Verdünnung von [Methyl 1',2'-³H]-Thymidin (Endkonzentration 125 µCi/ml). Um den Grad der [³H]Thymidin-Inkorporation zu messen, wird das Stimulationsmedium verworfen und zweimal mit PBS gespült. Es folgt dann eine fünfminütige Inkubation mit 1 ml eiskaltem 100%igem Methanol und zwei weitere Spülgänge mit PBS. Danach werden die Zellen für fünf Minuten mit 1 ml kalter 10%iger Trichloressigsäure behandelt und wieder zweimal mit PBS gespült. Schließlich werden die Zellen durch Zugabe von 1 ml kalter 1M NaOH für mindestens 30 Minuten lysiert. Durch die Zugabe von 1 ml 0,3M HCl erfolgt die Neutralisation des Lysates. Dieses wird dann in 20ml-Szintillationsgefäße gefüllt und mit 10ml Hydroluma-Szintillationsflüssigkeit versetzt. Die Proben werden über Nacht inkubiert, um eine vollständige Szintillations-Reaktion zu gewährleisten. Am darauf folgenden Tag werden die Proben im β-Counter gemessen.

3.2 Intrazerebrale Injektionen

3.2.1 Auswahl des Tiermodelles

Die intrazerebrale Injektion mit Hilfe des stereotaktischen Apparates stellt ein gängiges *in vivo*-Modell dar, um verschiedenste Wirkstoffe, Proteine oder Zellen (z.B. bei Transplantationsstudien) in definierte Hirnregionen von Versuchstieren zu injizieren.

Um unsere Hypothese der Mikrogliaaktivierung durch α-Synuclein Protofibrillen zu prüfen, erfolgten Vorversuche. Dazu wurde in den zerebralen Kortex von Ratten eine Injektion von α-Syn PF (250ng/ml) sowie kontralateral dem äquivalenten Volumen an PBS als Kontrolle durchgeführt. Nach Auswertung dieser Vorversuche erfolgte die Injektion von α-Syn PF oder PBS supranigral, d.h. der Stichkanal endete rostral der SN, um eine Immunreaktion allein bedingt durch die Stichinzision zu verhindern.

3.2.2 Synthese und Reinigung von α -Synuclein

Rekombinantes humanes Wild-Typ α -Syn wurde in *Escherichia coli* exprimiert und bis zur Homogenität gereinigt. Zur detaillierten Beschreibung siehe Kahle et al., 2001.

3.2.3 Operationstechnik und Versuchsgruppen

Die Wistar-Ratten werden mit Natriumpentobarbital (50mg/kg Körpergewicht) intraperitoneal anästhesiert und in einen stereotaktischen Apparat (Kopf®) eingespannt. Die künftige Inzisionsstelle wird rasiert und mit Kodan™ desinfiziert. Durch einen ca. zwei Zentimeter langen mediosagittalen Hautschnitt, beginnend von der Sutura frontalis, wird die Kopfhaut durchtrennt und die Schädelkalotte durch Mobilisation beider Hautlappen freigelegt. Eventuelle Blutungen werden elektrokoaguliert und der Knochen mit Wasserstoffperoxid gereinigt. Ausgehend für die Berechnung der Injektionsstelle ist der Punkt Bregma, die Kreuzungsstelle der Sutura frontalis und der Sutura sagittalis. Folgende Koordinaten werden zum Erreichen der SN berechnet: 4,8mm posterior von Bregma, 1,7mm lateral der Mittellinie und 8,2mm ventral zur Hemisphärenoberfläche (Paxinos und Watson, 1980). Die Injektionsstelle wird markiert und die Kalotte mit einem Elektrobohrer eröffnet, wobei darauf zu achten ist, dass der Sinus sagittalis superior nicht verletzt wird. Das Bohrloch wird vom Knochenstaub gereinigt und die Injektionsnadel langsam in das Parenchym eingebracht. Jedes Versuchstier erhält LPS oder α -Syn PF (250ng/ml) in 2 μ l steriles PBS knapp oberhalb der linken SN und durch ein kontralaterales Bohrloch 2 μ l sterilen PBS als Kontrolle knapp oberhalb der rechten SN. Beide Injektionen erfolgen über einen Zeitraum von je fünf Minuten. Um eine gleichmäßige Verteilung der Substanzen im Parenchym zu gewährleisten, wird die Nadel erst nach weiteren fünf Minuten aus dem Gehirn gezogen. Beide Bohrlöcher werden mit Lysostypt™ (Kollagenschwamm) verschlossen und die Wundränder mit Wundklammern wieder adaptiert. Als mögliches Therapiemodell wurde eine Versuchsgruppe mit Semapimod, einem MAP-Kinase-Inhibitor, behandelt.

Folgende Versuchsgruppen werden zur Untersuchung der Wirkung von α -Syn und Semapimod auf die Anzahl TH-positiver dopaminergener Neurone der SN *in vivo* gebildet:

Versuchsgruppe	Behandlung	Anzahl der Versuchstiere
I	Nicht-operiert	$n=5$
II (unbehandelte Kontrolle)	Supranigrale Injektion von PBS links und α -Syn PF rechts; intraperitoneale Injektion von 100 μ l 5%iger Glukoselösung	$n=5$
III	Supranigrale Injektion von PBS links und α -Syn PF rechts; intraperitoneale Injektion von Semapimod 10mg/kg KG in 100 μ l 5%iger Glukoselösung	$n=5$

Überlebenszeit der Gruppen II und III: 7 Tage

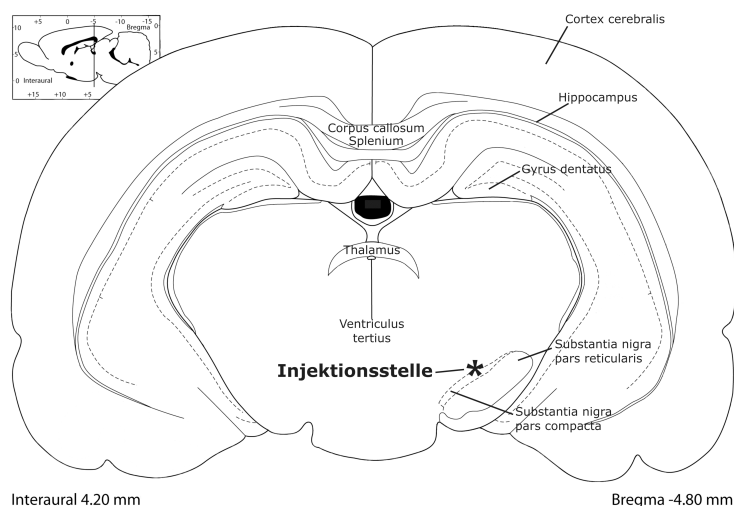


Abb. 6: Schematische Darstellung der intrazerebralen Injektionsstelle (koronar).

Koronarer Schnitt durch das Gehirn einer Ratte. Die Injektionsstelle für LPS oder α -Syn (*) befindet sich linksseitig rostral der SN. Kontralateral wurde die Kontrollsubstanz injiziert (Paxinos und Watson, 1980, modifiziert).

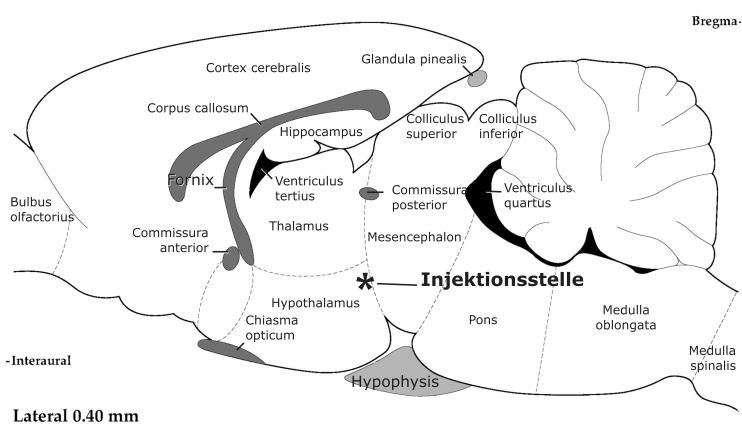


Abb. 7: Schematische Darstellung der intrazerebralen Injektionsstelle (sagittal).

Sagittaler Schnitt durch das Gehirn einer Ratte. Die Injektionsstelle für LPS oder α -Syn (*) befindet sich linksseitig rostral der SN. Kontralateral wurde die Kontrollsubstanz injiziert (Paxinos und Watson, 1980, modifiziert).

3.2.4 Perfusion und Aufarbeitung

Nach einer Überlebenszeit von einer Woche werden die Versuchstiere erneut anästhesiert, der Thorax eröffnet und die *Aorta thoracica* abgeklemmt, um eine Perfusion der unteren Körperhälfte zu verhindern. Nach Eröffnung des linken Ventrikels, wird die Perfusionsnadel bis in die *Aorta ascendens* geschoben und dort fixiert. Zum Abfluss der Perfusionslösung wird das rechte Herzohr eröffnet. Nach transkardialer Perfusion von 300ml 0.9% NaCl Lösung erfolgt die Perfusion mit 300ml gekühltem vierprozentigem Paraformaldehyd (PFA) in Phosphatpuffer innerhalb von 10min. Nach Ende der Perfusion wird das Gehirn freipräpariert, in der Perfusionslösung bei 4°C für 24 h gelagert und danach die Perfusionslösung gegen 1% PFA ausgetauscht. Zur histologischen Aufarbeitung werden die Gehirne in Paraffin eingebettet und 7µm dicke Koronarschnitte durch die gesamte SN angefertigt.

3.2.5 Immunhistochemie

Um den Umfang der Neurodegeneration zu erfassen, werden Schnitte der gesamten SN untersucht. Die Darstellung der jeweiligen Antigene erfolgt enzymatisch nach der alkalischen Phosphatase-Methode. Zur Darstellung kommen: (i) Astrozyten: saures Gliafilamentprotein (GFAP) (Paintlia et al., 2008) (ii) Mikroglia: ionisiertes Calcium bindendes Adaptermolekül 1 (Iba1) (Kielian T et al., 2008) (iii) dopaminerge Neurone: Tyrosinhydroxylase (TH) (Nocjar et al., 2002).

Nach Entfernung des Paraffins mit Xylen und Alkohol werden die Schnitte in Tris-Puffer ausgiebig gespült und für fünf Minuten in 10mM Citratpuffer in der Mikrowelle behandelt. Nach Blockade unspezifischer Bindungsstellen mit 0,75% BSA in PBS für 20min erfolgt die Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern gegen GFAP (1:50), Iba1 (1:50) und TH (1:750) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach wiederholtem Waschen in Tris-Puffer werden die Schnitte mit einem Sekundärantikörper (Kaninchen-anti-Maus-IgG, 1:100; Maus-anti-Kaninchen-IgG; 1:100) in Tris-Puffer unter Zugabe von 10% Rattenserum inkubiert, an den dann als Tertiärantikörper ein Peroxidase gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper/ Ziege-anti-Maus-Antikörper gebunden wird. Die Inkubation des Sekundär- und Tertiärantikörpers erfolgt für jeweils 30 Minuten, zwischen den Inkubationsschritten werden die Objektträger ausgiebig in Tris-Puffer gespült. Die Entwicklung erfolgt in einem Standardansatz aus Wasserstoffperoxid und 3,3-Diamino-benzidinhydrochlorid (DAB).

3.2.6 Auswertung der Neurodegeneration

Jeder zehnte Schnitt wird visuell auf die Anzahl der nigralen TH-positiven Neurone unter einem Lichtmikroskop durch drei Untersucher unabhängig voneinander gezählt.

3.3 Berechnungen, Statistiken, Grafik und Ausarbeitung

Alle Berechnungen und graphischen Darstellungen wurden mit einem kommerziellen Tabellenkalkulationsprogramm durchgeführt (ExcelTM, Microsoft, München). Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM (Standardabweichung des Mittelwertes) dargestellt. Die Auswertung der Daten erfolgte bei den *in-vitro*-Experimenten bezogen auf die unstimulierten Kontrollen, bei den *in-vivo*-Experimenten bezogen auf die Werte mit inerte Kontrollsubstanz behandelte Tiere.

Zur statistischen Auswertung wurden Varianzanalysen (ANOVA) durchgeführt, denen sich ein multipler, paarweiser Vergleich mit Hilfe des post-hoc Testes (Bonferoni) anschloss. Eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant angenommen. Die Bildbearbeitung erfolgte mit CorelDrawTM und CorelPhotopaintTM (Corel Corporation, Ottawa, Kanada). Die Ausarbeitung der Dissertation erfolgte mit WordTM für WindowsTM der Firma Microsoft.

4 Ergebnisse

4.1 Studien zum Peripheren Benzodiazepinrezeptor an Mikroglia

4.1.1 Mikroglia in Astrozyten-konditioniertem Medium

In Astrozyten-konditioniertem Medium (AKM) kultivierte Mikroglia bildet eine Ruheform, die sogenannte ramifizierte Form aus. Diese Morphologie ist durch ein kleines Soma mit mehreren schlanken Pseudopodien-tragenden Fortsätzen charakterisiert (\Rightarrow Abb. 2). Innerhalb von drei Tagen bilden fast alle Mikrogliazellen in AKM diese Ruheform aus. Erste Anzeichen sind bereits nach 24 Stunden sichtbar, nachdem sich die Zellen an den Untergrund geheftet haben (Wollmer et al., 2001). Die ramifizierte Zellform dient als Kontrolle der Aktivierungs- und Inaktivierungsexperimente, daher wird ein Zeitraum von drei Tagen gewählt, bevor Untersuchungen zur Änderung des mikroglialen Phänotyps vorgenommen werden. In die Auswertung werden nur Kulturen einbezogen, bei denen eine klar nachweisbare Ramifizierung erkennbar ist.

4.1.2 Aktivierung ruhender Mikroglia *in vitro*

Der Wechsel der Mikroglia von einer ruhenden in eine aktivierte Zellform ist initial durch Änderung ihrer Morphologie erkennbar. Eine aktivierte Mikrogliazelle zeigt einen spindelförmig bis ovoid verändertes Soma und eine reduzierte Anzahl ihrer Zellausläufer. Die verbliebenen Fortsätze wirken verplumpt (Kreutzberg, 1996; Wollmer et al., 2001). Stimulus für diesen veränderten Zustand ist die Gabe von LPS (200ng/ml) welches im Verlauf von drei Tagen zum sogenannten amöboiden Phänotyp führt (Kreutzberg, 1996; Wollmer et al., 2001). Diese morphologischen Veränderungen sind erste Untersuchungsparameter zur experimentellen Mikrogliaaktivierung (\Rightarrow Abb. 8).

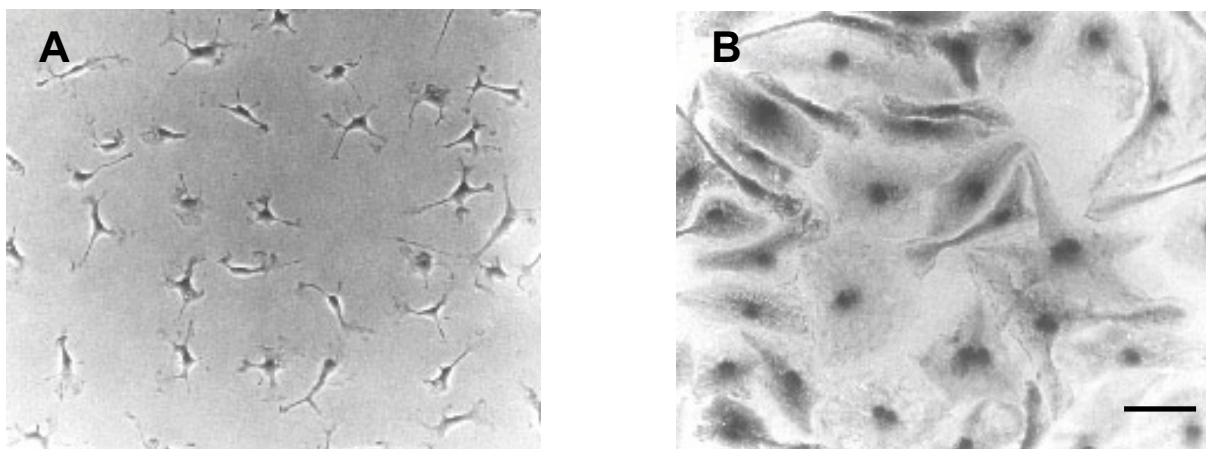


Abb. 8: Morphologie der Mikrogliazellen kultiviert in AKM. Der ramifizierte Phenotyp der Mikroglia (A) dient als Kontrolle für Stimulationsversuche. Nach Stimulation bildet die Mikroglia den amöboiden Phenotyp (B, nach LPS-Gabe) aus. Die Bildpaare A und B jeweils in gleicher Vergrößerung (Balken = 15 μ m).

4.1.3 Immunzytochemischer Nachweis des PBR

Immunzytochemische Untersuchungen zum Nachweis des PB-Rezeptors an Mikrogliazellen zeigen, dass sowohl die ruhende als auch die LPS-aktivierten Zellen den PB-Rezeptor exprimieren. Während die ruhende Zellform nur eine schwache Expression des PBR zeigt, ist die PB-Rezeptorfärbung bei aktivierten Zellen wesentlich intensiver ausgeprägt. Mit steigendem Aktivitätszustand der Mikroglia steigt also auch die Expressionsdichte des PBR (\Rightarrow Abb. 9).

