

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

**IMMUNMODULATION ALS THERAPIESTRATEGIE BEIM
IDIOPATHISCHEN PARKINSON-SYNDROM**
INHIBITION DER NEUROINFLAMMATION DURCH
IMMUNMODULATORISCHE KOMPONENTEN DES HELMINTHEN
ACANTHOCHAILONEMA VITAE

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

vorgelegt von

PETER BEHRENDT

aus Kiel

Kiel 2014

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ralph Lucius, Anatomisches Institut der CAU zu Kiel
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Paul Saftig, Biochemisches Institut der CAU zu Kiel

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2014

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 10.07.2014

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|----|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Neurodegenerative Erkrankungen | 1 |
| 1.2 | Morbus Parkinson..... | 1 |
| 1.3 | Entzündungsvorgänge im Zentralnervensystem: Neuroinflammation | 7 |
| 1.3.1 | Mikroglia: Schlüsselzellen der Neuroinflammation..... | 8 |
| 1.3.2 | Immunpathologie des Morbus Parkinson..... | 13 |
| 1.4 | Anti-inflammatorische Strategie beim Morbus Parkinson | 19 |
| 1.5 | Immunmodulation beim Morbus Parkinson..... | 20 |
| 1.5.1 | Immunmodulatorisches Cystatin des Nematoden <i>Acanthocheilonema vitae</i> | 21 |
| 1.6 | Fragestellung | 22 |
| 2 | Material | 23 |
| 2.1 | Geräte | 23 |
| 2.2 | Computersoftware | 23 |
| 2.3 | Verbrauchsmaterialien..... | 24 |
| 2.4 | Chemikalien und Reagenzien..... | 24 |
| 2.5 | Lösungen und Puffer | 26 |
| 2.6 | Immunmodulator | 28 |
| 2.7 | Enzyme, Primer und TaqMan [®] -System (<i>Assay on Demand</i>) | 29 |
| 2.8 | Antikörper | 29 |
| 2.9 | Versuchstiere..... | 29 |
| 3 | Methoden | 30 |
| 3.1 | Zellbiologische Methoden zur Isolierung und Kultivierung primärer Mikrogliazellen | 30 |
| 3.1.1 | Isolierung und Kultivierung primärer Mikroglia..... | 30 |
| 3.1.2 | Stimulationsversuche..... | 31 |
| 3.2 | Morphologie der Mikroglia: Coomassie-Färbung..... | 32 |
| 3.3 | Molekularbiologische Methoden..... | 32 |
| 3.3.1 | Indirekte Stickstoffmonoxid-Messung | 32 |
| 3.3.2 | Isolierung der Gesamt-RNA..... | 32 |
| 3.3.3 | Reverse Transkription | 33 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.3.4 | Quantitative Real-time – PCR (q-PCR)..... | 34 |
| 3.4 | Proteinbiochemische Methoden | 35 |
| 3.4.1 | Western-Blot | 35 |
| 3.4.2 | ELISA..... | 37 |
| 3.5 | Immunzytochemische Färbung | 38 |
| 3.6 | Berechnung, Statistiken, Grafiken und Ausarbeitung | 38 |
| 4 | Ergebnisse | 39 |
| 4.1 | Morphologie rAV17-stimulierter Mikroglia | 39 |
| 4.2 | Immunmodulation oxidativer Stressmechanismen in Mikroglia durch rAV17 | 41 |
| 4.2.1 | Indirekter Nachweis des Moleküls NO | 41 |
| 4.2.2 | Einfluss auf die Expression der iNOS-mRNA in Mikroglia | 42 |
| 4.3 | Immunmodulation der LPS-induzierten Zytokinproduktion in Mikroglia durch rAV17..... | 43 |
| 4.3.1 | IL-6 mRNA-Synthese in Mikroglia..... | 43 |
| 4.3.2 | IL-1 β mRNA-Synthese in Mikroglia..... | 44 |
| 4.3.3 | TNF- α mRNA-Synthese in Mikroglia..... | 45 |
| 4.3.4 | TNF- α -Freisetzung in Mikroglia | 46 |
| 4.4 | Einfluss auf die Expression der COX-2-mRNA in Mikroglia | 47 |
| 4.5 | Einfluss auf die Expression der IL-10-mRNA in Mikroglia | 48 |
| 4.6 | Studien über potentielle Signalwege des Immunmodulators rAV17 | 49 |
| 4.6.1 | Einfluss des Immunmodulators rAV17 auf den ERK-Signalweg in Mikroglia | 49 |
| 4.6.2 | Einfluss des Immunmodulators rAV17 auf den NF- κ B-Signalweg | 51 |
| 5 | Diskussion | 53 |
| 5.1 | Kulturstudien | 54 |
| 5.1.1 | <i>In vitro</i> -Kultivierung von Mikrogliazellen | 54 |
| 5.1.2 | Wissenschaftliche Kontextualisierung der Versuchsergebnisse..... | 54 |
| 5.2 | Ausblick: rAV17 als potentielles Therapeutikum | 64 |
| 6 | Zusammenfassung | 66 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 68 |
| 8 | Danksagungen | 95 |
| 9 | Curriculum vitae | 96 |

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Illustration der Parkinson-Krankheit von Sir William Richard Gowers aus: *A Manual of Diseases of the Nervous System* (Handbuch für Krankheiten des Nervensystems) von 1886. 2
- Abbildung 2:** Einfluss des Immunmodulators rAV17 auf die Morphologie primärer Mikrogliazellen. 40
- Abbildung 3:** Der Immunmodulator reduziert die LPS-induzierte NO-Freisetzung bei simultaner Stimulation der Mikroglia mit LPS und rAV17 nach 6h (A) und 24h (B). 41
- Abbildung 4:** Der Immunmodulator reduziert die LPS-induzierte mRNA-Expression der iNOS bei simultaner Stimulation der Mikroglia mit LPS und rAV17 nach 6h (A) und 24h (B). 42
- Abbildung 5:** Einfluss des Immunmodulators rAV17 auf die mRNA-Expression von IL-6 in primären Mikroglia nach 6h (A) und 24h (B). 43
- Abbildung 6:** Einfluss des Immunmodulators rAV17 auf die mRNA-Expression von IL-1 β in primären Mikroglia nach 6h (A) und 24h (B). 44
- Abbildung 7:** Einfluss des Immunmodulators rAV17 auf die mRNA-Expressionsrate von TNF- α in primären Mikroglia nach 6h (A) und 24h (B). 45
- Abbildung 8:** Einfluss des Immunmodulators rAV17 auf die TNF- α -Freisetzung primärer Mikroglia nach 6h (A) und 24h (B). 46
- Abbildung 9:** Einfluss des Immunmodulators rAV17 auf die mRNA-Expressionsrate von COX-2 in primären Mikroglia nach 6h (A) und 24h (B). 47
- Abbildung 10:** Einfluss des Immunmodulators rAV17 auf die mRNA-Expressionsrate von Il-10 in Mikroglia nach 2h (A), 6h (B) und 24h (C). 48
- Abbildung 11:** Einfluss des Immunmodulators rAV17 auf die ERK1/2-Phosphorylierung in Mikroglia nach 10-minütiger (A) und 15-minütiger (B) Stimulationszeit. 50
- Abbildung 12:** Densitometrische Auswertung der Western-Blot-Ergebnisse: Der Immunmodulator reduziert die Phosphorylierung von ERK1/2 in Mikroglia nach 15-minütiger Stimulationszeit. 50
- Abbildung 13:** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in primären Mikroglia. 52
- Abbildung 14:** Zusammenfassende Darstellung eines möglichen Erklärungsmodells der Effekte von rAV17 bei LPS-aktivierten Mikroglia. 63

Glossarium

| | |
|------------------|---|
| AK | Antikörper |
| ALS | Amyotrophe Lateralsklerose |
| APZ | Antigenpräsentierende Zellen |
| AS | α -Synuclein |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AV | <i>Acanthocheilonema vitae</i> |
| BDNF | <i>brain derived neurotrophic factor</i> |
| BHS | Bluthirnschranke |
| CBD | Kortikobasale Degeneration |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> |
| CED | Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen |
| COX | Cyclooxygenase |
| CSF | Liquor cerebrospinalis |
| DAC | Dopamin-Chinon |
| DAT (AD) | Demenz vom Alzheimer-Typ (<i>Alzheimer disease</i>) |
| DBS | Tiefe Hirnstimulation (<i>deep brain stimulation</i>) |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure (englisch: DNA) |
| DUSPs | <i>dual specificity phosphatases</i> |
| DZ | Dendritische Zellen |
| ERK | <i>Extracellular signal-regulated kinases</i> |
| GABA | γ -Aminobuttersäure (<i>Gamma-aminobutyric acid</i>) |
| GDNF | <i>glial derived neurotrophic factor</i> |
| MH, HD | Morbus Huntington (<i>Huntington disease</i>) |
| HSV | Herpes simplex Virus |
| Ig | Immunglobuline |
| IL | Interleukin (IL-1 β , IL-6, IL-10) |
| IL-10-R | IL-10-Rezeptor |
| INF | Interferon |
| iNOS | Induzierbare NO-Synthase |
| IPS (MP, PD, PS) | Idiopathisches Parkinson-Syndrom (Morbus Parkinson, <i>Parkinson disease</i> , Parkinson-Syndrom) |
| LB | Lewy-Bodies |
| LBD | Demenz vom Lewy-Körperchen-Typ |
| L-DOPA | Levo-Dopamin |
| LPS | Lipopolysaccharide |

| | |
|-----------------------------|---|
| MAPK | <i>mitogen-activated protein kinases</i> |
| MHC | Hauptgewebeverträglichkeitskomplex (<i>Major histocompatibility complex</i>) |
| MPP ⁺ | 1-Methyl-4-phenyl-pyridin |
| MPTP | 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin |
| MS | Multiple Sklerose (Enzephalomyelitis disseminata) |
| MSA | Multisystematrophie |
| N- α -Syn | Nitrotyrosin-modifiziertes α -Synuclein |
| NADPH-Oxidase | Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat- Oxidase |
| NF- κ B | <i>nuklear factor - κB</i> |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen |
| NM | Neuromelanin |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| O ₂ ⁻ | Superoxid-Anion |
| [•] OH | Hydroxyl-Radikal |
| 6-OHDA | 6-Hydroxydopamin |
| ONOO ⁻ | Peroxyinitrit |
| pERK | Phosphorylierte ERK |
| PET | Positronen-Emissions-Tomographie |
| PGE ₂ | Prostaglandin E ₂ |
| PPAR- γ | <i>peroxisome proliferator activated receptor-γ</i> |
| PSB | Progressive supranukleäre Blickparese |
| rAV17 | Rekombinantes 17 Kilodalton schweres Sekretionspeptid des Nematoden <i>Acanthocheilonema viate</i> |
| (m)RNA | Boten-RNA (<i>messenger ribonucleic acid</i>) |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>) |
| SOCS | <i>suppressor of cytokine signaling</i> |
| T _H -Zelle | T-Helferzelle |
| T _{reg} -Zelle | Regulatorische T-Zelle (früher auch Suppressor-T-Zelle) |
| TNF- α | Turmonekrosefaktor- α |
| TNF-R1 | Turmonekrosefaktor- α -Rezeptor 1 |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

1 Einleitung

1.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Im Zuge des demographischen Wandels gewinnen Alterserkrankungen eine zunehmende medizinische und gesundheitsökonomische Bedeutung. Ein Formenkreis dieser Erkrankungen sind die sogenannten neurodegenerativen Erkrankungen, deren bedeutendster Risikofaktor das Alter ist. Sie führen in steigendem Maße zu Behinderung und Beeinträchtigung der Lebensqualität alternder Menschen [1-3]. Neurodegeneration ist definiert als eine nach Entwicklungsabschluss des Zentralnervensystems (ZNS) einsetzende, progredient zunehmende, neuronale Dysfunktion, welche einhergeht mit dem Verlust von Nervenzellen und axonalen Verbindungen im ZNS [4]. Während Gliazellen bei adulten Säugern proliferationsfähig sind, kann der Verlust postmitotisch differenzierter Nervenzellen nur unbefriedigend kompensiert werden. Im Rahmen dieser Erkrankungen kommt es zu einer sukzessiven Atrophie anatomischer Strukturen und funktioneller Einheiten, wie beispielsweise des nigrostriatalen Systems beim Morbus Parkinson [5]. Die verschiedensten potentiellen Auslösefaktoren und die Pathophysiologie der Neurodegeneration sind bis dato nicht abschließend geklärt. Es verdichten sich jedoch Hinweise auf eine multifaktorielle Genese, bei der genetische (endogene), epigenetische und umweltbedingte (exogene) Faktoren interagieren.

Zu den neurodegenerativen Erkrankungen zählt eine große Gruppe klinisch heterogener, neurologischer Erkrankungen, bei denen es zu einer ätiologisch unklaren, selektiven Degeneration bestimmter Neuronenpopulationen in speziellen funktionell-anatomischen Systemen kommt [4]. Klinische Zeichen sind, je nach betroffener Nervenzellpopulation, kognitive, motorische oder sensible Dysfunktionen [6]. Zu diesen neurodegenerativen Erkrankungen zählen die Demenz vom Alzheimer-Typ (DAT, AD), die idiopathische Parkinson-Erkrankung (IPS, M. Parkinson, PD), die Huntington-Erkrankung (HD) und die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) [4, 7, 8].

Diese Arbeit befasst sich schwerpunktmäßig mit dem idiopathischen Parkinson-Syndrom.

1.2 Morbus Parkinson

Definition: Die Symptomkonstellation der „Schüttellähmung“ wurde erstmals 1817 von dem englischen Arzt James Parkinson in seiner Schrift „*An assay of the shaking palsy*“ beschrieben. Es handelt sich um eine chronisch-progredient fortschreitende, neuropsychiatrische Erkrankung. Die Definition erfolgt klinisch-pathologisch durch das gemeinsame Auftreten der Kardinalsymptome Ruhetremor, Rigor, Akinese und posturale Instabilität [8, 9].

Unter neuropathologischen Aspekten zählt das Vorkommen intrazellulärer Einschlusskörperchen, den sogenannten Lewy-Körperchen (engl.: *lewy bodies*, LB), zu den Kerncharakteristika der Parkinson-Erkrankung. Die LB-assoziierte Degeneration betrifft beim IPS typischerweise die dopaminergen Neurone der Substantia nigra pars compacta (SNpc) im Mittelhirn, sodass ein sukzessiver Verlust der nigrostriatalen Projektion ins Striatum resultiert [10].

Das Parkinson-Syndrom kann unter ätiologischen Gesichtspunkten in vier Gruppen untergliedert werden, von denen der von James Parkinson beschriebene idiopathische Morbus Parkinson mit 75 bis 80 Prozent am häufigsten vorkommt [11]:

- Familiäres Parkinson-Syndrom,
- Primäres idiopathisches Parkinson-Syndrom unbekannter Ätiologie (IPS, M. Parkinson),
- Sekundäre symptomatische Parkinson-Syndrome (PS) mit bekannter Ätiologie (entzündlich, metabolisch, vaskulär, medikamenteninduziert, toxininduziert, posttraumatisch),
- Parkinson-Syndrome als Bestandteil anderer neurodegenerativer Erkrankungen (synonym: atypische Parkinson-Syndrome, Parkinson-plus-Syndrome): z.B. die Multisystematrophie (MSA), progressive supranukleäre Blickparese (PSP), kortikobasale Degeneration (CBD), spinocerebelläre Atrophien oder die Demenz vom Lewy-Körperchen-Typ (LBD) [11-13].

Epidemiologie des IPS: Die Parkinson-Krankheit manifestiert sich in der Regel in der 6. Lebensdekade [8]. Während eine Manifestation vor dem 30. Lebensjahr sehr selten ist, steigt die Inzidenz mit zunehmendem Alter deutlich an, von auf 20/100.000 bezogen auf die Gesamtbevölkerung auf 120/100.000 in der siebenten Lebensdekade [11]. Die Prävalenz wird auf 200/100.000 Einwohner geschätzt [8]. Da in den westlich-industrialisierten Staaten der relative Anteil der über 65-Jährigen in den vergangenen Jahrzehnten deutlich angestiegen ist, kann mit einer relevanten Zunahme der Parkinson-Erkrankung gerechnet werden [4].

Die Mortalitätsrate und Lebensqualität bei Parkinson-Patienten hat sich durch das Medikament L-DOPA wesentlich verbessert. Dennoch leiden die meisten Parkinson-Patienten trotz optimaler Therapie nach 5-10 Jahren unter nicht unerheblichen motorischen Behinderungen [11].

Symptomatologie des IPS: Die klinische Diagnose des Parkinson-Syndroms erfolgt durch das Vorhandensein einer Akinesie (Verlangsamung bei der Initiierung und Durchführung willkürlicher Bewegungen, progressive Verlangsamung und Abnahme der Amplitude bei repetitiven Bewegungen) und mindestens einem der folgenden Kardinalsymptome (siehe Abbildung 1):

- Muskulärer Rigor (erhöhter Muskeltonus, gesteigerte tonische Dehnungsreflexe, Zahnradphänomen),
- Ruhetremor (4-6Hz, selten 9 HZ; Auftreten in Ruhe, Abnahme bei Bewegungen),
- Posturale Instabilität (Verminderung der Haltungs- und Stellreflexe, welche primär nicht durch visuelle, vestibuläre, zerebelläre oder propriozeptive Störungen erklärbar sind).



Abbildung 1: Illustration der Parkinson-Krankheit von Sir William Richard Gowers aus: *A Manual of Diseases of the Nervous System* (Handbuch für Krankheiten des Nervensystems) von 1886.

Fakultative Begleitsymptome betreffen das sensorische System (Dysästhesien und Schmerzen), das Vegetativum (Störungen des Blutdruckes, der Temperaturregulation, der Harnblasenfunktion und sexueller Funktionen), psychische Symptome (v.a. Depression, Schlafstörungen) und kognitive Beeinträchtigungen (frontale Störungen, in fortgeschrittenen Stadien Demenz) [13].

Für die Diagnose eines IPS muss zunächst das Parkinson-Syndrom vorliegen und in der Folge ein symptomatisches PS oder häufige Differentialdiagnosen ausgeschlossen werden. Tremor, Rigor und Akinese beginnen bei dem IPS immer halbseitig („Hemi-Parkinson“) [8].

Neuropathologie des IPS: Das neuropathologische Hauptmerkmal der Parkinson-Erkrankung ist ein progressiver Untergang von Nervenzellen der zentralen und kaudalen Anteile der Substantia nigra pars compacta (SNpc) [14], welcher makroskopisch als Depigmentierung der schwarzen Substanz im Mittelhirn imponiert (Erstbeschreibung durch Tretiakoff, 1919 [5]). Diese Nervenzellen produzieren den Neurotransmitter Dopamin und projizieren mit ihren Nervenendigungen (Axonen) in den sogenannten Streifenkörper (Striatum). Es gibt Untersuchungen, dass die dopaminergen Axon-terminalen den primären Ort des neurodegenerativen Prozesses darstellen können und der Untergang der Nervenzellsomata infolge eines „*dying back*“-Phänomens resultieren kann [11, 15].

Der Nachweis einer verminderten Dopamin-Konzentration in den Basalganglien durch *post mortem*-Studien bei Parkinson-Patienten führte zur Formulierung der „Dopaminmangel-Hypothese“, die durch die erfolgreiche Einführung der Levodopa-(L-DOPA) Therapie bestätigt wurde [16-19]. Erste motorische Symptome des IPS manifestieren sich bei einem Dopaminmangel im Striatum von etwa 80%, bei dem bereits 60% der Neurone in der SNpc degeneriert sind [11, 15, 20-22]. Das Ausmaß des Dopaminmangels korreliert mit dem Grad der Akinesie. Außer dieser charakteristischen Neurodegeneration im dopaminergen System, finden sich beim IPS Veränderungen in weiteren anatomischen Regionen. Betroffen sind das noradrenerge (Locus coeruleus), das serotonerge (Raphe Kerne) und das cholinerge System (Nucleus basalis Meynert, dorsaler Motorkern des Vagus). Weiterhin sind spezielle Kortexareale (v.a. Cingulum und Cortex entorhinalis der Hippocampus-formation) und Anteile des autonomen und enterischen Nervensystems betroffen [11, 23-29].

Das zweite neuropathologische Merkmal der Parkinson-Erkrankung sind die zytoplasmatischen Lewy-Körperchen benannt nach ihrem Erstbeschreiber, dem Neurologen Friedrich H. Lewy (1885-1950) [30-32]. LB lassen sich beim IPS in allen betroffenen Hirnregionen nachweisen, wobei sie einem Gradienten vom unteren Hirnstamm über die Basalganglien bis zum Kortex zu folgen scheinen [33]. Biochemisch handelt es sich bei den LB um sphärische, eosinophile Proteinaggregate aus unterschiedlichen Proteinen, zu denen unter anderem das α -Synuclein zählt. Außer bei der Parkinson-Erkrankung kommen LB weiterhin bei der AD und der Demenz vom Lewy-Körperchen-Typ vor [11]. Die beschriebenen funktionell-anatomischen Veränderungen bei der Parkinson-Erkrankung führen zu folgender Vermutung über den Pathomechanismus dieser hypokinetischen Bewegungsstörung: Durch den Dopamin-Mangel beim IPS kommt es zu einer Störung der Impulsmodulation in den Basalganglien, die in eine komplexe fronto-striato-thalamische Regelschleife eingebunden sind.

Im Striatum werden durch das Dopamindefizit inhibitorische GABA-Enkephalin-Neurone disinhibiert, während inhibitorische GABA-Substanz-P-Neurone in ihrer Aktivität gemindert werden [25, 34]. In der Folge werden die sogenannten Ausgangsneurone der Basalganglien disinhibiert, was zu einer tonischen Hemmung der thalamischen Schaltkerne führt. Es wird vermutet, dass auf diese Weise die thalamo-kortikale Projektion vermindert und zeitlich verzögert wird und dadurch die Bewegungsprogramme nicht mehr in ihrer optimalen zeitlichen Sequenz ablaufen.

Ätiologie: Die Ätiologie und Pathogenese des IPS ist unklar. Als ätiopathogenetische Faktoren werden sowohl genetische als auch umweltbedingte Faktoren diskutiert [12]:

- (1) Genetische Determinanten (monogen/polygen)
- (2) Infektionen (Bakterien, Viren)
- (3) Umwelttoxine (Schwermetalle, Pestizide, Herbizide)
- (4) Vermehrte Apoptose (programmierter Zelltod)
- (5) DNA-Alterationen (Mutationen)

(6) Alterungsprozesse: Der physiologische Alterungsprozess zeigt bezüglich des Verlustes dopaminerger Neurone und klinischer Symptome Parallelen mit der Parkinson-Erkrankung auf und gilt als ein Hauptrisikofaktor für das IPS [1-3, 35, 36]. Die Anzahl dopaminerger Neurone nimmt mit einer Rate von 5-10% pro Dekade ab [14], was zu einem geschätzten Verlust von etwa einem Drittel aller dieser Neurone im fortgeschrittenen Alter führt [37]. Zelluläre Pathomechanismen des Alterungsprozesses und des IPS zeigen ebenfalls Gemeinsamkeiten auf. Dennoch unterscheidet sich die Neurotopographie des altersbedingten Verlustes dopaminerger Neurone von derjenigen beim IPS [14, 38-42]. Der mit dem Alter einhergehende Verlust dopaminerger Neurone kann als physiologisch angesehen werden und manifestiert sich per se nicht als IPS [14].

(7) Oxidativer Stress und mitochondriale Dysfunktion: Der Begriff „oxidativer Stress“ beschreibt eine Überschreitung der antioxidativen Kapazitäten einer Zelle durch die exzessive Produktion freier Radikale, welche in der Folge Lipide, Nukleinsäuren, Proteine und andere zelluläre Strukturen schädigen oder endogene Neurotoxine generieren [43-45]. Aktuelle Forschungen schreiben diesem Pathomechanismus eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des IPS zu. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Entdeckung des MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin), welches ein PS-ähnliches Krankheitsbild induziert [46], indem es durch Inhibierung des Komplex-I der Atmungskette den mitochondrialen Elektronentransport blockiert [47]. Tatsächlich weisen Patienten, die an dem IPS erkrankt sind, eine verminderte Komplex-I-Aktivität in der SNpc auf und es wurden Abnormitäten des Komplex-I identifiziert [48, 49]. Durch Komplex-I-Defekte kommt es in Verbindung mit dem hohen Eisen-II-Gehalt in der SN zur vermehrten Bildung von zellschädigenden Hydroxyl-Radikalen ($\cdot\text{OH}$) und letztendlich zur Apoptose-Induktion [45, 50]. Der programmierte Zelltod scheint die finale Endstrecke zellulärer Dysregulationen beim IPS darzustellen [51, 52].

Die Neurone der SN sind in besonderer Art vulnerabel für oxidativen Stress, da ihre Dopaminsynthese mit einer hohen Rate an oxidativen Prozessen verbunden ist [11, 45, 53-55].

Diese Vulnerabilität zeigt sich beispielsweise in der erhöhten Konzentration des 8-Hydroxy-2-Desoxyguanosins (8-OHdG: Biomarker für DNA-Schäden) in der SN von Parkinsonpatienten [56, 57]. Ein weiterer Hinweis für dieses Vulnerabilitätskonzept sind die reduzierten antioxidativen Kapazitäten der dopaminergen Neurone im physiologischen Alterungsprozess und bei Parkinsonpatienten [58-60].

(8) Proteinagglutination: Das pathogenetische Merkmal einiger neurodegenerativer Erkrankungen ist die intra-/extrazelluläre Ansammlung (Akkumulation) und Zusammenlagerung (Aggregation) anormaler Proteine. Diese entstehen vermutlich durch pathologische Fehlfaltungen oder Defekte in den zellulären Abbauwegen dieser Proteinstrukturen wie dem Ubiquitin-System [61, 62]. Der Arbeitsgruppe um Polymeropoulos gelang es 1997 in der größten bislang beschriebenen Familie mit erblichem Parkinsonsyndrom einen mit der Erkrankung korrelierenden Genlocus (PARK 1) auf dem Chromosom 4p21 zu identifizieren [63]. In diesem konnten sie eine *Missense*-Mutation (Ala53Thr) feststellen, welche für das Proteinaggregat α -Synuclein der LB codiert [64-67]. Die Tatsache, dass α -Synuclein in einer aggregierten Form in den charakteristischen LB vorkommt, hat zu der Hypothese geführt, dass die Proteinaggregation ein wichtiger Schritt in der molekularen Pathogenese des IPS sein kann [68-70]. α -Synuclein kommt normalerweise in präsynaptischen Nervenendigungen vor [71-75]. Außer der Regulation der intrazellulären Dopamin-Homöostase wurden für α -Synuclein interessanterweise auch neuroprotektive Effekte beschrieben [62, 76-78]. Anormale Proteininformationen stellen einen möglichen Konvergenzpunkt unterschiedlicher Pathogenesefaktoren dar, insofern, als dass sowohl genetische als auch oxidative Schädigungen von α -Synuclein zu dessen verstärkter Aggregationsneigung zu führen scheinen [43, 62, 79, 80].