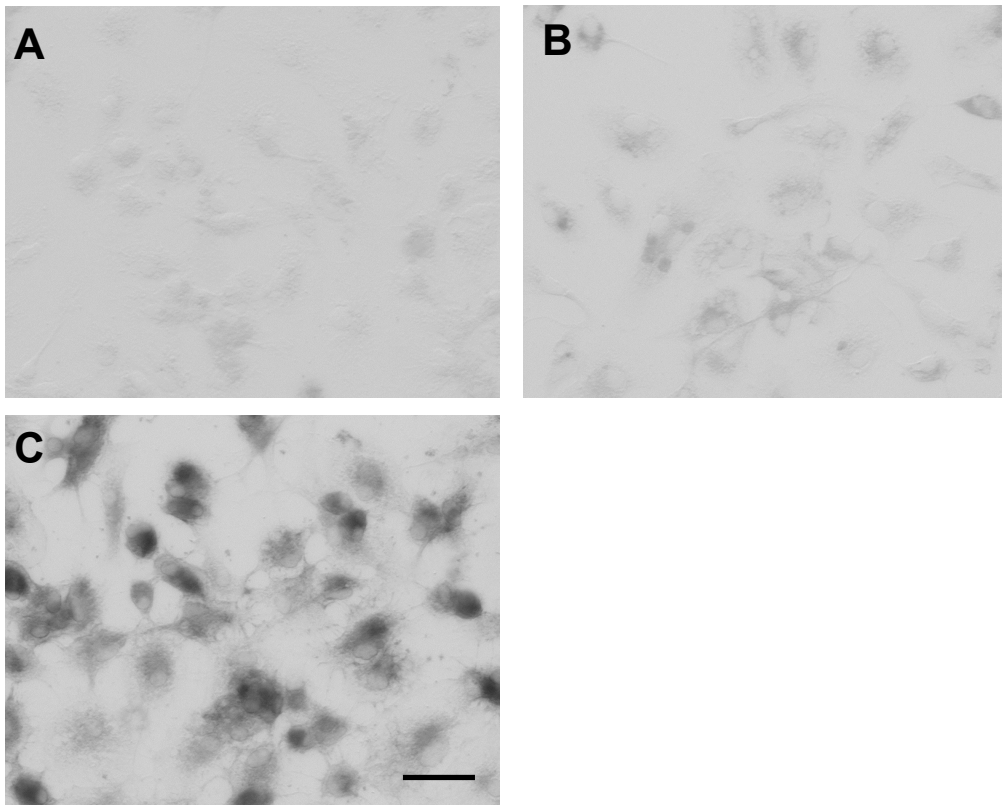


Abb. 9: Die Expressionsdichte des PBR steigt mit dem Grad der Mikrogliaaktivierung. Ruhende Mikroglia als Kontrolle ohne Primärantikörper (A), schwache Expression des PBR bei unstimulierter Mikroglia (B) und verstärkte Expression des PBR bei LPS-aktivierter Mikroglia (C) (Balken = 15 μ m).

4.1.4 Nachweis des PBR mittels RT-PCR

Zur Amplifikation der Ratten PBR cDNA wurden folgende Primer 5'-CCT CGC CGA CCA GAG TTA TCA C-3' (Sense) 5'-GGC TCC TAC ATA ATC TGG AAA GAG-3' (Antisense) genutzt. Das Primerdesign für das PBR-Gen wurde mit Hilfe der Gene-Fisher-Software (Giegerich et al., 1996) basierend auf der publizierten Sequenz M84221 (NCBI, Nucleotid database) erstellt. Die Primer zur Amplifikation der β -Aktin cDNA besitzt die Sequenzen 5'-AGA GGG AAA TCG TGC GTG ACA-3' (Sense) und 5'-CAC TGT GTT GGC ATA GAG GTC-3' (Antisense) (Westenfelder et al., 1999). Die Amplifikation der β -Aktin cDNA dient als Kontrolle für die Intaktheit der RNA.

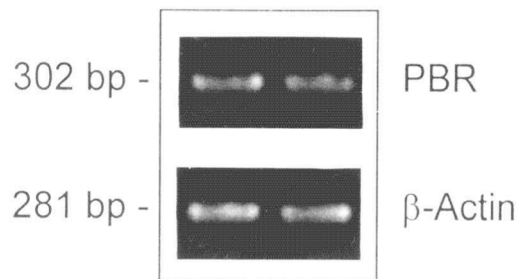


Abb. 10: RT-PCR zum Nachweis des PBR an Mikrogliazellen. Bei 302 bp zeigt sich die spezifische Bande für den PBR. Kontrolle des PCR-Verfahrens mit β -Actin, dessen Primer eine Bande bei 281 bp aufweist.

4.1.5 Nachweis des PBR im Western-Blot

Die Expression des PBR konnte abschließend im Western-Blot verifiziert werden. Der Rezeptor ließ sich an ruhender Mikroglia als Basalexpression und verstärkt an LPS-stimulierter Mikroglia nachweisen. Als Positivkontrolle diente Gewebe aus der Nebenniere.

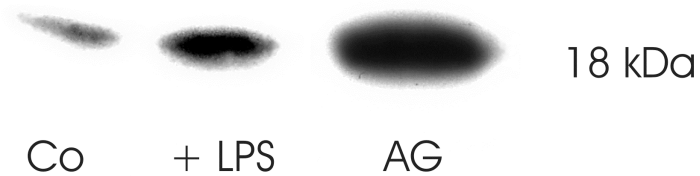


Abb. 11: Western-Blot zum Nachweis des PBR an Mikrogliazellen. (Co, ruhende Mikroglia), (LPS, LPS-aktivierte Mikroglia), (AG, adrenal gland, Nebenniere als Positivkontrolle).

4.1.6 Nachweis des proinflammatorischen Moleküles NO

NO wird von ruhender Mikroglia in geringer Konzentration freigesetzt. Diese Basalsynthese steigt deutlich an, wenn die Zellen durch LPS stimuliert werden. Jeder der getesteten PBR-Liganden war in der Lage, die Freisetzung von NO zu reduzieren und zeigte so einen antiinflammatorischen Einfluss auf die aktivierte Mikroglia. Verschiedene Konzentrationen (\Rightarrow 3.1.3) der Wirkstoffe zeigten einen Effekt auf die NO-Freisetzung. Die Dosierung mit dem höchsten modulatorischen Effekt wurde grafisch in Abb. 12 dargestellt. NO kann nicht direkt, sondern nur indirekt über das stabile Abbauprodukt Nitrit in einer Farbreaktion und anschließender photometrischen Messung quantifiziert werden. Die Freisetzung von NO ist signifikant höher ($p < 0,05$), wenn die Zellen mit LPS stimuliert werden [$21,59\mu\text{M} \pm 1,22$] im Vergleich zur Nativkontrolle [$1,63\mu\text{M} \pm 0,16$]. Eine signifikante Suppression ($p < 0,01$) der LPS-induzierten NO-Freisetzung wurde mit dem PBR-Liganden PK11195 ($100\mu\text{M}$) [$6,57\mu\text{M} \pm 0,88$] beobachtet. Die Benzodiazepine Clonazepam ($5\mu\text{M}$) [$9,33\mu\text{M} \pm 2,28$], Midazolam ($100\mu\text{M}$) [$3,16\mu\text{M} \pm 0,17$] und Diazepam ($100\mu\text{M}$) [$11,17\mu\text{M} \pm 0,96$] inhibierten ebenfalls die LPS-induzierte NO-Produktion. Eine zusätzliche Gabe der Antagonisten Flumazenil (5 - $20\mu\text{M}$) oder ODN (1nM - $100\mu\text{M}$) hemmte nicht die LPS-induzierte NO-Freisetzung (Daten nicht dargestellt).

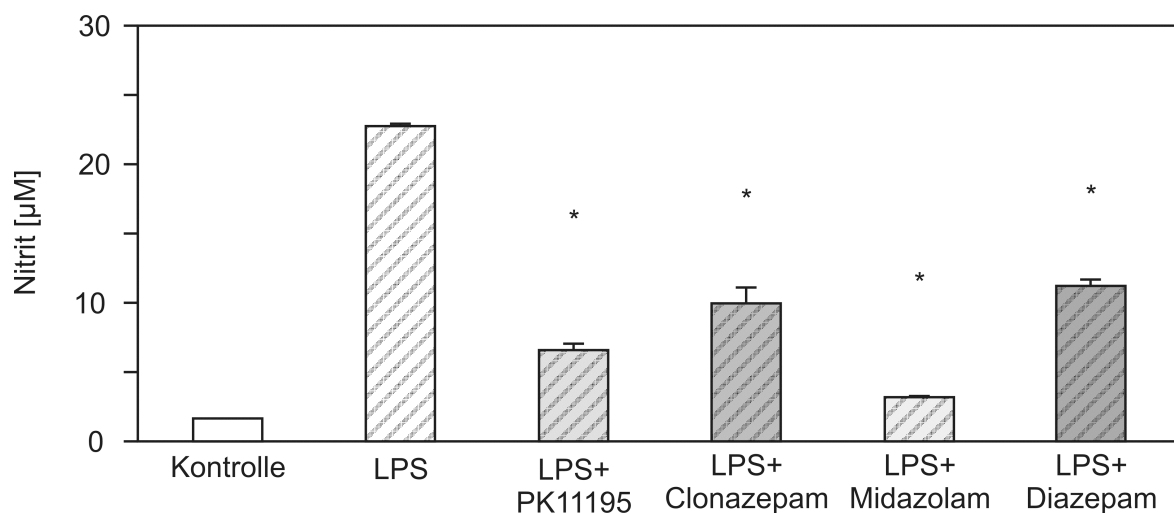


Abb. 12: Konzentration von Nitrit in Mikrogliaulturen nach 24-stündiger Koinkubation mit LPS und verschiedenen Liganden des PBR. $*P < 0,05$ bezogen auf die Kontrolle mit Zuhilfenahme des ANOVA-Tests. Die Daten wurden in sechs separaten Experimenten mit $n=6$ erhoben.

4.1.7 Nachweis des proinflammatorischen Moleküles TNF- α

Der Nachweis von TNF- α erfolgte mit Hilfe der ELISA-Methode. Die Konzentrationen von TNF- α steigt graduell in LPS-stimulierten Mikrogliazellkulturen [305,68pg/ml \pm 14,86] im Vergleich zur Nativkontrolle [0,06pg/ml \pm 0,01] an. Eine Koinkubation mit verschiedenen Benzodiazepinen hemmte die TNF- α -Freisetzung wie folgt: Clonazepam (5 μ M) [113,66pg/ml \pm 18,36], Midazolam (100 μ M) [120,34pg/ml \pm 17,41] und Diazepam (100 μ M) [149,68pg/ml \pm 85,57].

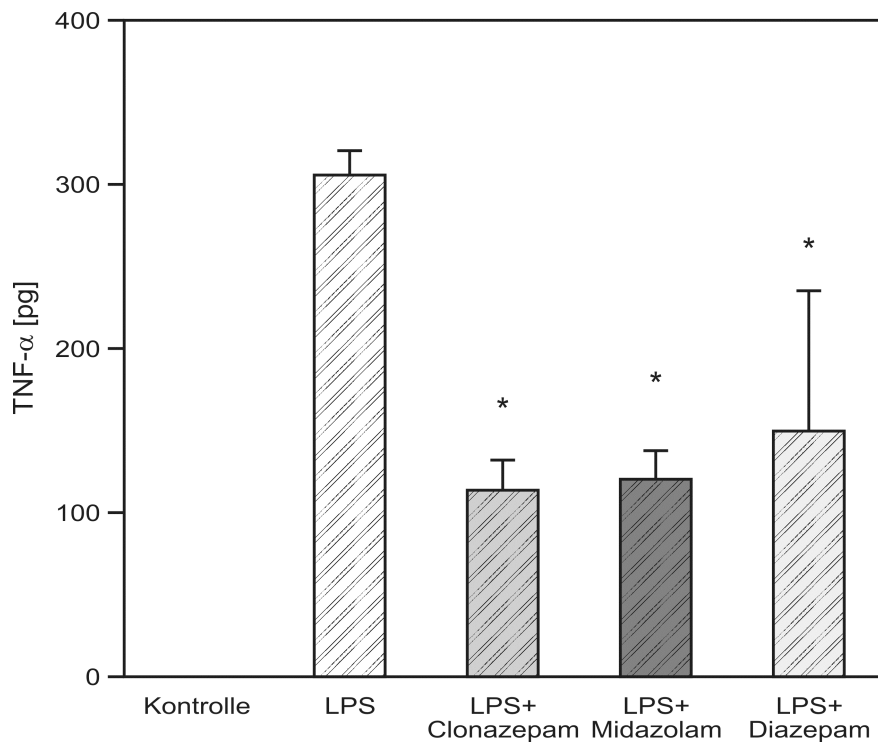


Abb. 13: Konzentration von TNF- α LPS-aktivierter Mikroglia nach 24-stündiger Koinkubation mit verschiedenen Liganden des PBR *in vitro*. $P < 0,01$ bezogen auf die Kontrollen mit Zuhilfenahme des ANOVA-Tests. Die Daten wurden in vier separaten Experimenten mit $n=6$ erhoben.

4.1.8 Effekt von Diazepam auf die Mikroglia proliferation

BZ vermindern die Proliferationsaktivität LPS-aktivierter Mikroglia. Der [^3H]Thymidin-Einbau in die Zellen, die mit LPS plus 100 μM Diazepam [819pmol/mg \pm 378] behandelt wurden, war signifikant niedriger als bei der Zellfraktion, die nur mit LPS [4193pmol/mg \pm 852] inkubiert wurden. Der Proliferationstest wurde nach sechs Stunden Inkubation ausgewertet.

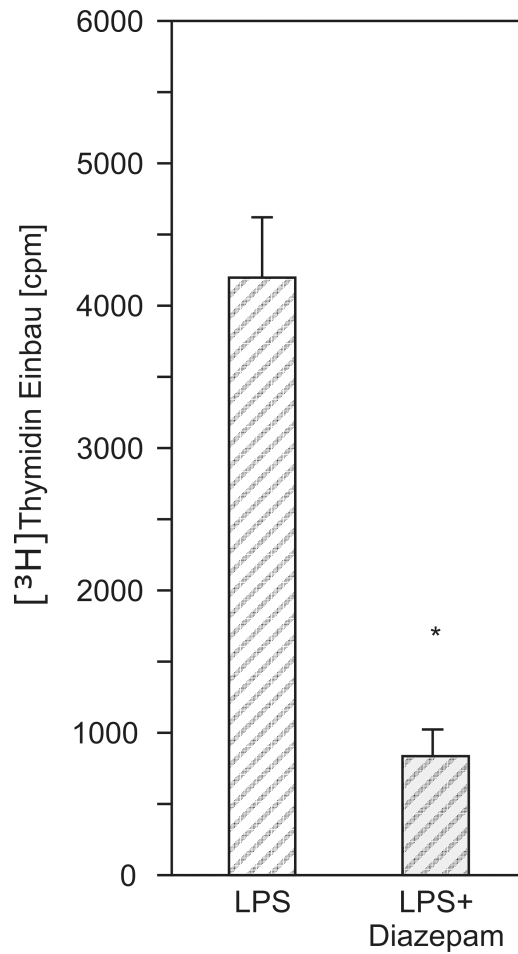


Abb. 14: Effekt von Diazepam auf die Zellproliferation. Diazepam senkt signifikant die Proliferation aktivierter Mikrogliazellen. $P < 0,05$ bezogen auf die Kontrolle mit Zuhilfenahme des ANOVA-Tests. Die Daten wurden in vier separaten Experimenten mit $n=5$ erhoben.

4.2 Studien zur Wirkung von α -Synuclein an Mikrogliazellen

4.2.1 Auch α -Synuclein aktiviert ruhende Mikroglia

Die Gabe von α -Syn PF führt analog zur LPS-Exposition zur morphologisch sichtbaren Transformation ruhender Mikroglia zum aktivierten Phänotyp (zum Vergleich \Rightarrow Abb. 8).

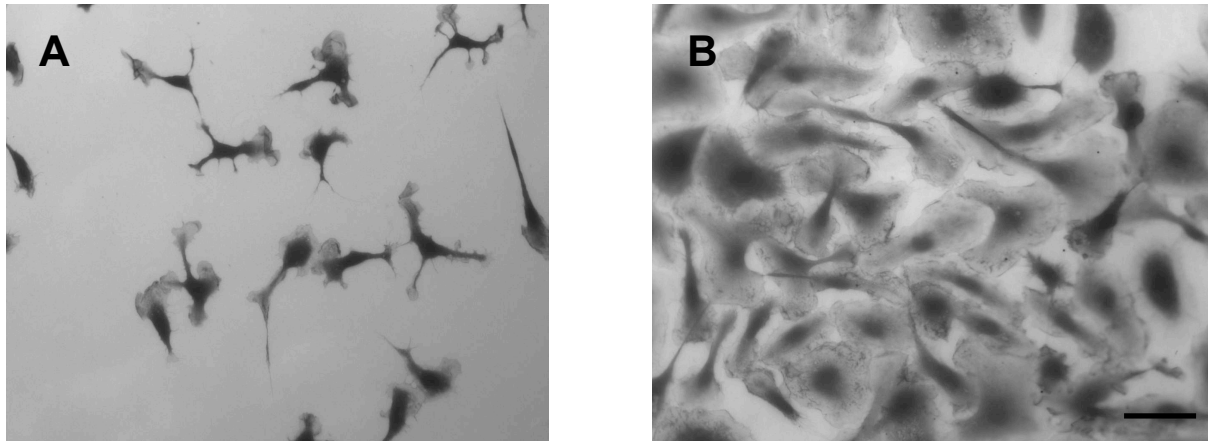


Abb. 15: Morphologie der Mikrogliazellen nach Exposition mit α -Syn. Der ramifizierte Phänotyp der Mikroglia (A) dient als Kontrolle für Stimulationsversuche. Nach Stimulation mit α -Syn PF entwickelt die Mikroglia den amöboiden Phänotyp (B). Die Bildpaare A und B jeweils in gleicher Vergrößerung (Balken = 15 μ m).

4.2.2 Die α -Synuclein-Aktivierung ruhender Mikroglia *in vitro* lässt sich experimentell reduzieren

Um Hinweise auf nachgeschaltete Signaltransduktionswege zu erhalten, wurden Hemmstoffe der p38-MAP-Kinase sowie der Proteinkinase Kinase 1/2 (MEK1/2) eingesetzt. Beide Substanzen waren in der Lage, die durch α -Syn PF induzierte morphologische Transformation der Mikroglia teilweise aufzuheben.