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

Therapie des IPS: Zum derzeitigen Zeitpunkt gibt es keine kurative Therapie des IPS. Gängige Therapieoptionen sind rein symptomatisch und versuchen die Lebensqualität der Parkinson-Patienten bis in fortgeschrittene Stadien auf einem hohen Niveau zu halten. Therapieoptionen beim IPS umfassen ein breites Spektrum nicht-medikamentöser Maßnahmen (z.B.: Krankengymnastik, Ergotherapie, psychologische Betreuung etc.) sowie medikamentöse und operative Eingriffe.

Indikation: Der Beginn einer medikamentösen Therapie richtet sich nach dem Patientenalter, dem klinischen Schweregrad, der Erkrankungsdauer und der sozialen Situation. Indikationen für eine stereotaktische Operation (Tiefe Hirnstimulation; engl.: *deep brain stimulation*, DBS) stellen sogenannte Parkinson-Spätsymptome (ON-OFF-Fluktuationen, choreatische Diskinesien, Hyperkinesien, u.a.) dar, bei denen die medikamentösen Therapieoptionen ausgeschöpft sind bzw. eine deutliche Dosissteigerung erfordern würden.

Pharmakotherapie des IPS: Die medikamentöse Therapie erfolgt hauptsächlich mit Wirkstoffen, die den Dopaminspiegel im Gehirn erhöhen. Junge Patienten unter 70 Jahren ohne wesentliche Komorbiditäten erhalten als Erste-Wahl-Medikation Dopamin-Rezeptor-Agonisten. Patienten jenseits des 70. Lebensjahres oder Multimorbide erhalten in der Regel eine Levo(L)-DOPA-Monotherapie [8].

Die Monotherapie wird fortgesetzt solange keine Wirkungsfluktuationen auftreten und ist anderen Anti-Parkinson-Medikamenten (Amantadin, Anticholinergika, Dopaminagonisten, MAO-B-Hemmer) in seiner symptomatischen Wirkung überlegen. Allerdings verzögert L-DOPA nach heutigem Kenntnisstand nicht die Krankheitsprogression. Seine Wirkung lässt nach einigen Jahren (im Durchschnitt nach 5-6 Jahre) nach und es treten ernste motorische Komplikationen (Wirkungsschwankungen und Dyskinesien) und Verwirrungszustände auf [6, 12, 13]. Zur Reduktion bzw. Verzögerung motorischer Nebenwirkungen unter L-DOPA gibt es zugelassene Kombinationspräparate mit Catechol-O-Methyl-Transferase(COMT)-Inhibitoren (Wirksamkeit bisher nicht nachgewiesen) oder Monoaminoxidase-B (MAO-B)-Inhibitoren (milde Wirksamkeit belegt [81]). Die älteste Pharmakostrategie beim IPS sind die Anticholinergika, welche nur noch bei jungen Patienten mit resistentem Tremor als Therapiealternative zum Einsatz kommen [82].

Eine adjuvante Therapieoption und Mittel der Wahl in der akinetischen Krise stellt die Kombination von L-DOPA mit Amantadin dar. Es vermindert die beim IPS auftretende Überaktivität acetylcholinergischer striataler Interneurone und wirkt antagonistisch am N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor. Während einige Untersuchungen eine über den Placeboeffekt hinausgehende Wirksamkeit für unzureichend belegt ansehen [83, 84], sprechen andere Ergebnisse sogar für einen milden neuroprotektiven Effekt durch Amantadin [85]. Aktuell in Studie bezüglich ihrer neuroprotektiven Wirkung befinden sich der Komplex-I-Inhibitor Kreatin, Kalzium-Kanal-Blocker und das den Harnsäurespiegel steigernde Inosin [82].

Stereotaktische Operation (DBS): Die Tiefe Hirnstimulation ist ein minimalinvasives, nicht-ablatives Verfahren, bei welchem durch die Implantation elektrischer Sonden in tiefe intrazerebrale Funktionszentren (Nucleus subthalamicus, Globus pallidus internus) deren pathologische Überaktivität durch elektrische Hochfrequenz-Stimulation reversibel inhibiert werden kann [86]. Diese Methode ist besonders wirksam bei den Kardinalsymptomen Rigor und Tremor [8] und verbessert signifikant die Lebensqualität der Patienten [87]. Die am besten geeignete Zielregion für die Mehrzahl der pharmakologisch „austherapierten“ Parkinson-Patienten stellt der Nucleus subthalamicus (NST) dar, durch dessen Stimulation sich ein hervorragender Effekt auf alle L-DOPA-sensitiven Symptome (Rigor, Akinese, Tremor) erzielen lässt [86, 88-91]. Deuschl und Mitarbeiter zeigten in einer randomisierten kontrollierten Studie, dass die DBS bei Parkinson-Patienten im fortgeschrittenen Stadium der alleinigen medikamentösen Therapie an Effektivität überlegen ist [92]. Die Platzierung im Globus pallidus internus erzielt zusätzlich eine Besserung von Dyskinesien und Dystonien [93].

Regenerative Therapiestrategien: Gegenstand aktuellster Forschungen sind der Ersatz bzw. die Regeneration von irreversibel untergegangenen Neuronen durch Fremdzellen oder eine Gentherapie. Diese Ansätze stellen gegenüber allen anderen Therapiestrategien den Versuch dar, das dopaminerge Defizit beim IPS kausal wiederherzustellen. In der Stammzellforschung kommen zwei unterschiedliche Zelltypen zum Einsatz: Pluripotente Stammzellen (embryonale SZ) und neuronale Stammzellen bzw. Progenitorzellen (Vorläuferzellen). Studer und Kollegen zeigten in einer neuen

Arbeit am Tiermodell mit pluripotenten Stammzellen, die sich von Neuralplatten-Neuronen ableiten, eine effektive Umwandlung in funktionale dopaminerge Neurone und eine komplette Erholung der Parkinsonsymptomatik [94, 95]. Für (induzierte) neuronale Progenitorzellen gibt es ebenfalls erfolgreiche Studienversuche [96-100]. Einen möglichen Rückschlag für die regenerative Medizin stellte die Entdeckung massiver genetischer Veränderungen bei induzierten pluripotenten Stammzellen und human-embryonalen Stammzellen dar [101].

Die Gentherapie verzeichnet erste klinische Erfolge [102, 103].

1.3 Entzündungsvorgänge im Zentralnervensystem: Neuroinflammation

Zentralnervöse Entzündungsvorgänge im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen sind für die Alzheimer-Erkrankung [104], das IPS [105-108], die MS, für Traumata und zerebrale Ischämien beschrieben [109-115]. Obgleich die Entzündungskomponente wahrscheinlich nicht den initialen Auslöser der neurodegenerativen Erkrankungen darstellt, verdichten sich die Hinweise, dass ein anhaltendes Entzündungsgeschehen maßgeblich zur Krankheitsprogression beiträgt.

Das ZNS gilt als ein immun-privilegiertes Organ. Das Phänomen eines „Immunprivilegs“ zeichnet sich durch die reduzierte Aktivierbarkeit des adaptiven und angeborenen Immunsystems im ZNS aus. Während das Immunsystem im restlichen Körper eine essentielle Bedeutung bei der Erhaltung der Gewebeintegrität hat, scheint die Toleranz eines Antigens im schlecht regenerationsfähigen ZNS unter bestimmten Umständen günstiger zu sein. Die Eliminierung eines Störreizes durch eine Immunreaktion nimmt in der Regel eine Art lokalen Kollateralschaden in Kauf. Die Hypothese einer immunologischen Toleranz wurde durch Shirai (1921) erstmals experimentell belegt [116]. P. B. Medawar postulierte anhand seiner Arbeit *„The fate of skin homografts in man“* (1943) [117], dass das ZNS zwar als ein immunologisch spezialisiertes Organ, aber keinesfalls als immunologisch inert zu verstehen sei. Die Existenz zahlreicher Immunzellen im Nervengewebe im Rahmen verschiedener ZNS-Erkrankungen spricht für weitreichende Aktionen des Immunsystems im ZNS [118-121]. Eine Schlüsselfunktion zur Koordination der peripheren und zentralen Immunabwehr im ZNS stellt eine spezielle Subfraktion der Gliazellen dar. Die sogenannten Mikrogliazellen repräsentieren als autochtone Effektorzellen das angeborene Immunsystems im ZNS.

Folgende Besonderheiten zeichnen das ZNS aus immunologischer Sicht aus:

- (1) Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) bildet eine anatomische und physiologische Barriere zwischen dem Intravasalraum und dem Liquor-bestimmten Extrazellularraum des ZNS [122]. Bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen und Gehirnverletzungen kommt es als Komplikation zur Störung dieser selektiven Barrierefunktion, sodass vermehrt periphere Entzündungszellen [123-125] und Entzündungsfaktoren ins Gehirn gelangen können [126-129].
- (2) Das Nervengewebe ist im Gegensatz zu allen anderen Gewebearten nicht an das Lymphsystem angebunden [130]. Dies erschwert die Aktivierung von Immunzellen und Lokalisation des Antigens. Des Weiteren finden sich im gesunden ZNS keine typischen Antigenpräsentierenden-Zellen (APZ)

wie die dendritischen Zellen [120, 131, 132]. Auch die basale Expression von MHC (*major histocompatibility complex*) Klasse-I und -II Molekülen ist im Vergleich zur Peripherie schwächer ausgeprägt [133, 134], sodass Antigen-spezifische T-Zell-Interaktionen erschwert sind [135]. Dennoch besteht im ZNS keine komplette MHC-Restriktion. Aktivierte Mikrogliazellen zeigen eine erhöhte Dichte an MHC-II-Molekülen und sind zur Interaktion mit T-Zellen fähig [135, 136].

(3) Das durch die BHS separierte ZNS-Kompartiment beinhaltet eine Art immunsuppressives Umgebungsmilieu: Astrozyten supprimieren oder anergisieren invadierende Immunzellen und produzieren lokal wirksame Mediatoren wie das Zytokin TGF- β 1 (*transforming growth factor- β 1*), die Entzündungsvorgänge unterdrücken und regulieren [137-140]. Ein Mechanismus, durch den das potentiell gefährliche Patrouillieren invadierter T-Lymphozyten im ZNS verhindert zu werden scheint, ist die verstärkte Expression sogenannter Fas-Liganden (FasL, CD95L), durch welche bei den T-Zellen die Fas (CD95)-vermittelte Apoptose induziert wird [141, 142].

Aufgrund seiner engen Homöostasegrenzen und der geringen neuronalen Regenerationskapazität erfordert das vulnerable neuronale Netzwerk wesentlich strenger regulierte Immunreaktionen [143]. Ein physiologischer Entzündungsprozess verläuft kontrolliert und zeitlich limitiert (transient) ab, beinhaltet zeitgleich immunregulierende und regenerative Mechanismen und ist durch die Elimination des Störreizes primär als vorteilhaft für den Organismus zu werten. Derartige Immuninterventionen erfüllen im ZNS protektive und restaurative Funktionen [143-148]. Anders hingegen sind persistierende Entzündungsreaktionen zu bewerten, die beispielsweise durch die chronische Exposition gegenüber exogenen Umweltgiften oder durch die Formierung endogener Antigene (z.B. Proteinaggregate) getriggert werden können. Eine derartige chronische und unkontrolliert verlaufende Immunreaktion wird als Mitverursacher neurodegenerativer Erkrankungen vermutet. Inwieweit dieses Geschehen als klassische Entzündungsreaktion verstanden werden kann, wird bisher noch kontrovers diskutiert, sodass dieses - im Hinblick auf Ätiologie, Regulation und Konsequenz unklare Phänomen - im Folgenden durch den Terminus *Neuroinflammation* beschrieben wird. Der folgende Abschnitt befasst sich im Detail mit den neuroinflammatorischen Vorgängen beim IPS.

1.3.1 Mikroglia: Schlüsselzellen der Neuroinflammation

Mikrogliazellen stellen eine Subfraktion der Gliazellen dar, die erstmals im 19. Jahrhundert von Rudolf Virchow (1821-1902) entdeckt wurden. Außer der von Virchow postulierten Stütz- und Haltefunktion (gr: *gliocyti* für „Leim“) im ZNS geht die Neurowissenschaft heute von einer wesentlich differenzierteren Bedeutung der Gliazellen bis hin zur Beteiligung an der Informationsverarbeitung aus. Die weitere Kategorisierung der Gliazellen ist dem Neuroanatomen P. del Rio Hortega (1882-1945) zu verdanken, zu dessen Ehren diese Zellen auch Hortega-Zellen genannt werden. In Hortegas klassischer Traktat von 1932 traf er eine Aussage, welche die Neurowissenschaften bis heute beschäftigt und Thema dieses Kapitels ist:

„*Inflammatory processes of any nature are soon to be manifested in the reaction of microglia*“ [149].

Mikroglia sind als residente (ortsansässige) Zellen des mononukleären Phagozytensystems und als APZ die Vertreter des angeborenen Immunsystems im ZNS. Mit einem relativen Anteil von 5-20% aller Gliazellen sind Mikroglia schätzungsweise ebenso zahlreich wie Nervenzellen [150, 151], wobei die Verteilung regional von 0,5 bis 16,6 % schwankt [152]. Im ruhenden Zustand bilden die verzweigten (ramifizierten) Zellen ein lückenloses Überwachungsnetz über das gesamte ZNS.

Bezüglich der ontogenetischen Herkunft der Mikroglia gilt derzeit als allgemeiner Konsens, dass während der Embryonalentwicklung mesodermale Vorläuferzellen der myeloiden Zellreihe in das zentralnervöse Parenchym einwandern und sich dort zu den ruhenden, ramifizierten Mikroglia differenzieren [153-157]. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass sich dieser Typ myeloider Vorläuferzellen von denjenigen der definitiven Hämatopoiese unterscheidet [154, 156, 158, 159].

Die adulte Hämatopoiese scheint keinen Beitrag zur adulten Mikrogliapopulation beizutragen [156], sodass sich Mikroglia demzufolge von den restlichen Gewebemakrophagen durch die Fähigkeit zur lokalen Selbsterhaltung unterscheiden [154, 156, 160, 161]. Eine alternative Hypothese geht von einer kontinuierlichen Unterhaltung der Mikroglia durch Zellen aus dem Knochenmark aus [160, 162, 163].

Die Hauptaufgabe der Mikroglia besteht als „Makrophagen des ZNS“ in der Bewahrung des Nervensystems vor jeglichen exogenen oder endogenen Störeinflüssen und dient somit dem Erhalt der Gewebeintegrität und Gewebemöostase im ZNS. Die Komplexität dieser Aufgabe spiegelt sich in der dynamischen Natur dieser Zellart wider, die sich nach funktionellen und morphologischen Gesichtspunkten in drei Klassen einteilen lässt [149]:

Amöboide Mikroglia sind die Mikrogliaklasse des sich entwickelnden Nervensystems. Durch die enge Interaktion mit den Nervenzellen [154] und Astrozyten [164-166] differenzieren die myeloiden Vorläuferzellen des Knochenmarks zu den residenten Mikroglia, welche als Phagozyten wesentlich am *Remodelling*-Prozess des reifenden Gehirns beteiligt sind [167, 168].

Ramifizierte (ruhende) Mikroglia: Die physiologische Zustandsform in einem störungsfreien ZNS sind ramifizierte Mikroglia. Diese differenzierten Gliazellen haben ein kleines Zytosoma und zahlreiche, fein verzweigte Zellausläufer (Ramifizierung) [149, 153, 169]. Ihr Immunphänotyp zeichnet sich durch eine geringe Dichte an MHC-II-Molekülen und Ko-Stimulatoren (CD86, CD40) aus, sodass sie nicht als suffiziente APZ qualifiziert sind [110, 112, 170, 171]. Dennoch wird der Terminus „ruhend“ keinesfalls dem Funktionszustand der ramifizierten Mikroglia gerecht. *In vivo*-Studien konnten mittels Multiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie die außerordentliche Dynamik der Mikrogliafortsätze visualisieren, sodass einige Autoren die Bezeichnung „wachende“ Mikroglia präferieren [169, 172, 173]. Es wird geschätzt, dass Mikroglia mit ihren Ausläufern das gesamte ZNS innerhalb weniger Stunden überprüfen können. Mikroglia scheinen auch synaptische Netzwerke zu scannen und durch die Entfernung nachteiliger Elemente neuronale Schaltkreise optimieren zu können („*synaptic stripping*“ nach G. Kreutzberg, 1960) [169, 174-176]. Als Instrumente dieser Sensorfunktion besitzen Mikroglia spezielle Rezeptoren, mit denen sie exogene Eindringlinge (mikrobielle Strukturen, Serumproteine), kritische Mediatorkonzentrationen (ATP, Glutamat),

anormale endogene Formationen (Proteinaggregate wie α -Synuclein, β -Amyloid oder Neuromelanin) oder spezielle Immunkomplexe erkennen können [169]. Eine dieser Rezeptorfamilien sind die sogenannten *pattern-recognition-receptors (PRRs)*, von denen die TLR (*toll-like-receptors*) [177-179], CD14 [180] und Mannose-Rezeptoren [181] bei Mikroglia nachgewiesen wurden. Anhand der zahlreichen Sensorinstrumente wird ersichtlich, dass der Funktionszustand der Mikroglia das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels zellulärer und humoraler Faktoren ist, die stimulierend oder inhibitorisch auf die Mikroglia einwirken [171]. Die besondere Bedeutung der interzellulären Kommunikation verdeutlichen Hoek und Kollegen, die die Rezeptor-Ligand-Paare CD200R-CD200 und CX₃CR1-CX₃CL1 zwischen Nervenzellen und Mikroglia als hemmende Schlüsselregulatoren der Mikrogliaaktivität identifizierten [154, 171, 182-185]. Eine Hypothese ist, dass das Wegfallen derartiger inhibitorischer Stimuli im Rahmen von neurodegenerativen Prozessen die Ursache für die rasch folgende Mikrogliaaktivierung ist. Zusammengefasst führt das Überwiegen stimulierender Einflüsse – sei es direkt durch Mikroglia-Aktivatoren oder indirekt durch deren Disinhibition – zum Übergang der Sensor-Mikroglia zu den sogenannten „aktivierten“ Mikroglia.

Aktivierte (reaktive) Mikroglia: Die Mikrogliaaktivierung beschreibt die Transformation der ramifizierten Mikrogliazellen in einen stärker intervenierenden Funktionszustand, der die Eliminierung des Störreizes im ZNS zum Ziel hat. Der Prozess geht einher mit gesteigerter Proliferation [186], Motilität [187] und Erhöhung der Phagozytoseaktivität. Dieser Funktionswandel zeigt sich in ausgeprägten morphologischen und immunphänotypischen Veränderungen. Die Zellmorphologie reaktiver Mikroglia ist charakterisiert durch die Retraktion der Zellausläufer hin zu rund-ovalen, amöboiden Zellen mit vergrößertem Zytosoma [149]. Die zielgerichtete Steuerung der amöboiden Bewegung hin zur Läsion erfolgt über Chemokine und Mediatoren wie extrazelluläres ATP, welche entweder von geschädigten Zellen freigegeben oder von Astrozyten dirigierend sezerniert werden [172]. Untersuchungen zum Migrationsverhalten der Mikroglia zeigen, dass diese innerhalb weniger Minuten das Läsionsgebiet erreichen können und identifizierten den Purinrezeptor P2Y₁₂ als entscheidendes Sensorinstrument im Rahmen der Chemotaxis [172, 188]. Vor Ort steuert das spezifische Lokalmilieu das Expressionsprofil der Mikrogliaaktivierung. Die aktivierten Mikroglia regulieren zahlreiche, immunologisch relevante, Oberflächenmoleküle herauf: TLR, MHC-I- und -II-Moleküle, Kostimulatoren (CD40, CD80=B7.1, CD86=B7.2), Komplementrezeptoren, Fc- γ -Rezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle wie Integrin Iib [106, 130, 164, 171].

Ihre Effektor-Funktion vermitteln sie durch Phagozytose von Zelldebris und die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-6, TNF- α), Chemokine und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) [164, 171]. Gleichzeitig werden anti-inflammatorische Regulatoren (IL-10, TGF- β) freigesetzt und Mechanismen initiiert, die die Neuroprotektion und -regeneration unterstützen [169, 189-191]. Anhand der beschriebenen Mikrogliaaktionen wird ersichtlich, weshalb diese Zellen im Rahmen der angeborenen Immunabwehr des ZNS als „Schlüsselzellen“ bezeichnet werden. Darüber hinaus unterstützen sie durch die Interaktion mit CD4⁺ und CD8⁺-T-Zellen auch die adaptive Immunabwehr [130].

Aktivierte Mikrogliazellen haben die Potenz zu einer suffizienten - mit DZ-vergleichbaren - Antigenpräsentation. Sie vermögen T-Zellen zu re-stimulieren und durch die Sekretion von Mediatoren deren Phänotyp, Aktivierung und Rekrutierung zu steuern [130, 135, 136, 154]. Der Prozess der Mikrogliaaktivierung kann zu jedem Zeitpunkt durch regulatorische Mechanismen an Dynamik verlieren und die Mikroglia gehen in der Folge in ihren nativen oder einen postreaktiven Zustand über.

In den Neurowissenschaften wird das Vorkommen aktivierter Mikrogliazellen im ZNS als ein widersprüchliches Phänomen angesehen, da sie offensichtlich eine essentielle Funktion für die ZNS-Integrität besitzen und zugleich zu zahlreichen Immunpathologien beizutragen scheinen [192]. Während Mikrogliazellen lange Zeit im Verruf standen, über einen stufenartigen Aktivierungsprozess zu neurotoxischen Immunzellen zu transformieren, setzt sich zunehmend ein plastisches Konzept der Mikrogliaaktivierung durch, in welchem die monomorphen aktivierten Mikrogliazellen unterschiedliche funktionale Phänotypen einnehmen können [154, 169, 193-196]. Für die verwandten Makrophagen hat sich die Vorstellung unterschiedlicher Subtypen (M1, M2 a-c) bereits etabliert [70, 197]. Die Idee dieses Konzepts basiert auf detaillierten molekularbiologischen Untersuchungen bei aktivierten Mikroglia. Die Stimulation mit unterschiedlichen Mikrogliaaktivatoren zeigt z.T. stark divergierende Gen-Expressionsprofile, welche eher neuroprotektiv-heilende oder neurotoxisch-schädigende Effekte der Mikroglia im ZNS vermuten lassen [24, 169, 198-201]. Schwartz und Kollegen (2006) zeigten, dass Mikrogliazellen im Hippocampusmodell je nach Aktivierungsbedingungen (IL-4 oder geringe INF- γ -Konzentration versus hohe INF- γ -Konzentration oder LPS oder Amyloid- β) entweder eine Neurogenese adulter neuronaler Progenitorzellen unterstützen oder im anderen Falle blockieren [169, 190].

Die Konsequenz einer Mikrogliaaktivierung für das ZNS scheint demnach wesentlich von den Aktivierungsbedingungen und der nachfolgenden Differenzierung des funktionalen Phänotyps abzuhängen [154, 169, 193]. Im Folgenden seien einige spezielle Mediatoren und Enzyme der Mikroglia im Hinblick auf das IPS erwähnt:

(1) Stickstoffmonoxid (NO) und induzierbare NO-Synthase (iNOS): NO ist der Schlüsselmediator oxidativer Stressmechanismen [202]. Neurotoxische Effekte durch NO entstehen durch das Zusammentreffen einer exzessiven NO-Produktion bei gleichzeitig eingeschränkter antioxidativer Kapazität der Zelle [203, 204]. In der SNpc von Parkinson-Patienten und experimentellen Versuchstieren finden sich zahlreiche aktivierte Mikroglia, deren iNOS-Expression stark gesteigert ist, und die hohe Konzentrationen an NO freisetzen [202, 205-208]. Des Weiteren weisen Parkinsonpatienten im *Liquor cerebrospinalis* (CSF) erhöhte Konzentrationen der NO-Metabolite (Nitrat und Nitrit), erhöhte Produkte der Lipidperoxidation und eine reduzierte Aktivität der antioxidativ wirkenden Superoxid-Dismutase (SOD1) auf [59]. Für ein beeinträchtigt Antioxidatives-System beim PS sprechen auch die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen [204, 209, 210]. In den dopaminergen Neuronen trägt oxidativer Stress über die Störung der Mitochondrien-

funktion und über oxidativen Veränderungen an intrazellulären Makromolekülen zum Nervenzellsterben bei [204, 211-214].

(2) Cyclooxygenase-2 (COX-2): Die Cyclooxygenasen 1 und 2 katalysieren die Umwandlung der Arachidonsäure in die bioaktiven Prostaglandine (Prostanoide) [215]. Durch die Produktion dieser Entzündungsmediatoren (v.a. Prostaglandin E₂) wurden aktivierte Mikrogliazellen in der SNpc und das Enzym COX-2 mit der Pathogenese des IPS assoziiert [70, 213, 216-219]. Die COX-2 Expression und das Endprodukt Prostaglandin E₂ sind in experimentellen Parkinsonmodellen und der SNpc von Parkinsonpatienten erhöht [207, 220-222]. *In vitro*-Studien zeigen, dass speziell aktivierte Mikrogliazellen (Stimulierung mit α -Synuclein, LPS oder MPP⁺ (1-Methyl-4-phenyl-1-pyridin)) gesteigerte Mengen an PGE₂ produzieren [218, 221, 223]. Darüber hinaus konnte bei MPTP-intoxikierten Mäusen eine reduzierte dopaminerge Neurodegeneration durch den Einsatz von COX-2-Inhibitoren oder die transgenetische COX-2-Ablation gezeigt werden [220, 224, 225].

(3) Proinflammatorische Zytokine (Interleukin (IL)-1, IL-6, Tumornekrosefaktor (TNF)- α): Eines der Hauptmerkmale der Mikrogliaaktivierung stellt die exzessive Produktion der sogenannten proinflammatorischen (entzündungsfördernden) Zytokine dar [112, 207, 226, 227]. Im gesunden Gehirn kommen Zytokine in sehr geringen Konzentrationen vor und sind beteiligt an zahlreichen zentralnervösen Funktionen wie Wachstum, Zelldifferenzierung/-proliferation [228], Neurotransmitterfreisetzung [229] oder an Gedächtnisleistungen [230]. Umgekehrt führen veränderte Zytokinspiegel zu neuronaler Dysfunktion und kognitiven Defiziten beim IPS [231, 232]. Im Rahmen der Mikrogliaaktivierung beim IPS [105] werden die dopaminergen Neurone mit einer lokal deutlich erhöhten Konzentration und andersartigen Zusammensetzung dieser Zytokine konfrontiert. In der SN und im CSF von Parkinsonpatienten sowie in experimentellen Parkinson-Tiermodellen sind die Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6) erhöht und gleichzeitig die Werte einiger Neurotrophine reduziert. Entsprechende Zytokinrezeptoren (TNF- α -Rezeptor 1 und IL-1 β -Rezeptor) wurden auf den Somata und Zellausläufern der dopaminergen Neurone der SNpc nachgewiesen. Intrazellulär weisen diese Nervenzellen eine erhöhte Caspase-Aktivität (Caspase 1 / 2) auf [233-239]. Diese Entdeckungen führen zu der Hypothese, dass für die dopaminerge Neurodegeneration beim IPS eine hyperreaktive Immunreaktion mitverantwortlich ist und diese Zytokin-vermittelt zum direkten oder indirekten Zelltod (Apoptose) der Nervenzellen führt [70, 240].