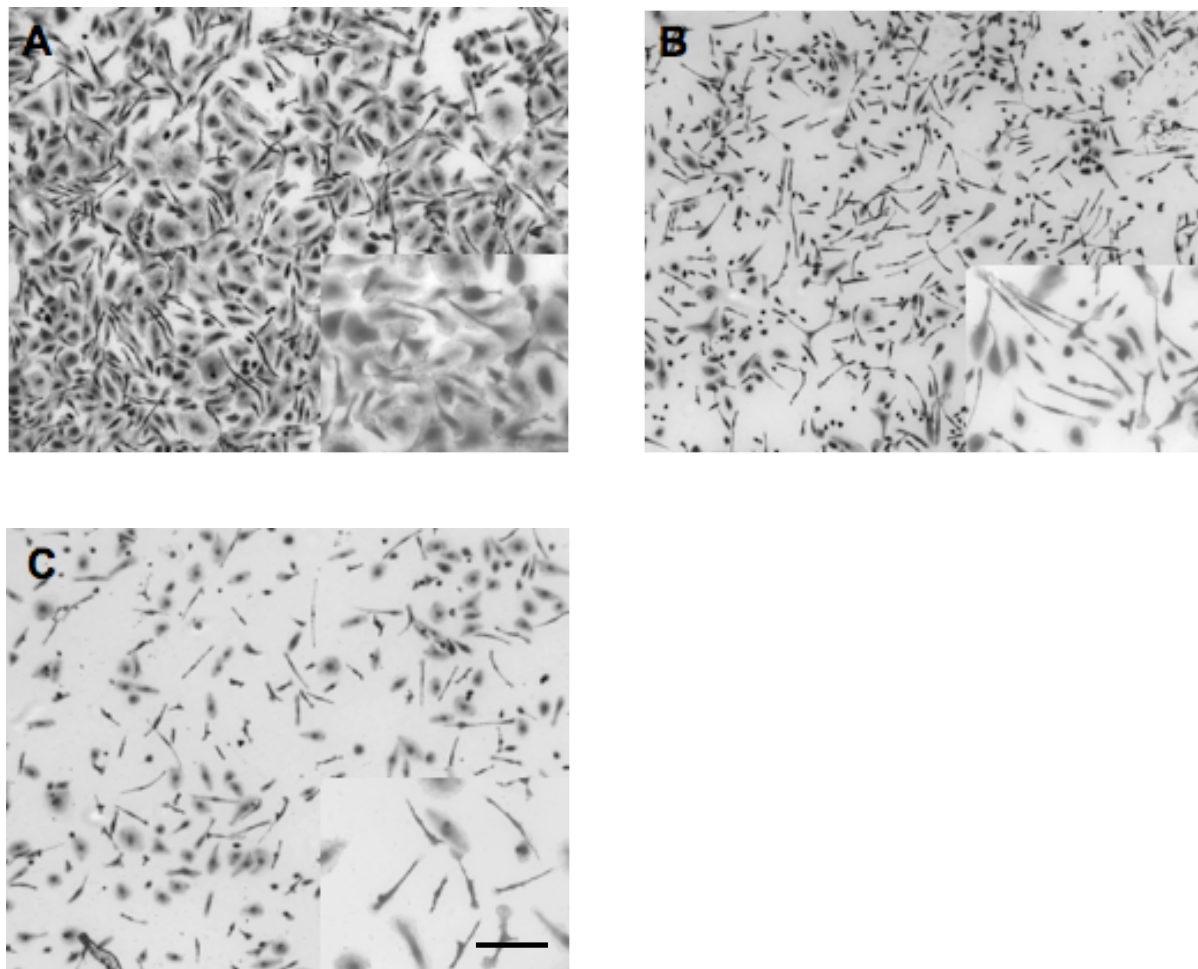


Abb. 16: Morphologische Studie von Mikroglia nach Exposition von α -Syn PF *in vitro*. α -Syn PF induzieren den aktivierten Phänotyp in Mikroglia kulturen (A). Die Blockade der p38-Phosphorylierung durch Behandlung mit SB203580 (B) und die Blockade der aktivierten Proteinkinase Kinase 1/2 (MEK1/2) durch den Wirkstoff UO126 (C) konnten teilweise diesen Aktivierungsprozess unterdrücken. Die Ausschnitte in A-C jeweils rechts unten zeigen eine starke Vergrößerung (Balken = 15 μ m).

4.2.3 Nachweis des proinflammatorischen Moleküles NO bei α -Syn aktivierter Mikroglia

Analog zur LPS-Gabe (\Rightarrow Abb. 12) führte die Exposition der Mikrogliaulturen mit α -Syn PF für 24 Stunden zu erhöhten Nitrit-Konzentrationen im Kulturmedium. Die Produktion von Nitrit konnte signifikant durch den Inhibitor der p38-Phosphorylierung SB203580 (1 μ M) als auch durch einen Inhibitor der Mitogen-aktivierten Proteinkinase Kinase 1 und 2 (MEK1/2) UO126 (10 μ M) reduziert werden (\Rightarrow Abb. 17). Ähnliche Ergebnisse konnten für Semapimod erhoben werden (Daten nicht dargestellt).

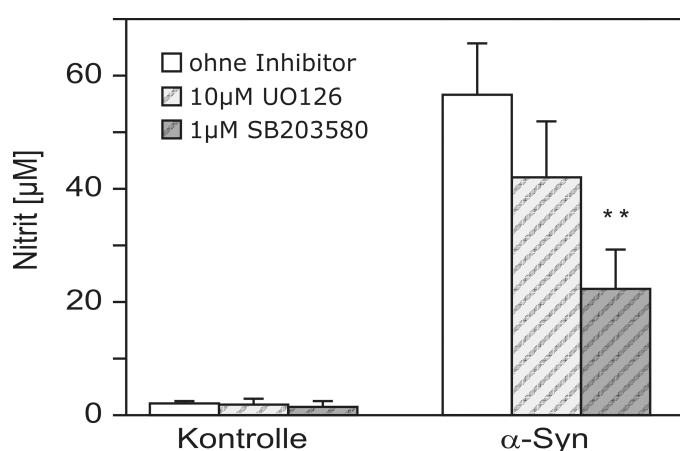


Abb. 17: Nitrit-Konzentration in Mikrogliaulturen nach 24-stündiger Koinkubation mit α -Syn PF und zwei verschiedenen MAPK-Inhibitoren. $^{**}P < 0,05$ bezogen auf die Kontrolle mit Zuhilfenahme des ANOVA-Tests. Die Daten wurden in vier separaten Experimenten mit $n=4$ erhoben.

4.3 Studien im Tiermodell

4.3.1 Vorversuche: intrakortikale Injektionen und α -Syn Überexpression

Die Vorversuche dienten zur Überprüfung der Hypothese, dass α -Syn PF auch *in vivo* in der Lage sind Mikrogliazellen zu aktivieren. Die intrakortikale Injektion von 2ng/ml α -Syn PF führte zu einer deutlich sichtbaren Mikrogliaaktivierung, die auf der kontralateralen Seite nicht sichtbar war.

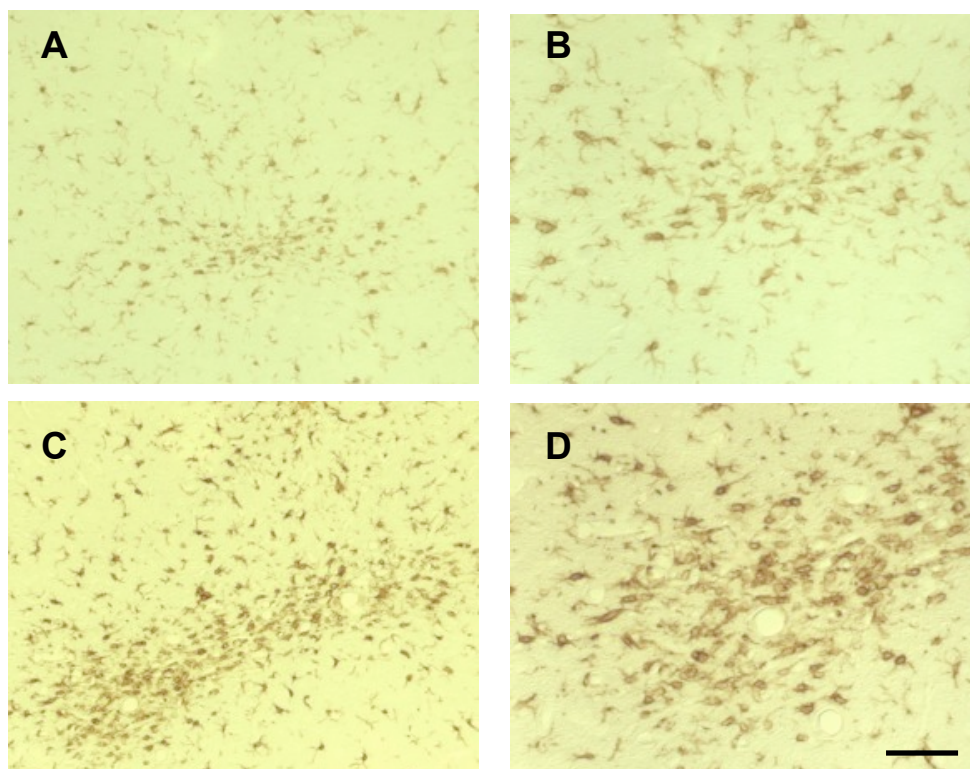


Abb. 18: Intrakortikale Injektion von α -Syn PF führt zur Mikrogliaaktivierung im Kortex. Bildpaar A und B zeigen eine leichte Mikrogliaaktivierung durch den Schaden der Stichinzision in der Kontrolle (Injektion von PBS). Verstärkte Aktivierung findet sich nach Injektion von α -Syn PF (Bildpaar C und D). Die Bilder B und D in höherer Vergrößerung (Balken = 150 μ m).

In einer weiteren Serie von Vorversuchen (Material von D. Kirik, Universität Lund, Schweden) konnte gezeigt werden, dass eine supranigrale Injektion von rekombinantem adenoviral-assoziiertem viralen (rAAV) Vektor zur Überexpression von humanen α -Syn PF und damit zur Aktivierung der Mikroglia in der SN führt (\Rightarrow Abb. 19).

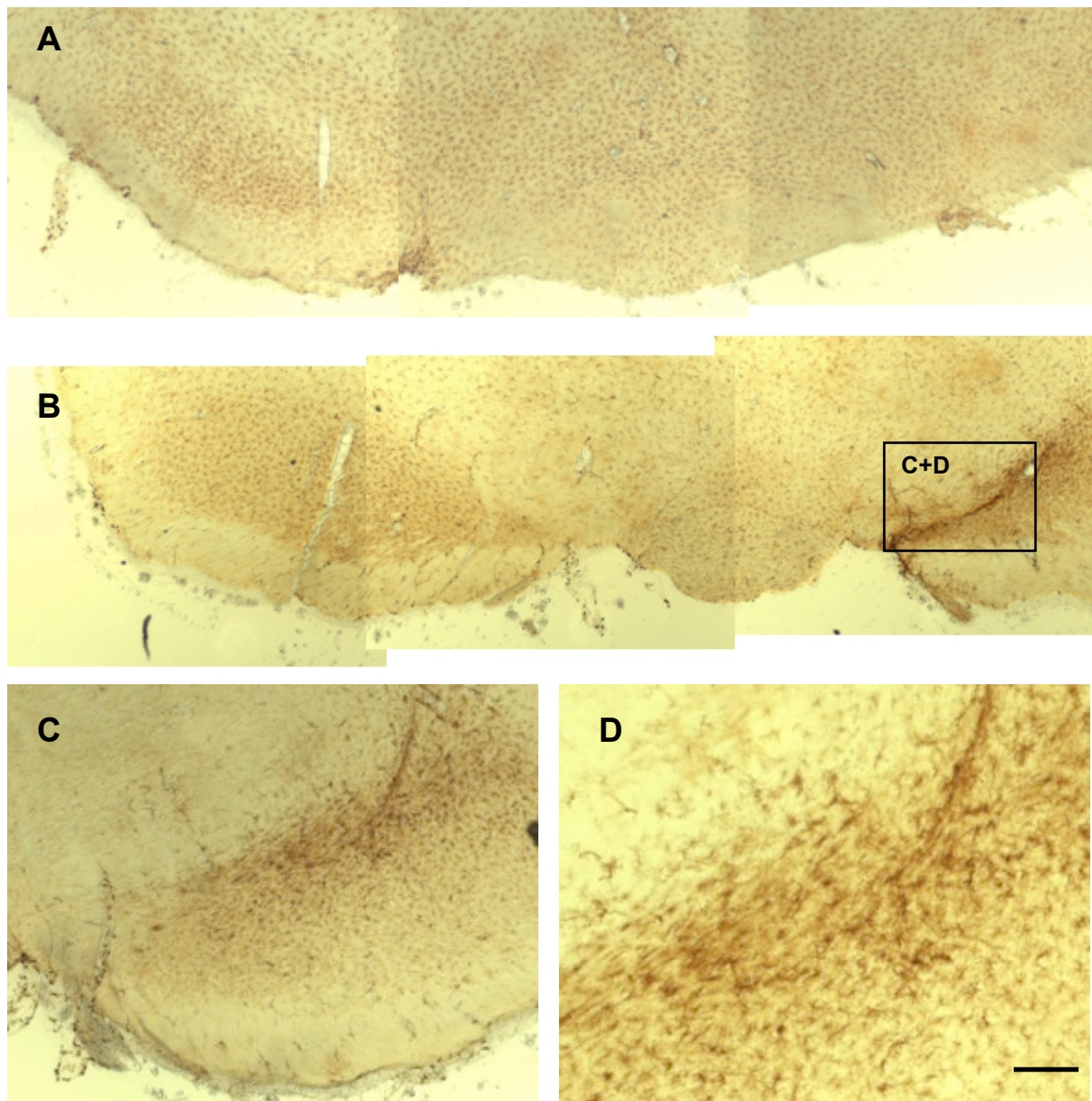


Abb. 19: Supranigrale Injektion von rekombinantem adenoviral-assoziiertem viralem (rAAV) Vektor zur Überexpression von humanen α -Syn PF führt zur Aktivierung der Mikroglia in der SN. Eine signifikant erhöhte Mikrogliaaktivierung, dargestellt durch Iba1-Immunhistochemie, konnte als Antwort auf die Überexpression von humanen α -Syn PF (B), nicht jedoch durch die Überexpression von grün-fluoreszierendem Protein (GFP) bei Kontrolltieren (A) dargestellt werden. Die Abbildungen C und D zeigen einen vergrößerten Bildausschnitt aus B. Repräsentative Mikrofotografie von $n=5$ Tieren (Balken = $150\mu\text{m}$).

4.3.2 Stereotaktische supranigrale Injektion von LPS und α -Syn PF

Die vorangegangenen *in vitro*-Studien in dieser Arbeit haben gezeigt, dass Mikrogliazellen analog zu LPS durch α -Syn PF aktiviert werden können und das neurotoxische Molekül NO freisetzen. Die Injektion von LPS bzw. α -Syn PF, nicht jedoch die kontralaterale Injektion der Kontrollsubstanz PBS induzierte eine deutliche Aktivierung der Mikroglia (\Rightarrow Abb. 20+21). Die Anzahl der TH-positiven (dopaminergen) Neurone in der SN war auf der Injektionsseite von LPS (Zellverlust hier nicht quantifiziert) bzw. α -Syn PF (78,4%) im Vergleich zu der Kontrollseite (100%) nach einer Woche Überlebenszeit reduziert. Dieser neuronale Verlust konnte durch die Behandlung mit Semapimod (CNI-1493) reduziert werden (\Rightarrow Abb. 22). Die Vorversuche im Tiermodell (\Rightarrow 4.3.1) zeigten eine Mikrogliaaktivierung (i) im cerebralen Kortex durch α -Syn PF und (ii) eine Mikrogliaaktivierung bei Überexpression von α -Syn. Ausgehend von diesen initialen positiven Befunden wurde zunächst das Modell der SNc-Injektion anhand einer LPS-Injektion entwickelt. Abbildung 20 zeigt die korrekte Etablierung des Modells: Die LPS-Injektion führte – wie schon in der Literatur beschrieben (\Rightarrow 1.3.2) zu einem Untergang dopaminergener Neurone (\Rightarrow Abb. 20).