(4) Anti-inflammatorisches Zytokin (Interleukin-10): Anti-inflammatorische (entzündungshemmende) Zytokine wie das IL-10 modulieren Entzündungsreaktionen, indem sie die initiale Immunantwort kontrolliert reduzieren und die Gewebereparatur und Regeneration fördern. Die immense Bedeutung dieser Immunmodulatoren zeigen Untersuchungen bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED), bei denen eine IL-10-Fehlfunktion mit einer besonders frühen Erkrankungsmanifestation und schweren Autoimmunreaktionen assoziiert wird [241-244]. Neuroprotektive Effekte des IL-10 sind für einige Pathologien des ZNS beschrieben [245-253].

Als Hauptquelle der IL-10-Produktion wurden Mikrogliazellen identifiziert [254-257]. IL-10 reduziert die Neurodegeneration in experimentellen Tiermodellen zur Parkinsonerkrankung [258-263].

Die Erforschung anti-inflammatorischer IL-10-Mechanismen beim IPS könnte eine potentielle Therapieoption eröffnen.

1.3.2 Immunpathologie des Morbus Parkinson

Die Degeneration dopaminerger Neurone beim IPS wird von zahlreichen Abnormitäten sowohl des peripheren als auch des zentralen Immunsystems begleitet. Diese betreffen Veränderungen der Lymphozytenfraktionen, der Immunglobulinsynthese, der Zytokinbildung oder der Synthese von Akute-Phase-Proteinen. Derartige Abnormalitäten lassen sich im CSF, im Blut oder in *post mortem*-Untersuchungen von Parkinsonpatienten nachweisen und lassen eine generalisierte Stimulation des peripheren und zentralen Immunsystems vermuten [24, 264, 265].

(1) Peripheres Immunsystem: Untersuchungen bei Patienten mit IPS zeigen eine verminderte Gesamtzahl der Lymphozyten im peripheren Blut, wobei unter den T-Zellen ($CD3^+$) insbesondere der Anteil der T-Helferzellen (T_H -Zellen, $CD4^+$) reduziert ist [266-268]. Das Verhältnis von $CD4^+$ - zu den zytotoxischen $CD8^+$ -T-Zellen ist zugunsten der $CD8^+$ -Zellen verschoben und das Helferzell-Verhältnis zugunsten der INF- γ -produzierenden T_{H1} -Zellen [269]. Antigen-erfahrene T-Zellen sind durch die $CD45RO^+$ -Isoform charakterisiert, welche ebenfalls beim IPS erhöht ist [266]. Insgesamt lassen diese Befunde eine periphere Lymphozytenaktivierung mit Betonung des proinflammatorischen $T_{H1}/CD8^+$ -Phänotyps beim IPS annehmen. Außer diesen quantitativen Veränderungen weisen die Lymphozyten beim IPS morphologische Alterationen und ein vermindertes Proliferationspotential nach Stimulationen mit Mitogenen auf, was Ausdruck einer eingeschränkten zellulären Immunantwort sein kann [265]. Periphere Lymphozyten von Parkinsonpatienten, insbesondere die $CD4^+$ -T-Zellen, scheinen besonders vulnerabel für Apoptose-Programme zu sein, und zwar durch ähnliche Mechanismen wie bei den dopaminergen Neuronen. Die Lymphozyten zeigen Defekte in mitochondrialen Komplexen und im Ubiquitin-Proteasom-System sowie Apoptosemerkmale wie eine vermehrte Fas-Expression, Caspase-Aktivierungen und DNA-Schäden [270-273].

Eine weitere Besonderheit der Lymphozytenfraktion ist das vermehrte Vorkommen der sogenannten $\gamma\delta^+$ -T-Zellen im CSF und im Serum von Parkinsonpatienten [274]. Diese T-Zell-Subpopulation verlässt den Thymus in einem voraktivierten Zustand und scheint aufgrund seiner T-Zell-Rezeptor-unabhängigen Aktivierung durch Zytokine an der frühen Phase von Immunantworten beteiligt zu sein. Die $\gamma\delta^+$ -T-Zellen wurden durch ihr vermehrtes Vorkommen bei Erkrankungen wie der MS [275] oder der Rheumathoiden Arthritis [276] mit pathologischen Autoimmunreaktionen assoziiert. Darüber sind erhöhte $\gamma\delta^+$ -T-Zell-Werte nach spezifischen viralen Infektionen beschrieben [277, 278], sodass dieser Befund die ätiologische Virushypothese der Parkinsonerkrankung stützen könnte. Veränderungen auf diesem Gebiet zeigen auch die im Vergleich zu Kontrollgruppen signifikant erhöhten Titer für HSV-Antikörper bei Parkinsonpatienten [279, 280]. Die Virushypothese erlangte vermehrte

Aufmerksamkeit, nachdem es zu Beginn des 20. Jahrhunderts im Rahmen einer Grippe-Pandemie zu zahlreichen Fällen eines post-enzephalitischen (*Enzephalitis lethargica*) Parkinsonsyndroms gekommen war. Neuere Studien stellen diesen Zusammenhang jedoch in Frage [281-283].

Eine Autoimmunhypothese des IPS wird durch das Vorkommen autoreaktiver Antikörper (Auto-AK) bei einigen Parkinsonpatienten gestützt. Zahlreiche Studien haben Immunglobuline im CSF und Serum nachgewiesen, welche mehr oder weniger spezifisch an Epitope (dopaminerge) Neurone binden [284-289]. Orr und Kollegen fanden eine positive Korrelation zwischen IgG-markierten dopaminergen Neuronen und dem Vorkommen CD64⁺ (Fcγ-Rezeptor-1 für IgG)-positiver Mikroglia [288]. Anti-dopaminerge Auto-AK können über die Opsonierung der Neurone zu einer Mikroglia-vermittelten Neurodegeneration beitragen, da die genetische Depletion des IgG-Rezeptors CD64⁺ sowohl die Mikrogliaaktivierung als auch die Neurodegeneration im Tiermodell verhindert [290, 291]. Da sich jedoch auch bei einem großen Prozentanteil gesunder Menschen ZNS-reaktive Auto-AK nachweisen lassen [292], ist die Frage nach einem Kausalzusammenhang zwischen den Auto-AK und der Pathogenese des IPS noch weitestgehend unbeantwortet. Abgesehen von dieser Fragestellung nutzten Han und Mitarbeiter (2012) die Existenz dieser Antikörper als Biomarker zur Etablierung eines möglichen *screening*-Instruments für das IPS [293].

Es gibt mehrere Hypothesen über die Entstehung von Autoimmunpathologien beim IPS. In Analogie zur Virushypothese geht eine Vermutung dahin, dass spezifische Infektionen die Bildung von Auto-AK triggern, indem die Erreger Strukturen aufweisen, die durch ihre Ähnlichkeit zu entsprechenden Selbst-Antigenen eine Fehlaktivierung des Immunsystems zur Folge haben. Eine derartige Proteinsequenz-Homologie ist für das mykobakterielle Hitzeschockprotein (HSP)-65 beschrieben, welches als Epitop auf einer Vielzahl von Mikroorganismen vorkommt und bereits im Zusammenhang mit ZNS-Autoimmunpathologien diskutiert wurde. HSP sind bekannte Aktivatoren von $\gamma\delta^+$ -T-Zellen und kommen beispielsweise in den LB dopaminerge Neurone vor [275, 294-296]. Des Weiteren können intrazelluläre Proteinmodifikationen durch oxidative Stressmechanismen zur Formation von endogenen Neoantigenen führen, die durch den Nervenzelluntergang für das Immunsystem zugänglich werden. Nitrotyrosin-modifiziertes α -Synuclein aus LB wurde bei MPTP-intoxikierten Mäusen in zervikalen Lymphknoten nachgewiesen, wo es periphere APZ und T-Zellen aktiviert [297-300]. Die beschriebenen Erkenntnisse legen eine Beteiligung humoraler und zellulärer Mechanismen des peripheren Immunsystems beim IPS nahe.

(2) Zentrales Immunsystem: Die Hypothese einer zentralen Immunpathologie beim IPS wurde maßgeblich durch den *post mortem*-Nachweis zahlreicher MHC-II-positiver, aktivierter Mikrogliazellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu untergegangenen dopaminergen Neuronen erhärtet [105]. Durch moderne bildgebende Verfahren (PET) lässt sich die vermehrte Mikrogliaaktivierung beim IPS neuerdings auch *in vivo* nachweisen [108, 301]. Die nigrale Mikrogliaaktivierung lässt sich in nahezu allen Tiermodellen der Parkinsonerkrankung nachvollziehen, in welchen ein parkinsonoides Syndrom durch Neurotoxine oder genetische Zellmanipulationen induziert wird [67, 302-314]. Außer der

Möglichkeit eines Epiphänomens deuten zahlreiche Studien auf einen kausalen Zusammenhang zwischen der Neurodegeneration und der Mikrogliaaktivierung beim IPS hin. Die Mikrogliaaktivierung erfolgt beim IPS nicht generalisiert im gesamten ZNS, sondern selektiv in den Gebieten des neuronalen Zelltodes. In den degenerierten Arealen geht die Mikrogliaaktivierung dem Nervenzelltod voran und eine Inhibition derselbigen reduziert den Verlust dopaminergener Neurone in der SNpc [312-317]. Die SN scheint durch die höchste Mikroglia-dichte im gesamten ZNS und ein Glia/Neuronen-Verhältnis von 3:1 in besonderer Weise für jegliche Formen von Immunaktivierung vulnerabel zu sein [150, 318]. Der Immunphänotyp der Mikroglia zeigt beim IPS und in entsprechenden Tiermodellen alle Eigenschaften aktivierter Mikrogliazellen. Die exzessive Produktion proinflammatorischer Zytokine und ROS sowie die Aktivierung von COX-1, COX-2, iNOS und der NADPH-Oxidase lassen einen neurotoxischen Phänotyp im Rahmen dieser Mikrogliaaktivierung annehmen [24, 206, 207, 238, 319, 320].

Die Heraufregulierung der MHC-II-Moleküle zur Antigen-Präsentation deutet zusätzlich auf eine Interaktion mit dem adaptiven Immunsystem hin. Tatsächlich weisen Parkinsonpatienten eine Infiltration der SNpc mit CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen auf [105, 125, 297, 321]. Die selektive Infiltration der SN und die Abwesenheit von NK-Zellen oder B-Zellen deuten auf eine zielgerichtete Chemotaxis hin [125]. Mikroglia sind in der Lage voraktivierte T-Zellen im ZNS zu re-stimulieren [135]. Über eine Restimulation von T_H1-Zellen wird vermutet, dass Mikroglia zu einer T_H1-Zell-abhängigen Verstärkung der Neuroinflammation und der Gewebeschädigung beitragen. Neuere Studien bestätigen diese Hypothese durch die Entdeckung von Nitrotyrosin-modifiziertem α -Synuclein (N- α -Syn) in zervikalen Lymphknoten von MPTP-intoxikierten Mäusen [297]. Dieses wird dort von Dendritischen Zellen prozessiert und führt zu einer suffizienten Immunisierung peripherer T-Zellen, welche nachfolgend die SN infiltrieren. Insbesondere die T-Zell-Subtypen T_H1 und T_H17 scheinen über die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren und die Modulation der Mikrogliaaktivierung die Neurodegeneration zu unterstützen [125, 298, 300]. Sowohl die Infiltration peripherer Immunzellen als auch der Austritt von Nervenzellbestandteilen wird vermutlich durch die beeinträchtigte BHS bei Parkinsonpatienten ermöglicht. Gliale Mediatoren wie NO oder TNF- α stören die Integrität der BHS und Chemokine führen zur Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle, die die selektive Leukozytendiapedese fördern [129, 139, 322-328]. Die genetische Ablation von T-Zellen im experimentellen MPTP-Parkinsonmodell führt zu einer reduzierten dopaminergen Neurodegeneration, wobei dieser neuroprotektive Effekt insbesondere durch Ausschaltung der CD4⁺-T-Zellen erreicht wurde [297]. Umgekehrt führte ebenso der adoptive Transfer von mit N- α -Syn-stimulierten T_H-Zellen zur Beschleunigung des Nervenzelluntergangs im MPTP-Modell [297, 298]. Gemeinsam mit den Veränderungen im peripheren Immunsystem sprechen diese Ergebnisse für eine gestörte Immuntoleranz mit zentralnervöser Beteiligung des adaptiven Immunsystems beim IPS.

Die Endstrecke der beschriebenen humoralen und zellulären neurotoxischen Faktoren stellen intrazelluläre Mechanismen in den dopaminergen Neuronen dar. Diese betreffen nach aktuellem

Forschungsstand insbesondere die Akkumulation modifizierter Proteinaggregate, die oxidative Dysregulierung oder direkte Apoptose-einleitende Signalwege (\rightarrow 1.2). Während die zahlreichen Pathogenesefaktoren beim IPS lange Zeit mehr oder weniger unabhängig bzw. konkurrierend nebeneinander standen, enthüllen neuere Forschungsergebnisse immer stärkere Interaktionen.

Die besondere Vulnerabilität dopaminerger Neurone für oxidativen Stress steht interessanterweise in engem Zusammenhang mit deren Dopamin-Metabolismus. Die zelluläre Dopamin-Homöostase wiederum scheint durch Proteinaggregate wie α -Synuclein gestört zu werden, durch die Dopamin aus dessen Speichervesikeln freigesetzt wird [329-331]. Im Zytosol kommt es zur Autoxidation von Dopamin zu dem endogenen Zytotoxin Dopamin-Chinon (DAC) und zur Produktion zahlreicher ROS. Dieser Prozess wird durch den erhöhten Eisengehalt in der SN und die erhöhten Enzymaktivitäten, wie der COX-2, bei Parkinsonpatienten unterstützt [220, 332, 333]. Gemeinsam mit der mitochondrialen Dysfunktion und den eingeschränkten antioxidativen Kapazitäten beim IPS kommt es durch die oxidativen Modifikationen an Proteinen, Membranlipiden und der DNS zur Störung zahlreicher Zellfunktionen und nachfolgend zur Apoptose.

Was die Chronologie der Neuroinflammation im Pathogeneseprozess des IPS anbetrifft, scheint diese im Wesentlichen als Reaktion auf den initial stattfindenden dopaminergen Zelltod zustande zu kommen. Offensichtlich scheint der idiopathische Auslöser der dopaminergen Neurodegeneration einen eigendynamischen Prozess in Gang zu setzen, in welchem Bestandteile der absterbenden Neurone die umgebenden Mikroglia bis hin zu peripheren T-Lymphozyten aktivieren. In der Folge kommt es zur Ausbildung einer hyperreaktiven Immunreaktion, die das chronische Sterben dopaminerger Neurone in der SNpc aktiv unterhält. Es entsteht ein sogenannter *circulus vitiosus*, welcher unabhängig von dem ursprünglichen Auslöser fortbesteht und als dessen zentrales Element die Mikrogliaaktivierung angenommen wird. Für diese Hypothese spricht die Entdeckung von Langston und Kollegen (1999), die bei Personen, die durch den Konsum von MPTP-enthaltenden Drogen ein Parkinsonsyndrom entwickelt hatten, noch Jahre nach der eigentlichen Intoxikation aktivierte Mikrogliazellen in der SNpc nachweisen konnten [46].

Im Folgenden sollen vor dem Hintergrund der Neuroinflammation die wichtigsten Moleküle vorgestellt werden, welche im Rahmen eines experimentellen Parkinsonmodells untersucht wurden, und die im Verdacht stehen, die Aktivierung lokaler Mikroglia zu vermitteln:

(1) 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP): Das Neurotoxin MPTP verursacht nachgewiesen ein akutes Parkinsonsyndrom beim Menschen. MPTP entsteht bei der unsachgemäßen Herstellung von synthetischem Heroin und hatte 1982 bei jugendlichen Drogenkonsumenten zu einem PS geführt, das dem IPS in klinischer und neuropathologischer Hinsicht ähnelt [334]. Intravenös injiziertes MPTP überwindet die BHS und wird durch die gliale Monoaminoxidase B zu dem aktiven Zytotoxin MPP^+ umgewandelt, welches durch seine hohe Affinität zu dem Dopamin-Transporter DAT Zugang zum Intrazellulärraum dopaminerger Neurone gewinnt [11]. Der entscheidende Pathomechanismus des MPP^+ scheint die Hemmung des mitochondrialen Komplexes I der

Atmungskette zu sein [335]. Diese geht einher mit der massiven Produktion von ROS und mit der Störung zahlreicher ATP-abhängiger Zellmechanismen [336-338]. Die Aktivierung pro-apoptotischer Signalwege nach MPTP-Administration spricht für den programmierten Zelltod als zelluläre Endstrecke der MPTP-Intoxikation [339-341]. Außer diesem direkten Neuroneneffekt scheint auch eine MPTP-abhängige Mikrogliaaktivierung als Pathogenesefaktor in Frage zu kommen, da die Anwesenheit von Mikrogliazellen die MPTP-Toxizität im Kulturmodell potenziert [342, 343]. *Post mortem*-Analysen nach MPTP-Intoxikation beim Menschen oder im Tiermodell zeigen große Mengen aktivierter Mikrogliazellen in der SNpc [46, 305]. Expressionsanalysen dieser Mikrogliazellen weisen eine deutlich verstärkte Expression proinflammatorischer Mediatoren wie IL-1 β , IL-6, TNF- α , der iNOS und NADPH-Oxidase auf [233, 319, 344-347]. Umgekehrt führt die genetische Ablation der COX-2 [220], der iNOS [346], der NADPH-Oxidase [319] oder des Zytokins TNF- α [348] zu einer reduzierten Neurodegeneration. Darüber hinaus zeigten Sriram und Kollegen (2006), dass die Mikrogliaaktivierung im Rahmen der MPTP-Intoxikation der dopaminergen Neurodegeneration vorausgeht [349]. Zusammenfassend stützen die Versuche mit MPTP eine kausale Bedeutung der Mikrogliazellen für den Neurodegenerationsvorgang.

(2) 6-Hydroxydopamin (6-OHDA): Bei diesem Neurotoxin handelt es sich um eine oxidierte Variante des Dopamins. Tierversuche mit 6-OHDA stellen das älteste und am häufigsten verwendete experimentelle Parkinsonmodell dar. Dieses Modell eignet sich durch seine eindeutige klinische Präsentation [350] gut zur Testung von Antiparkinsonika bis hin zu Stammzellversuchen [351, 352]. Ungerstedt und Mitarbeiter beschrieben 1968 erstmals die selektive Degeneration monoaminerger Neurone im ZNS nach unilateraler Injektion von 6-OHDA in die SNpc oder in das mittlere Vorderhirnbündel [353]. Der zytotoxische Mechanismus beinhaltet die Generation zahlreicher ROS und Chinone [354, 355], welche über die Störung bedeutender Zellfunktionen zur Apoptose führen [356]. In Analogie zum MPTP-Modell ist auch für die 6-OHDA-Intoxikation eine begleitende Mikrogliaaktivierung beschrieben [302, 303]. Die erhöhte Konzentration mikroglialer Mediatoren wie dem TNF- α , IL-1 β und IL-6, in Kombination mit der Reduktion neurotrophischer Faktoren wie dem BDNF im CSF und in *post mortem*-Analysen der nigrostrialen Region von 6-OHDA-intoxizierten Ratten, sprechen für eine Mikroglia-vermittelte inflammatorische Komponente der 6-OHDA-Toxizität [344]. Diese Hypothese unterstützen *in vivo*-PET-Analysen der Mikrogliaaktivierung nach 6-OHDA-Injektion [357, 358].

Kuhn und Kollegen (2006) führten detaillierte Expressionsanalysen bei Mikrogliazellen durch, welche mit dem Oxidationsprodukt Dopamin-Chinon (DAC) aktiviert wurden. DAC entsteht im Rahmen der 6-OHDA-Intoxikation und induziert *in vitro* bei Mikrogliazellen ein neurotoxisches Genexpressionsprofil mit selektiver Induktion neurotoxisch-assoziiierter Gene und Herabregulierung neuroprotektiver Gene [199]. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese zeigten He und Kollegen (2001), dass es nach der 6-OHDA-Injektion nahezu zu einer Verdopplung der Mikrogliaanzahl in der

SNpc kommt, dass diese Rekrutierung der eigentlichen Neurodegeneration vorangeht und dass eine Hemmung der Mikrogliaaktivierung durch Minocyclin die 6-OHDA-Toxizität vermindert [303].

(3) Lipopolysaccharid (LPS): LPS wird bei dem Zerfall gramnegativer Bakterien als toxisches Endotoxin frei [359] und kann über die zirkumventrikulären Organe Zugang zum ZNS erhalten [360]. Dort bindet es an die Mikroglia-rezeptoren CD14 und TLR4 [361, 362]. Die nachfolgende Aktivierung des NF- κ B-Signalweges führt zur Aktivierung der Mikroglia und zu einer gesteigerten Produktion zahlreicher Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6), Chemokine, Prostaglandine und ROS [164, 363-367]. Durch seine direkte Mikrogliaaktivierung und Auslösung einer selektiven dopaminergen Neurodegeneration nach intranigraler Injektion hat sich LPS als Substanz eines experimentellen Parkinsonmodells mit Betonung der Neuroinflammationskomponente etabliert [308, 368]. Eine maßgebliche Entdeckung in diesem Zusammenhang machte die Arbeitsgruppe um W.G. Kim (2000): die Injektion derselben LPS-Dosis in die Hippocampus-, Kortex- oder SN-Region führte bei adulten Ratten zu einer selektiven Neurodegeneration der dopaminergen SN-Neurone. Diese wurde begleitet von einer starken Mikrogliaaktivierung und einer massiven Produktion proinflammatorischer Zytokine und ROS. Aufgrund der äquivalenten Reaktion der regionalen Mikroglia auf die LPS-Konfrontation vermuten Kim und Mitarbeiter als Ursache der regional unterschiedlichen LPS-Suszeptibilität die anlagebedingt hohe Mikroglia-dichte in der SN. Für die Mikrogliaaktivierung als eigenständigen Pathogenesefaktor spricht weiterhin, dass sie der eigentlichen LPS-induzierten Neurodegeneration vorausgeht [367, 368] und ihre Inhibition durch Pharmaka wie Dexamethason mit einer deutlichen Reduktion des Nervenzellsterbens einhergeht [317]. Saijo und Kollegen (2009) zeigten zudem, dass die neuroinflammatorische Reaktion auf LPS hauptsächlich durch die Mikroglia, weniger durch Astrozyten und praktisch nicht durch Neurone zustande kommt [369]. Neben den akuten LPS-Injektionsversuchen, bei welchen als Konfundierungseffekt eine transiente Störung der BHS nicht auszuschließen ist, führt auch die systemische LPS Applikation zu einer Mikrogliaaktivierung und progressiven Degeneration der dopaminergen SN-Neurone im Mäusemodell [309, 370].

Die Erkenntnisse aus dem LPS-Modell unterstützen das Pathogenesekonzept der Neuroinflammation und unterstreichen das neurotoxische Potential aktivierter Mikrogliazellen.

(4) Neuromelanin (NM): In Analogie zum Melanin der Melanozyten bezeichnet man als NM ein zytosolisches Polymer der dopaminergen Neurone der SNpc, welches als schwarz-bräunliches Pigment dieser Region ihr charakteristisches Kolorit verleiht [371]. *Post mortem*-Untersuchungen sprechen dafür, dass es sich bei der NM-Formation um einen normalen Vorgang in der SN handelt [372], zumal einige Forschungsergebnisse dem NM eine physiologische Bedeutung als zelluläres Antioxidans zusprechen [373]. Das Vorläufermolekül des Neuromelanins, Aminochrom, entsteht bei der spontanen Autooxidation von zytosolischem Dopamin. Dieser Entstehungsmechanismus über die zytotoxischen Vorläufermoleküle DAC und Aminochrom kann die neurotoxischen Effekte von freiem NM erklären, solange dieses nicht in dessen doppelwandigen Vesikeln vorliegt [55, 374, 375]. Im Hinblick auf das IPS haben einige Studien eine positive Korrelation zwischen dem Ausmaß des

dopaminergen Zelltores und der Menge an NM in den betroffenen Hirnregionen ergeben [376, 377]. Parkinsonerkrankte weisen chemische Modifikationen des NM auf, welche die Bildung von ROS begünstigen könnten [378-381]. Außer dem zellulären NM weisen Autopsiestudien an MPTP-intoxikierten Personen extrazelluläres NM in unmittelbarer Nachbarschaft zu aktivierten Mikrogliazellen noch bis zu 12 Jahre nach der eigentlichen Vergiftung nach [46]. Zecca und Kollegen (2008) belegten im *in vivo*-Rattenmodell, dass die intranigrale Injektion von humanem NM zu einer potenten Mikrogliaaktivierung und dopaminergen Neurodegeneration führt [310]. *In vitro*-Analysen der Mikrogliareaktion auf humanes NM zeigen eine Aktivierung des NF- κ B-Signalweges mit Steigerung der Synthese proinflammatorischer Mediatoren wie TNF- α , IL-6 und NO [311].

(5) α -Synuclein (AS): Das Vorkommen von AS in den LB beim IPS sowie dessen Assoziation mit Formen eines familiären PS haben dieses Molekül in das Zentrum pathogenetischer Forschungen gerückt. In den dopaminergen Neuronen kommt es zu zahlreichen posttranslationalen Modifikationen von AS (Oxidierung, Nitrierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Trunkierung) [61], welche über die Konformationsänderung der Proteinstruktur dessen Aggregation fördern und zur Formation neurotoxischer Protofibrillen führen [55, 67, 382, 383]. AS-basierte Genmodelle mit Überexpression der Wildtyp-Variante von AS bzw. mutierten AS-Varianten führen zur Neurodegeneration in der SNpc [43, 384-387]. Ähnlich wie für NM wurde auch für extrazelluläres AS, speziell für AS-Protofibrillen und nitriertes AS, eine suffiziente Mikrogliaaktivierung nachgewiesen. Mikroglia reagieren auf die Konfrontation mit AS mit der Produktion extrazellulärer Superoxide, NO, IL-1 β und TNF- α [67, 194, 307, 388]. In Neuronen-Glia-Kokulturen führt die Depletion von AS-aktivierten Mikroglia zur Reduktion des Nervenzellsterbens [218].

Die Freisetzung (modifizierter) Strukturen wie des NM, des AS oder des DAC aus den absterbenden dopaminergen Neuronen und die nachfolgende Aktivierung lokaler Mikroglia stellt somit ein evidenten Erklärungsmodell zur Chronifizierung des Nervenzellsterbens in der SNpc dar.

1.4 Anti-inflammatorische Strategie beim Morbus Parkinson

Aufgrund der Tatsache, dass neuroinflammatorische Prozesse einen entscheidenden Stellenwert im Pathogeneseprozess der Parkinsonerkrankung zu haben scheinen (\rightarrow 1.3), haben sich zahlreiche Untersuchungen mit der Suppression dieses Entzündungsgeschehens beschäftigt. Während die derzeitige pharmakologische Parkinsontherapie rein symptomatisch ist, stellt die Unterbrechung des Erkrankungsprozesses weiterhin ein Zukunftskonzept dar. Zahlreiche anti-inflammatorische Substanzen wurden in experimentellen Parkinsonmodellen untersucht:

(1) Dexamethason: Das steroidale Antiphlogistikum Dexamethason führt im MPTP-Modell zu einem reduzierten dopaminergen Zelluntergang und einer suffizienten Inhibition der begleitenden Mikrogliaaktivierung und Lymphozyten-Infiltration [389]. In den Mikroglia hemmt Dexamethason den NF- κ B-Signalweg und einige MAPK-Signalwege sowie die nachfolgende Produktion

proinflammatorischer Zytokine und ROS [389, 390]. Aufgrund der erheblichen Langzeitnebenwirkungen stellen Steroide jedoch kein günstiges Therapiekonzept des IPS dar.

(2) Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAID): Zahlreiche Untersuchungen in Kultur- und Tiermodellen zur Parkinsonerkrankung zeigen neuroprotektive Effekte einiger bestimmter NSAIDs [391]. Darüber hinaus haben epidemiologische Studien ein reduziertes Risiko für die Entwicklung eines IPS bei Patienten gezeigt, welche aus anderen therapeutischen Gründen NSAIDs einnahmen [392-394]. Auch für die selektiven COX-2-Inhibitoren wurde eine Reduktion neurodegenerativer Effekte beschrieben [320, 395]. Der Mechanismus einiger dieser Wirkstoffe scheint jedoch weniger die Hemmung der mikroglialen Neuroinflammation zu sein, sondern eher die Verminderung der ROS in den dopaminergen Neuronen [220]. Der protektive Effekt einer Langzeiteinnahme von NSAID auf das IPS ist jedoch seit jeher umstritten. Neueste Veröffentlichungen sprechen gegen eine Risikoreduktion durch NSAIDs [396-399].

(3) Minocyclin: Minocyclin ist ein semisynthetisches Tetrazyklin der zweiten Generation. Unabhängig von seinen antibiotischen Wirkeigenschaften hat Minocyclin einen anti-inflammatorischen Effekt [400], indem es über die Hemmung mikroglialer Signalwege die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine hemmt [315, 400, 401]. Minocyclin wirkt neuroprotektiv im MPTP-Modell [402]. Seine Effektivität in humanen Studienansätzen bedarf jedoch noch weiterer Untersuchungen [403].

(4) PPAR- γ (peroxisome proliferator activated receptor- γ) Agonisten: Für den nukleären Rezeptor PPAR- γ sind diverse anti-inflammatorische Effekte beschrieben, welche unter anderem die Reduktion oxidativer Stressmechanismen, Apoptosemechanismen und mikroglialer Entzündungsmediatoren betreffen [404]. Agonisten dieses Kernrezeptors haben neuroprotektive Effekte im MPTP- [405], LPS- [219], und 6-OHDA-Modell [351] ergeben. Moderate Nebenwirkungen in der Langzeitanwendung und erste erfolgreiche klinische Testungen machen PPAR-Agonisten zu einer erfolgsversprechenden Wirkstoffklasse [406].

1.5 Immunmodulation beim Morbus Parkinson

Eine globale Suppression der Mikrogliaaktivierung steht gewissermaßen im Konflikt mit der in Kapitel 1.3 beschriebenen essentiellen Bedeutung der Mikroglia für die Integrität des ZNS. Vor diesem Hintergrund muss die bisherige anti-inflammatorische Therapiestrategie beim IPS - mit dem Ziel die Mikrogliaaktivierung zu hemmen - differenziert betrachtet werden. Zahlreiche aktuell zur Verfügung stehende anti-inflammatorische Medikamente haben streng betrachtet nur einen begrenzten „anti-inflammatorischen“ Wirkmechanismus. Sie vermögen zwar proinflammatorische Immunreaktionen zu reduzieren, stimulieren jedoch weder anti-inflammatorische noch neuroreparative Immunmechanismen [10]. Darüber hinaus können proinflammatorische Mediatoren auch vorteilhafte Effekte für das ZNS erfüllen [192, 407, 408], sodass es berechtigt erscheint, eine globale Langzeitinhibition derartiger Mechanismen im ZNS als Therapieoption in Frage zu stellen. Diese Hypothese

unterstützen die bisher eher enttäuschenden klinischen Erfolge durch den Einsatz anti-inflammatorischer Therapeutika [10, 24, 70, 399, 409-412]. Die genaue Betrachtung der entsprechenden präklinischen Untersuchungen einiger dieser Wirkstoffe zeigt bereits auf dieser Ebene kontroverse Ergebnisse [413, 414].

Der Begriff *Immunmodulation* beschreibt demnach weniger die Suppression der Mikrogliaaktivierung, sondern vielmehr die Neuorientierung des mikroglialen Signal- und Expressionsmusters hin zu einem eher entzündungsdämpfenden und gewebergenerativen Phänotyp. Immunmodulatoren sind Substanzen, welche über die Beeinflussung einer gestörten und einseitigen Mikrogliaaktivierung im Rahmen chronischer Immunpathologien wie dem IPS das physiologische Regenerationspotential zentraler Immunmechanismen wiederherzustellen versuchen. Auf der Grundlage dieser Überlegungen untersucht diese Arbeit die Effekte eines parasitären Sekretionsproduktes mit immunmodulatorischen Eigenschaften auf LPS-aktivierte Mikrogliazellen *in vitro*.

1.5.1 Immunmodulatorisches Cystatin des Nematoden *Acanthocheilonema vitae*

Für die langfristige Persistenz im Wirtsorganismus haben Parasiten im Laufe der Evolution zahlreiche sogenannte „Immunevasionsmechanismen“ entwickelt, um sich den Immunreaktionen des Wirtes zu entziehen. Es wird angenommen, dass Nematoden in zentrale Schaltstellen des Immunsystems eingreifen, um den „immunologischen Phänotyp“ des Wirtes in ihrem Sinne zu verändern [415]. Die Nagetierfilarie *Acanthocheilonema vitae* (AV) sezerniert zu diesem Zweck ein immunmodulierendes Protein aus der Gruppe der Cystatine [416]. Dieses beeinflusst das Zytokinnetzwerk und moduliert lokal und systemisch die Wirtsimmunantwort, indem es eine anti-inflammatorisch wirkende T_H2-T_{reg}-Zell-Antwort induziert. In Makrophagen bewirkt es die funktionale Ausrichtung hin zu dem eher anti-inflammatorischen M2-Phänotyp und regt die Produktion von IL-10 an [415-419]. Die primären Zielzellen des Immunmodulators stellen Makrophagen/Monozyten dar [416, 420, 421].

Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. R. Lucius (Institut für Biologie, Humboldt Universität zu Berlin) hat ein Verfahren etabliert, um diesen parasitären Immunmodulator als 17 Kilodalton schweres Protein (AV17) rekombinant zu synthetisieren (rAV17) und hat rAV17 bereits erfolgreich in experimentellen Tiermodellen zur allergischen Atemwegshyperreaktivität (Asthma) und Kolitis eingesetzt [418, 419].

Die klinische Relevanz einer Nematoden-induzierten Immunmodulation zeigt die erfolgreiche Anwendung der *Trichuris-suris*-Therapie (Phase-II-Studie) bei Menschen mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen [422-424].

Die beschriebenen Eigenschaften lassen einen immunmodulierenden Effekt des rAV17 auch auf LPS-stimulierte Mikroglia vermuten.

1.6 Fragestellung

Im Kontext der Neuroinflammations-Hypothese des IPS untersucht diese Dissertationsarbeit zum ersten Mal den Einfluss eines parasitären Immunmodulators (rAV17) auf LPS-aktivierte Mikrogliazellen *in vitro* (isolierte Mikroglia-Zellkultur). Zu diesem Zweck sollen konkret folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- **Hat der Immunmodulator rAV17 einen Effekt auf isolierte Mikrogliazellen in Ruhe und nach Stimulation mit LPS?**
- **Lassen sich nachgeschaltete Signalwege identifizieren, welche rAV17 auf zellbiologischer Ebene beeinflusst?**
- **Lässt sich anhand der gefundenen Ergebnisse eine Aussage über die phänotypische Ausrichtung der rAV17-modulierten Mikrogliazellen in Ruhe und im LPS-Entzündungsmodell treffen?**
- **Lassen die Ergebnisse dieser Arbeit eine mögliche anti-inflammatorische Wirkung im Tiermodell mit einem gesteigerten Überleben dopaminerger Neurone erwarten (Neuroprotektion)?**

2 Material

2.1 Geräte

| | |
|---|---------------------------------|
| ABI Prism-Sequence Detection System 7000 | Applied Biosystems, USA |
| Axiocam Fotokamera | Carl Zeiss, Göttingen |
| Biokular STEMI SV8 | Carl Zeiss, Göttingen |
| Blot-Kammer Trans-Blot [®] SD Cell | Bio-rad, USA |
| Elektrophoresekammer | Biometra, Göttingen |
| Filmkassette Hypercassette | Amersham Pharmacia, UK |
| Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M | Carl Zeiss, Göttingen |
| Gefrier-/Kühlschrank | Privileg, Hamburg |
| Gefrierschrank (-70°C) | Heraeus, Hanau |
| Gelkammer | Bio-rad, USA |
| Inkubator Hera Cell 150 | Heraeus, Hanau |
| Mikroskop 201177 | Wilovert, Wetzlar |
| Neubauer Zählkammer (0,0025cm ² , Tiefe 0,1mm) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Mikrotiterplatten-Photometer (SLT Reader 340 ATTC) | SLA Laborinstrumente, Karlsheim |
| Photometer Ultrospec 3100 pro | Amersham Biosciences, Freiburg |
| Photomikroskop | Carl Zeiss, Göttingen |
| Pipetten (1-1000µl) | Eppendorf, Hamburg |
| Rotationsschüttler Typ R0 01 | Gerhard, Bonn |
| Spannungsquelle Power Pac ²⁰⁰ | Bio-rad, USA |
| Sicherheitswerkbank HERASafe [®] | Heraeus, Hanau |
| Thermal Cycler GenAMP [®] -PCR System 9700 | Applied Biosystems, USA |
| Thermomixer Compact | Eppendorf, Hamburg |
| Tirschzentrifuge 5415 R | Eppendorf, Hamburg |
| Vortex-Genie 2 | Scientific Industries, USA |
| Waage BP 610 | Sartorius AG, Göttingen |
| Wasserbad | Köttermann, Uetze/Hänigsen |

2.2 Computersoftware

| | |
|--|---|
| Real-time PCR: ABI Prism 7000 SDS | Applied Biosystems, USA |
| Fluoreszenzmikroskopie: Axiovision 4.7 | Carl Zeiss, Göttingen |
| Densitometrie: PCBAS 2.09 | Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt |
| Statistik: Prism 5 (Version 5.04) | GraphPad, USA |

2.3 Verbrauchsmaterialien

| | |
|---|----------------------------------|
| Amersham ECM-Hyperfilm | Amersham Pharmacia, UK |
| Deckgläser, Ø 12 mm | Carl Roth, Karlsruhe |
| ELISA 96-Mikrotiterplatten | Nunc MaxiSorp™, USA |
| Gewebekulturschälchen (60 × 15 mm) | Sarstedt, Nürnberg |
| Multiply Reaktionsgefäße (150µl) | Sarstedt, Nürnberg |
| Multiply 96-well qPCR-Platte | Sarstedt, Nürnberg |
| Pipettenspitzen, verschiedene Größen | Greiner, Frikenhausen |
| Objektträger, SuperFrost Plus | Menzel, Braunschweig |
| PVDF- Membran „Hybond P“ | Amersham Pharmacia, UK |
| Reaktionsgefäße (1,5ml) | Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg |
| Whatmann-Pappe | Mercateo, München |
| Zellkulturflaschen, Ø 100 mm | Sarstedt, Nürnberg |
| Zellkulturplatten (6, 12, oder 24 Vertiefungen) | Sarstedt, Nürnberg |
| Zellschaber | Sarstedt, Nürnberg |
| Zentrifugenröhrchen (10ml, 50ml) | Sarstedt, Nürnberg |

Ferner das übliche Laborzubehör und Glasgebrauchsmaterial.

2.4 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien genügten mindestens dem analytischen Reinheitsgrad.

| | |
|---|------------------------------|
| Azeton | Merck, Darmstadt |
| Acrylamid | Serva, Heidelberg |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Merck, Darmstadt |
| Bisbenzimid | Sigma, Heidelberg |
| Bio-Rad Protein Assay | Bio-rad, USA |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | Serva, Heidelberg |
| Chloroform | Sigma, Deisenhofen |
| Coomassie Blau | Bio-rad, USA |
| Dulbeccos` s PBS (Ca ²⁺ und Mg ²⁺ frei) | PAA, Österreich |
| Dulbecco` s Modified Eagle Medium (DMEM) | Invitrogen, Karlsruhe |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ethanol | Merck, Darmstadt |
| Entwickler | Carl Roth, Karlsruhe |
| Fetales Kälberserum (FKS) | Invitrogen, Karlsruhe |
| Fixierlösung (Western-Blot) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Glutaraldehyd | Merck Schuchardt, Hohenbrunn |
| Glycin | Carl Roth, Karlsruhe |

| | |
|---|-----------------------------|
| Glycogen | Sigma, Deisenhofen |
| Griess-Reagenz | Sigma, Deisenhofen |
| Immu-Mount Eindeckmedium | Thermo-Scientific, USA |
| HCl | Carl Roth, Karlsruhe |
| HEPES (2-4-2-Hydroxyethyl-1-piperazinyl-Ethansulfonsäure) | Biomol, Hamburg |
| Isopropanol | Carl Roth, Karlsruhe |
| Kasein (Magermilchpulver) | Frema, Heimertingen |
| Kaisers-Glyceringelantine | Merck, Darmstadt |
| L-Glutamin | Sigma, Deisenhofen |
| Lipopolysaccharid (Salmonella typhimurium) | Sigma, Deisenhofen |
| Methanol | Carl Roth, Karlsruhe |
| NaCl | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumduodecylsulfat (SDS) | Biomol, Hamburg |
| Penicillin/ Streptomycin | PAA, Österreich |
| Poly-D-Lysin | PAA, Österreich |
| Qiazol | Qiagen, Hilden |
| Rinderserumalbumin (BSA) | Sigma, Deisenhofen |
| RNase freies Aqua bidest | Anatomisches Institut, Kiel |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Carl Roth, Karlsruhe |
| TRIS-EDTA-Pufferlösung | Amersham Pharmacia, UK |
| TRIS-HCl | Carl Roth, Karlsruhe |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) | Sigma, Deisenhofen |
| Trypsin | Invitrogen, Karlsruhe |
| TWEEN 20 | Carl Roth, Karlsruhe |

2.5 Lösungen und Puffer

| | | |
|--|----------|---|
| Dissoziationslösung | 0,024g | HEPES |
| | 0,020g | Trypsin |
| | 0,002g | EDTA |
| | 35µl | DNase (1mg/ml) |
| | ad 10ml | DMEM |
| Kulturmedium Mikroglia | 500ml | DMEM (4,5g Glucose/l) |
| | 60ml | FKS (bei 44-53°C inaktiviert) |
| | 5ml | L-Glutamin (200mM) |
| | 6ml | Penicillin (10000U/ml) und Streptomycin (10mg/ml) in PBS |
| Für die Stimulationsversuche wurde das FKS für 30 Minuten bei 56°C inaktiviert. | | |
| Entfärbelösung für Coomassie-Färbung | 30% | Ethanol |
| | 10% | Essigsäure |
| | ad 1,0l | Aqua bidest |
| Elektrodenpuffer (Laufpuffer; pH 8,2) | 12,2g | TRIS |
| | 57,6g | Glycin |
| | 4g | SDS |
| | ad 4,0l | Aqua bidest |
| Gelpuffer I (pH 8,8) für Trenngel | 1,5M | TRIS HCl |
| | 0,4% | SDS |
| | ad 250ml | Aqua bidest |
| Gelpuffer II (pH 6,8) für Sammelgel | 0,5M | TRIS HCl |
| | 0,4% | SDS |
| | ad 250ml | Aqua bidest |
| Trenngel (12,5%) | 4,17ml | Acrylamid |
| | 2,5ml | Gelpuffer I |
| | 3,29ml | Aqua bidest |
| | 60µl | APS 10% |
| | 30µl | TEMED |

| | | |
|--|------------------------------------|-----------------------------|
| Sammelgel (4,5%) | 1,67ml | Acrylamid |
| | 2,6ml | Gelpuffer II |
| | 5,79ml | Aqua bidest |
| | 60µl | APS 10% |
| | 30µl | TEMED |
| Lauffrontanzeiger | Bromphenolblau, gesättigte Lösung | |
| Lysis – Puffer | 100mM | NaCl |
| | 50mM | TRIS pH 7,5 |
| | 5mM | EDTA |
| | 1% | Triton X-100 |
| | 2mM | Natrium-Vanadat |
| | 2,5mM | Natrium-Pyrophosphat |
| | 1mM | β-Glycerol-phosphat |
| | 1mM | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| Transferpuffer (pH 9,0) | 25mM | TRIS |
| | 192mM | Glycin |
| | 10% | Methanol |
| TBS-T (TRIS-buffered Saline Tween)- Puffer (pH 7,5) | 50mM | TRIS |
| | 150mM | NaCl |
| | 1mM | EDTA |
| | 0,1% | Tween |
| SDS – Probenpuffer | 0,23g | SDS |
| | 1,25ml | Gelpuffer II |
| | 1ml | Glycin |
| | 50mM | DTT (Dithiotreitol) |
| | 60µl | APS 10% |
| | 30µl | TEMED |
| | ad 10ml | Aqua bidest |
| BSA-Lösung | 1% BSA in PBS | |
| Poly-D-Lysin-Lösung | 0,002% Poly-D-Lysin in Aqua bidest | |

| | | |
|----------------------|----------|---|
| Phosphatpuffer | 1,66g | $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ |
| | 11,2g | $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ |
| | ad 500ml | Aqua bidest |
| Zamboni-Fixierlösung | 8g | Paraformaldehyd gelöst in |
| | 35ml | gesättigter Pikrinsäure bei 60°C |
| | ad 200ml | Phosphatpuffer |

Gebrauchsfertige Kits und Lösungen

| | |
|---|-------------------------|
| dNTP-Mix (10 nM) | Bioline, Luckenwalde |
| cDNA-Synthese: cDNA Synthese Kit | Fermentas, St. Leon-Rot |
| DNA-Verdau: RQ1 RNase-Free DNase-Kit | Promega, USA |
| ELISA: BD OptEIA™ Set für Ratten-TNF- α (modifiziert durch TMB-Substrat-Set der Firma Thermo-Scientific,USA) | BD Biosciences, USA |
| Real-time-PCR: TaqMan® Universal PCR Master-Mix | Applied Biosystems, USA |
| Substratlösung ECL | Amersham Pharmacia, UK |

2.6 Immunmodulator

Der Immunmodulator (rAV17) wurde freundlicherweise von Prof. Dr. rer. nat. R. Lucius (Institut für Biologie, Humboldt-Universität zu Berlin) zur Verfügung gestellt.

Hierbei handelt es sich um rekombinant in *E.coli* hergestellte Proteine des Parasiten *Acanthocheilonema vitae* mit einem Molekulargewicht von 17 kDa. Das Protein wurde von LPS gereinigt und die residuale LPS-Kontamination auf < 0,1 EU/ml bestimmt [419].

Die Peptide wurden in PBS in einer Stammkonzentration von 250nM gelöst.

2.7 Enzyme, Primer und TaqMan®-System (*Assay on Demand*)

Enzyme:

| | |
|--|-------------------------|
| RevertAcid™ H Minus M-MuLV | Fermentas, St. Leon-Rot |
| RNase-freie DNase (10U/μl) | Promega, USA |
| Thermus Aquaticus DNA(TaqMan®)-Polymerase (5U/l) | Fermentas, St. Leon-Rot |

TaqMan-Assay on Demand®

| | |
|---------------------------------|---|
| Induzierbare NO-Synthase (iNOS) | (ID; Applied Biosystems, USA): (Rn00561646_m1) |
| Interleukin - 1β | (Rn00580432_m1) |
| Interleukin - 6 | (Rn00561420_m1) |
| TNF - α | (Rn99999017_m1) |
| COX - 2 | (Rn00568225_m1) |
| Interleukin - 10 | (Rn00563409_m1) |
| Eukaryotische 18S - rRNA | (Hs99999901_s1) |

Primer:

| | |
|-----------------------|-------------------------|
| Random Hexamer Primer | Fermentas, St. Leon-Rot |
|-----------------------|-------------------------|

2.8 Antikörper

Primäre Antikörper:

| | |
|--|---|
| Phospho-p44/42 MAPK (ERK 1/2) – Antikörper (T202/T204) [200μg/ml] | Cell Signaling Technology, USA |
| p42 MAPK (ERK2) -Antikörper [200μg/ml] | Cell Signaling Technology, USA |
| NF-κB p65 (A)-Antikörper (C22B4) [200μg/ml] | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |

Sekundäre Antikörper:

| | |
|--|-----------------------|
| Anti-Rabbit-(HPR-konjugierter)-Antikörper [1mg/ml] | Dianova, Hamburg |
| Ziegen-anti-Kaninchen IgG (Alexa Fluor® 488) [1mg/ml] | Invitrogen, Karlsruhe |

2.9 Versuchstiere

Für die Gewinnung primärer Mikrogliazellkulturen wurden Ratten vom Stamm Wistar eingesetzt. Verwendet wurden Tiere vom 1. bis 3. postnatalen Tag (P1-P3). Die Tiere stammten aus dem Tierhaus der vorklinischen Institute der Universität Kiel und wurden unter Standardbedingungen gehalten.

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden zur Isolierung und Kultivierung primärer Mikrogliazellen

3.1.1 Isolierung und Kultivierung primärer Mikroglia

Die Präparation der Ratten wurde nach der modifizierten Standardmethode nach McCarthy und deVellis (1980) durchgeführt: Die neugeborenen Ratten (P1-P3) wurden dekapitiert, die Hirne aus den Schädelkalotten entnommen und in Gewebekulturschälchen mit PBS (supplementiert mit 1% Penicillin/Streptomycin) gesammelt. Die weitere Präparation erfolgte unter dem Binokular. Die Großhirnkortizes wurden vorsichtig aus den Meningen herausgelöst und das Kleinhirn, das Dienzephalon, der Hippocampus und der Bulbus olfactorius entfernt. Jeweils 4-5 der verbliebenden Kortexhälften und bis zu 6 Mesenzephalien wurden in separaten Gewebekulturschälchen in 3ml PBS gewaschen. Unter einer sterilen Werkbank wurden diese mit einem Skalpell zerkleinert, die Gewebestücke aus je einem Gewebekulturschälchen wurden in 10ml-Zentrifugenröhrchen überführt und in diesen enzymatisch dissoziiert (zweimalige Inkubation im Wasserbad mit 3ml der Dissoziationslösung und 35µl DNase bei 37°C und 5% CO₂ für jeweils 30 Minuten). Der Überstand wurde abpipetiert und die Trypsinaktivität durch Zugabe von 2ml FKS-haltigem Zellkulturmedium gestoppt. Verbliebene kleinste Gewebeteilchen wurden durch wiederholtes Resuspendieren mit einer thermisch-verengten Pasteurpipette dissoziiert. Die Zellsuspensionen der Kortizes und Mesenzephalien wurden - weiterhin getrennt - in jeweils einem 50ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und die Zellzahl bestimmt. Dazu wurden 10µl der Zellsuspension mit 10µl Trypanblau gemischt und die vitalen Zellen in einer Neubauer Zählkammer mikroskopisch ausgezählt.

Jeweils 5 Millionen Zellen der getrennten Ansätze wurden anschließend in Zellkulturflaschen überführt, Kulturmedium ad 10ml zugegeben und die Zellen bei 37°C und 8,4% CO₂-Begasung für 1-2 Wochen im Inkubator kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle 48 Stunden gewechselt.

Aus den auf diese Weise gewonnenen Mischkulturen aus Astrozyten und Mikroglia ließen sich die Mikroglia isolieren und separat kultivieren. Da sich die Mikroglia als frei flottierende Zellen durch manuelles Schütteln von dem Astrozytenrasen lösen, wurde zur Gewinnung isolierter Mikrogliazellen der Überstand aus den Kulturflaschen (ab Tag 9) jeweils in 50ml Zentrifugenröhrchen dekantiert. Durch 5-minütige Zentrifugation (500 × g) setzten sich die Mikroglia als Zellpellet am Boden des Zentrifugenröhrchens ab. Der Überstand wurde entfernt und die Mikroglia in dem verbliebenen Restmedium resuspendiert. Die Zellsuspensionen der unterschiedlichen Mikroglia (Kortizes und Mesenzephalon) wurden in ein gemeinsames 50ml Zentrifugenröhrchen überführt. Zur Bestimmung der Zelldichte und Vitalität der Mikroglia wurden 10µl der Zellsuspension mit 10µl Trypanblau gemischt und in der Neubauer-Zählkammer mikroskopisch gezählt.

3.1.2 Stimulationsversuche

Für die Versuche wurde in die Vertiefungen einer Zellkulturplatte jeweils 1,5ml Kulturmedium gegeben und die Mikroglia je nach Versuchsmethodik in einer definierten Zelldichte auf der Zellkulturplatte oder beschichteten Deckgläsern ausgesät:

- 100.000 Mikrogliazellen auf Deckgläsern für Coomassie-Färbung,
- 1 Million Mikrogliazellen für Real-time-PCR und ELISA,
- 1 Million Mikrogliazellen für Western-Blot und
- 100.000 Mikrogliazellen auf Deckgläsern für Immunzytochemie.

Die Zellkulturplatte wurde für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 8,4% CO₂-Begasung inkubiert. Während dieser Zeit hafteten sich die Mikrogliazellen an den Böden der Vertiefungen bzw. den Deckgläsern an. Nach der Kultivierung wurde der Überstand abgesaugt und das jeweilige Stimulationsreagenz hinzugegeben.