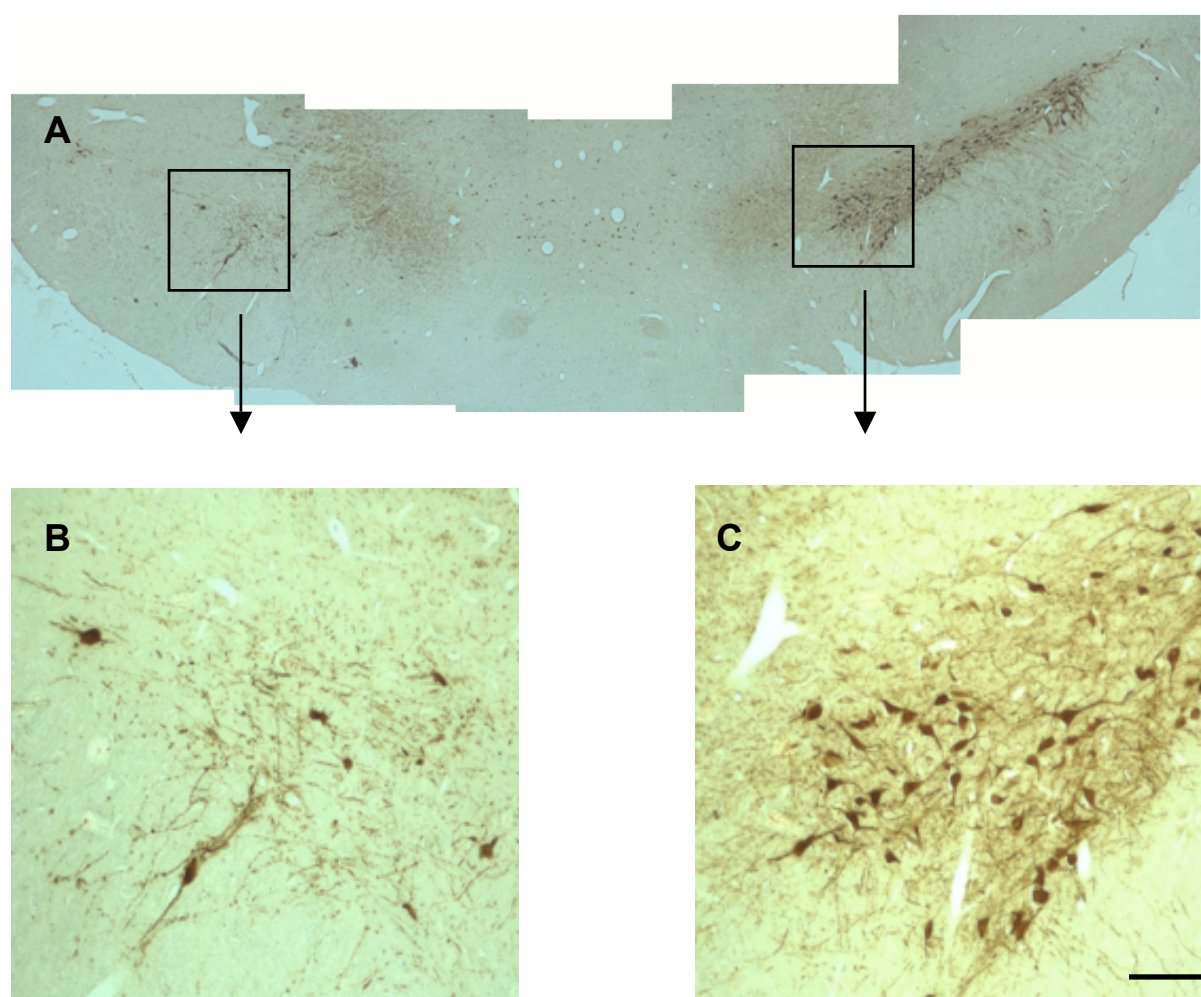


Abb. 20: Repräsentatives Beispiel von entzündungsbedingtem neuronalen Zelltod *in vivo*. Nach supranigraler Injektion von LPS lässt sich eine deutliche Reduktion dopaminerger (TH-positiv gefärbter) Neurone in der SN auf der Injektionsseite (B), nicht jedoch auf der kontralateralen Seite (C) nachweisen. Abbildung A zeigt eine rekonstruierte Übersichtsaufnahme beider SN in niedriger Vergrößerung (Balken = 150µm).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die intrakortikale Injektion von α -Syn PF zur Aktivierung von Mikrogliazellen im Kortex und die Überexpression von α -Syn PF zur Aktivierung von Mikrogliazellen in der SN führt, folgte die supranigrale Injektion von α -Syn PF und die Evaluation des entzündungsbedingten neuronalen Schadens. Die Applikation von LPS bzw. α -Syn PF, nicht jedoch die kontralaterale Injektion der Kontrollsubstanz PBS induzierte eine deutliche Aktivierung der Mikroglia (\Rightarrow Abb. 20+21). Die Anzahl der TH-positiven (dopaminergen) Neurone in der SN war auf der Injektionsseite von LPS (Zellverlust hier nicht quantifiziert) bzw. α -Syn PF (78,4%) im Vergleich zu der Kontrollseite (100%)

nach einer Woche Überlebenszeit reduziert. Dieser neuronale Verlust konnte durch die Behandlung mit Semapimod (CNI-1493) reduziert werden (\Rightarrow Abb. 22).

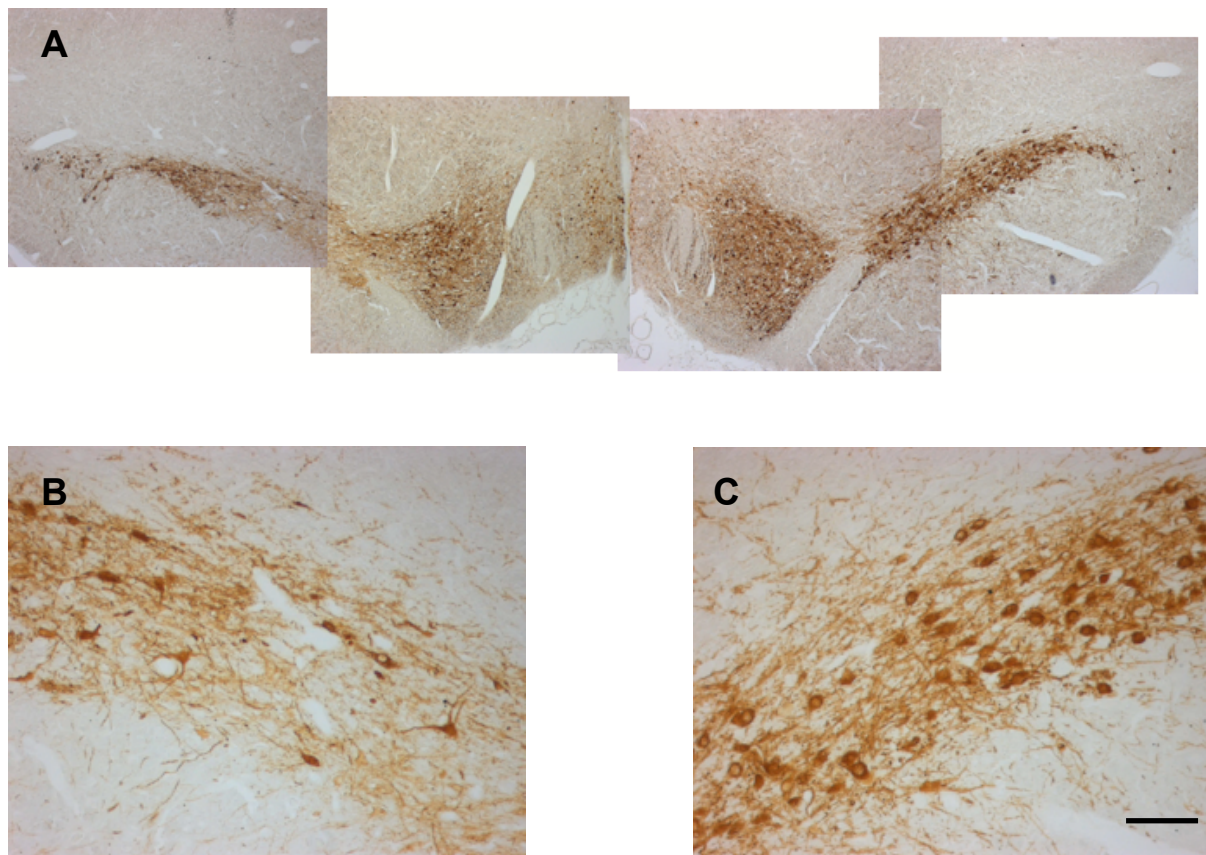


Abb. 21: Injektion von α -Syn PF führt zum Zelltod dopaminergener Neurone. Repräsentative Mikrofotos zeigen eine signifikante Reduktion nigraler TH-positiver Neurone, eine Woche *post injectionem* von α -Syn PF rostral der SN. Während die Injektion von PBS keine Zeichen eines neuronalen Zellverlustes (C) aufzeigt, führt die Behandlung mit α -Syn PF zu einer deutlichen Reduktion der dopaminergen Neurone (B). Abbildung A zeigt eine rekonstruierte Übersichtsaufnahme beider SN in niedriger Vergrößerung (Balken = 150 μ m).

4.3.3 Antiinflammatorische Therapie mit Semapimod

Der durch α -Syn PF induzierte entzündungsbedingte dopaminerge Zellverlust in der SN konnte durch eine antiinflammatorische Therapie deutlich reduziert werden (\Rightarrow Abb. 22 und Abb. 23).

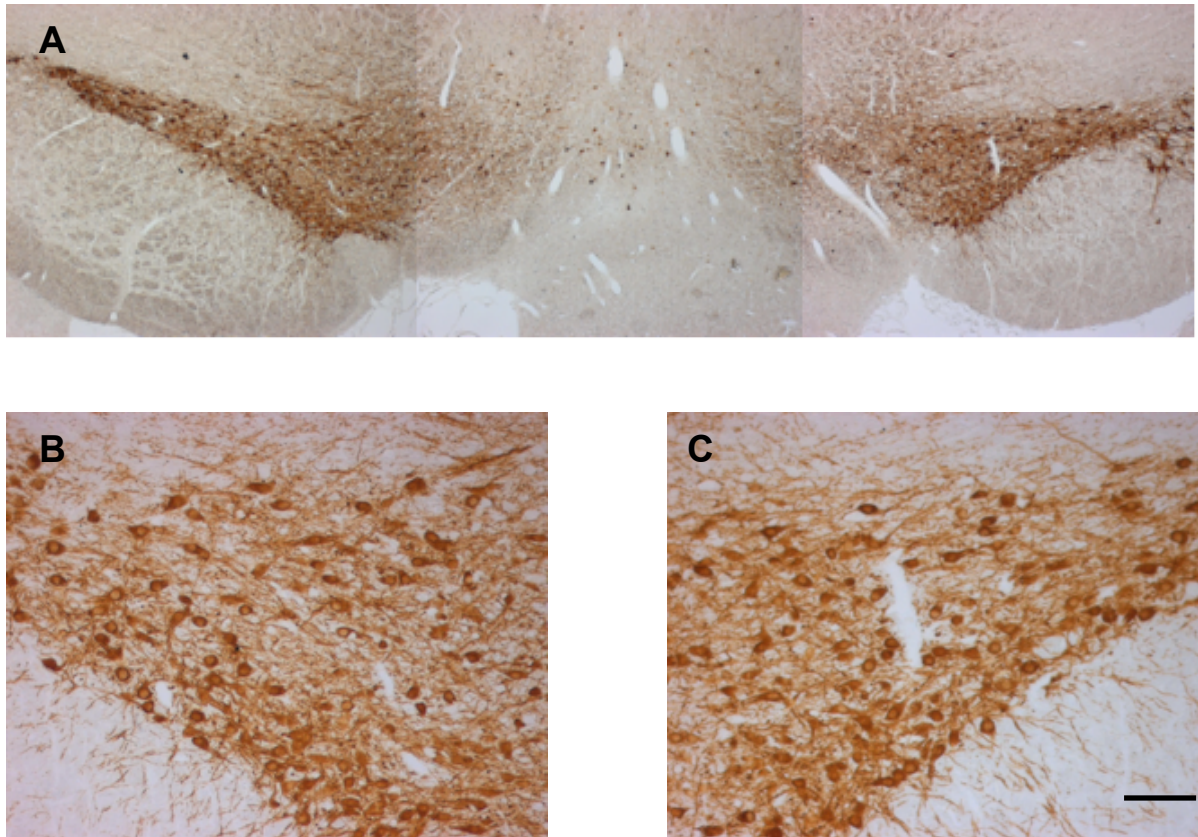


Abb. 22: Antiinflammatorische Therapie mit Semapimod reduziert den von α -Syn PF induzierten entzündungsbedingten Untergang dopaminerger Nigraneurone. Der neuronale Zelltod konnte durch die intraperitoneale Behandlung mit dem MAP-Kinase Inhibitor Semapimod (CNI-1493) reduziert werden (B, α -Syn PF; C, PBS). Abbildung A zeigt eine rekonstruierte Übersichtsaufnahme beider SN in niedriger Vergrößerung (Balken = 150 μ m).

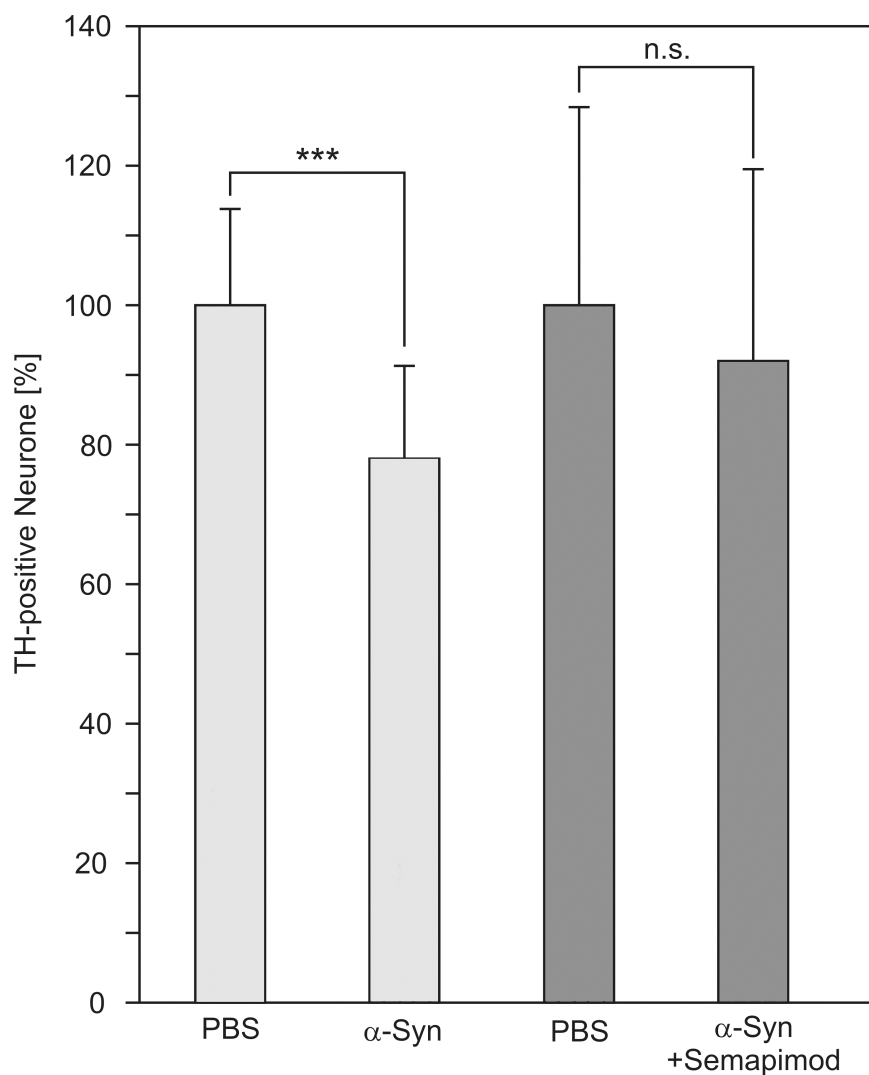


Abb. 23: Quantifizierung der Gesamtzahl TH-positiver Somata in der SNc. Nach intrazerebraler Injektion von PBS oder α -Syn PF in Semapimod behandelten oder unbehandelten Kontrolltieren zeigt sich ein signifikanter α -Syn PF induzierter dopaminergischer Nervenzelltod in der SNc (***) ($p < 0,001$ unter Zuhilfenahme des ANOVA-Tests, $n=10$), der durch die Gabe von Semapimod (CNI-1493) vermindert wurde.

5 Diskussion

Zu Beginn dieser Arbeit existierten zahlreiche Befunde, dass eine neuroinflammatorische Reaktion, morphologisch gekennzeichnet durch aktivierte Mikrogliazellen, den neuronalen Zelltod beim idiopathischen Parkinson-Syndrom (IPS) begleitet. In verschiedenen Studien, in denen eine Degeneration dopaminerger Neurone der SN hervorgerufen wurde, konnte diese Begleitreaktion reproduziert werden. Eine daran anknüpfende antiinflammatorische Therapie reduzierte in einigen Versuchen den neuronalen Schaden.

Die im Folgenden diskutierten Untersuchungen sollen neue Informationen über einen möglichen molekularen Auslöser des chronisch neuroinflammatorischen Prozesses beim IPS erbringen und ein denkbares Konzept über einen therapeutischen Ansatzpunkt aufzeigen.

5.1 Kulturstudien

5.1.1 Kultivierung von Mikrogliazellen

Die in den beschriebenen Experimenten verwendeten Zellkulturmodelle stellen anerkannte Modelle zur Untersuchung möglicher Aktivatoren bzw. Inhibitoren der Mikrogliaaktivität *in vitro* dar (Wollmer et al., 2001; Wilms et al., 2003; Zecca et al., 2008). Der Prozess der Gewinnung, der Aussaat und der späteren Kultivierung ist für sich ein Reiz, der die Mikroglia stimuliert und sie so in einen Zustand erhöhter Aktivierung versetzt. Mikroglia zeigen physiologischerweise eine ramifizierte (spinnenförmige) Morphologie, die den nicht-aktivierten Zustand der Zellen widerspiegelt und dem sensiblen Milieu des ZNS angepasst ist. Der Ruhezustand der Mikroglia wird *in situ* streng durch direkten Zell-zu-Zell-Kontakt zwischen Astrozyten, Neuronen und Mikrogliazellen als auch durch lösliche Kontrollfaktoren hervorgerufen (Wilms et al. 1997). In Kultur kann ein derartiges Netzwerk nicht aufgebaut werden, jedoch kann der Einsatz von AKM einem Reizzustand der Mikroglia entgegenwirken. Ein genaues Profil der Zusammensetzung von AKM ist bis heute nicht bekannt, jedoch werden unter anderem ATP und ATP-Spaltprodukte als potentielle Inhaltsstoffe diskutiert (Wollmer et al. 2001). Neben der Beurteilung der Morphologie (ramifiziert = ruhend, ovoid = aktiviert) dienen die Aktivitätsparameter (keine/geringe NO- oder TNF- α -Produktion) als Nachweis für die Inaktivität der für die *in vitro*-Untersuchungen verwendete Mikroglia. Durch diese Behandlung ist es möglich, nicht bzw. geringgradig voraktivierte Zellen einem definierten Stimulus auszusetzen, um darauf Morphologie und Aktivitätsparameter zu analysieren. Ein charakteristisches Merkmal der Mikroglia ist die schnelle Reaktion der Zellen zu einem frühen Zeitpunkt einer gestörten Homeostase des ZNS.

Der Mikroglia wird aus diesem Grund die Eigenschaft eine Sensorfunktion zugeschrieben. Kultivierte Mikrogliazellen können durch verschiedenste Moleküle aktiviert werden. Es werden konventionelle Stimulatoren wie LPS, INF- γ , PMA (Phorbol ester) von Molekülen seniler Plaques (β -Amyloidpeptid, A β ; Amyloidprecursorpeptid, APP), HIV verwandten Molekülen (Tat, gp41), Zytokinen (IL-1 β , IL-6) und anderen endogenen Molekülen wie Hitzeschockproteine, GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), PAF (*platelet activating factor*) unterschieden (Nakamura, 2002) (\Rightarrow 1.3.1). Bakterielle LPS und INF- γ sind die gängigsten Stimulantien der Mikrogliaaktivität. Nach Inkubation der Mikrogliazellen produzieren diese eine Vielzahl unterschiedlichster neurotoxischer Moleküle, wie etwa TNF- α (Meda et al., 1995), NO (Chao et al., 1992, Wilms et al., 2003) oder reaktive Sauerstoffspezies (Banati et al., 1994). Ein Konzentrationsanstieg der Beispielmoleküle TNF- α und NO im Kulturüberstand spiegelt somit den erhöhten Aktivierungsgrad der stimulierten Zellen wider und wurde in Verbindung mit einer LPS-Stimulation in verschiedenen Arbeiten belegt (Kalehua et al. 2000; Ledebor et al. 2000; Nakamura et al., 1999). Als für das IPS relevanter endogener Aktivator der Mikrogliazellen konnte extrazelluläres humanes NM, das Pigment dopaminerger Neurone durch *in vitro*- und *in vivo*-Modelle identifiziert werden (Wilms et al., 2003; Zecca et al., 2008). Die Aktivierung der Mikroglia ging in diesen Untersuchungen ebenfalls mit einem signifikanten Untergang benachbarter dopaminerger Neurone einher (Zecca et al., 2008).