Um Mikrogliazellen in einen Zustand erhöhter Aktivität zu versetzen, wurde LPS (10ng/ml LPS Typ Salmonella in Kulturmedium), das Endotoxin gramnegativer Bakterien, dem Medium hinzugefügt. LPS ist ein akzeptierter Induktor proinflammatorischer Mikrogliaereaktionen [425]. Nicht-aktivierte Kontrollansätze erhielten das äquivalente Volumen an Kulturmedium. Die Experimentalansätze wurden zusätzlich mit dem immunmodulatorischen Peptid inkubiert:

| <u>Versuchsansatz</u> | <u>Stimulationsreagenz</u> |
|-----------------------|---|
| 1 | 1ml Kulturmedium als Kontrolle |
| 2 | 10 ng/ml LPS in 1ml Kulturmedium |
| 3 | 250nM rAV17 in 1ml Kulturmedium |
| 4 | 10 ng/ml LPS und 250nM rAV17 in 1ml Kulturmedium. |

Die Versuchsansätze wurden anschließend für den jeweiligen Stimulationszeitraum bei 37°C und 8,4% CO₂-Begasung inkubiert. Nach der jeweiligen Stimulationszeit wurden folgende Analysemethoden angewandt:

- Coomassie-Färbung nach 24 Stunden,
- Indirekte Messung der NO-Freisetzung in den Zellkulturüberstand nach 6 und 24h,
- RNA-Isolierung aus den stimulierten Mikrogliazellen nach 2, 6 und 24 Stunden für die Real-time PCR. Der bei diesen Versuchen abgenommene Zellkulturüberstand diente dem Proteinnachweis von TNF- α nach 6 und 24 Stunden Stimulationszeit (ELISA),
- Western-Blot-Analyse der ERK-Phosphorylierung nach 10 und 15 Minuten und
- Immunzytochemische NF- κ B-Färbung nach 60 Minuten.

3.2 Morphologie der Mikroglia: Coomassie-Färbung

Die morphologischen Veränderungen der Mikrogliazellen wurden mittels Coomassie-Zellfärbung mikroskopisch untersucht. Nach der 24-stündigen Inkubation der Mikroglia mit den Stimulationsreagenzien (→ 3.1.2) wurden die Zellen auf den Deckgläsern dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellfixierung erfolgte für 40 Minuten mit 30µl 2,5% Glutaraldehyd. Die Deckgläser wurden erneut dreimal mit PBS gewaschen und für 40 Minuten mit 50µl der Färbelösung Coomassie-Blau behandelt. Überschüssige Farbstofflösung wurde mit 75µl einer Entfärbelösung (→2.5) und Aqua bidest entfernt und die Deckgläser mit Kaisers-Glyceringelantine auf Objektträgern eingedeckt.

Die Auswertung der Zellmorphologie erfolgte lichtmikroskopisch.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Indirekte Stickstoffmonoxid-Messung

Stickstoffmonoxid (NO) wird von aktivierten Mikrogliazellen freigesetzt und dient als Indikator der Mikrogliaaktivierung. Der Nachweis des NO erfolgte indirekt mittels Griess-Reagenz nach Johann Peter Griess. Dazu wurden 100µl des Kulturüberstandes jedes Versuchsansatzes (nach 6- oder 24-stündiger Stimulation) mit dem gleichen Volumen Griess-Reagenz gemischt und für 15 Minuten in einer 96-Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Das Nachweisprinzip beruht darauf, dass in einer ersten Reaktion das Nitrit (NO_2^-), ein stabiles Produkt von NO, mit Sulfanilamid (1. Komponente des Griess-Reagenz) zu einem Komplex reagiert. In einem zweiten Schritt reagiert dieser Komplex mit Naphtylethylendiamin (2. Komponente des Griess-Reagenzes) zu einem violetten Azoprodukt [426]. Der Farbumschlag wurde bei 540nm im Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

3.3.2 Isolierung der Gesamt-RNA

Die Isolierung der zellulären Gesamt-RNA erfolgte durch die *single-step*-Methode (Einschritt-Flüssigphasen-Separation) mittels Qiazol-Reagenz. Die Methode beruht auf der unterschiedlichen Löslichkeit der zu extrahierenden Substanzen in einer zweiphasigen Emulsion. Qiazol ist ein Gemisch aus dem chaotropen Salz Guanidinisothiocyanat (GTC), welches sehr effektiv die Zellen lysiert und gleichzeitig RNasen und andere Enzyme inaktiviert, und Phenol, in dem sich DNA und Proteine lösen. Durch die Inaktivierung der RNasen sofort nach der Lyse ist die Methode stabil und liefert hochwertige RNA.

Der erste Schritt der RNA-Isolierung bestand in der Zelllyse. Dazu wurde zunächst der Zellkulturüberstand der Versuchsansätze (→ 3.1.2) entfernt und die Mikroglia zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde je 1ml Qiazol-Reagenz zu jedem Ansatz gegeben und die angehafteten Mikrogliazellen zusätzlich mit einem sterilen Zellschaber mechanisch von dem Boden der Zellkulturplatte gelöst. Das Lysat wurde jeweils in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde 200µl Chloroform hinzugegeben,

für 15 Sekunden kräftig geschüttelt und wieder für 2-3 Minuten bei RT inkubiert. Im anschließenden Zentrifugationsschritt für 15 Minuten bei $12000 \times g$ und 4°C erfolgte die Phasentrennung in eine obere wässrige Phase (RNA), eine Interphase (DNA und Proteine) und eine untere rötliche Chloroform-Phenol-Phase (DNA und Proteine). Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. In einem weiteren Isolierungsschritt wurde $1\mu\text{l}$ Glykogen dazugegeben und dann die RNA mit Isopropanol präzipitiert. Der Ansatz wurde für 10 Minuten bei RT inkubiert und 10 Minuten bei $12000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Dadurch schlug sich die RNA als gelartiges Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes nieder. Der flüssige Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das RNA-Pellet mit 1ml Ethanol (75%) durch Schütteln und anschließende Zentrifugation (5 Minuten bei $7500 \times g$ und 4°C) gewaschen. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet kurz luftgetrocknet und durch mehrmaliges Resuspendieren in $20\text{-}50\mu\text{l}$ RNase-freiem Aqua bidest (je nach Pelletgröße) eluiert und für 5 Minuten bei 60°C inkubiert. Bei -70°C konnte die RNA für mehrere Wochen gelagert werden.

Die Quantifizierung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch. Dazu wurden jeweils $5\mu\text{l}$ der RNA-Probe mit $995\mu\text{l}$ Messpuffer gemischt und für 260nm und 280nm ein Absorptionsspektrum aufgezeichnet. Die RNA-Konzentration wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{RNA-Menge } [\mu\text{g}/1\mu\text{l}] = E(260\text{nm}) * 40 * 200 (\text{Verdünnungsfaktor}) / 1000$$

Als Korrelat für die Reinheit der RNA galt der Extinktionsquotient aus den Werten für 260nm und 280nm . Er sollte $\geq 1,7$ betragen.

3.3.3 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription dient der Umschreibung der isolierten Boten-RNA (mRNA) in komplementäre DNA (cDNA). Dieser Schritt ist notwendig für die Nukleinsäure-Amplifizierung im folgenden Real-time-PCR-Verfahren und gewährleistet eine höhere Umweltresistenz gegenüber den ubiquitär vorkommenden RNasen. Vor der eigentlichen cDNA-Synthese erfolgte zunächst ein DNA-Verdau nach Anleitung eines DNase-Kits, um die restliche DNA-Kontamination zu beseitigen.

DNA-Verdau: Die Proben wurden mit folgendem Reaktionsansatz versetzt und für 15 Minuten bei 37°C in einem Thermocycler (GenAmp[®] PCR System 9700) inkubiert:

Reaktionsansatz für DNA-Verdau

| | |
|----------------|---|
| $8\mu\text{l}$ | Probe ($1\mu\text{g}$ RNA in $8\mu\text{l}$ Aqua bidest) |
| $1\mu\text{l}$ | RQ1 RNase-freier DNase $10 \times$ Reaktionspuffer |
| $1\mu\text{l}$ | RQ1 RNase-freie DNase |

Der DNA-Verdau wurde beendet durch 10-minütige Inkubation mit $1\mu\text{l}$ RQ1 DNase *Stop Solution* (25mM EDTA) bei 65°C . Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben auf Eis gestellt.

Reverse Transkription: Die eigentliche cDNA-Synthese wurde nach der Anleitung eines cDNA-Synthese-Kits durchgeführt. Zuerst wurde den Proben $1\mu\text{l}$ Random Hexamer-Primer zugegeben und der Ansatz für 5 Minuten bei 70°C im Thermocycler inkubiert. Dabei handelt es sich um eine Mixtur

aus Primern aus jeweils sechs zufällig zusammengesetzten Nukleotiden, welche an einer komplementären Region mit der Proben-mRNA hybridisieren. Jeder Ansatz erhielt einen weiteren Zusatz aus 4µl Reaktionspuffer, 1µl Aqua bidest und 2µl dNTP-Mix. Die Reaktionsgefäße wurden für 5 Minuten bei 25°C im Thermocycler vortemperiert. In einem letzten Schritt wurde jeweils 1µl der Reversen Transkriptase zu den Proben pipettiert. Der Thermocycler inkubierte die Proben für 10 Minuten bei 25°C, 60 Minuten bei 42°C und zuletzt für 10 Minuten bei 70°C. Die cDNA-Proben konnten bei -20°C für mehrere Wochen gelagert werden.

3.3.4 Quantitative Real-time – PCR (q-PCR)

Die quantitative Real-time-PCR ist ein Verfahren zur Quantifizierung von Nukleinsäuren. In dieser Doktorarbeit diente die Methode dem Vergleich der Genexpressionsaktivität ausgewählter Gene zwischen Kontroll- und Stimulationsansätzen.

Prinzip: Bei der in dieser Doktorarbeit verwendeten Real-time PCR mit dem TaqMan®-System wurden dem Reaktionsansatz außer dem spezifischen Primer der eigentlichen PCR spezielle Oligonukleotide (TaqMan®-Sonden; *Assay on Demand*) zugegeben, die in Kombination mit der 5'-3'-Exonucleaseaktivität der Taq-Polymerase ein detektierbares Fluoreszenzsignal generieren [427]. Die Quantifizierung erfolgte durch den Vergleich des C_T-Wertes (PCR-Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Hintergrundsignal abhebt) mit den C_T-Werten eines Standards. Für die relative Quantifizierung wurde die Expression der unterschiedlichen Zielgene auf einen internen Standard (*housekeeping-gene*; 18s-rRNA) bezogen und nach der ΔΔCT-Methode berechnet.

Durchführung: Die Durchführung erfolgte mit dem TaqMan®-System. Dazu wurden jeweils 4µl einer cDNA-Probe (1:20 verdünnt mit Aqua bidest) auf eine spezielle qPCR-Platte (*96-well Multiply*) pipettiert. Alle Proben wurden dabei in zweifacher Ausführung angesetzt. Zu den Proben wurde folgendes Reaktionsgemisch hinzugegeben:

qPCR Master-Mix

10µl TaqMan® Universal Master Mix

1µl TaqMan®-*Assay on Demand*

5µl RNase-freies Aqua bidest

Die quantitative Real-time PCR wurde im ABI Prism™ Sequence Detection System 7000 durchgeführt. Die Proben wurden im ersten Schritt für 15 Sekunden auf 94°C erhitzt (Denaturierung). Im zweiten Schritt (*Annealing*) wurde die Temperatur für 60 Sekunden auf 60°C reduziert und die Primer hybridisierten mit den komplementären cDNA-Sequenzen. Im dritten Schritt vervollständigte die Taq-Polymerase bei 72°C die cDNA-Einzelstränge ausgehend von den Primern zu Doppelsträngen. Insgesamt fanden 40 Zyklen statt, wobei sich nach dem letzten Zyklus eine 5- bis 10-minütige Elongationsphase anschloss.

Datenauswertung: Die Datenauswertung erfolgte mit der ABI Prism™ 7000 SDS Software.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Western-Blot

Die Western-Blot-Analyse ist ein Verfahren zum spezifischen Nachweis von Proteinen in einem Proteingemisch. In diesem Fall wurde mittels Western-Blot-Analyse der Einfluss der immunmodulatorischen Moleküle auf die Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK1/2) untersucht. Diese Serin/Threonin-Kinasen gehören zur Gruppe der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs), welche eine Schlüsselrolle bei zahlreichen Zellprogrammen wie Differenzierung, Proliferation, Motilität und Zelltod einnehmen.

Prinzip: Im ersten Schritt werden die Proteine eines Proteingemisches durch das Elektrophoreseverfahren SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese; engl. *Sodium-dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) auf einem Trägergel gemäß ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld aufgetrennt. Das negativ geladene Detergenz SDS „maskiert“ die Eigenladungen der Proteine, sodass diese entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden. Am Ende des Verfahrens sind alle Proteine nach der Größe sortiert in Form sogenannter Banden angeordnet und können mittels Immundetektion in einem zweiten Schritt visualisiert werden. Dazu werden die Proteine im Gel durch „Abklatschen“ (*blotting*) auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran übertragen. Der primäre Antikörper bindet bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode an ein Epitop des Antigens pERK1/2 bzw. ERK2. An die F_C-Region des Primärantikörpers bindet ein sekundärer, enzymgekoppelter HRP (engl. *horseradish peroxidase* = Meerrettichperoxidase)-Markierungsantikörper. Die HRP katalysiert die Umsetzung von zugegebenem Luminol in seine oxidierte Form, bei der eine Lumineszenz freigesetzt und detektiert werden kann.

Durchführung: Für die Western-Blot Analysen wurden die Mikrogliazellen 30 Minuten vor der LPS-Zugabe mit dem Immunmodulator rAV17 vorbehandelt. Die Gewinnung der Gesamtproteine erfolgte nach Entfernung des Kulturmediums und einem zweimaligen Waschschrift mit kaltem PBS nach 10- bzw. 15- minütiger Stimulationszeit mit 100 µl Lysispuffer. Zusätzlich wurden die Mikroglia mit einem sterilen Zellschaber mechanisch vom Boden der Vertiefungen abgelöst. Das Zelllysate wurde durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren homogenisiert und in 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt.

(1) Proteinquantifizierung: Die Proteinbestimmung erfolgte nach der durch Fanger (1987) modifizierten Methode nach Bradford (1976). In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 10µl Probe mit 790µl Aqua bidest und 200µl Biorad-Protein-Assay-Lösung gemischt und für 20 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595nm photometrisch gemessen. Die Proteinmenge wurde anhand einer BSA-Standardreihe kalkuliert und in entsprechenden Protein-Aliquots zusammen mit SDS-Probenpuffer ad 20µl angesetzt, sodass sich eine definierte Proteinmenge von 5µg/20µl SDS-Probenpuffer ergab. Die Probe wurde 5 Minuten bei 99°C denaturiert.

(2) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE): Zur Trennung des Proteingemisches wurde eine Variante der PAGE, die SDS-PAGE, in einem Tris-HCl-Puffersystem verwendet. Eine optimale Trennschärfe ergab sich bei einem Polyacrylamid-Gehalt des Trenngels von 12,5%. In die Taschen des Sammelgels (4,5%) wurden 20µl der Westernblot-Probe (5µg/20µl in SDS-Probenpuffer) pipettiert. Zusätzlich wurde ein Protein-Standard aufgetragen. Die elektrophoretische Proteinauftrennung erfolgte in Lauffpuffer bei einer Stromstärke von 170mA und einer Spannung von 200V so lange, bis ein Bromphenolblau-Lauffrontanzeiger das untere Ende des Trenngels erreicht hatte.

(3) Proteintransfer (*Blotting*): Der Proteintransfer erfolgte in einer Graphitkammer durch die *semidry*-Methode, bei der das Gel und eine spezielle proteinbindende PVDF-Membran sandwichartig von Filterpapieren eingerahmt wurden. Dazu wurde die PVDF-Membran in der Größe des Trenngels für 1 Minute in Methanol aktiviert, im Anschluss mit Aqua bidest gewaschen und für 15 Minuten in Transferpuffer gelagert. Auf die mit Transferpuffer angefeuchtete Kathodenplatte wurden zwei in Transferpuffer eingeweichte Whatmann-Pappen gelegt. In der Schichtungsfolge Richtung Anode folgte die PVDF-Membran, das Polyacrylamidgel und wieder zwei in Transferpuffer eingelegte Whatmann-Pappen. Die Luftblasen wurden vorsichtig ausgestrichen und die Kathodenplatte aufgelegt. Der Proteintransfer erfolgte entlang eines senkrecht zur ehemaligen Laufrichtung angelegten elektrischen Feldes bei 25V und 340mA für etwa 75 Minuten. Nach dem Transfer wurden die freien Bindungsstellen der PVDF-Membran durch einstündige Inkubation in einer 5% Kasein-TBS-T-Lösung geblockt.

(4) Immundetektion: Im ersten Schritt wurde die geblockte PVDF-Membran mit TBS-T-Puffer gewaschen, mit 1ml Primärantikörperlösung (1:1000 in TBS-T-Puffer) blasenfrei eingeschweißt und über Nacht bei 4°C inkubiert:

Primärantikörper: phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) oder

Primärantikörper: p42 MAPK (ERK2).

Im zweiten Schritt wurde die PVDF-Membran erneut mit TBS-T-Puffer gewaschen und anschließend auf dem Rotationsschüttler für 1 Stunde mit dem HRP(*horse-radish-peroxidase*)-konjugierten Sekundärantikörper (in einer Verdünnung von 1:30000 in 5% Kasein-haltigem TBS-T-Puffer) bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran wieder mit TBS-T-Puffer gewaschen.

Die Chemilumineszenz-Detektion wurde mit einer ECL-Substratlösung (*enhanced chemoluminescence analysis*-) durchgeführt. Dazu wurde die Membran für 5 Minuten bei RT mit 2,5ml der Detektionslösung (40:1 Verhältnis aus *EZ-ECL Solution A* und *EZ-ECL Solution B*) inkubiert. Die Lösung A enthielt Verstärkersubstanzen und das zyklische Diacylhydrat Luminol, das in einer HPR-katalysierten Oxidationsreaktion mit dem Wasserstoffperoxid (H₂O₂) aus Lösung B reagierte und so eine Chemilumineszenz entwickelte. Die Membran wurde in Folie verpackt und in eine lichtdichte Filmkassette verpackt. Zur Darstellung der Banden auf Hyperfilmen wurde dieser auf die Membran gelegt und belichtet, entwickelt und fixiert.

Als Ergänzung zu der beschriebenen Methode wurden die ERK2-Proteinmenge zur exakteren Bestimmung nicht anhand zweier getrennter Gele untersucht, sondern durch sogenanntes „strippen“ (engl. abziehen) derselben pERK1/2-Membran durchgeführt. Für das Entfernen der gebundenen Antikörper auf der Membran wurde diese zunächst für 1 Minute in Methanol aktiviert und anschließend für 15 Minuten mit TBS-Transferpuffer gewaschen. In einem nächsten Schritt wurde die Membran zunächst dreimal mit 0,1 M Glycin bei RT für 15 Minuten inkubiert und dann dreimal mit 0,1 M TRIS ebenfalls bei RT für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit Kasein (5% in TBS-T-Puffer) geblockt und konnte dann erneut mit dem Primärantikörper (p42 MAPK (ERK2)) inkubiert werden (weiter wie (4)).

(5) Densitometrische Auswertung: Zur objektiven Auswertung der Western-Blot-Ergebnisse wurden die belichteten Röntgenfilme mit den sichtbaren Proteinbanden eingescannt und mit der Software PC-BAS 2.0 densitometrisch analysiert. Die Densitometrie ist eine quantitative Messung der Farbdichte, das heißt, der Farbmenge pro Flächeninhalt.

3.4.2 ELISA

Der Enzymgekoppelte Immunadsorptionstest (*Enzyme-linked-Immunesorbent-Assay, ELISA*) ist eine weitere Methode zum spezifischen Proteinnachweis. In dieser Doktorarbeit wurde mittels ELISA die Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins TNF- α ins Kulturmedium untersucht. Zur Durchführung wurde das BD OptEIA™ Kit in einer modifizierten Form angewandt. Dieses TNF- α -Kit beruht auf dem Prinzip der Sandwich-Enzym-Immunoassay-Technik und der (Strept-)Avidin-Biotin-Methode zur Verbesserung der Sensitivität des Tests.

Durchführung: Die Vertiefungen der 96-Well-Mikrotiterplatte wurden mit 100 μ l des primären Anti-TNF- α -Antikörpers (Fangantikörper (*Capture-Antibody*); 1:250 Verdünnung in PBS) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Vertiefungen fünf Mal mit Waschpuffer gewaschen, anschließend mit 200 μ l Verdünnungslösung (*Assay Diluent*) geblockt und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschschriff mit Waschpuffer. Die ELISA-Analysen wurden mit je 50 μ l Zellkulturüberstand (\rightarrow 3.1.2) durchgeführt. Zunächst wurden die Proben mit Verdünnungslösung (*Assay Diluent*) verdünnt (1:20) und jeweils 100 μ l in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Zusätzlich wurde eine Standard-Konzentrationsreihe mit rekombinantem Ratten-TNF- α in Verdünnungslösung auf die Mikrotiterplatte gegeben (1000 - 31,3pg/ml). Die Bindung von TNF- α an den Beschichtungsantikörper erfolgte während einer zweistündigen Inkubation bei RT.

Im zweiten Schritt wurden die Vertiefungen mit Waschpuffer gewaschen und für 1 Stunde mit dem sekundären Detektionsantikörper (Biotin-konjugierter *Detection-Antibody*; 1:250 Verdünnung mit Verdünnungslösung) bei RT inkubiert. Durch anschließendes Waschen der Platte wurde der überschüssige Sekundärantikörper ausgewaschen. Im nächsten Schritt wurden 100 μ l des Enzymreagenz (SAv-HRP; 1:250 Verdünnung in Verdünnungslösung) in jede Vertiefung gegeben und die Mikrotiterplatte für 30 Minuten bei RT inkubiert. Das Streptavidin-HRP-Konjugat (SAv-HRP)

bindet hochaffin an das Biotin des Sekundärantikörpers und katalysiert die Farbreaktion bei Zugabe der Substratlösung. Nach einem nachfolgenden gründlichen Waschschrift wurde die Farbreaktion mit 100µl Substratlösung (*TMB Substrat Reagent Set*) gestartet. Die Substratlösung enthielt Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Tetramethylbenzidin (TMB), das in einer HPR-katalysierten Oxidationsreaktion zu einem blauen Farbstoff reagierte. Die Farbreaktion wurde nach etwa 10 Minuten durch Zugabe von 50µl Stopplösung (*Stop-Solution*) beendet.

Die Auswertung erfolgte mit einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 450nm (Referenz: 570nm).

3.5 Immunzytochemische Färbung

Die immunzytochemische NF-κB-Färbung wurde durchgeführt, um anhand der Lokalisationsanalyse des Transkriptionsfaktors NF-κB (engl.: *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) Hinweise über den inflammatorischen Aktivierungsgrad der Mikrogliazellen zu erhalten.

Immunzytochemische Färbung: Autoklavierte und entfettete Deckgläser (Ø 12mm) wurden zunächst für 2 Stunden mit Poly-D-Lysin-Lösung beschichtet und nachfolgend viermal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 100.000 Mikrogliazellen für 24 Stunden auf diesen Deckgläsern kultiviert und nachfolgend für 60 Minuten stimuliert (→ 3.1.2). Zur Fixierung der Zellen wurde der Zellkulturüberstand abgesaugt, die Deckgläser mit PBS gewaschen und die Zellen für 30 Minuten mit Zamboni-Fixierlösung bei RT inkubiert. In einem zweiten Schritt wurden die Zellen für 10 Minuten mit Aceton nachfixiert, anschließend mit PBS gewaschen und für 30 Minuten mit BSA-Lösung (1% BSA in PBS) bei RT blockiert.

Im ersten Schritt der immunzytochemischen Färbung wurden die zellbeschichteten Deckgläser für 60 Minuten mit dem Primärantikörper (NF-κB p65 (A); Verdünnung 1:100 in BSA-Lösung) bei RT inkubiert. Die Deckgläser wurden mit PBS gewaschen und im zweiten Schritt mit dem Sekundärantikörper (Ziegen-anti-Kaninchen-IgG Alexa Fluor®; Verdünnung 1:700 in PBS-Lösung) für 60 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die auf den Deckgläsern fixierten Zellen mit PBS und nachfolgend mit Aqua bidest gewaschen, jeweils auf einem Objektträger mit Immu-Mount-Eindeckmedium eingedeckt und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

3.6 Berechnung, Statistiken, Grafiken und Ausarbeitung

Die Berechnungen und graphischen Darstellungen wurden mit Microsoft Excel und GraphPad Prism (Version 5.04) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert ± SEM (*standard error of the mean*) dargestellt. Alle Experimente wurden in mindestens dreifacher Ausführung durchgeführt. Die statistische Auswertung wurde durch Varianzanalysen (ANOVA) und nachfolgende Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Für den isolierten Vergleich zweier Parameter wurde eine t-Test-Auswertung angewandt. Eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant angenommen.

Die Ausarbeitung der Dissertation erfolgte mit Microsoft Word für Windows™.

4 Ergebnisse

4.1 Morphologie rAV17-stimulierter Mikroglia

Eine experimentelle Methode, um die Reaktion von Mikrogliazellen auf externe Stimuli zu untersuchen, besteht in der mikroskopischen Analyse der Zellmorphologie [112]. Abbildung 2A zeigt ruhende Mikroglia mit kleinem Zytosoma und zahlreichen, fein verzweigten Zellausläufern. Die Stimulation mit LPS führt zur Aktivierung der Mikroglia, die initial an einer Veränderung der Zellmorphologie erkennbar ist. Abbildung 2B zeigt LPS-aktivierte Mikroglia. Die rund-ovalen, amöboiden Zellen haben ein vergrößertes Zytosoma und retrahierte Zellausläufer. Beide Phänotypvarianten dienen als Vergleichskontrollen für die Experimente mit dem Immunmodulator. Abbildung 2C zeigt Mikroglia, die mit dem Immunmodulator rAV17 behandelt wurden. Die Zellen zeigen zahlreiche dünne Fortsätze und keine wesentliche Vergrößerung des Zytosomas. Diese Morphologie entspricht derjenigen ruhender Mikroglia.

Die simultane Stimulation mit LPS und rAV17 zeigt ein buntes Bild verschiedener Aktivierungsstadien der Mikroglia. Die Zellen in Abbildung 2D zeigen noch kleine Zellausläufer und unterscheiden sich so von der vollaktivierten LPS-Positivkontrolle. Gleichzeitig zeigen einige Zellen eine deutlich rundere Zellkontur mit vergrößertem Zytosoma, womit sie sich ebenfalls von dem ruhenden Phänotyp abgrenzen.

Zusammengefasst führt die Behandlung mit rAV17 zu keiner klassischen morphologischen Transformation aktivierter Mikroglia wie sie unter LPS beobachtet wird. Bei simultaner Stimulation scheint rAV17 die aktivierenden Effekte von LPS auf Mikroglia teilweise aufzuheben.

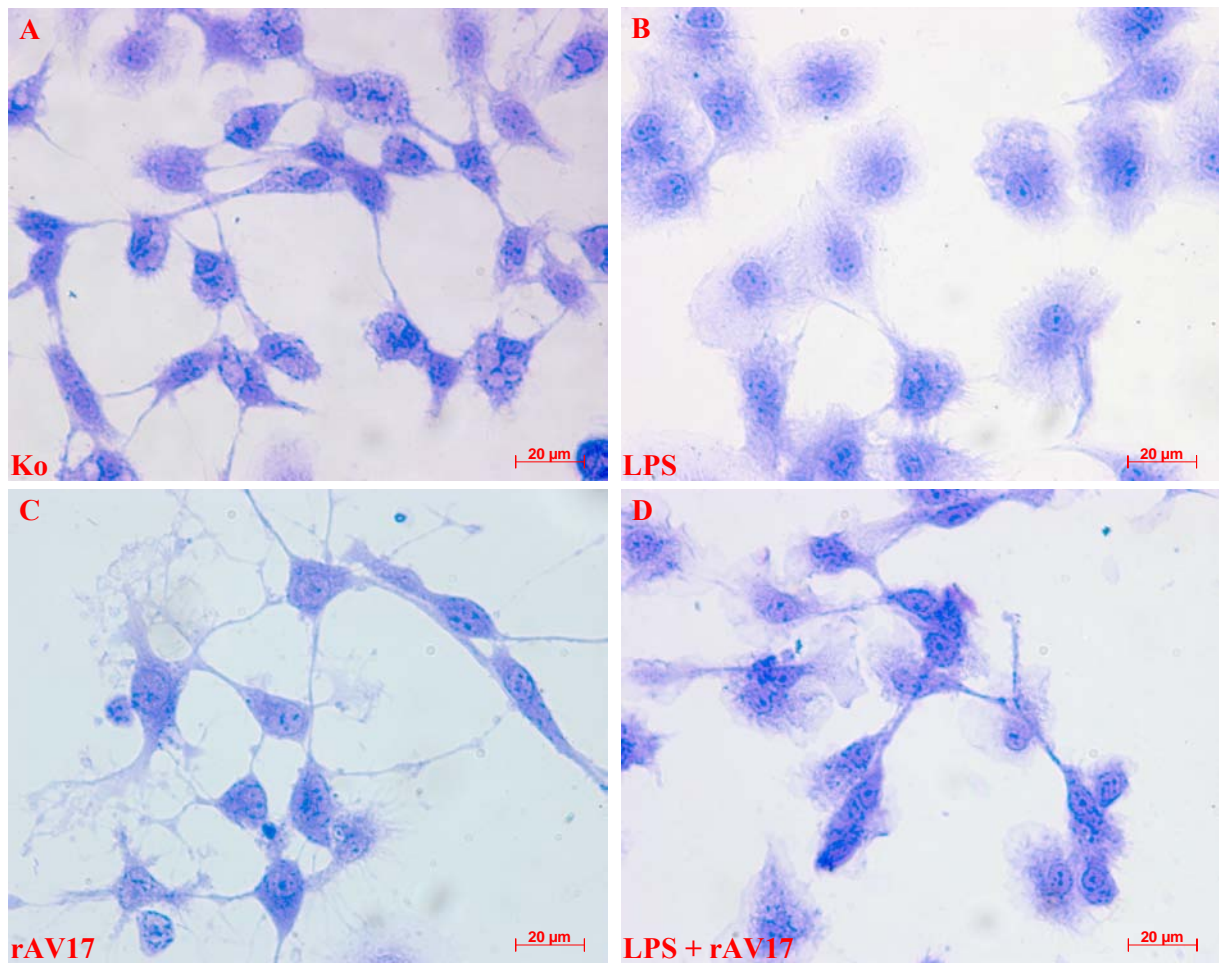


Abbildung 2: Einfluss des Immunmodulators rAV17 auf die Morphologie primärer Mikrogliazellen. Die Morphologie ruhender Mikroglia (A) und LPS-aktivierter Mikroglia (B) dienen als Kontrolle für die Stimulationsversuche. Mikroglia, die mit rAV17 behandelt wurden, zeigen eine ruhende, ramifizierte Morphologie (C). Die simultane Stimulation mit rAV17 und LPS führt tendenziell zu einer Blockierung der LPS-induzierten Mikroglia-Transformation (D). Für die Analyse der Zellmorphologie wurden die Mikroglia für 24h mit dem jeweiligen Stimulationszusatz inkubiert und mit der Färbelösung Coomassie-Blue gefärbt.

4.2 Immunmodulation oxidativer Stressmechanismen in Mikroglia durch rAV17

Oxidative Dysregulationen scheinen einen wesentlichen Pathogenesefaktor der nigralen Neurodegeneration darzustellen (\rightarrow 1.2). Daher wurde untersucht, ob der Immunmodulator rAV17 einen Einfluss auf den Schlüsselmediator NO oder das NO-synthetisierende Enzym iNOS hat.

4.2.1 Indirekter Nachweis des Moleküls NO

Die Ergebnisse der Stimulationsversuche sind in Abbildung 3 für die Versuche nach 6 und 24 Stunden grafisch dargestellt, wobei die Messwerte als Relativwert [in %] der NO-Freisetzung bei LPS-stimulierten Mikroglia angegeben sind. Die unstimulierten Kontrollzellen zeigen die Basisrate der NO-Freisetzung in Ruhe an. Durch die Anregung der Mikrogliazellen mit LPS lässt sich die NO-Freisetzung der Mikrogliazellen signifikant ($***p < 0,001$) steigern (3A/B). Die Inkubation mit rAV17 zeigt keinen signifikanten Unterschied zu ruhenden Mikroglia (3A/B). Durch die simultane Stimulation mit rAV17 und LPS lässt sich die massiv erhöhte NO-Freisetzung durch LPS nach 6 Stunden um $7,4(\pm 2,3)$ % (3A) und nach 24 Stunden signifikant ($*p < 0,05$) um $8,5(\pm 1,4)$ % reduzieren (3B).

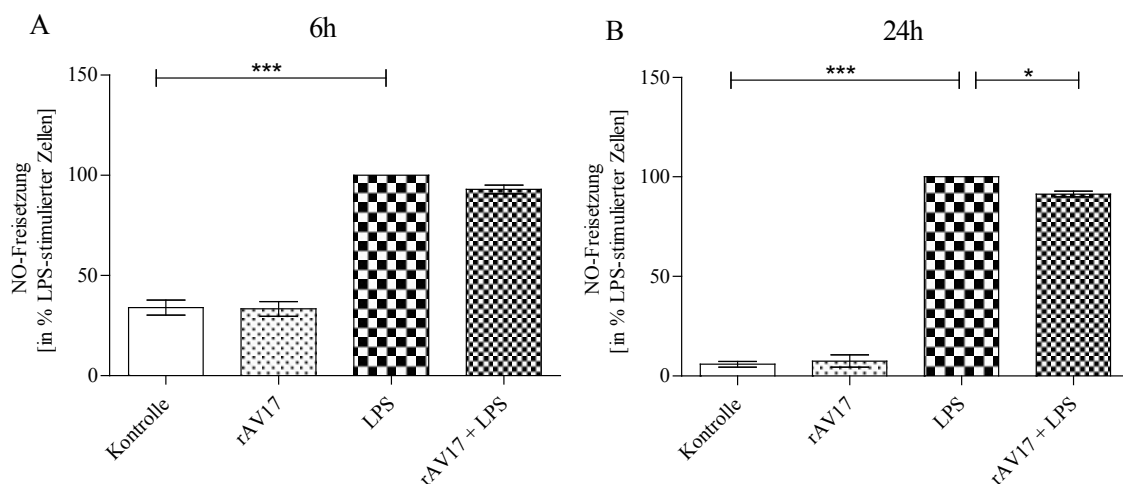


Abbildung 3: Der Immunmodulator reduziert die LPS-induzierte NO-Freisetzung bei simultaner Stimulation der Mikroglia mit LPS und rAV17 nach 6h (A) und 24h (B). Die NO-Messung erfolgte im Zellüberstand der vier Versuchsansätze indirekt mittels Griess-Reagenz nach 6- und 24-stündiger Mikroglia-simulation. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM ($n=4$ (6h-Versuche), $n=3$ (24h-Versuche)); $***p < 0,001$, $*p < 0,05$).

4.2.2 Einfluss auf die Expression der iNOS-mRNA in Mikroglia

Die Expressionsrate der iNOS-mRNA wurde mittels q-PCR gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 für die Versuche nach 6 und 24 Stunden grafisch dargestellt, wobei die Messwerte als Relativwert [in %] der iNOS-mRNA-Expressionsrate in LPS-stimulierten Mikroglia angegeben sind.

Die Basisexpressionsrate der iNOS-mRNA ist bei 6- bzw. 24-stündiger Stimulationszeit in den Kontrollmikroglia signifikant ($***p < 0,001$) geringer als bei den LPS-stimulierten Zellen (4A/B). Dasselbe gilt für die rAV17-stimulierten Mikroglia, wobei sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den rAV17-stimulierten Zellen zeigt (4A/B). Durch simultane Stimulation mit rAV17 und LPS wird die mRNA-Expression der iNOS nach 6 Stunden signifikant ($*p < 0,05$) um $16,5(\pm 6,5) \%$ (4A) und nach 24 Stunden signifikant ($*p < 0,05$) um $29,3(\pm 10,4) \%$ reduziert (4B).

Die Ergebnisse stehen im Einklang mit der rAV17-vermittelten Inhibition der LPS-induzierten NO-Freisetzung (\rightarrow Abbildung 3) und legen daher die Vermutung nahe, dass rAV17 die NO-Freisetzung über die Inhibition der iNOS-Expression vermittelt.

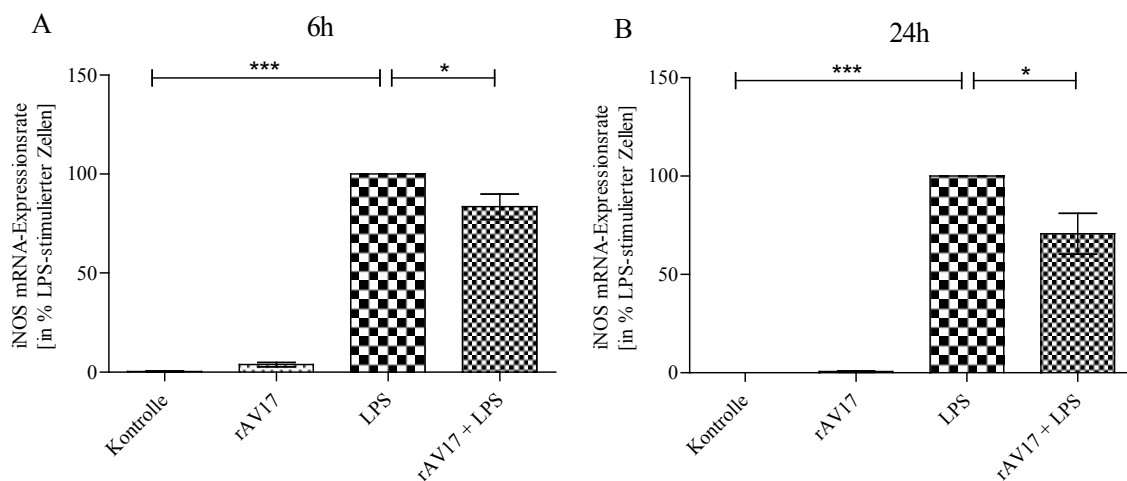


Abbildung 4: Der Immunmodulator reduziert die LPS-induzierte mRNA-Expression der iNOS bei simultaner Stimulation der Mikroglia mit LPS und rAV17 nach 6h (A) und 24h (B). Die relative Quantifizierung der iNOS-mRNA-Expressionsrate wurde mittels q-PCR durchgeführt. Die mRNA der 6h- bzw. 24h-Stimulationsversuche wurde zunächst isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die q-PCR erfolgte mit dem TaqMan[®]-System. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM ($n=4$ (6h-Versuche), $n=3$ (24h-Versuche); $***p < 0,001$, $*p < 0,05$).

4.3 Immunmodulation der LPS-induzierten Zytokinproduktion in Mikroglia durch rAV17

Außer der neurotoxischen Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies führt die unkontrollierte Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α zur Schädigung von Neuronen bis hin zu deren Zelltod (\rightarrow 1.3). Um den Effekt des Immunmodulators rAV17 auf die Produktion dieser proinflammatorischen Zytokine zu untersuchen, wurden LPS-aktivierte Mikrogliazellen in An- bzw. Abwesenheit von rAV17 inkubiert und die mRNA-Expression von IL-6, IL-1 β und TNF- α gemessen. Die TNF- α -Freisetzung wurde zusätzlich mittels ELISA im Zellkulturüberstand gemessen.

4.3.1 IL-6 mRNA-Synthese in Mikroglia

Die mRNA-Expressionsrate des proinflammatorischen Zytokins IL-6 wurde mittels q-PCR gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 für die Versuche nach 6 und 24 Stunden grafisch dargestellt, wobei die Messwerte als Relativwert [in %] der IL-6-mRNA-Expressionsrate in LPS-stimulierten Mikroglia angegeben sind.

Die Basisexpressionsrate der IL-6-mRNA fällt bei den Kontrollzellen nach 6 bzw. 24 Stunden signifikant ($***p < 0,001$) geringer aus als bei den LPS-stimulierten Mikroglia (5A/B). Dasselbe gilt für die rAV17-stimulierte Kultur. Diese zeigt für beide Stimulationszeiträume keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe (5A/B). Durch simultane Inkubation mit rAV17 und LPS ergibt sich nach 6 Stunden eine signifikant ($*p < 0,05$) höhere IL-6-mRNA-Expressionsrate von $30,4(\pm 10,9) \%$ (5A). Zellen, die 24 Stunden mit LPS und rAV17 ko-inkubiert waren, zeigen eine signifikante ($**p < 0,01$) Reduktion der IL-6-mRNA um $19,67(\pm 5,5) \%$ (5B).

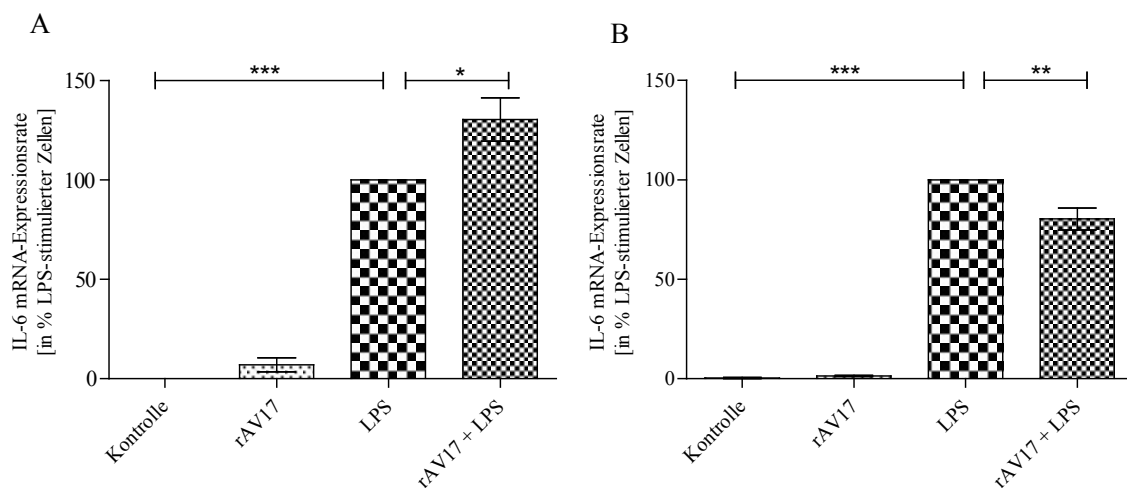


Abbildung 5: Einfluss des Immunmodulators rAV17 auf die mRNA-Expression von IL-6 in primären Mikroglia nach 6h (A) und 24h (B). Die relative Quantifizierung der IL-6-mRNA-Expressionsrate wurde mittels q-PCR durchgeführt. Die mRNA der 6h- bzw. 24h-Stimulationsversuche wurde zunächst isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die q-PCR erfolgte mit dem TaqMan[®]-System. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM (n=3; $***p < 0,001$, $**p < 0,01$, $*p < 0,05$).

4.3.2 IL-1 β mRNA-Synthese in Mikroglia

Die mRNA-Expressionsrate des proinflammatorisch wirksamen Interleukins-1 β wurde mittels q-PCR gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 für die Versuche nach 6 und 24 Stunden grafisch dargestellt, wobei die Messwerte als Relativwert [in %] der IL-1 β -mRNA-Expressionsrate in LPS-stimulierten Mikroglia angegeben sind.

Die Auswertung der Stimulationsversuche nach 6 Stunden zeigt eine signifikant ($***p < 0,001$) geringere mRNA-Expression des IL-1 β in den Kontroll- und rAV17-Ansätzen im Vergleich zu den LPS-stimulierten Zellen, wobei die IL-1 β -Expression der rAV17-stimulierten Zellen signifikant ($*p < 0,05$) höher ausfällt als diejenige der Kontrollgruppe (6A). Auf die LPS-induzierte IL-1 β -mRNA-Expression hat der Immunmodulator nach 6 Stunden keinen signifikanten Einfluss (6A).

Nach 24 Stunden Stimulationszeit ergibt sich – äquivalent zur sechsstündigen Stimulation – eine signifikant ($***p < 0,001$) geringere mRNA-Expression des IL-1 β der Kontroll- und rAV17-Ansätze, verglichen mit den LPS-stimulierten Mikroglia (6B). Desweiteren zeigt der Immunmodulator nach 24 Stunden keinen signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrollkultur, aber reduziert die LPS-induzierte Steigerung der IL-1 β -mRNA-Expression signifikant ($**p < 0,01$) um $34(\pm 9,4) \%$ (6B).

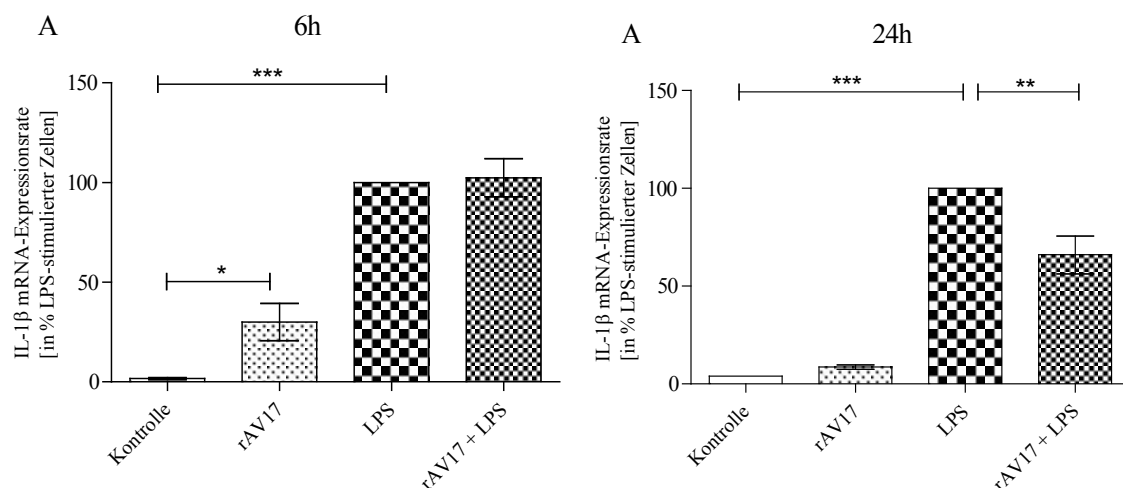


Abbildung 6: Einfluss des Immunmodulators rAV17 auf die mRNA-Expression von IL-1 β in primären Mikroglia nach 6h (A) und 24h (B). Die relative Quantifizierung der IL-1 β -mRNA-Expressionsrate wurde mittels q-PCR durchgeführt. Die mRNA der 6h- bzw. 24h-Stimulationsversuche wurde zunächst isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die q-PCR erfolgte mit dem TaqMan[®]-System. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM ($n=3$; $***p < 0,001$, $**p < 0,01$, $*p < 0,05$).

4.3.3 TNF- α mRNA-Synthese in Mikroglia

Die mRNA-Expressionsrate des proinflammatorischen Zytokins TNF- α wurde mittels q-PCR gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 für die Versuche nach 6 und 24 Stunden grafisch dargestellt, wobei die Messwerte als Relativwert [in %] der TNF- α -mRNA-Expressionsrate in LPS-stimulierten Mikroglia angegeben sind.

Verglichen mit der mRNA-Expressionsrate der LPS-aktivierten Mikroglia zeigt sich für die 6-Stunden-Stimulation eine signifikant ($***p < 0,001$) geringere Basisexpressionsrate für TNF- α bei den Kontroll- und den rAV17-stimulierten Mikroglia (7A/B). Die TNF- α -mRNA-Expression der rAV17-stimulierten Zellen ist nach 6 Stunden signifikant ($*p < 0,05$) höher als die der Kontrollgruppe (7A). Die simultane Stimulation mit rAV17 und LPS zeigt nach 6 Stunden keinen signifikanten Einfluss auf die mRNA-Expression von TNF- α bei LPS-aktivierten Zellen (7A).

Bei den Versuchen nach 24 Stunden streuen die Expressionswerte der Kontroll- und rAV17-stimulierten Zellen so stark, dass weder eine signifikant geringere TNF- α -mRNA-Expression im Vergleich zu LPS-stimulierten Mikroglia gezeigt werden kann, noch ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontroll- und der rAV17-behandelten Mikroglia (7B). Durch einen t-Test-Vergleich der mRNA-Expressionsrate der mit LPS und der simultan mit rAV17 und LPS stimulierten Zellen ergibt sich - im Gegensatz zur sechsstündigen Stimulation - nach 24 Stunden eine signifikante ($*p < 0,05$) Reduktion der TNF- α -Expression um $38,3(\pm 7,9) \%$ (7B).

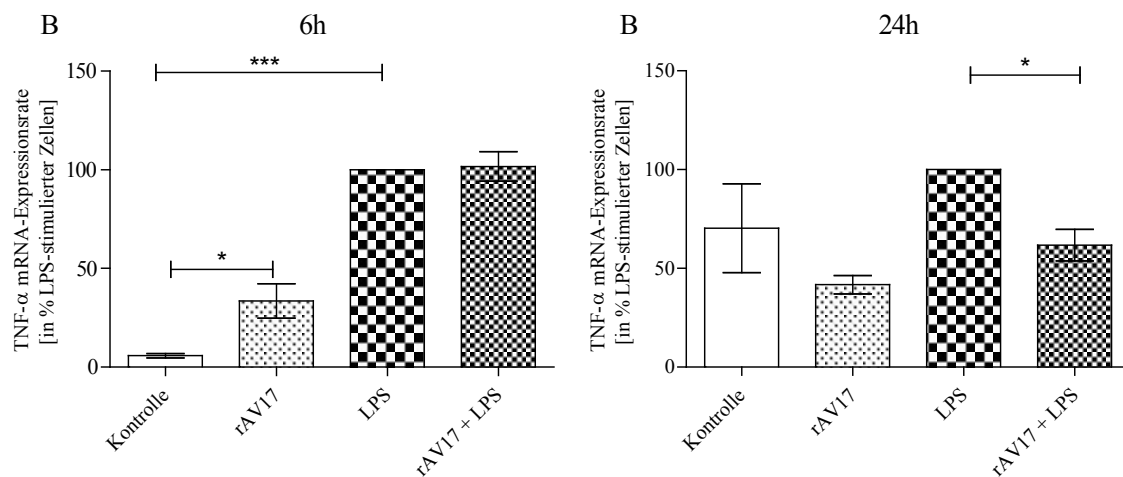


Abbildung 7: Einfluss des Immunmodulators rAV17 auf die mRNA-Expressionsrate von TNF- α in primären Mikroglia nach 6h (A) und 24h (B). Die relative Quantifizierung der TNF- α -mRNA-Expressionsrate wurde mittels q-PCR durchgeführt. Dazu wurde die mRNA der 6h- bzw. 24h-Stimulationsversuche zunächst isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die q-PCR erfolgte mit dem TaqMan[®]-System. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM (n=4; $***p < 0,001$, $*p < 0,05$).

4.3.4 TNF- α -Freisetzung in Mikroglia

Der Proteinnachweis des Zytokins TNF- α erfolgte mit der ELISA-Methode. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 für die Versuche nach 6 und 24 Stunden grafisch dargestellt, wobei die Messwerte als Relativwert [in %] der TNF- α -Freisetzung bei LPS-stimulierten Mikroglia angegeben sind.

Der Vergleich mit den LPS-stimulierten Mikroglia zeigt für beide Stimulationszeitpunkte eine signifikant ($***p < 0,001$) geringere TNF- α -Produktion der Zellen in Ruhe (Kontrollzellen) und nach Stimulation mit rAV17 (8A/B). Der Immunmodulator rAV17 zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die TNF- α -Produktion der Mikrogliazellen in Ruhe (8A/B). Durch simultane Behandlung der Zellen mit rAV17 und LPS zeigt sich nach 6 Stunden noch kein signifikanter Einfluss des Immunmodulators (8A). Nach 24 Stunden führt rAV17 zu einer signifikanten ($**p < 0,01$) Reduktion der TNF- α -Konzentration um $12,0(\pm 3,8) \%$ (8B).

Sowohl die Ergebnisse auf der Transkriptionsebene (Abbildung 7) als auch die TNF- α -Proteinbestimmung (Abbildung 8) zeigen nach 24 Stunden eine signifikante Reduktion von TNF- α in den simultan mit LPS und rAV17 stimulierten Mikroglia.

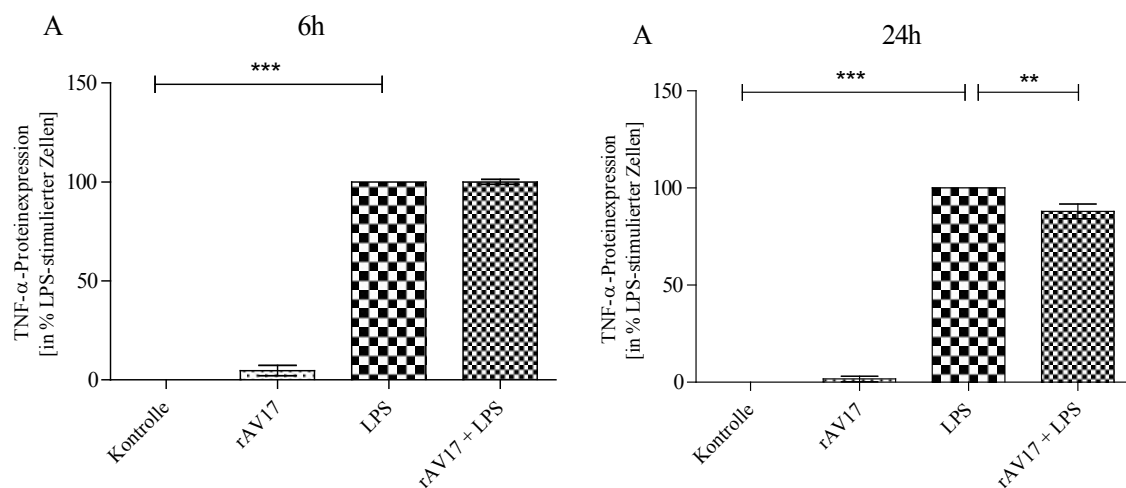


Abbildung 8: Einfluss des Immunmodulators rAV17 auf die TNF- α -Freisetzung primärer Mikroglia nach 6h (A) und 24h (B). Die TNF- α -Freisetzung wurde mittels ELISA im Zellkulturüberstand bestimmt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM ($n=4$; $***p < 0,001$, $**p < 0,01$).