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Molekül α -Syn ist ein Hauptbestandteil seniler Plaques und LB bei einer Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. M. Alzheimer und dem IPS (Goedert, 2001). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass humanes α -Syn Mikrogliazellen *in vitro* aktiviert und zu einer signifikanten Synthesesteigerung der proinflammatorischen Moleküle TNF- α und NO führt.

In vorangegangenen Arbeiten war es gelungen aktivierte Mikroglia pharmakologisch so zu beeinflussen, dass sie wieder den Ruhezustand annahm (Wollmer et al., 2001). Das Kultursystem ist somit eine gute Möglichkeit, um Wirkstoffe - hier Benzodiazepine und benzodiazepinähnliche Substanzen bzw. MAP-Kinase-Inhibitoren - auf ihre antientzündliche Wirkung an Mikrogliazellen zu untersuchen.

5.1.2 Nachweis des PBR an Mikroglia

Die Basis zur Beantwortung der aufgestellten Thesen ist der Nachweis des PBR an primären Mikrogliazellen der Ratte. Die Expression des PBR wurde durch drei verschiedene Methoden untersucht:

(i) durch eine RT-PCR wurde zunächst überprüft, inwiefern Transkripte der PBR-mRNA in der Mikroglia nachzuweisen waren. Unter Zuhilfenahme des für das Ratten-PBR-Gen spezifischen Primers konnte gezeigt werden, dass das für den PBR kodierende Gen in der Mikroglia der Ratte transkribiert wird. Die Kultivierung von Mikrogliazellen neonataler Wistarratten (P2-3) erlaubt das Anzüchten einer mehr als 98 Prozent reinen, primären Mikrogliakultur. Vor Durchführung der RT-PCR wurde die Homogenität der Kultur durch einen immunhistochemischen Nachweis gegen Mikroglia-assoziierte Antigene (OX-42) bestätigt. (ii) Da die RT-PCR lediglich das Transkript, nicht aber das vollständig exprimierte Protein detektiert, erfolgte der Nachweis des PBR zusätzlich auf Proteinebene im Western-Blot. (iii) Als dritte Nachweismethode ist noch die Immunhistochemie zu nennen, durch die der PBR mit Hilfe von Primärantikörpern gegen den PBR und im Verlauf durch farbgekoppelte Sekundärantikörper nachgewiesen werden konnten.

Die PBR sind ubiquitär in verschiedenen Organsystemen von Säugetieren und dem Menschen vorhanden. Während der PBR physiologisch im ZNS nur schwach exprimiert wird, steigt diese Expression nach einem neuronalen Schaden mit konsekutiver Mikrogliaaktivität an und erweist sich so als Marker für Neuroinflammation und Gliose im geschädigten ZNS (Banati, 2002). Tierstudien zeigten, dass eine neuronale Schädigung durch Exzitotoxizität (Altar und Baudry, 1990), zerebrale Ischämie (Stephenson et al., 1995) und experimentelle Fazialisnervaxotomie (Banati et al., 1997) zu einem deutlichen Anstieg der Expressionsdichte des PBR *in situ* führt. Durch nuklearmedizinische PET-Untersuchungen konnte dieser Dichteanstieg *in vivo* bei Patienten, die an MS (Banati et al., 2000) oder M. Alzheimer (Cagnin et al., 2001) erkrankt waren, nachgewiesen werden. Die zelluläre Quelle für die verstärkte PBR Expression im ZNS wurde kontrovers diskutiert: Die PB-Rezeptorbindung des für die PET-Studien genutzten radioaktiv markierten Liganden PK11195 wurde an Astrozyten (Itzhak et al., 1993) und in Mikrogliaulturen (Stephenson et al., 1995) beschrieben.

Im Fazialisnervaxotomie-Modell, das den Vorteil einer umschriebenen Neurodegeneration bei intakter Blut-Hirn-Schranke bietet, wurde die aktivierte Mikroglia als Hauptbindungsstelle für PBR-Liganden identifiziert (Banati et al., 1997). Diese Befunde konnten in der vorliegenden

Arbeit durch die immunhistochemischen Ergebnisse (stärkste Färbungsintensität in LPS-aktivierter Mikroglia *in vitro*) sowie im Western-Blot und der RT-PCR bestätigt werden.

5.1.3 Freisetzung proinflammatorischer Moleküle und deren Beeinflussung durch PBR-Liganden

Diese Arbeit zeigt, dass die PBR-Liganden PK11195, Midazolam, Clonazepam und Diazepam, nicht jedoch der CBR-Antagonist Flumazenil oder endogenes ODN, die mikrogliale Produktion neurotoxischer Moleküle *in vitro* reduzieren. Eine Suppression der Mikrogliaaktivität könnte indirekt neuroprotektiv sein, da die beiden untersuchten Beispielfaktoren (NO und TNF- α) als potenziell nervenzellschädigend gelten: NO ist neurotoxisch, weil es Komplex I und II der Atmungskette hemmt (Dawson et al., 1993). Des Weiteren bildet NO mit Superoxidanionen Peroxinitrit, ein hoch reaktives Molekül, das zur Oxidation von Proteinen, Lipiden und DNA führen kann und zur striatalen Neurodegeneration in einem Mausmodell des PS *in vivo* geführt hat (Mihm et al., 2001). 3-Nitrotyrosin, ein durch NO katalysiertes Radikal, wurde immunhistochemisch verstärkt in LB bei Parkinson-Patienten nachgewiesen (Good et al., 1998). Die Dichte von Mikrogliazellen, die die induzierbare Form der iNOS exprimieren, ist in der SN bei Patienten mit IPS im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erhöht (Hunot et al., 1996). Erhöhte Konzentrationen des NO-Metaboliten Nitrit wurde im CSF von IPS-Patienten im Vergleich zur gesunden Vergleichsgruppe nachgewiesen (Pennathur et al., 1999), ein Befund, der experimentell in MPTP intoxikierten Mäusen ebenfalls gezeigt werden konnte (Schulz et al., 1995).

TNF- α ist ein wichtiges Zytokin zur Steuerung inflammatorischer Prozesse und zur Regulation des programmierten Zelltodes. TNF- α -produzierende Astrozyten und Mikroglia wurden in der SNc bei IPS-Patienten in unmittelbarer Nachbarschaft von degenerierenden dopaminergen Neuronen nachgewiesen (Hunot et al., 1999). Immunreaktivität von TNF-Rezeptoren zeigte sich an Perikaryen und Zellausläufern vieler dopaminerger Neurone in Gehirnen von Patienten mit IPS (Boka et al., 1994). *In vitro*- und *in vivo*-Studien, in denen TNF-R1 und TNF-R2 Knockout-Mäuse verwendet wurden, zeigten, dass die Aktivierung von TNF-R1 einen neurotoxischen und die Aktivierung von TNF-R2 einen neuroprotektiven Effekt hat (Fontaine et al., 2002; Kassiotis und Kollias, 2001). Eine verstärkte Expression von TNF-R1 konnte in der SN bei Parkinson-Patienten ebenfalls nachgewiesen werden (Mogi et al., 2000). Diese Erkenntnisse legen die Vermutung nahe, dass TNF- α über diesen Rezeptor bei dopaminergen Nigra-Neuronen den Zelltod auslösen könnte. TNF- α führte bei

Primärkulturen von dopaminergen Zellen von Ratten zum Zelluntergang. Die dabei verwendeten Konzentrationen waren ähnlich hoch wie die, die von LPS aktivierten Mikroglia kulturen produziert werden können (Clarke und Branton, 2002), zudem konnte die neurotoxische Wirkung des Mediums LPS aktivierter Mikroglia auf dopaminerge Neurone um 50% durch neutralisierende Anti-TNF- α Antikörper reduziert werden (Gayle et al., 2002). Eine verstärkte Bindung von PBR-Liganden wurde in Verbindung mit verschiedenen Hirntumoren beschrieben (Ferrarese et al., 1989; Black et al., 1990; Ikezaki und Black, 1990). Vorangegangene Arbeiten zeigten, dass Makrophagen in Clustern um Tumoren angelagert sind und dass ihre Präsenz mit einer Tumorregression korreliert. Benzodiazepine binden spezifisch an Rezeptoren von Makrophagen und modulieren *in vitro* ihre Zellantwort (z.B. Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies) (Lenfant et al., 1986). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Kapazität von Makrophagen IL-1, TNF- α und IL-6 freizusetzen durch eine intraperitoneale Injektion des PBR-Liganden Ro5-4864 inhibiert werden konnte (Zavala et al., 1990). Diese *in vivo*-Untersuchungen demonstrierten somit bereits ein antiinflammatorisches Potenzial für PBR-Liganden außerhalb des ZNS.

5.1.4 Einfluss von PBR-Liganden auf die mikrogliale Proliferation

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PBR-Liganden eine antiproliferative Wirkung auf aktivierte Mikrogliazellen *in vitro* haben. Ein antiproliferativer Effekt von Benzodiazepinen konnte bereits an Tumorzellen nachgewiesen werden (Wang et al., 1984). Mikroglia proliferation und -migration in Arealen, in denen Neurodegeneration stattfindet, sind ein Kennzeichen von neurodegenerativen Erkrankungen. Eine Suppression der mikroglialen Proliferation könnte so die inflammatorische Antwort von aktivierten Mikrogliazellen zusätzlich reduzieren.

5.1.5 Bedeutung des PBR in Neuroinflammation und Neurodegeneration

Die funktionelle Bedeutung einer verstärkten Expression des mikroglialen PBR als Antwort auf einen pathologischen Prozess im ZNS ist unbekannt. Eine verstärkte Expressionsdichte des PBR bei neuroentzündlichen und neurodegenerativen Erkrankungen des Menschen könnte eine Adaptation der Mikroglia auf einen prolongierten neuronalen Schaden mit der Freisetzung von toxischen Faktoren sein. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse von Lacor und seinen Mitarbeitern (Lacor et al., 1996,1999) gestützt, die immunhistochemisch einen Anstieg der PBR-Expressionsdichte bei einer Wallerdegeneration während einer

peripheren Nervendegeneration und anschließender Rückkehr der PBR-Expressionsdichte auf physiologische Werte nach Regeneration des Nerven zeigen konnte. Eine mögliche Quelle von endogenen Liganden für den PBR könnten Astrozyten sein, die sogenannte Endozepine, wie den DBI, freisetzen (Patte et al., 1999). Die Bedeutung der Endozepine ist noch unklar. Eine mögliche neuroprotektive pharmakologische Strategie könnte auf den PBR der Mikroglia abzielen, da Diazepam neuroprotektiv in experimentellen Schlaganfallmodellen war (Schwartz-Bloom et al., 2000).

5.2 Studien am Tiermodell

In der vorangegangenen *in vitro* Studie dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bakterielle LPS Mikrogliazellen aktivieren und es so zu einer Freisetzung der beiden neurotoxischen Beispielfaktoren NO und TNF- α kommt. Diese Faktoren spielen auch beim IPS im Rahmen der Neuroinflammation eine Rolle (\Rightarrow 5.1.3). Unklar ist jedoch weiterhin, ob es endogene Faktoren gibt, die ursächlich an der Auslösung und/ oder der Aufrechterhaltung einer chronischen Entzündungsreaktion beim IPS beteiligt sind. Ein mögliches Molekül ist α -Syn. Dieses ist Hauptbestandteil von LB und extrazellulären Filamentablagerungen bei einer Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Parkinson, M. Alzheimer, LBD und der MSA, den sog. Synucleinopathien (\Rightarrow 1.3.2). α -Syn aktiviert proinflammatorische Signalwege in Mikrogliazellen. Die Mikrogliaaktivierung führt zu einer Freisetzung neurotoxischer Moleküle und zu einem damit einhergehenden dopaminergen Zelltod *in vivo*. Dieser Befund könnte ein Hinweis dafür sein, dass eine Mikrogliaaktivierung nicht nur ein Epiphänomen ist, sondern sekundär zur Progression der Neurodegeneration beiträgt. Die Daten dieser Arbeit unterstützen das Konzept, dass eine extrazelluläre Akkumulation von nichtabbaubaren intrazellulären Molekülen, wie α -Syn, die chronische Aktivierung von Mikroglia bei neurodegenerativen Erkrankungen verstärkt und unterhält.

Isoliertes humanes NM, ein unlösliches Pigment dopaminergener Neurone, führte ebenfalls zur Aktivierung von Mikrogliazellen *in vitro* (Wilms et al., 2003) und *in vivo* (Zecca et al., 2008). Im Vergleich zu anderen intrazellulären Proteinen wird α -Syn nach exzitotoxischem und ischämischem Nervenzelltod nicht direkt abgebaut, sondern aggregiert im extrazellulären Raum (Kitamaru et al., 2001). Vorangegangene Arbeiten wiesen α -Syn im Kulturüberstand von kultivierten Neuronen, im CSF (Borghi et al., 2000; El-Agnaf et al., 2003) und im Plasma (Lee et al., 2006) von Parkinson-Patienten und gesunden Kontrollpersonen nach. Die Exozytose von monomerem und aggregiertem α -Syn in den Extrazellulärraum ist in

Verbindung mit proteasomaler und mitochondrialer Dysfunktion erhöht (Lee et al., 2005). Diese Ergebnisse zeigen, dass α -Syn sowohl von gesunden Neuronen als auch verstärkt von degenerierenden Neuronen freigesetzt wird und dass dieser Prozess nicht passiv durch Zellnekrose oder Apoptose stattfindet. Eine direkte Exposition von Mikrogliazellen mit α -Syn ist somit denkbar. Untersuchungsbefunde von Rosenstiel und Mitarbeitern (Rosenstiel et al., 2009) zeigen, dass extrazelluläres α -Syn parallel NF- κ B, p42/44-MAPK- und p38-MAPK-Signalfade in Mikroglia aktiviert. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert die Expression von Genen verschiedener Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 (Collart et al., 1990; Libermann und Baltimore, 1990) und wird als wesentlicher Transkriptionsfaktor für die Mikrogliaaktivität betrachtet (Rosenstiel et al., 2001). Diese Arbeit demonstriert, dass eine Injektion von α -Syn PF rostral der SN von Ratten zu einer Aktivierung von Mikrogliazellen und konsekutivem Zelltod dopaminergener Nigraneurone kommt. Eine pharmakologische Inhibition von MAPK könnte ein therapeutischer Ansatz sein, um die Mikrogliaaktivität zu supprimieren und so den neuronalen Zelltod aufzuhalten. Um diese Arbeitshypothese zu prüfen, erfolgte die Behandlung dieser Tiere mit Semapimod, einem MAP-Kinase Inhibitor, der *in vivo* gut verträglich ist und in klinischen Studien bei schwerem M. Crohn Wirksamkeit bewiesen hat (Hommes et al., 2002; Lowenberg et al., 2005). Semapimod wurde ebenfalls erfolgreich in einem Rattenmodell für rheumatoide Arthritis (Larsson et al., 2005) und der EAE, einem Tiermodell für Multiple Sklerose (Martiney et al., 1998), eingesetzt. Tiere, die eine therapeutische Dosis (10mg/kg KG) erhielten, zeigten einen deutlich verminderten dopaminergen Zelltod nach intrazerebraler Injektion von α -Syn PF. Die Reduktion des neuronalen Zelltodes korrelierte dabei mit einer verminderten Mikrogliainfiltration und einer verminderten Expression der iNOS (Daten nicht dargestellt) auf der Injektionsseite.

5.3 Ausblick

Neurodegenerative Erkrankungen wie das IPS betreffen vorwiegend Menschen höheren Alters. Zwar können im Fall der Parkinson-Erkrankung die Patienten zunächst medikamentös und im Verlauf auch durch die tiefe Hirnstimulation suffizient symptomatisch therapiert werden, jedoch kann der Krankheitsverlauf nicht gestoppt bzw. eine Regeneration eingeleitet werden. Bis heute ist keine kurative Therapie für das IPS verfügbar, daher muss der Entwicklung von Therapieansätzen, die den neurodegenerativen Prozess aufhalten, eine besondere Bedeutung zugemessen werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen erstmals, dass α -Syn, ein Bestandteil der Lewy-Körperchen bei Parkinson-Patienten, zu einer Aktivierung von Mikrogliazellen und darauffolgend zum Untergang von dopaminergen Neuronen führt. Dieser Befund stützt die Vermutung, dass aktivierte Mikroglia zum neuronalen Untergang beim IPS beitragen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Degeneration dopaminergere Nigraneurone durch den immunsupprimierenden Wirkstoff Semapimod reduziert werden konnte. In einer weiteren Reihe von Untersuchungen in dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass PBR immunsuppressive Effekte auf aktivierte Mikrogliazellen vermitteln können. Die PBR aktivierter Mikrogliazellen werden bereits in experimentellen klinischen Studien zum Nachweis von aktiven neuropathologischen Prozessen beim Menschen durch die PET genutzt. In diesen Studien konnte deutlich nachgewiesen werden, dass ein verstärkter Krankheitsprozess mit einer erhöhten Expression des PBR an Mikrogliazellen einhergeht.