4.4 Einfluss auf die Expression der COX-2-mRNA in Mikroglia

Die induzierbare COX-2 trägt über die Produktion des proinflammatorischen Prostaglandins E₂ (PGE₂) zur Initiation der glialen Entzündungsreaktion bei (→ 1.3). Um den Effekt des Immunmodulators rAV17 auf LPS-aktivierte Mikrogliazellen zu untersuchen, wurde die mRNA-Expression der COX-2 mittels qPCR bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 für die Versuche nach 6 und 24 Stunden grafisch dargestellt, wobei die Messwerte als Relativwert [in %] der COX-2-mRNA-Expressionsrate in LPS-stimulierten Mikroglia angegeben sind.

Nach 6 Stunden Stimulationszeit weisen die Kontrollzellen und die rAV17-stimulierten Mikroglia eine signifikant (**p < 0,001) geringere mRNA-Expression auf als die mit LPS stimulierten Zellen (9A). Die rAV17-stimulierten Zellen zeigen eine höhere Basisexpressionsrate der COX-2-mRNA als die Kontrollgruppe (9A). Durch simultane Stimulation der Mikrogliazellen mit LPS und rAV17 resultiert eine signifikante (*p < 0,05) Steigerung der COX-2-mRNA-Expression um 20,3 (± 6,8)% in Relation zur LPS-Gruppe (9A).

Für die Versuche nach 24 Stunden ergibt sich ebenfalls eine signifikant (**p < 0,001) geringere mRNA-Expressionsrate der COX-2 beim Vergleich der Kontroll- und rAV17-stimulierten Zellen mit den LPS-stimulierten Mikroglia (9B). Es ergibt sich kein Unterschied zwischen den Kontroll- und rAV17-stimulierten Mikroglia nach 24 Stunden (9B). Darüber hinaus reduziert rAV17 die mRNA-Expressionsrate der COX-2 nach 24 Stunden signifikant (*p < 0,05) um 32,5(± 11,6) % in den simultan stimulierten Mikroglia (9B).

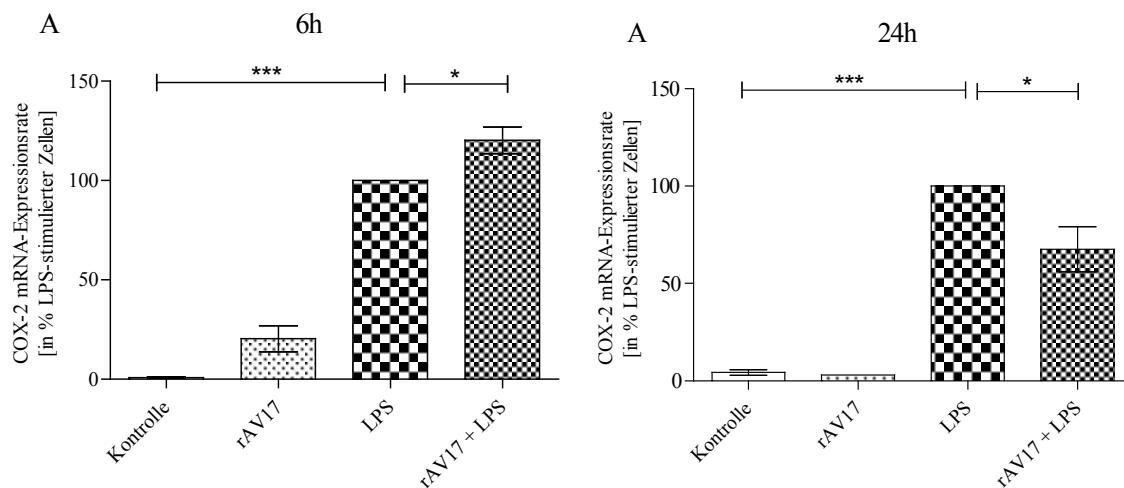


Abbildung 9: Einfluss des Immunmodulators rAV17 auf die mRNA-Expressionsrate von COX-2 in primären Mikroglia nach 6h (A) und 24h (B). Die relative Quantifizierung der COX-2-mRNA-Expressionsrate wurde mittels q-PCR durchgeführt. Die mRNA der 6h- bzw. 24h-Stimulationsversuche wurde zunächst isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die q-PCR erfolgte mit dem TaqMan[®]-System. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert ± SEM (n=6 (6h-Versuche), n=4 (24h-Versuche); ***p < 0,001, *p < 0,05).

4.5 Einfluss auf die Expression der IL-10-mRNA in Mikroglia

Um den immunmodulatorischen Effekt von rAV17 weiter zu evaluieren, wurde die mRNA-Expressionsrate des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 mittels q-PCR untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 für die Versuche nach 2, 6 und 24 Stunden grafisch dargestellt, wobei die Messwerte als Relativwert [in %] der IL-10-mRNA-Expressionsrate in LPS-stimulierten Mikroglia angegeben sind.

Nach 6 und 24 Stunden Stimulationszeit weisen die Kontroll- und rAV17-stimulierten Mikroglia eine signifikant ($***p < 0,001$) geringere mRNA-Expression des Zytokins IL-10 auf als die mit LPS behandelten Kulturen (10B/C). Die rAV17-stimulierten Zellen zeigen im Vergleich zur Kontrolle eine additive IL-10-mRNA-Expressionsrate von $90,0(\pm 11,2)$ % nach 2 Stunden (signifikant ($*p < 0,01$); 10A), $14,6(\pm 4,6)$ % nach 6 Stunden (signifikant ($*p < 0,05$); 10B) und $11,3(\pm 6,3)$ % nach 24 Stunden (10C).

Die simultane Stimulation der Mikrogliazellen mit LPS und rAV17 ergibt ein zweigipfliges Expressionsprofil der IL-10-mRNA. Nach 2 Stunden ergibt die rAV17-Zugabe einen additiven Effekt auf die IL-10-Expression von $60,9 (\pm 24,7)\%$ (10A), während nach 6 Stunden kein signifikanter Unterschied nachzuweisen ist (10B). Nach 24 Stunden führt rAV17 erneut zu einem signifikanten ($*p < 0,05$) Anstieg der mRNA-Expressionsrate von IL-10 um $35,0(\pm 4,0)$ % über das LPS-induzierte IL-10-Level hinaus (10C).

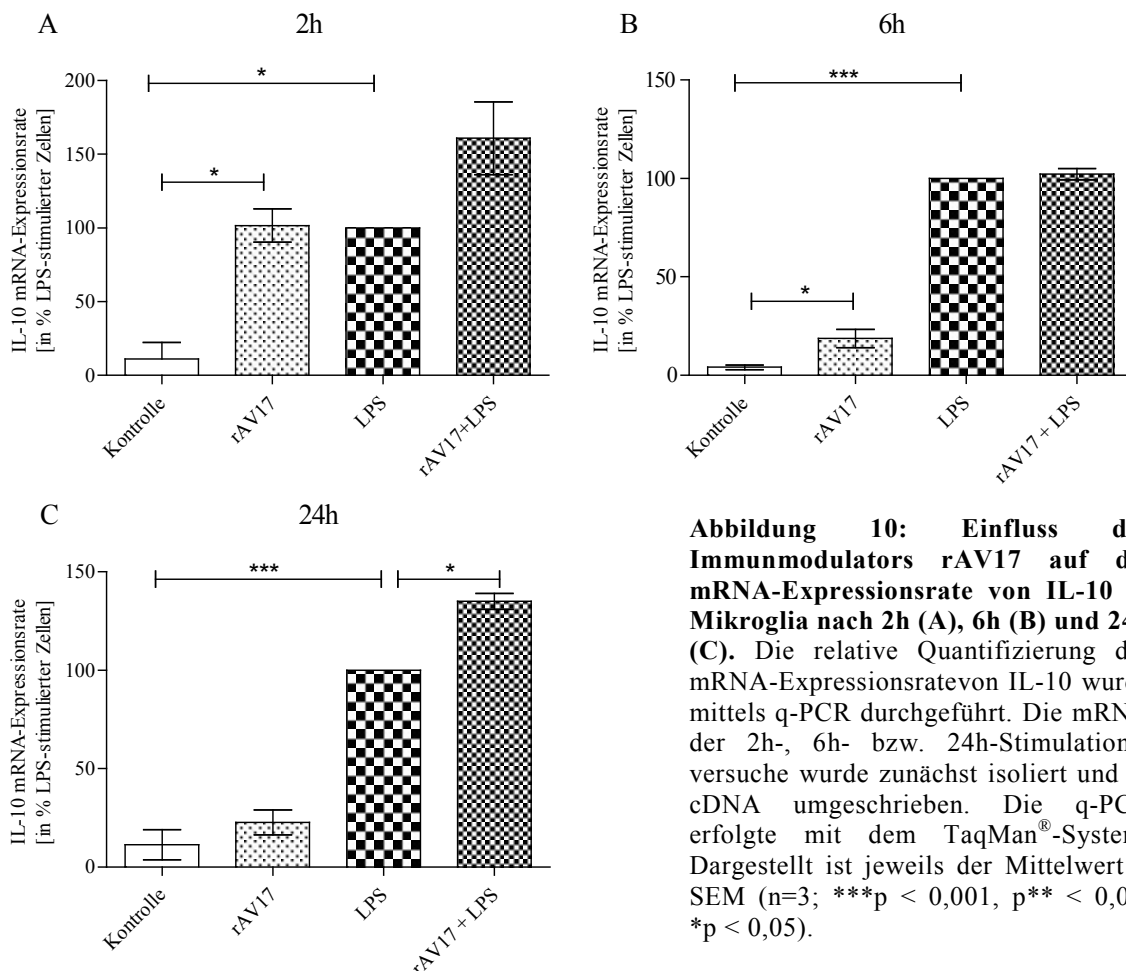


Abbildung 10: Einfluss des Immunmodulators rAV17 auf die mRNA-Expressionsrate von IL-10 in Mikroglia nach 2h (A), 6h (B) und 24h (C). Die relative Quantifizierung der mRNA-Expressionsrate von IL-10 wurde mittels q-PCR durchgeführt. Die mRNA der 2h-, 6h- bzw. 24h-Stimulationsversuche wurde zunächst isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die q-PCR erfolgte mit dem TaqMan®-System. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM (n=3; $***p < 0,001$, $p^{**} < 0,01$, $*p < 0,05$).

4.6 Studien über potentielle Signalwege des Immunmodulators rAV17

Für Entzündungsprozesse existieren zwei bedeutende intrazelluläre Signalkaskaden: die MAPK (*mitogen-activated protein-kinase*)-Kaskaden, zu denen die ERK- und p38-Signalwege zählen, und der NF- κ B-Signalweg. Zur Evaluierung des Einflusses des Immunmodulators rAV17 auf diese Signalwege wurde der ERK-Signalweg mittels Westernblot-Analyse und der NF- κ B-Signalweg mittels immunzytochemischer Färbung des Transkriptionsfaktors NF- κ B untersucht.

4.6.1 Einfluss des Immunmodulators rAV17 auf den ERK-Signalweg in Mikroglia

Der Einfluss des Immunmodulators rAV17 auf die MAP-Kinasen ERK1/2 wurde durch Bestimmung der Zunahme an transient-phosphoryliertem ERK 1/2 (pERK 1/2) untersucht. Der Nachweis der pERK1/2 erfolgte mittels Western-Blot nach 10- und 15-minütiger Stimulationszeit.

Abbildung 11A zeigt die Proteinbanden eines Westernblots nach 10-minütiger Stimulationszeit. LPS zeigt eine deutliche pERK1/2-Aktivierung (Bande bei 44/42 kDa; 11A). Die Inkubation mit rAV17 weist eine stärkere Aktivierung als die Kontrolle auf (11A). Durch simultane Stimulation der Mikroglia mit LPS und rAV17 ergibt sich tendenziell eine stärkere Induktion des ERK-Signalweges als unter LPS allein (11A). Die densitometrische Auswertung des Westernblot-Diagramms ergibt eine additive pERK1/2-Aktivierung um 20% durch rAV17 im Vergleich zur Kontrolle und eine um 13% gesteigerte Induktion bei simultaner Stimulation im Vergleich zur alleinigen LPS-Stimulation.

Die statistische Auswertung der Densitometrieergebnisse nach 10 Minuten Stimulationszeit zeigt aufgrund starker Schwankungen innerhalb der Versuchsgruppe keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Stimulationsansätzen. Während zwei Versuche bereits eine Ruheaktivität von pERK1/2 über das LPS-Niveau hinaus ergeben, zeigt nur ein Versuch (11A) eine normalwertige Kontrollaktivität.

Abbildung 11B zeigt eine repräsentative Westernblot-Darstellung nach 15-minütiger Stimulationszeit. Die Auswertung dieser Banden ergibt eine starke pERK1/2-Aktivierung (Bande bei 44/42 kDa) durch LPS-Stimulation der Mikroglia (11B). Der Immunmodulator rAV17 scheint die LPS-induzierte Phosphorylierung von pERK1/2 in diesem Versuch tendenziell zu reduzieren (11B). Die Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs in Ruhe und durch rAV17 fällt eindeutig schwächer aus (11B). Die Zugabe von rAV17 senkt die pERK-Phosphorylierung nach 15 Minuten sogar etwas unter das Ruhenniveau.

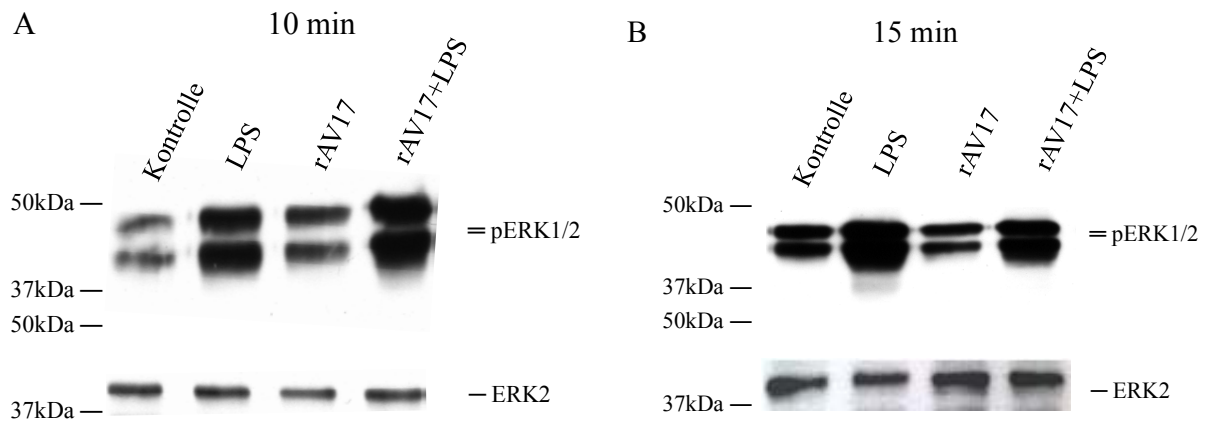


Abbildung 11: Einfluss des Immunmodulators rAV17 auf die ERK1/2-Phosphorylierung in Mikroglia nach 10-minütiger (A) und 15-minütiger (B) Stimulationszeit. Für die Analyse der ERK1/2-Phosphorylierung wurden die intrazellulären Proteinbestandteile zunächst in einer SDS-PAGE-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend die Menge an phosphoryliertem ERK1/2 (pERK 1/2) und Gesamt-ERK2 (ERK2) durch Western-Blot-Analyse bestimmt. Die Bandenpositionen von pERK1/2, Gesamt-ERK2 (ERK2) und die des Molekularmassenmarkers sind jeweils auf der rechten bzw. linken Seite angezeigt.

Die relativen Intensitätsunterschiede dreier Versuche nach 15 Minuten Stimulationszeit wurden weiterhin densitometrisch quantifiziert. Die Kontrollzellen weisen signifikant (** $p < 0,01$) weniger phosphoryliertes ERK1/2-Protein auf als die mit LPS stimulierten Zellen. Eine signifikant (* $p < 0,05$) geringere Proteinkonzentration zeigen auch die mit rAV17 stimulierten Zellen im Vergleich zu den LPS-stimulierten Zellen. Der Immunmodulator rAV17 weist bezüglich der pERK1/2-Aktivierung nach 15 Minuten keine signifikanten Unterschiede gegenüber ruhenden Mikroglia auf (keine grafische Darstellung). Abbildung 12 zeigt die statistische Auswertung nach 15 Minuten bei simultaner Inkubation der Mikrogliazellen mit LPS und rAV17 im Vergleich zur LPS-Gruppe. Die Ergebnisse sind dargestellt als Relativwert [in %] der pERK1/2-Aktivierung der LPS-stimulierten Mikroglia. Der Immunmodulator reduziert die ERK-1/2-Phosphorylierung signifikant (* $p < 0,05$) um $8,9 (\pm 0,5) \%$ im Vergleich zu LPS-stimulierten Mikroglia.

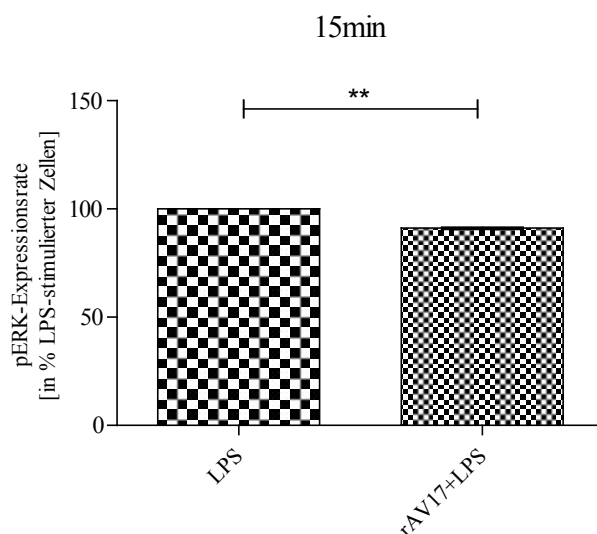


Abbildung 12: Densitometrische Auswertung der Western-Blot-Ergebnisse: Der Immunmodulator reduziert die Phosphorylierung von ERK1/2 in Mikroglia nach 15-minütiger Stimulationszeit. Die Werte entsprechen den Mittelwerten \pm SEM der pERK1/2 Menge. Die statistische Auswertung erfolgte als t-Test. ($n=3$; ** $p < 0,01$).

4.6.2 Einfluss des Immunmodulators rAV17 auf den NF- κ B-Signalweg

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B liegt bei ruhenden Mikroglia gebunden an einen Inhibitor-Komplex (I κ B) im Zytoplasma vor. Proinflammatorische Stimuli wie LPS bewirken dessen Dissoziation von I κ B und die nachfolgende Translokation in den Zellkern, wo NF- κ B über die Bindung an spezifische DNA-Abschnitte (sogenannte κ B-Motive) die Expression proinflammatorischer Mikrogliafaktoren induziert. Daher erlaubt die Verteilungsanalyse von NF- κ B durch die immunzytochemische Färbung von dessen p65-Untereinheit eine Aussage über den Einfluss des Immunmodulators rAV17 auf die Aktivierung der NF- κ B-Signalkaskade.

In Mikroglia wurde der Transkriptionsfaktor NF- κ B immunzytochemisch detektiert, nachdem die Zellen für 60 Minuten mit LPS (13B), dem Immunmodulator rAV17 (13C) oder simultan mit LPS und rAV17 (13D) inkubiert wurden. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 13.

Die Kontrollzellen blieben unbehandelt und zeigen eine primär zytoplasmatische Lokalisation von NF- κ B mit minimaler Anfärbung im Zellkern (Pfeil; 13A). Die Aktivierung der NF- κ B-Signalkaskade zeigt sich bei den LPS-aktivierten Mikroglia durch die stark grün fluoreszierenden Zellkerne (Pfeil; 13B).

Mikroglia, die mit dem Immunmodulator rAV17 inkubiert wurden, zeigen signalarme Zellkerne (Pfeil; 13A) und unterscheiden sich dadurch deutlich von den LPS-aktivierten Mikroglia (13B). Die simultane Stimulation der Mikroglia mit LPS und rAV17 zeigte eine im Vergleich zur LPS-Kontrolle deutlich geringere Fluoreszenz der Zellkerne (Pfeil; 13D).

Zusammenfassend zeigt die Auswertung der immunzytochemischen NF- κ B-Färbungsergebnisse, dass der Immunmodulator rAV17 zu keiner wesentlichen Aktivierung der NF- κ B-Signalkaskade (13A) im Vergleich zu ruhenden Mikroglia (13A) führt. Im Gegenteil, die simultane Simulation der Mikroglia mit rAV17 und LPS (13D) führt zu einer deutlich abgeschwächten Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs im Vergleich zu LPS-stimulierten Mikroglia (13B).

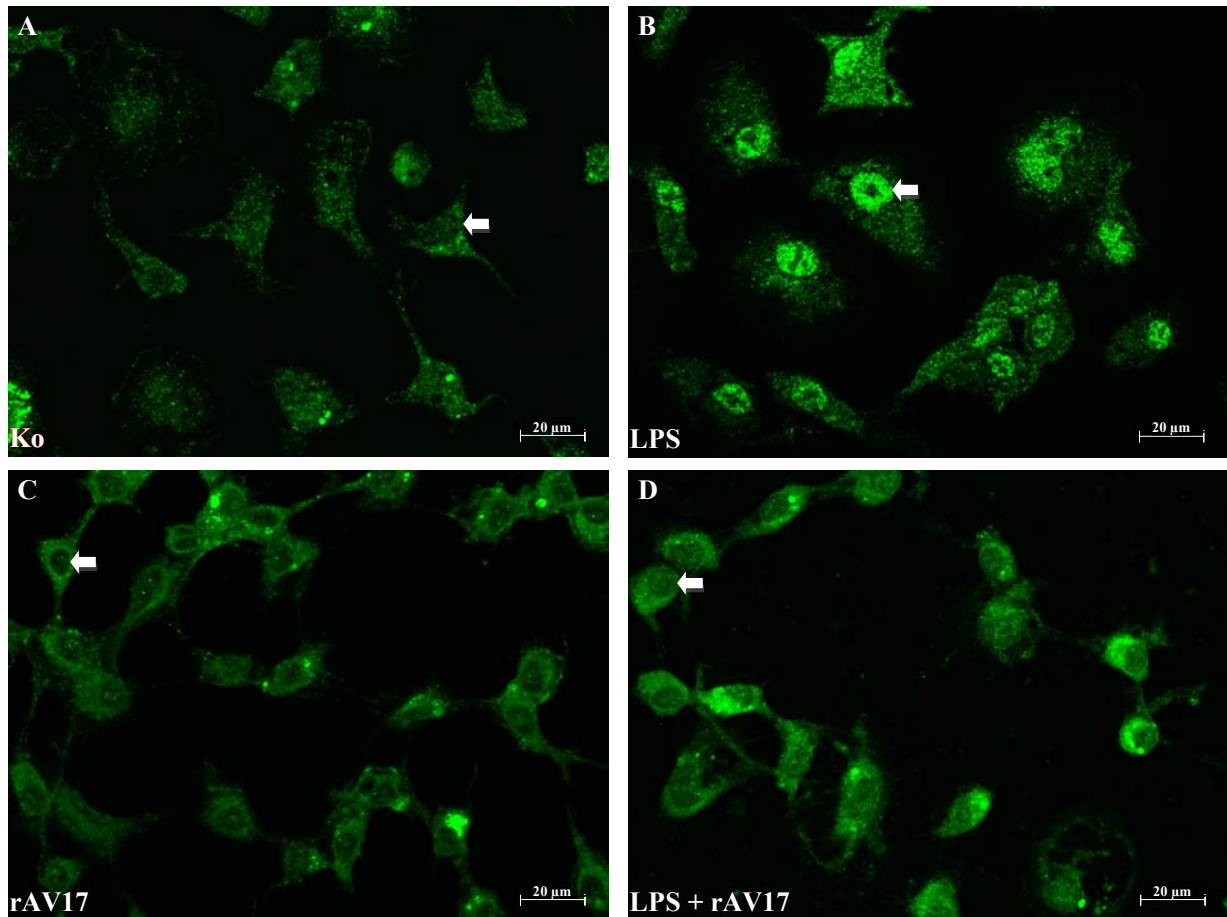


Abbildung 13: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in primären Mikroglia. Nicht-stimulierte Mikroglia zeigen eine minimale NF- κ B-Kernfärbung (A), während LPS als Positivkontrolle zu einer eindeutigen Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern führt (B). Die Stimulation der Mikroglia mit rAV17 führt zu keiner wesentlichen Aktivierung des NF- κ B-Signalweges (C). Bei der simulatenen Stimulation mit LPS und rAV17 blockiert der Immunmodulator die LPS-induzierte Translokation von NF- κ B (D). Für die immunzytochemische Färbung wurden die Mikrogliazellen für 24h stimuliert und die Zellen mit Zamboni-Reagenz und Aceton fixiert. Der NF- κ B-Nachweis erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenz und wurde im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

5 Diskussion

„We await the day when researchers`capacity to modulate microglial cell-behavior is equivalent to even a tiny fraction of that achieved effortlessly by the intact CNS”.

Dieses Zitat der Arbeitsgruppe um R. Ransohoff (Nature, 2010) spiegelt den Strategiewandel der anti-inflammatorischen Therapie bei neurodegenerativen Erkrankungen wie dem IPS wider [154].

Angesichts des ausbleibenden Erfolges der bisherigen anti-inflammatorischen Therapie in der klinischen Anwendung (→ 1.5) führen die neuen Erkenntnisse über die Funktionen der Mikroglia zu dem therapeutischen Ziel, durch eine funktionale Neuorientierung dieser Zellen im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen einen Teil ihrer physiologischen Funktionen zurückzugewinnen.