Der progressive Verlauf des IPS bietet Manipulationsmöglichkeiten, die den degenerativen Prozess aufhalten sollen. Ein Patient mit IPS wird symptomatisch, wenn 50-70 Prozent der dopaminergen Nigraneurone degeneriert sind. Vor Erreichen der klinischen Symptomatik vergeht so eine präklinische Periode von 5-7 Jahren. Die beiden radiologischen Untersuchungsmethoden PET und die Single Photon Emissions Computer Tomografie (SPECT) sind in der Lage, eine frühe Abnahme der striatalen dopaminergen Funktion nachzuweisen, bevor sich klinische Symptome manifestieren. Diese diagnostische Methode könnte als Screening-Methode für präklinische Patienten mit IPS dienen. Kriterien für den Einschluss in eine Hochrisiko-Population könnten Personen mit einer chronischen Exposition zu Pestiziden, Personen mit einer genetischen Prädisposition oder Personen, die in jungen Jahren eine ZNS-Entzündung, ein ZNS-Trauma erlitten oder neurotoxische Substanzen (z.B. synthetische Drogen) konsumiert haben, sein. An diese Vorsorgeuntersuchungen könnte sich bei einem positiven Befund eine neuroprotektive antiinflammatorische Prophylaxe

anschließen. Bei einem symptomatischen PS könnte eine Dopamin-Substitution kombiniert mit einer antiinflammatorischen Therapie möglicherweise sowohl die Symptome als auch die Progression der Krankheit positiv beeinflussen. Dieser Ansatz käme insbesondere in frühen bzw. mittleren Krankheitsstadien zum Einsatz.

Die genannten Beobachtungen könnten Grundlage für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien zur Behandlung des IPS und anderen neurodegenerativen Erkrankungen sein. Die komplexen zellulären und molekularen Interaktionen bei neurodegenerativen Erkrankungen erscheinen so vielfältig, dass einfache Lösungen sicher nicht zu erwarten sind. Möglicherweise können jedoch einige der hier beschriebenen Befunde dazu beitragen, Anteile des komplexen Geschehens zu verstehen, um die Grundlagen einer wirksamen Therapie für Patienten mit IPS zu schaffen.

6 Zusammenfassung

Das Idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS, Morbus Parkinson), erstmalig 1817 von James Parkinson beschrieben, ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach Morbus Alzheimer. Die Erkrankung betrifft 1-2% der Gesamtpopulation der über 65-jährigen. Das pathologische Korrelat der Erkrankung ist die progressive Degeneration dopaminerger Neurone in der Substantia nigra pars compacta (SNc) des Mittelhirns. Dieser neuronale Zellverlust führt zur Verarmung des Striatums an Dopamin. Wenn ca. 50% der dopaminerger Neurone der SNc abgestorben und damit ca. 70-80% des striatalen Dopamins verloren ist, entwickeln die Patienten die typischen Kardinalsymptome Bradykinese, Ruhetremor, Rigor und posturale Instabilität aus.

Mikroglia sind die residenten Gewebsmakrophagen des ZNS und „Schlüsselzellen“ in der Initiierung und Unterhaltung von Entzündungsreaktionen im Gehirn. Aktivierte Mikrogliazellen setzen proinflammatorische und bekanntermaßen neurotoxische Moleküle frei. Die Degeneration der dopaminerger Nigraneurone beim IPS geht mit einer chronischen Entzündungsreaktion, d.h. Mikrogliaaktivierung, einher. Während wahrscheinlich endogene (genetische Prädisposition) und exogene Faktoren (z.B. Umweltgifte) den dopaminerger Zelltod einleiten, besteht kein Zweifel, dass die begleitende neuroinflammatorische Reaktion den Zellverlust verstärkt. Von degenerierenden dopaminerger Neuronen in den Extrazellulärraum freigesetzte Moleküle stehen in Verdacht, die chronische Mikrogliaaktivierung zu unterhalten. Ein *circulus vitiosus* aus Nervenzelldegeneration und einer daraus resultierenden Aktivierung von Mikrogliazellen mit Freisetzung neurotoxischer Faktoren kann so zur Progression der Erkrankung beitragen. Wirkstoffe, die die Mikrogliaaktivität hemmen, um diesen Teufelskreis zu durchbrechen, geraten aus diesem Grund mehr und mehr in den Fokus der Parkinsonforschung.

Mikrogliazellen exprimieren den peripheren Benzodiazepinrezeptor (PBR). Unter physiologischen Bedingungen erfolgt nur eine schwache Bindung des PBR Liganden PK11195 an Mikrogliazellen, wohingegen nach einem neuronalen Schaden die mikrogliale Expression von PBR stark ansteigt. Eine verstärkte Bindung von radioaktiv markiertem [³H][R]-PK11195 am PBR in PET Studien in klinisch-experimentellen Untersuchungen beim Menschen gilt somit als Marker für eine Schädigung des ZNS. Die Stärke des [³H][R]-PK11195 Signals korreliert hier unmittelbar mit der Krankheitsaktivität. Da die Funktion des PBR bei aktivierten Mikrogliazellen unbekannt ist, ist es das Ziel der vorliegenden Arbeit, verschiedene PBR-Liganden *in vitro* auf ihr antiinflammatorisches Potenzial hin zu

untersuchen. Primäre Mikrogliaulturen exprimieren den PBR. Diese Expression konnte in dieser Arbeit durch die RT-PCR, im Western-Blot und immunzytochemisch nachgewiesen werden. Die Stärke der Expression korrelierte hier mit dem Aktivierungsgrad der Mikroglia. Die in dieser Arbeit untersuchten Benzodiazepine (Clonazepam, Midazolam, Diazepam) und der PBR-Ligand (PK11195) verminderten die Proliferation und die Freisetzung der neurotoxischen Moleküle Stickstoffmonoxid (NO) und Tumor necrosis Faktor- α (TNF- α) im Vergleich zu Lipopolysaccharid (LPS)-aktivierten Kontrollen.

α -Synuclein (α -Syn) Aggregate sind ein Hauptbestandteil von senilen Plaques und Lewy-Körperchen (LB) und spielen eine zentrale Rolle bei einer Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen, den sog. Synucleinopathien (IPS, Morbus Alzheimer, Demenz mit Lewy-Körperchen (LBD), Multisystematrophie (MSA)). Die Exposition von primären Mikrogliaulturen mit α -Synuclein Protofibrillen (α -Syn PF) führt analog zur LPS-Exposition zum aktivierten Phänotyp mit konsekutiver Freisetzung von NO und TNF- α . Die intrazerebrale Injektion von α -Syn PF rostral der Substantia Nigra pars compacta (SNc) von adulten Ratten führte zur tiefen Aktivierung von Mikrogliazellen und zum Verlust von dopaminergen Nigraneuronen. Dieser neuronale Zellverlust konnte durch den antiinflammatorischen Wirkstoff und MAP-Kinase Inhibitor Semapimod reduziert werden.

Eine Beteiligung von Mikrogliazellen im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen und unterschiedlichen ZNS-Läsionen konnte durch verschiedene Studien belegt werden. Dabei bleibt unklar, ob die Mikrogliareaktion zum neuronalen Schaden beiträgt, ob die Zellen eventuell den neuronalen Schaden begrenzen und so regenerativen Einfluss haben oder aber erst nach Untergang der Neurone aktiviert werden. Durch die Freisetzung von neurotoxischen Faktoren können sie im Sinne einer inadäquaten Abwehrreaktion die umgebenden Zellen schädigen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die erhöhte Expressionsdichte der mikroglialen PBR eine Basis für weitere Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung der Mikrogliareaktion auf einen neuronalen Schaden darstellt. Diese Untersuchungen müssen therapeutische Strategien überprüfen, die das Konzept vom *circulus vitiosus* aus neuronalem Zelltod - Neuroinflammation - neuronalem Zelltod anvisieren.

7 Literaturverzeichnis

Abeliovich, A., Y. Schmitz, I. Farinas, D. Choi-Lundberg, W.H. Ho, P.E. Castillo et al. 2000. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25:239-52.

Alam, Z.I., A. Jenner, S.E. Daniel, A.J. Lees, N. Cairns, C.D. Marsden, P. Jenner, B. Halliwell. 1997. Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem* 69:1196-203.

Alho, H., E. Costa, P. Ferrero, M. Fujimoto, D. Cosenza-Murphy, A. Guidotti. 1985. Diazepam-binding inhibitor: a neuropeptide located in selected neuronal populations of rat brain. *Science* 229:179-182.

Aloisi, F. Immune function of microglia. 2001. *Glia* 36:165-179.

Aloisi, F., F. Ria, L. Adorini. 2000. Regulation of T cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol Today* 21:141-147.

Altar, C.A., M. Baudry. 1990. Systemic injection of kainic acid: gliosis in olfactory and limbic brain regions quantified with [³H]PK 11195 binding autoradiography. *Exp Neurol* 109:333-41.

Antkiewicz-Michaluk, L., A.G. Mukhin, et al. 1988. Purification and characterization of a protein associated with peripheral-type benzodiazepine binding sites. *J Biol Chem* 263:17317-17321.

Ashwell, K. 1991. The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Brain Res Dev Brain Res* 58:1-12.

Aubin, N., O. Curet, A. Deffois, C. Carter. 1998. Aspirin and salicylate protect against MPTP-induced dopamine depletion in mice. *J Neurochem* 71:1635-42.

Banati, R.B. 2002. Visualising microglial activation in vivo. *Glia* 40:206-17.

Banati, R.B., J. Gehrman, P. Schubert, G.W. Kreutzberg. 1993. Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7:111-8.

Banati, R.B., M.B. Graeber. 1994. Surveillance, intervention and cytotoxicity: is there a protective role of microglia? *Dev Neurosci* 16:114-27.

Banati, R.B., R. Myers, G.W. Kreutzberg. 1997. PK ('peripheral benzodiazepine')-binding sites in the CNS indicate early and discrete brain lesions: microautoradiographic detection of [³H]PK11195 binding to activated microglia. *J Neurocytol* 26:77-82.

Banati, R.B., J. Newcombe, R.N. Gunn, A. Cagnin, F. Turkheimer, F. Heppner, G. Price, F. Wegner, G. Giovannoni, D.H. Miller, G.D. Perkin, T. Smith, A.K. Hewson, G.

Bydder, G.W. Kreutzberg, T. Jones, M.L. Cuzner, R. Myers. 2000. The peripheral benzodiazepine binding site in the brain in multiple sclerosis: quantitative in vivo imaging of microglia as a measure of disease activity. *Brain* 123:2321-37.

Banati, R.B., P. Schubert, G. Rothe, J. Gehrmann, K. Rudolphi, G. Valet, G.W. Kreutzberg. 1994. Modulation of intracellular formation of reactive oxygen intermediates in peritoneal macrophages and microglia/brain macrophages by propentofylline. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:145-9.

Bas, J., M. Calopa, M. Mestre, D.G. Molleví, B. Cutillas, S. Ambrosio, E. Buendia. 2001. Lymphocyte populations in Parkinson's disease and in rat models of parkinsonism. *J Neuroimmunol* 113:146-52.

Bechmann, I., G. Mor, J. Nilsen, M. Eliza, R. Nitsch, F. Naftolin. 1999. FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia*. 27:62-74.

Benabid, A.L., S. Chabardes, J. Mitrofanis, P. Pollak. 2009. Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for the treatment of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 8:67-81.

Benavides, J., C. Malgouris, F. Imbault, F. Begassat, A. Uzan, C. Renault, M.C. Dubroeuq, C. Gueremy, G. Le Fur. 1983. "Peripheral type" benzodiazepine binding sites in rat adrenals: binding studies with [3H]PK 11195 and autoradiographic localization. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 266:38-49.

Bernheimer, H., W. Birkmayer, O. Hornykiewicz, K. Jellinger, F. Seitelberger. 1973. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci* 20:415-55.

Betarbet, R., T.B. Sherer, G. MacKenzie, M. Garcia-Osuna, A.V. Panov, J.T. Greenamyre. 2000. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 3:1301-6.

Black, K.L., K. Ikezaki, E. Santori, D.P. Becker, H.V. Vinters. 1990. Specific high-affinity binding of peripheral benzodiazepine receptor ligands to brain tumors in rat and man. *Cancer* 65:93-7.

Bianchi, M., O. Bloom, T. Raabe, P.S. Cohen, J. Chesney, B. Sherry, H. Schmidtmayerova, T. Calandra, X. Zhang, M. Bukrinsky, P. Ulrich, A. Cerami, K.J. Tracey. 1996. Suppression of proinflammatory cytokines in monocytes by a tetravalent guanyldrazone. *J Exp Med* 183:927-36.

Bianchi, M., P. Ulrich, O. Bloom, M. Meistrell 3rd, G.A. Zimmerman GA, H. Schmidtmayerova, M. Bukrinsky, T. Donnelley, R. Bucala, B. Sherry, et al. 1995. An

inhibitor of macrophage arginine transport and nitric oxide production (CNI-1493) prevents acute inflammation and endotoxin lethality. *Mol Med* 1:254-66.

Birkmayer, W., O. Hornykiewicz. 1961. The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia. *Wien Klin Wochenschr* 73:787-8.

Björk, L., K.J. Tracey, P. Ulrich, M. Bianchi, P.S. Cohen, K. Akerlund, T.E. Fehniger, U. Andersson, J. Andersson. 1997. Targeted suppression of cytokine production in monocytes but not in T lymphocytes by a tetravalent guanylylhydrazone (CNI-1493) *J Infect Dis* 176:1303-12.

Block, M.L., J.S. Hong. 2005. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol* 76:77-98.

Boka, G., P. Anglade, D. Wallach, F. Javoy-Agid, Y. Agid, E.C. Hirsch. 1994. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 172:151-4.

Borghi, R., R. Marchese, A. Negro, L. Marinelli, G. Forloni, D. Zaccheo, G. Abbruzzese, M. Tabaton. 2000. Full length alpha-synuclein is present in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease and normal subjects. *Neurosci Lett* 287:65-7.

Bossy-Wetzell, E., R. Schwarzenbacher, S.A. Lipton. 2004. Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med* 10:2-9.

Boya, J., J. Calvo, A. Prado. 1979. The origin of microglial cells. *J Anat* 129:177-86.

Braak, H., E. Braak, D. Yilmazer, C. Schultz, R.A. de Vos, E.N. Jansen. 1995. Nigral and extranigral pathology in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 46:15-31.

Braak, H., K. Del Tredici. 2008. Assessing fetal nerve cell grafts in Parkinson's disease. *Nat Med* 14:483-5.

Braak, H., K. Del Tredici, U. Rüb, R.A. de Vos, E.N. Jansen, E. Braak. 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24:197-211.

Braestrup, C., R.F. Squires. 1977. Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H)diazepam binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:3805-3809.

Breider, T., J. Callebert, M.T. Heneka, G. Landreth, J.M. Launay, E.C. Hirsch. 2002. Protective action of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 82:615-24.

Brooks, A.I., C.A. Chadwick, H.A. Gelbard, D.A. Cory-Slechta, H.J. Federoff. 1999. Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. *Brain Res*

823:1-10.

Butovsky, O., M. Koronyo-Hamaoui, G. Kunis, E. Ophir, G. Landa, H. Cohen, M. Schwartz. 2006. Glatiramer acetate fights against Alzheimer's disease by inducing dendritic-like microglia expressing insulin-like growth factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:11784-9.

Butovsky, O., G. Kunis, M. Koronyo-Hamaoui, M. Schwartz. 2007. Selective ablation of bone marrow-derived dendritic cells increases amyloid plaques in a mouse Alzheimer's disease model. *Eur J Neurosci* 26:413-6.

Butterfield, P.G., B.G. Valanis, P.S. Spencer, C.A. Lindeman, J.G. Nutt. 1993. Environmental antecedents of young-onset Parkinson's disease. *Neurology* 43:1150-8.

Cagnin, A., D.J. Brooks, A.M. Kennedy, R.N. Gunn, R. Myers, F.E. Turkheimer, T. Jones, R.B. Banati. 2001. In-vivo measurement of activated microglia in dementia. *Lancet* 358:461-7.

Carlsson, A. 1964. Evidence for a role of dopamine in extrapyramidal functions. *Acta Neuroveg* 26:484-93.

Castano, A., A.J. Herrera, J. Cano, A. Machado. 2002. The degenerative effect of a single intranigral injection of LPS on the dopaminergic system is prevented by dexamethasone, and not mimicked by rh-TNF-alpha, IL-1beta and IFN-gamma. *J Neurochem* 81:150-7.

Chandra, S., G. Gallardo, R. Fernandez-Chacon, O.M. Schluter, T.C. Sudhof. 2005. Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell* 123:383-96.

Chao, C.C., S. Hu, T.W. Molitor, E.G. Shaskan, P.K. Peterson. 1992. Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol* 149:2736-41.

Chen, H., S.M. Zhang, M.A. Hernan, M.A. Schwarzschild, W.C. Willett, G.A. Colditz, et al. 2003. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. *Arch Neurol* 60:1059-64.

Chomczynski, P., N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-9.

Ciccetti, F., A.L. Brownell, K. Williams, Y.I. Chen, E. Livni, O. Isacson. 2002. Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. *Eur J Neurosci* 15:991-998.

Clarke, D.J., R.L. Branton. 2002. A role for tumor necrosis factor alpha in death of dopaminergic neurons following neural transplantation. *Exp Neurol* 176:154-162.

Clarke, G., R.A. Collins, B.R. Leavitt, D.F. Andrews, M.R. Hayden, C.J. Lumsden,

R.R. McInnes. 2000. A one-hit model of cell death in inherited neuronal degenerations. *Nature* 406:195-199.

Clayton, D.F., J.M. George. 1998. The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci* 21:249-54.

Cohen, P.S., H. Nakshatri, J. Dennis, T. Caragine, M. Bianchi, A. Cerami, K.J. Tracey. 1996. CNI-1493 inhibits monocyte/macrophage tumor necrosis factor by suppression of translation efficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3967-71.

Collart, M.A., P. Baeuerle, P. Vassalli. 1990. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 10:1498-506.

Combs, C.K., D.E. Johnson, J.C. Karlo, S.B. Cannady, G.E. Landreth. 2000. Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: inhibition of beta-amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPAR-gamma agonists. *J Neurosci* 20:558-67.

Cserr, H.F., P.M. Knopf. 1992. Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. *Immunol Today* 13:507-12.

Cuadros, M.A., C. Martin, P. Coltey, A. Almendros, J. Navascues. 1993. First appearance, distribution and origin of macrophages in the early development of the central nervous system. *J Comp Neurol* 330:113-129.

Corde, M.G., M. Ferrari, A. Guidotti, D. Konkel, E. Costa. 1984. Isolation, purification and partial sequence of a neuropeptide (diazepam-binding inhibitor) precursor of an anxiogenic putative ligand for benzodiazepine recognition site. *Neurosci Lett* 47:319-24.

Członkowska, A., I. Kurkowska-Jastrzebska, A. Członkowski, D. Peter, G.B. Stefano. 2002. Immune processes in the pathogenesis of Parkinson's disease - a potential role for microglia and nitric oxide. *Med Sci Monit* 8:165-77.

Dahlström, A., A. Wigander, K. Lundmark, C.G. Gottfries, P.M. Carvey, A. McRae. 1990. Investigations on auto-antibodies in Alzheimer's and Parkinson's diseases, using defined neuronal cultures. *J Neural Transm Suppl* 29:195-206.

Dawson, V.L., T.M. Dawson, D.A. Bartley, G.R. Uhl, S.H. Snyder. 1993. Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain culture. *J Neurosci* 13:2651-2661.

De Souza, E.B., R.R. Anholt, et al. 1985. Peripheral-type benzodiazepine receptors in endocrine organs: autoradiographic localization in rat pituitary, adrenal, and testis. *Endocrinology* 116:567-573.

Davalos, D., J. Grutzendler, G. Yang, J.V. Kim, Y Zuo, S. Jung, D.R. Littman, M.L.

Dustin, W.B. Gan. 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci.* 8:752-8.

DeLorey, T.M., R.W. Olsen. 1992. Gamma-aminobutyric acid A receptor structure and function. *J Biol Chem* 267:16747–16750.

Diener, H.C., N. Putzki. 2008. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Thieme, Stuttgart.

Dobrenis, K. Microglia in cell culture and in transplantation therapy for central nervous system disease. 1998. *Methods* 16:320-344.

Deierborg, T., D. Soulet, L. Roybon, V. Hall, P. Brundin. 2008. Emerging restorative treatments for Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 85:407-32.

Du, Y., Z. Ma, S. Lin, R.C. Dodel, F. Gao, K.R. Bales, L.C. Triarhou, E. Chernet, K.W. Perry, D.L. Nelson, S. Luecke, L.A. Phebus, F.P. Bymaster, S.M. Paul. 2001. Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14669-74.

El-Agnaf, O.M., S.A. Salem, K.E. Paleologou, L.J. Cooper, N.J. Fullwood, M.J. Gibson, M.D. Curran, J.A. Court, D.M. Mann, S. Ikeda, M.R. Cookson, J. Hardy, D. Allsop. 2003. Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J* 17:1945-7.

Feng, Z.H., T.G. Wang, D.D. Li, P. Fung, B.C. Wilson, B. Liu, S.F. Ali, R. Langenbach, J.S. Hong. 2002. Cyclooxygenase-2-deficient mice are resistant to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced damage of dopaminergic neurons in the substantia nigra. *Neurosci Lett* 329:354–358.

Ferrarese, C., I. Appollonio, M. Frigo, S.M. Gaini, R. Piolti, L. Frattola. 1989. Benzodiazepine receptors and diazepam-binding inhibitor in human cerebral tumors. *Ann Neurol* 26:564-8.

Fiszer, U., E. Mix, S. Fredrikson, V. Kostulas, H. Link. 1994. Parkinson's disease and immunological abnormalities: increase of HLA-DR expression on monocytes in cerebrospinal fluid and of CD45RO+ T cells in peripheral blood. *Acta Neurol Scand* 90:160-166.

Fiszer, U., K. Piotrowska, J. Korlak, A. Czlonkowska. 1991. The immunological status in Parkinson's disease. *Med Lab Sci* 48:196-200.

Flügel, A., F.W. Schwaiger, H. Neumann, I. Medana, M. Willem, H. Wekerle, G.W. Kreutzberg, M.B. Graeber. 2000. Neuronal FasL induces cell death of encephalitogenic T lymphocytes. *Brain Pathol* 10:353-64.

Fontaine, V., S. Mohand-Said, N. Hanoteau, C. Fuchs, K. Pfizenmaier, U. Eisel. 2002.

Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2. *J Neurosci* 22:1–7.

Gao, H.M., B. Liu, J.S. Hong. 2003a. Critical role of microglia NADPH oxidase-derived free radicals in the MPTP model of Parkinson's Disease. *J Neurosci* 23:1228–1236.

Gao, H.M., B. Liu, W. Zhang, J.S. Hong. 2003b. Synergistic dopaminergic neurotoxicity of MPTP and inflammogen lipopolysaccharide: relevance to the etiology of Parkinson's disease. *FASEB J* 17:1957–1971.

Gao, H.M., B. Liu, W. Zhang, J.S. Hong 2003c. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci* 24:395–401.

Gayle, D.A., Z. Ling, C. Tong, T. Landers, J.W. Lipton, P.M. Carvey. 2002. Lipopolysaccharide (LPS)-induced dopamine cell loss in culture: roles of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and nitric oxide. *Brain Res Dev* 133:27–35.

Gebicke-Haerter, P.J., D. Van Calker, W. Nörenberg, P. Illes. 1996. Molecular mechanisms of microglial activation. Implications for regeneration and neurodegenerative diseases. *Neurochem Int* 29:1-12.

Gehrmann, J., Y. Matsumoto, G.W. Kreutzberg. 1995. Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 20:269-87.

George, J.M. 2002. The synucleins. *Genome Biol* 3.

Gerhard, A., I. Trender-Gerhard, F. Turkheimer, N.P. Quinn, K.P. Bhatia, D.J. Brooks. 2006. In vivo imaging of microglial activation with [(11)C](R)-PK11195 PET in progressive supranuclear palsy. *Mov Disord* 21:89-93.

Gerlach, M., H. Reichmann, P. Riederer. 2007. Die Parkinson-Krankheit. Grundlagen, Klinik, Therapie. Springer. Wien.

Gibb, W.R. 1986. Idiopathic Parkinson's disease and the Lewy body disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol* 12:223-34.

Gibb, W.R. 1992. Melanin, tyrosine hydroxylase, calbindin and substance P in the human midbrain and substantia nigra in relation to nigrostriatal projections and differential neuronal susceptibility in Parkinson's disease. *Brain Res* 581:283-91.

Giulian, D., M. Corpuz. 1993. Microglial secretion products and their impact on the nervous system. *Adv Neurol* 59:315-20.

Goedert, M. 2001. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2:492-501.

Goedert, M., M.G. Spillantini. 1998. Lewy body diseases and multiple system atrophy as alpha-synucleinopathies. *Mol Psychiatry* 3:462-5.

Good, P.F., A. Hsu, P. Werner, P.W. Olanow. 1998. Protein nitration in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:338–342.

Gorell, J.M., C.C. Johnson, B.A. Rybicki, E.L. Peterson, R.J. Richardson. The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology* 50:1346-50.

Hardmann, C.D., J. Henderson, D.I. Finkelstein, G. Paxinos, M.K. Horne, G.M. Halliday. 2002. Comparison of the basal ganglia in rats, marmosets, macaques, baboons and humans: volume and neuronal number for the output and internal relay and striatal modulating nuclei. *J Comp Neurol* 445:238-255.

Heneka, M.T., T. Klockgether, D.L. Feinstein. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands reduce neuronal inducible nitric oxide synthase expression and cell death in vivo. *J Neurosci* 20:6862-7.

Hererra, A.J., A. Castano, J.L. Venero, J. Cano, A. Machado. 2000. The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system. *Neurobiol Dis* 7:429–447.

He, Y., S. Appel, W. Le. 2001. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain Res* 909:187-93.

Hirsch, E.C., S. Hunot. 2009. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol* 4:382-97.

Hommes, D., B. van den Blink, T. Plasse, J. Bartelsman, C. Xu, B. Macpherson, G. Tytgat, M. Peppelenbosch, S. van Deventer. 2002. Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 122:7-14.

Hufschmidt, A., C.H. Lücking. 2006. *Neurologie compact*. Thieme, Stuttgart.

Hunot, S., F. Boissiere, B. Faucheux, B. Brugg, A. Mouatt-Prigent, Y. Agid, E.C. Hirsch. 1996. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience* 72:355-63.

Hunot, S., N. Dugas, B. Faucheux, A. Hartmann, M. Tardieu, P. Debré, Y. Agid, B. Dugas, E.C. Hirsch. 1999. FcεR11/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-α in glial cells. *J Neurosci* 19:3440–3447.

Hunter, D.J. 2005. Gene-environment interactions in human diseases. *Nat Rev Genet* 6:287-98.

Ikezaki, K., K.L. Black. 1990. Stimulation of cell growth and DNA synthesis by

peripheral benzodiazepine. *Cancer Lett* 49:115-20.

Ishikawa, A., H. Takahashi. 1998. Clinical and neuropathological aspects of autosomal recessive juvenile parkinsonism. *J Neurol* 245:4-9.

Itzhak, Y., L. Baker, M.D. Norenberg. 1993. Characterization of the peripheral-type benzodiazepine receptors in cultured astrocytes: evidence for multiplicity. *Glia* 9:211-8.

Jellinger, K. 1989. Alzheimer pathology in Parkinson's disease. *Neurology* 39:874-5.

Jenner, P. 2008. Functional models of Parkinson's disease: a valuable tool in the development of novel therapies. *Ann Neurol* 64:16-29.

Jiang, C., A.T. Ting, B. Seed. 1998. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391:82-6.

Kahle, P.J., M. Neumann, L. Ozmen, V. Muller, S. Odoy, N. Okamoto, et al. 2001. Selective insolubility of alpha-synuclein in human Lewy body diseases is recapitulated in a transgenic mouse model. *Am J Pathol* 159:2215-25.

Kalehua, A.N., D.D. Taub, P.V. Baskar, J. Hengemihle, J. Muñoz, M. Trambadia, D.L. Speer, M.G. De Simoni, D.K. Ingram. 2000. Aged mice exhibit greater mortality concomitant to increased brain and plasma TNF-alpha levels following intracerebroventricular injection of lipopolysaccharide. *Gerontology* 46:115-28.

Kassiotis, G., G. Kollias. 2001. Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: implications for the pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination. *J Exp Med* 193:427-434.

Kastner, A., E.C. Hirsch, O. Lejeune, F. Javoy-Agid, O. Rascol, Y. Agid. 1992. Is the vulnerability of neurons in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease related to their neuromelanin content? *J Neurochem* 59:1080-9.

Kielian, T., M.M. Syed, S. Liu, N.K. Phulwani, N. Phillips, G. Wagoner, P.D. Drew, N. Esen. 2008. The synthetic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist ciglitazone attenuates neuroinflammation and accelerates encapsulation in bacterial brain abscesses. *J Immunol* 180:5004-16.

Kim, W.G., R.P. Mohny, B. Wilson, G.H. Jeohn, B. Liu, J.S. Hong. 2000. Regional difference in susceptibility to lipopolysacchride-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci* 20:6309-6316.

Kakimura, J., Y. Kitamura, K. Takata, Y. Kohno, Y. Nomura, T. Taniguchi. 2001. Release and aggregation of cytochrome c and alpha-synuclein are inhibited by the antiparkinsonian drugs, talipexole and pramipexole. *Eur J Pharmacol* 417:59-67.

Kreutzberg, G. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. 1996. *Trends Neurosci* 9:312-8.

Kristensson, K. 1992. Potential role of viruses in neurodegeneration. *Mol Chem Neuropathol* 6(1-2):45-58.

Kruger, R., W. Kuhn, T. Muller, D. Woitalla, M. Graeber, S. Kosel, et al. 1998. Ala30 Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 18:106-8.

Kukowska-Jatrzebska, I., A. Wronska, M. Kohutnicka, A. Czlonkowski. 1999. The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. *Exp Neurol* 156:50-61.

Lacor, P., J. Benavides, B. Ferzaz. 1996. Enhanced expression of the peripheral benzodiazepine receptor (PBR) and its endogenous ligand octadecaneuropeptide (ODN) in the regenerating adult rat sciatic nerve. *Neurosci Lett* 220:61-5.

Lacor, P., P. Gandolfo, M.C. Tonon, E. Brault, I. Dalibert, M. Schumacher, J. Benavides, B. Ferzaz. 1999. Regulation of the expression of peripheral benzodiazepine receptors and their endogenous ligands during rat sciatic nerve degeneration and regeneration: a role for PBR in neurosteroidogenesis. *Brain Res* 815:70-80.

Langston, J.W., P. Ballard, J.W. Tetrud, I. Irwin. 1983. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219:979-80.

Langston, J.W., L.S. Forno, J. Tetrud, A.G. Reeves, J.A. Kaplan, D. Karluk. 1999. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4 phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol* 46:598-605.

Larsson, E., H.E. Harris, K. Palmblad, B. Månsson, T. Saxne, L. Klareskog. 2005. CNI-1493, an inhibitor of proinflammatory cytokines, retards cartilage destruction in rats with collagen induced arthritis. *Ann Rheum Dis* 64:494-6

Lawson, L.J., V.H. Perry, P. Dri, S. Gordon. 1990. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39:151-70.

Ledeboer, A., J.J. Brevé, S. Poole, F.J. Tilders, A.M. Van Dam. 2000. Interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor-beta differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells. *Glia* 30:134-42.

Lee, P.H., G. Lee, H.J. Park, O.Y. Bang, I.S. Joo, K. Huh. 2006. The plasma alpha-synuclein levels in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J Neural Transm* 113:1435-9.

Lee, H.J., S. Patel, S.J. Lee. 2005. Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *J Neurosci* 25:6016-24.

Lenfant, M., J. Haumont, F. Zavala. 1986. In vivo immunomodulating activity of PK 1195, a structurally unrelated ligand for "peripheral" benzodiazepine binding sites - I. Potentiation in mice of the humoral response to sheep red blood cells. *Int J Immunopharmacol* 8:825-8.

Libermann, T.A., D. Baltimore. 1990. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol* 10:2327-34.

Lieberman, A.P., P.M. Pitha, H.S. Shin, M.L. Shin 1989. Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:6348-6352.

Liu, B., J.S. Hong. 2003. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J Pharmacol Exp Ther* 304:1-7.

Loeffler, D.A., D.M. Camp, S.B. Conant. 2006. Complement activation in the Parkinson's disease substantia nigra: an immunocytochemical study. *J Neuroinflammation* 19:29.

Lotharius, J., P. Brundin. 2002. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and α -Synuclein. *Nat Rev Neurosci* 3:932-42.

Lowenberg, M., A. Verhaar, B. van den Blink, F. ten Kate, S. van Deventer, M. Peppelenbosch, et al. 2005. Specific inhibition of c-Raf activity by semapimod induces clinical remission in severe Crohn's disease. *J Immunol* 175:2293-300.

Luedke, C.E., A. Cerami. 1990. Interferon-gamma overcomes glucocorticoid suppression of cachectin/tumor necrosis factor biosynthesis by murine macrophages. *J Clin Invest* 86:1234-40.

Madewell, B.R., P.H. Gumerlock, K.A. Saunders, F.J. Meyers, S.A. Kraegel, E.S. Kawasaki ES. 1989. Canine and bovine ras family expression detected and discriminated by use of polymerase chain reaction. *Anticancer Res* 9:1743-9.

Mandel, S., O. Weinreb, M.B. Youdin. 2003. Using cDNA microarray to assess Parkinson's disease models and the effects of neuroprotective drugs. *Trends Pharmacol Sci* 24:184-191.

Martiney, J.A., A.J. Rajan, P.C. Charles, A. Cerami, P.C. Ulrich, S. Macphail, K.J. Tracey, C.F. Brosnan. 1998. Prevention and treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by CNI-1493, a macrophage-deactivating agent. *J Immunol* 160:5588-95.

Masters, C., T. Wyss-Coray, G. Painetti. 2008. Anti-inflammatory drugs fall short in Alzheimer's disease. *Nat Med* 14:916.

Matsumoto, Y., M. Fujiwara. 1986. In situ detection of class I and II major histocompatibility complex antigens in the rat central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. An immunohistochemical study. *J Neuroimmunol* 12:265-77.

McEnery, M.W., A.M. Snowman, R.R. Trifiletti, S.H. Snyder. 1992. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3170–3174.

McGeer, E.G., P.L. McGeer. 2005. Pharmacologic approaches to the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Biodrugs* 19:31–37.

McGeer, P.L., E.G. McGeer. 2004. Inflammation and the degenerative diseases of aging. *Ann N Y Acad Sci* 1035:104-16.

McGeer, P.L., S. Itagaki, H. Akiyama, E.G. McGeer. 1988. Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. *Ann Neurol* 24:574-6.

McGeer, P.L., E.G. McGeer. 1995. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev* 21:195-218.

McGeer, P.L., E.G. McGeer. 2008. Glial reactions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 23:474-83

McGeer, P.L., E.G. McGeer, S. Itagaki, K. Mizukawa. 1987. Anatomy and pathology of the basal ganglia. *Can J Neurol Sci* 14:363-372.

Meda, L., M.A. Cassatella, G.I. Szendrei, L. Otvos Jr, P. Baron, M. Villalba, D. Ferrari, F. Rossi. 1995. Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature* 374:647-50.

Menegon, A., P.G. Bord, A.C. Blackburn, G.D. Mellick, D.G. Le Couteur. Parkinson's disease, pesticides, and glutathione transferase polymorphisms. *Lancet* 352:1344-6.

Mihm, M.J., B.L. Schanbacher, B.L. Wallace, L.J. Wallace, N.J. Uretsky, J.A. Bauer. 2001. Free 3-Nitrotyrosine Causes Striatal Neurodegeneration In Vivo. *J Neurosci* 21:149.

Minghetti, L., G. Levi. 1998. Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog Neurobiol* 54:99-125.

Mirza B., H. Hadberg, P. Thomsen, T. Moos. 2000. The absence of reactive astrocytosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. *Neuroscience* 95:425-432.

Mogi, M., A. Togari, T. Kondo, Y. Mizuno, O. Komure, S. Kuno, H. Ichinose, T. Nagatsu. 2000. *J Neural Transm* 107:335-41.

Mogi, M., A. Togari, K. Tanaka, N. Ogawa, H. Ichinose, T. Nagatsu. 1999. Increase in level of tumor necrosis factor (TNF) alpha in 6-hydroxydopamine-lesioned striatum in rats without influence of systemic L-DOPA on the TNF-alpha induction. *Neurosci Lett* 268:101–104.

Nagatsu, T., M. Mogi, H. Ichinose, A. Togari. 2000a. Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 60:277-290.

Nagatsu, T., M. Mogi, H. Ichinose, A. Togari. 2000b. Cytokines in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 58:143–151.

Nagatsu, T., M. Sawada. 2006. Cellular and molecular mechanisms of Parkinson's disease: neurotoxins, causative genes, and inflammatory cytokines. *Cell Mol Neurobiol* 26:779–800.

Nakamura, Y. 2002. Regulating factors for microglial activation. *Biol Pharm Bull* 25:954-953.

Nakamura, Y., Q.S. Si, K. Kataoka. 1999. Lipopolysaccharide-induced microglial activation in culture: temporal profiles of morphological change and release of cytokines and nitric oxide. *Neurosci Res* 35:95-100.

Neumann, H. 2001. Control of glial immune functions by neurons. *Glia* 36:191-199.

Neumann, H., H. Wekerle. 1998. Neuronal control of the immune response in the central nervous system: linking brain immunity to neurodegeneration. *J Neuropath Exp Neurol* 57:1-9.

Nicklas, W.J., I.Vyas, R.E. Heikkila. 1985. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci* 36:2503-8.

Nocjar, C., B.L. Roth, E.A. Pehek. 2002. Localization of 5-HT(2A) receptors on dopamine cells in subnuclei of the midbrain A10 cell group. *Neuroscience* 111:163-76.

Olson, J.M., B.J. Ciliax, W.R. Mancini, A.B. Young. 1988. Presence of peripheral-type benzodiazepine binding sites on human erythrocyte membranes. *Eur J Pharmacol* 152:47-53.

Orr, C.F., D.B. Rowe, G.M. Halliday. 2002. An inflammatory review of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 68:325–340.

Paintlia, A.S., M.K. Paintlia, I. Singh, A.K. Singh. 2006. IL-4-induced peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation inhibits NF-kappaB trans activation in central nervous system (CNS) glial cells and protects oligodendrocyte progenitors under neuroinflammatory disease conditions: implication for CNS-demyelinating diseases. *J Immunol* 176:4385-98.

Papadopoulos, V., A.G. Mukhin, et al. 1990. The peripheral-type benzodiazepine receptor is functionally linked to Leydig cell steroidogenesis. *J Biol Chem* 265:3772–3779.

Patte, C., P. Gandolfo, J. Leprince, J.L. Thoumas, M. Fontaine, H. Vaudry, M.C. Tonon. 1999. GABA inhibits endozepine release from cultured rat astrocytes. *Glia* 25:404-11.

Paulus, W., K. Jellinger. 1991. The neuropathologic basis of different clinical subgroups of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 50:743-55.

Paxinos, G., C.R. Watson, P.C. Emson. 1980. AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. *J Neurosci Methods* 3:129-49.

Pedigo, N.W., H. Schoemaker, M. Morelli, J.N. McDougal, J.B. Malick, T.F. Burks, H.I. Yamamura. 1981. Benzodiazepine receptor binding in young, mature and senescent rat brain and kidney. *Neurobiol Aging* 2:83–88.

Pennathur, S., V. Jackson-Lewis, S. Przedborski, J.W. Heinecke. 1999. Mass spectrometric quantification of 3-nitrotyrosine, ortho-tyrosine, and o,o'-dityrosine in brain tissue of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine-treated mice, a model of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Biol Chem* 274:34621-8.

Perry, V.H. 1998. A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *J Neuroimmunol* 90:113-21.

Poewe, W. Treatments for Parkinson disease - past achievements and current clinical needs. 2009. *Neurology* 72:S65-73.

Polymeropoulos, M.H., C. Lavedan, E. Leroy, S.E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, et al. 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276:2045-7.

Priller, J., A. Flügel, T. Wehner, M. Boentert, C.A. Haas, M. Prinz, F. Fernández-Klett, K. Prass, I. Bechmann, B.A. de Boer, M. Frotscher, G.W. Kreutzberg, D.A. Persons, U. Dirnagl. 2001. Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med* 7:1356-61.

Quilty, M.C., A.E. King, W.P. Gai, D.L. Pountney, A.K. West, J.C. Vickers, et al. 2006. Alpha-synuclein is upregulated in neurons in response to chronic oxidative stress and is associated with neuroprotection. *Exp Neurol* 199:249-56.

Raivich, G., M. Bohatscheck, C.U. Kloss, A. Werner, L.L. Jones, G.W. Kreutzberg. 1999. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Rev* 30:77-105.

Reese, T.S., M.J. Karnovsky. 1967. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 34:207-17.

Reynolds, A., C. Laurie, R.L. Mosley, H.E. Gendelman. 2007. Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Int Rev Neurobiol* 82:297-325.

Riederer, P., S. Wuketich. 1976. Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. *J Neural Transm* 38:277-301.

Rio-Hortega P. 1919. El tercer elemento de los centros nerviosos. *Bol Soc Esp de Biol* 9:69.

Rodriguez M., P. Barroso-Chinea, P. Abdala, J. Obeso, T. Gonzalez-Hernandez. 2001. Dopamine cell degeneration induced by intraventricular administration of 6-hydroxydopamine in the rat: similarities with cell loss in Parkinson's disease. *Exp Neurol* 169:163-181.

Rosenstiel, P., R. Lucius, G. Deuschl, J. Sievers, H. Wilms. 2001. From theory to therapy: implications from an in vitro model of ramified microglia. *Microsc Res Tech* 54:18-25.

Rosenstiel, P., H. Wilms, M. Romero-Ramos, A. Arlt, H. Schäfer, D. Seegert, P.J. Kahle, J.H. Claasen, C. Holzknecht, L.O. Brandenburg, G. Deuschl, J. Sievers, S. Schreiber, D. Kirik, R. Lucius. 2009. Suppression of MAP kinases inhibits microglial activation and neuronal cell death induced by α -Synuclein protofibrils. *Int J Immunopathol Pharmacol* 22:897-909.

Schulz, J.B., R.T. Matthews, M.M. Muqit, S.E. Browne, M.F. Beal. 1995. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *J Neurochem* 64:936-9.

Schwartz, J., T.S. Elizan. 1979. Search for viral particles and virus-specific products in idiopathic Parkinson disease brain material. *Ann Neurol* 6:261-3.

Schwartz, M., G. Moalem, R. Leibowitz-Amit, I.R. Cohen. 1999. Innate and adaptive immune responses can be beneficial for CNS repair. *Trends Neurosci* 22:295-9.

Schwartz-Bloom, R.D., K.A. Miller, D.A. Evenson, B.J. Crain, J.V. Nadler. 2000. Benzodiazepines protect hippocampal neurons from degeneration after transient cerebral ischemia: an ultrastructural study. *Neuroscience* 98:471-84.

Shepherd, C.E., E. Thiel, H. McCann, A.J. Harding, G.M. Halliday. 2002. Cortical inflammation in Alzheimer's disease but not in Lewy body dementia. *Arch Neurol* 57:817-822.

Sies, H. 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 91:31-38.

Sriram, K., J.M. Matheson, S.A. Benkovic, D.B. Miller, M.I. Luster, J.P. O'Callaghan

JP. 2002. Mice deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: implications for Parkinson's disease. *FASEB J* 16:474–476.

Stephenson, D.T., D.A. Schober, E.B. Smalstig, R.E. Mincy, D.R. Gehlert, J.A. Clemens. 1995. Peripheral benzodiazepine receptors are colocalized with activated microglia following transient global forebrain ischemia in the rat. *J Neurosci* 15:5263-74.

Stoll, G., S. Jander. 1999. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol* 58:233-47.

Streit, W.J., S.A. Walter, N.A. Pennell. 1999. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57:563-81.

Surguchov, A. 2008. Molecular and cellular biology of synucleins. *Int Rev Cell Mol Biol* 270:225-317.

Takahashi, M., T. Yamada. 1999. Viral etiology for Parkinson's disease--a possible role of influenza A virus infection. *Jpn J Infect Dis* 52:89-98.

Tallman, J.F., S.M. Paul, P. Skolnick, D.W. Gallager. 1980. Receptors for the age of anxiety: pharmacology of the benzodiazepines. *Science* 207:274–281.

Teismann, P., K. Tieu, O. Cohen, D.K. Choi, D.C. Wu, D. Marks, M. Vila, V. Jackson-Lewis, S. Przedborski. 2003a. Pathologic role of glial cells in Parkinson's disease. *Movement Dis* 18:121–129.

Teismann P., M. Vila, D.K. Cho, K. Tieu, D.C. Wu, V. Jackson-Lewis, S. Przedborski. 2003b. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5473–5478.

Tolwani, R.J., M.W. Jakowec, G.M. Petzinger, S. Green, K. Waggle. 1999. Experimental models of Parkinson's disease: insights from many models. *Lab Anim Sci* 49:363-71.

Tretiakoff, M.C. 1919. Contribution à l'étude de l'anatomie pathologique du locus niger de Soemmering. Thèse, Université de Paris.

Vila, M., S. Przedborski. 2003. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 4:365-75.

Villa, P., M.T. Demitri, C. Meazza, M. Sironi, P. Gnocchi, P. Ghezzi. 1996. Effects of methyl palmitate on cytokine release, liver injury and survival in mice with sepsis. *Eur Cytokine Netw* 7:765-9.

Vowinckel, E., D. Reutens, B. Becher, G. Verge, A. Evans, T. Owens, J.P. Antel. 1997. PK11195 binding to the peripheral benzodiazepine receptor as a marker of microglia activation in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci*

Res 50:345-53.

Wang, J.K., J.I. Morgan, S. Spector. 1984. Benzodiazepines that bind at peripheral sites inhibit cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:753–756.

Weggen, S., J.L. Eriksen, P. Das, S.A. Sagi, R. Wang, C.U. Pietrzik, K.A. Findlay, T.E. Smith, M.P. Murphy, T. Bulter, D.E. Kang, N. Marquez-Sterling, T.E. Golde, E.H. Koo. 2001. A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* 414:212-6.

Wiendl, H., R. Hohlfeld. 2009. Multiple sclerosis therapeutics: unexpected outcomes clouding undisputed successes. *Neurology* 72:1008-15.

Wilms, H., D. Hartmann, J. Sievers. 1997. Ramification of microglia, monocytes and macrophages in vitro: influences of various epithelial and mesenchymal cells and their conditioned media. *Cell Tissue Res* 287:447-58.

Wilms, H., J.H. Claasen, C. Röhl, J. Sievers, G. Deuschl, R. Lucius. 2003. Involvement of benzodiazepine receptors in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases: evidence from activated microglial cells in vitro. *Neurobiol Dis* 14:417-24.

Wilms, H., P. Rosenstiel, J. Sievers, G. Deuschl, L. Zecca, R. Lucius. 2003. Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease. *FASEB J* 17:500-502.

Wollmer, M.A., R. Lucius, H. Wilms, J. Held-Feindt, J. Sievers, R. Mentlein. 2001. ATP and adenosine induce ramification of microglia in vitro. *J Neuroimmunol* 115:19-27.

Wu, D.C., V. Jackson-Lewis, M. Vila, K. Tieu, P. Teismann, C. Vadseth, D.K. Choi, H. Ischiropoulos, S. Przedborski. 2002. Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J Neurosci* 22:1763-71.

Wu, D.C., P. Teismann, K. Tieu, M. Vila, V. Jackson-Lewis, H. Ischiropoulos, S. Przedborski. 2003. NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6145–6150.

Wucherpfennig, K.W. 1994. Autoimmunity in the central nervous system: mechanisms of antigen presentation and recognition. *Clin Immunol Immunopathol* 72:293-306.

Yamada, T., P.L. McGeer, E.G. McGeer. 1992. Lewy bodies in Parkinson's disease are recognised by antibodies to complement proteins. *Acta Neuropathol* 84:100–104.

Zavala, F., V. Taupin, B. Descamps-Latscha. 1990. In vivo treatment with benzodiazepines inhibits murine phagocyte oxidative metabolism and production of

interleukin 1, tumor necrosis factor and interleukin-6. *J Pharmacol Exp Ther* 255:442-50.

Zecca, L., F.A. Zucca, H. Wilms, D. Sulzer. 2003. Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics. *Trends Neurosci* 26:578-80.

Zecca, L., H. Wilms, S. Geick, J.H. Claasen, L.O. Brandenburg, C. Holzknacht, M. Panizza, F.A. Zucca, G. Deuschl, J. Sievers, R. Lucius. 2008. Human neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat substantia nigra: implications for Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 116:47-55.

Zhang, W., T. Wang, Z. Pei, D.S. Miller, X. Wu, M.L. Block, B. Wilson, W. Zhang, Y. Zhou, J.S. Hong, J. Zhang. 2005. Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J* 19:533-542.

Zhao, W., W. Xie, Q. Xiao, D.R. Beers, S.H. Appel. 2006. Protective effects of an anti-inflammatory cytokine, interleukin-4, on motoneuron toxicity induced by activated microglia. *J Neurochem* 99:1176-87.

8 Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem akademischen Lehrer und Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ralph Lucius. Ich möchte ihm für die wissenschaftliche Ausbildung, seine Führung und für unzählige leidenschaftliche Diskussionen um das Thema Neuroinflammation danken.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Henrik Wilms, Heidelberg, für vielfältige Anregungen und Diskussionen bedanken.

Ein großer Dank gilt an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. med. Jobst Sievers, in dessen Arbeitsgruppe ich meine Experimente durchführen konnte sowie für den Kontaktaufbau an das Wallenberg Neurozentrum der Universität Lund/ Schweden.

Von Herrn Dr. rer. nat. Zaal Kokaia habe ich während der Aufenthalte am Wallenberg Neurozentrum das tierexperimentelle Arbeiten gelernt. Ich danke ihm dafür.

Ich möchte mich sehr bei Herrn Prof. Dr. med. Günther Deuschl bedanken, der mir vermittelte, dass Grundlagenforschung ihren Weg in die klinische Anwendung und damit ins „wirkliche Leben“ finden muss. Des Weiteren danke ich ihm für die Unterstützung im Rahmen von Kongressteilnahmen und der Baltic Summerschool.

Frau Rosi Sprang möchte ich herzlich für die sorgfältige Ausbildung in der Zellkultur danken.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Clemens Franke für die Hilfe bei der Anfertigung der Schaubilder in dieser Arbeit.

Zuletzt danke ich sehr meiner Familie, ihre Unterstützung war mir in jeder Situation ein starker und wichtiger Rückhalt. Meinen Eltern ist diese Arbeit gewidmet.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Jan-Hendrik Claasen
Geburtsdatum	02.03.1978
Geburtsort	Flensburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

1998	Abitur am Fachgymnasium Niebüll
------	---------------------------------

Zivildienst

1998-1999	Carl-Ludwig-Jessen-Schule Niebüll
-----------	-----------------------------------

Hochschulbildung

1999-2007	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität (CAU) zu Kiel
2001	Ärztliche Vorprüfung
2003	Erster Teil der Ärztlichen Prüfung
2006	Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung
2006-2007	Praktisches Jahr in der Klinik für Chirurgie, Klinik für Innere Medizin, Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel
2007	Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung und Erhalt der Approbation als Arzt

Stipendien

2003	Stipendium des Wallenberg Neurozentrums der Universität Lund, Schweden
2003-2007	Stipendiat der Friedrich-Ebert-Stiftung Bonn
2004	Stipendium der Stipendiumstiftung der CAU Kiel

Klinische/ wissenschaftliche Tätigkeiten

- 2001 Aufnahme der Doktorarbeit am Institut für Anatomie der CAU Kiel, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Lucius
- 2002 Sechswöchiger Forschungsaufenthalt am Wallenberg Neurozentrum der Universität Lund, Schweden, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Lindvall
- 2003-2004 Einjähriger Forschungsaufenthalt am Stammzellzentrum der Universität Lund, Schweden, Arbeitsgruppe Dr. Z. Kokaia
- 8/ 2004 Einmonatiger Forschungsaufenthalt in der Klinik für Neurochirurgie, University of Chicago, USA
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Penn
- 9/ 2004 Einmonatiger Forschungsaufenthalt am Stammzellzentrum der Universität Lund, Schweden,
Arbeitsgruppe Dr. Z. Kokaia
- 6/ 2007-7/ 2008 Assistenzarzt in der Klinik für Innere Medizin (1. Medizin), UKSH, Campus Kiel
- Seit 7/ 2008 Assistenzarzt in der Klinik für Neurologie, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden
- Seit 7/ 2008 Postdoktorand am Zentrum für Regenerative Therapien Dresden (CRTD), Technische Universität Dresden,
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kempermann
- 2/ 2009 Sonderurlaub und Beginn des BMBF geförderten Forschungsprojektes „Adult human neural stem cell lines of defined potential“
- Seit 4/ 2009 Assistenzarzt am Epilepsie-Zentrum Bethel, Bielefeld

Publikationen

Wilms, H., **J.H. Claasen**, C. Röhl, J. Sievers, G. Deuschl, R. Lucius. 2003. Involvement of benzodiazepine receptors in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases: evidence from activated microglial cells in vitro. *Neurobiol Dis* 14:417-24.

Ekdahl, C.T., **J.H. Claasen**, S. Bonde, Z. Kokaia, O. Lindvall. 2003. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13632-7.

kommentiert 2003 in *Science* 302:1689-90.

Cacci, E., **J.H. Claasen**, Z. Kokaia. 2005. Microglia-derived tumor necrosis factor-alpha exaggerates death of newborn hippocampal progenitor cells in vitro. *J Neurosci Res* 80:789-97.

Heldmann, U., P. Thored, **J.H. Claasen**, A. Arvidsson, Z. Kokaia, O. Lindvall. 2005. TNF- α antibody infusion impairs survival of stroke-generated neuroblasts. *Exp Neurol* 196:204-8.

Zecca, L., H. Wilms, S. Geick, **J.H. Claasen**, L.O. Brandenburg, C. Holzkecht, M.L. Panizza, F.A. Zucca, G. Deuschl, J. Sievers J., R. Lucius. 2008. Neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat substantia nigra - implications for Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 116:47-55.

Rosenstiel, P., H. Wilms, M. Romero-Ramos, A. Arlt, H. Schäfer, D. Seegert, P.J. Kahle, **J.H. Claasen**, C. Holzkecht, L.O. Brandenburg, G. Deuschl, J. Sievers, S. Schreiber, D. Kirik, R. Lucius. 2009. Suppression of MAP kinases inhibits microglial activation and neuronal cell death induced by α -Synuclein protofibrils. *Int J Immunopathol Pharmacol* 22:897-909.