Aktivierte Mikrogliazellen sind bei zahlreichen ZNS-Pathologien wie der AD, dem IPS, der ALS, der MS, der Prionen-Erkrankung und vielen weiteren beschrieben [201, 428]. Die Neuroinflammations-Hypothese hat diese Zellen in das Zentrum anti-inflammatorischer Therapieversuche gerückt (→ 1.3). Neuere Entdeckungen über die Plastizität der Mikrogliaaktivierung und das neuroregenerative Potential dieser Zellen führen zu der in dieser Arbeit verfolgten immunmodulatorischen Therapiestrategie im Rahmen des IPS [410]. Den theoretischen Hintergrund dieses Ansatzes bildet das sich zunehmend durchsetzende Konzept der differenzierten mikroglialen Phänotypen. Lange Zeit wurde die Mikrogliaaktivierung durch das Stufenkonzept nach Kreutzberg (1996) beschrieben [112]. Neueste Studien verstehen die Mikrogliaaktivierung demgegenüber als eine stark kontextabhängige Phänotypendifferenzierung, die sich insbesondere durch das Expressionsprofil der Zellen und weniger anhand der morphologischen Transformation beschreiben lässt [193, 201, 412, 428-430]. Aktivierte Mikroglia mit einem „anti-inflammatorischen Phänotyp“ finden sich in Modellen zur AD [430], zur Prionen-Erkrankung [431], zur MS [432] und in Regionen axonaler Waller-Degeneration bei Nagern [433] und beim Menschen [434]. Diese Mikroglia setzen nur geringe Mengen proinflammatorischer Mediatoren frei und exprimieren stattdessen vornehmlich Moleküle und Mediatoren, die mit anti-inflammatorischen Eigenschaften assoziiert werden. Darüber hinaus sind Mikroglia in der Lage neurotrophische Mediatoren wie BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) oder GDNF (*glial derived neurotrophic factor*) zu sezernieren, welche die Proliferation und das Wachstum (dopaminerge) Neurone fördern [227, 435]. Beide Faktoren reduzieren in *in vivo*- und *in vitro*-Parkinsonmodellen den 6-OHDA-induzierten oxidativen Stress und zeigen neuroprotektive Effekte [436, 437].

Im umgekehrten Fall kann das spezifische Mikromilieu im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen einen maladaptiven Mikroglia-Phänotyp mit neurotoxischen Effekten induzieren. Dieses ist vermutlich insbesondere dann der Fall, wenn die Mikrogliaaktivierung unkontrolliert abläuft, sich-selbst-erhaltende Mechanismen entwickelt oder die Mikroglia altersbedingte Funktionsstörungen aufweisen [412, 429, 438]. Eine derartige Dysregulation der Mikrogliaaktivierung ist bei Erkrankungen wie dem IPS anzunehmen.

Die therapeutische Strategie der Immunmodulation ist daher, die dysregulierte Mikrogliaaktivierung neu zu polarisieren, indem die neurotoxischen Mechanismen unterdrückt und neuroregenerative

Mechanismen angeregt werden. Diese Therapievorstellung geht über die Globalsuppression der Mikrogliaaktivierung der bisherigen „anti-inflammatorischen“ Therapie hinaus und versucht im Idealfall nicht nur einzelne Mediatoren oder Enzyme zu beeinflussen, sondern einen generellen „Phänotypen-*switch*“ herbeizuführen.

5.1 Kulturstudien

5.1.1 *In vitro*-Kultivierung von Mikrogliazellen

In dieser Arbeit wurde das natürliche Sekretionspeptid rAV17 des Nematoden *Acanthocheilonema vitae* hinsichtlich seines Potentials zur Immunregulierung bei LPS-aktivierten Mikroglia untersucht. Als ein anerkanntes *in vitro*-Versuchsmodell dienten hierbei etablierte Mikroglia-Zellkulturen [67, 439]. Die korrekte Untersuchung der molekularen Mechanismen der Mikrogliaaktivierung bzw. der Mikroglia-Immunmodulation erfordert ramifizierte (ruhende) Mikroglia als Kulturvoraussetzung. Wie in Abschnitt 1.3 beschrieben, ist die jeweilige Zustandsform der Mikroglia das Ergebnis zahlreicher humoraler und zellulärer Faktoren, welche stimulierend oder inhibierend auf die Zellen einwirken. Dementsprechend stellt der Kultivierungsvorgang *per se* einen starken Stimulationsreiz für Mikroglia dar [165, 440]. Um diesen Störfaktor zu kontrollieren wurden die Mikroglia primär als eine Astrozyten-Mikroglia-Mischkultur inkubiert. Sievers und Kollegen (1994) zeigten, dass diese Prozedur eine ramifizierte Mikrogliamorphologie induziert [441]. Darüber hinaus wird durch diese Methode der Funktionszustand der Mikroglia weniger gestört als durch anderen Methoden, bei welchen der Mikrogliakultur Wachstumsfaktoren zugegeben werden [442].

Vor dem Hintergrund einer neuroinflammatorischen Komponente beim IPS, gilt das Endotoxin LPS als ein akzeptiertes Reagenz, um Mikroglia *in vitro* zu aktivieren [165]. Auf diese Weise lassen sich einige Aspekte der Parkinsonpathologie *in vitro* rekonstruieren und experimentell modellieren.

Der Immunmodulator rAV17 zeigt in dieser Arbeit eindeutige Effekte auf ruhende und aktivierte Mikroglia. Anhand des morphologischen Verhaltens der Zellen, der Genexpression, der Freisetzung der proinflammatorischen Mediatoren NO und TNF- α und der Beeinflussung immunologisch relevanter Signalwege soll im Folgenden die phänotypische Differenzierung der Mikroglia unter rAV17 abgeschätzt werden.

5.1.2 Wissenschaftliche Kontextualisierung der Versuchsergebnisse

Die unstimulierten Kontroll-Mikrogliazellen zeigen in Kulturbedingungen die für ruhende Mikroglia charakteristische ramifizierte Morphologie [67]. Auf molekularbiologischer Ebene zeigen die ramifizierten Kontrollmikroglia keine wesentliche Expression bzw. Freisetzung der untersuchten Parameter. Durch Stimulation mit LPS werden alle beschriebenen Faktoren massiv erhöht und die Mikroglia zeigen eine rund-ovale Morphologie. Diese Ergebnisse sind äquivalent zu den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen [443, 444] und sprechen für eine suffiziente Versuchsgrundlage.

5.1.2.1 Beeinflussung des proinflammatorischen Mikroglia-Phänotyps durch rAV17

Das rekombinant hergestellte Cystatin des Nematoden *Acanthocheilonema vitae* führt im Kulturmedium zu einer zeitabhängigen Reduktion der untersuchten Mediatoren NO und TNF- α nach 24 Stunden. Die mikrogliale mRNA-Expression der iNOS, der COX-2 und der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α wird durch rAV17 ebenfalls nach 24 Stunden reduziert.

Demgegenüber steigert rAV17 konkret das anti-inflammatorische Potential der Mikrogliazellen, indem es zu einer deutlichen mRNA-Expressionssteigerung des Zytokins IL-10 führt. Es steigert die IL-10-Expression sowohl bei ruhenden als auch bei LPS-aktivierten Mikroglia. Diese molekularbiologische Charakterisierung der Mikrogliareaktion spiegelt sich tendenziell auch in dem morphologischen Verhalten der rAV17-stimulierten Mikroglia wider. Inwiefern eine Hemmung der Mikroglia-Transformation zu der amöboiden Zellmorphologie jedoch als suffizientes Kriterium zur Funktionsbeurteilung dieser Zellen verwendet werden kann, steht derzeit zur Debatte. Neueste Veröffentlichungen sehen die phänotypische Differenzierung der Mikroglia als entscheidendes Kriterium an, da Mikroglia mit mikroskopisch monomorphem amöboidem Aussehen, möglicherweise gravierende Funktionsunterschiede aufweisen können [154, 193, 201, 412, 429]. Als primäres Ziel ist demnach nicht die Aktivierungshemmung der Mikroglia zu verfolgen, sondern die Unterstützung neuroregenerativer/-protektiver Mikrogliafunktionen.

Der Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit anderen Untersuchungen zur LPS-Stimulation von Mikroglia weist darauf hin, dass die Ergebnisse nicht durch die normale Kinetik LPS-stimulierter Mikroglia *in vitro* zustande kommen. Neben der eigenen Positivkontrolle (LPS-stimulierte Mikroglia), zeigen unabhängige Arbeitsgruppen, dass LPS bei Mikroglia zu einer anhaltend hohen Produktion von IL-1 β , IL-6 und TNF- α nach 24 Stunden und zu einer Steigerung der NO-Freisetzung bis zu 72 Stunden nach der Stimulation führt [366, 443, 445-447]. Die mRNA-Expressionsraten von iNOS, COX-2 und den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β und IL-6 zeigen ebenfalls anhaltend hohe Raten zum 24 Stunden Zeitpunkt [366, 448, 449]. Diese Daten stützen die Interpretation der Versuchsergebnisse insofern, als dass die Reduktion der entsprechenden Expressions- und Freisetzungsraten nach 24 Stunden auf den immunmodulatorischen Effekt des rAV17 zurückzuführen sind.

Wie ist der Effekt des Immunmodulators hinsichtlich der *in vivo*-Situation beim PS einzuschätzen?

Im Rahmen der Parkinsonforschung wird LPS-stimulierten Mikroglia ein neurotoxischer Phänotyp zugesprochen [428]. Die klassische LPS-Aktivierung führt bei Mikroglia zu einer massiven Produktion proinflammatorischer Zytokine (IL-1 β , IL-1, TNF- α) und NO (\rightarrow 1.3.2) und gesteigerten Enzymexpressionen der iNOS und COX-2 [450, 451]. Das Kulturmedium LPS-aktivierter Mikroglia ist zytotoxisch für dopaminerge Neuronenkulturen *in vitro* [369, 452]. Darüber hinaus bestätigen auch *in vivo*-Experimente eine selektive neurotoxische Wirkung von LPS auf die dopaminergen Neurone der SNpc [308, 318]. Daher kann anhand der konsequenten Reduktion der in dieser Arbeit untersuchten Faktoren nach LPS-Stimulation und des eindeutigen rAV17-Effekts auf das anti-inflammatorische IL-10 eine neuroprotektive Wirkung des Immunmodulators vermutet werden. Diese

Interpretation der Versuchsergebnisse soll im Folgenden in den Kontext der aktuellen wissenschaftlichen Forschung gestellt und anhand der untersuchten Parameter genauer erläutert werden:

NO und iNOS: Außer der iNOS kann der NO-reduzierende Effekt auch durch Beeinflussung der mikroglialen NADPH-Oxidase vermittelt sein [107, 453]. Da der Immunmodulator rAV17 jedoch sowohl das NO-produzierende Enzym iNOS als auch den zytotoxischen Mediator NO reduziert, ist hier ein kausaler Zusammenhang anzunehmen. Experimentelle Parkinsonmodelle sowie *post mortem*-Untersuchungen bei Parkinsonpatienten liefern direkte Evidenz für die Bedeutung der iNOS und des NO im Rahmen der Parkinsonpathologie (→ 1.3.1). Hochkonzentriert hemmt NO den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette und führt so zur mitochondrialen Dysfunktion und zellulären Energiekrise der dopaminergen Neurone [204, 211-213]. Des Weiteren bildet NO mit hochreaktiven Superoxid-Anionen (O_2^-) das zytotoxische Peroxynitrit ($ONOO^-$), das zahlreiche Makromoleküle oxidiert bzw. nitriert [214]. Molekularer Marker derartig veränderter Strukturen ist das 3-Nitrotyrosin (3-NT), welches als freies 3-NT zu einer signifikanten striatalen Neurodegeneration führt [454]. Im Parkinson-Tiermodell kommt es 24 Stunden nach der Gabe von MPTP zu einer dramatischen Erhöhung der 3-NT-Konzentration in der SNpc [455]. Als ein betroffenes Makromolekül haben immunhistochemische Untersuchungen bei Parkinson-Patienten nitrosative Veränderungen im α -Synuclein (N- α -Syn) der LB identifiziert [456, 457]. *In vitro*-Versuche mit N- α -Syn induzieren einen neurotoxischen Mikroglia-Phänotyp [194, 300]. Ein anderes Zielmolekül der Nitrierung ist das Schlüsselenzym der Dopaminsynthese, die Tyrosin-Hydroxylase. Die katalytische Aktivität der Tyrosin-Hydroxylase nimmt parallel mit dem Nitrierungsgrad ab [458, 459]. Darüber hinaus führt die übermäßige ROS-Produktion an der Mitochondrienmembran zu Lipidperoxidationen, die deren Permeabilitätseigenschaften stören und somit die zelluläre Apoptose induzieren [204, 460].

Im Umkehrschluss führt die selektive Inhibition der iNOS und NO-Freisetzung zu einer signifikanten Reduktion des dopaminergen Zellverlustes im *in vitro*- und *in vivo*-Parkinsonmodell [202, 208, 316, 447, 461]. Ein neuroprotektiver Effekt durch genetische Ausschaltung der iNOS findet sich auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie der AD [462]. Demnach lässt auch die rAV17-bedingte Reduktion der iNOS-mRNA-Expression und der NO-Freisetzung eine Hemmung des neurodegenerativen Prozesses beim IPS annehmen.

COX-2: Das Enzym COX-2 gilt nach der klassischen Vorstellung als entzündungsunterstützend (proinflammatorisch) [463]. *In vitro*-Experimente zeigen, dass Stimulanzen wie α -Synuclein, LPS oder MPP^+ , die mit neurotoxischen Effekten assoziiert werden, zu einer verstärkten COX-2-Expression in Mikroglia führen [218, 221, 223, 366]. Wang und Kollegen (2005) zeigen in kombinierten Neuronen-Mikroglia-Kulturen, dass das Parkinsontoxine MPP^+ in beiden Zelltypen zu einer COX-2-Expressionssteigerung führt. Hierbei ist die Induktion der neuronalen COX-2 von der Anwesenheit der Mikroglia abhängig. Die selektive COX-2-Inhibierung führt in der Mikroglia-Kombinationskultur - nicht jedoch in der angereicherten Neuronenkultur - zu einer Abschwächung der

MPP⁺-vermittelten dopaminergen Neurotoxizität [221]. Zum Anderen führt eine COX-2-Inhibition bzw. genetische COX-2-Ablation zu einer reduzierten Neurodegeneration im *in vivo*-MPTP-Modell [220, 224, 225]. *Post mortem*-Analysen zeigen eine erhöhte COX-2-Expression in aktivierten Mikroglia der SNpc von Parkinsonpatienten [207].

Die Daten sprechen für eine Neurodegeneration-unterstützende Bedeutung der mikroglialen COX-2. Zusätzlich zur Cyclooxygenase-Aktivität produziert die COX-2 zahlreiche ROS, die den oxidativen Stress in der SNpc forcieren können [220, 224, 464, 465]. Diesen Befunden zufolge, ist die rAV17-bedingte Reduktion der COX-2-Expressionsrate nach 24 Stunden als neuroprotektiv einzustufen.

Tatsächlich erscheint es jedoch schwierig, ein komplexes System wie das Arachidonsäure-abgeleitete Mediatorsystem grundsätzlich als pro- oder anti-inflammatorisch zu definieren. Am Ende der COX-2-Reaktionskette stehen eine Vielzahl verschiedenster Prostaglandintypen und eine ebenso große Anzahl möglicher Rezeptoren. Die Prostaglandin-vermittelten COX-2-Effekte kommen je nach Stimulus und den primär betroffenen Zelltypen stark kontextabhängig zustande [464, 466-468]. In Modellen zur Neurodegeneration, in denen LPS zur Neuroinflammation, Gliaaktivierung und sekundären Neurotoxizität führt, verstärkt der PGE₂-Rezeptor EP2 beispielsweise die Entzündungsreaktion und sekundäre Synaptotoxizität [469-471]. Demgegenüber vermittelt PGE₂ über EP2 in *in vivo*-Modellen zur zerebralen Ischämie neuroprotektive Effekte [472, 473].

Beim PS scheint die COX-2 generell stärker in Neuronen vertreten zu sein [220, 463, 474], in denen sie durch die Produktion von ROS und Zytotoxin Dopamin-Chinon für das selektive Sterben der dopaminergen Neurone verantwortlich ist [220, 224, 475]. Insofern kann der neurotoxische Effekt vor allem der neuronalen COX-2 zuzuschreiben sein [220, 474] und aktivierte Mikroglia können diesen Effekt über die Induktion der neuronalen COX-2 durch proinflammatorische Metabolite verstärken [225, 476]. Neuere Studiendaten legen darüber hinaus die Vermutung nahe, dass die COX-2 in Mikroglia eher neuroprotektive Effekte vermittelt und vielmehr die COX-1 für die proinflammatorischen und neurotoxischen Effekte verantwortlich ist [463, 466-468, 477, 478].

Die eindeutige Interpretation der Ergebnisse zur COX-2 in Mikroglia bedarf offensichtlich weiterer Untersuchungen dieses vielfältigen Mediatorsystems, sodass es auch schwer fällt, die rAV17-bedingte COX-2-Expressionssteigerung nach 6 Stunden eindeutig zu interpretieren.

Proinflammatorische Zytokine: Den Zytokinen IL-1 β , IL-6 und TNF- α werden neurotoxische Effekte im Rahmen der AD, des IPS (\rightarrow 1.3.2), der MS, der ALS und anderen neurodegenerativen Erkrankungen zugeschrieben [70, 411]. Epidemiologischen Studien zeigen, dass erhöhte IL-6-Serumwerte mit einem gesteigerten Risiko einhergehen, an Parkinson zu erkranken [479]. Beim PS kommt es durch die hohe Anzahl aktivierter Mikroglia in der SN und den Selbsterhaltungseffekt der Mikrogliaaktivierung (*circulus vitiosus*) zu einer schädlichen Kombination aus hoher Lokaldosis der proinflammatorischen Zytokine und einer chronischen Expositionsdauer. Während interessanterweise im *in vivo*-Parkinsonmodell die einmalige Injektion von TNF- α bzw. IL-1 β in die SN zu keinen neurodegenerativen Veränderungen führt [317, 480], verursacht demgegenüber die chronische

TNF- α -Exposition einen signifikanten Nervenzellverlust in der SN. Dieser wird, ähnlich wie beim IPS, begleitet von einer Mikrogliaaktivierung und motorischen Dysfunktionen [481, 482]. Dieselbe Entdeckung wurde auch für das IL-1 β bestätigt [483]. Neben den physiologischen Funktionen dieser Zytokine scheint als Nettoeffekt die zytotoxische Komponente beim PS zu überwiegen, da neutralisierende Antikörper gegen IL-1 β oder TNF- α die LPS-induzierte Neurodegeneration *in vivo* um etwa 50% mildern können [240, 365].

Die neurotoxischen Mechanismen der Zytokine beim IPS sind noch größtenteils Gegenstand neurowissenschaftlicher Forschungen. TNF- α vermag über den TNF- α -Rezeptor 1, der eine zytosolische Todesdomäne trägt, einen direkten Apoptosemechanismus in Nervenzellen zu induzieren [484]. Die dopaminergen Neurone der SNpc von Parkinsonpatienten exprimieren diesen Rezeptor verstärkt [237, 485] und Untersuchungen mit Primärkulturen dopaminergener Neurone bei Mäusen bestätigen diesen direkt-neurotoxischen Mechanismus [240, 348, 486]. Des Weiteren führen TNF- α und IL-1 β zur Aktivierung des pro-apoptotischen NF- κ B-Signalweges [487-489], der in dopaminergen Neuronen beim IPS und in Parkinson-Tiermodellen verstärkt aktiviert ist [490-493]. In diesen bewirkt NF- κ B als nukleärer Transkriptionsfaktor eine Induktion der neuronalen NOS, der COX-2 und pro-apoptotischer Faktoren (z.B. p53) und unterstützt auf diese Weise den oxidativen Stress und den nachfolgenden Zelltod in der SN [220, 332, 481, 491, 494-496]. Der NF- κ B-Signalweg nimmt parallel auch eine Schlüsselrolle bei der Mikrogliaaktivierung ein. Zahlreiche Mikrogliaaktivatoren wie LPS [497] oder Neuromelanin [311] sowie positive *feedback*-Schleifen der proinflammatorischen Zytokine führen zur NF- κ B-Aktivierung in den Mikroglia [448, 498]. Der NF- κ B-Signalweg induziert in diesen die proinflammatorischen Mediatoren IL-1 β , TNF- α , IL-6 und NO sowie die Enzyme iNOS und COX-2 [443, 448, 499-505]. Dieses potenziert die Neuroinflammation und forciert indirekt den oxidativen Stress in der SN. Eine Hemmung des mikroglialen NF- κ B-Signalweges in Zellkulturstudien und im MPTP-Parkinsonmodell führt zur Reduktion der freigesetzten proinflammatorischen Mediatoren und reduziert die Neurodegeneration in der SNpc [502, 505, 506]. Beim PS führt daher vermutlich die Kombination aus einem *circulus vitiosus* und positiven Rückkopplungsschleifen zu einer Dysregulierung der Mikrogliaaktivierung mit Ausbildung eines neurotoxischen Phänotyps. Für die Hypothese einer dysregulierten Mikrogliareaktion sprechen auch die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Lai (2008). Diese konnten im Tiermodell belegen, dass die Neurotoxizität einer Mikrogliareaktion mit dem Ausmaß des initialen Schadens im ZNS zunimmt [507].

Einige Autoren fordern daher Wirkstoffe, die nicht hochspezifisch nur ein Enzym hemmen, sondern eine phänotypische Neudifferenzierung der Mikroglia bewirken. Zu diesem Zwecke sollen diese in unterschiedliche Regelschleifen eingreifen, ohne dabei die Mikrogliafunktionen im ZNS global zu blockieren [10, 428]. Der Immunmodulator rAV17 zeigt nach 24 Stunden eine deutliche Reduktion der angesprochenen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α . Ein zentraler Mechanismus scheint nach unseren Befunden dabei die Förderung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 zu sein. Ein weiterer Hinweis für das neuroprotektive Potential des Immunmodulators kann die Steigerung der

IL-1 β -Expression in Ruhe sein. Bei nur geringer Störung der ZNS-Homöostase werden dem Zytokin IL-1 β durchaus neuroregenerative Effekte durch die Freisetzung von astrozytären Neurotrophinen (z.B. GDNF) zugeschrieben [508, 509]. Dieser protektive Effekt wird durch hohe Zytokindosen - beispielsweise von IL-6 - im Rahmen stärkerer Störungen des ZNS-Gleichgewichtes offenbar antagonisiert [510]. Die entsprechend hohe TNF- α -Expression in Ruhe nach 24 Stunden ist vermutlich am ehesten auf eine Grundaktivierung der Zellkultur zurückzuführen, da bereits die Kontrollen eine abnormal hohe mRNA-Expression aufweisen. Daher wurde der Effekt des Immunmodulators auf LPS-aktivierte Mikroglia isoliert mit einem t-Test untersucht und zusätzlich die Proteinmenge von TNF- α im Kulturmedium als Maß für dessen Freisetzung bestimmt. TNF- α wird auf Proteinebene eindeutig reduziert, sodass von einem tatsächlichen rAV17-Effekt auf TNF- α ausgegangen werden kann.

Anti-inflammatorisches IL-10: Zahlreiche Studien haben sich mit der Suppression der Mikroglia-aktivierung beschäftigt, während nur wenige darauf zielen, das neuroprotektive Potential dieser Zellen zu verstärken. Außer Wachstumsfaktoren wie dem GDNF spielt das IL-10 eine entscheidende Rolle bei der Neuroprotektion im Rahmen zahlreicher ZNS-Pathologien [252, 253, 261, 511]. IL-10 reduziert die Neurodegeneration in LPS- und 6-OHDA-Modellen zur Parkinson-Erkrankung [258, 261]. *In vitro*-Experimente LPS-aktivierter Mikroglia zeigen, dass IL-10 die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen und die Expression der COX-2 hemmt [262, 263, 512]. Ein entscheidender Mechanismus hierbei ist die Inhibition des mikroglialen NF- κ B-Signalweges [259, 513]. Des Weiteren reduziert IL-10 die Freisetzung extrazellulärer ROS, indem es die mikrogliale iNOS und NADPH-Oxidase hemmt [260, 263, 512]. Die Tatsache, dass die transgene IL-10-Überexpression in der SN einen neuroprotektiven Effekt im 6-OHDA-Modell vermittelt [261], spricht für die Hypothese, dass sich auch die rAV17-induzierte Steigerung der IL-10-mRNA-Expression bei ruhenden und LPS-aktivierten Mikroglia neuroprotektiv auswirkt.

Basierend auf der Hypothese, dass ein Teil der Vulnerabilität der SN-Neurone durch die hohe Dichte an Mikroglia in der SN verursacht wird [318], kann IL-10 durch Hemmung der chemotaktischen Rekrutierung weiterer Mikroglia bzw. peripherer Immunzellen zur Neuroprotektion beitragen [299, 514-516]. Arimoto und Kollegen (2007) zeigen, dass die kontinuierliche exogene IL-10-Zufuhr nach LPS-Injektion in die SN zu einer deutlich geringeren Anzahl aktivierter Mikroglia vor Ort führt [258]. Außer dieser indirekten Neuroprotektion über die Modulation der Mikroglia-reaktion blockiert IL-10 nach neueren Untersuchungen auch direkt die Neuroapoptose in Nervenzellen, indem es die Expression anti-apoptotischer Faktoren wie Bcl-2 induziert und gleichzeitig pro-apoptotische Mechanismen wie die Caspase 3-Aktivierung oder Cytochrom-c-Freisetzung hemmt [245, 246, 252, 258, 517, 518].

Zusammengefasst ergeben diese Ergebnisse eine Parallele zu den ontogenetisch verwandten Monozyten, bei welchen rAV17 über IL-10 die Differenzierung zum anti-inflammatorischen M2-Phänotyp unterstützt [418, 419, 519]. Dieser wird assoziiert mit einer T_H2-Zell-Immunreaktion, der Phagozytose von Zelldebris, der Expression anti-inflammatorischer Moleküle und der

Unterstützung der Gewebereparatur und -regeneration. M2-Makrophagen, spezifische T_{reg}-Zellen und eine T_H2-Dominanz finden sich gehäuft im Rahmen von Helminthen-Infektionen und gehen mit verringerten allergischen und autoimmunen Immunreaktionen des Wirts einher [520-522]. Effektormoleküle dieser Immunmodulation sind parasitäre Sekretionsprodukte wie das (r)AV17 und das IL-10 (→ 1.5.1).

Vor diesem Hintergrund kritisieren Khandelwal und Kollegen (2011) den Einsatz Mikroglia-hemmender Substanzen. Sie diskutieren, dass eine mögliche Ursache für den limitierten Erfolg „anti-inflammatorischer“ Pharmaka bei neurodegenerativen Erkrankungen - wie dem IPS und der AD - die Außerachtlassung neuroprotektiver Kapazitäten sein kann [411]. Die erhöhten IL-10-Serumspiegel bei Parkinsonpatienten [523] können Ausdruck eben dieser physiologischen Anstrengung des Organismus gegenüber der Neuroinflammation sein. Darüber hinaus geht auch die klinische Symptombesserung bei Parkinsonpatienten mit einer Erhöhung des IL-10-Serumspiegels einher [524]. Der therapeutische Ansatz einer Immunmodulation liefert mit rAV17 eine natürliche Substanz, welche sowohl proinflammatorische Mediatoren hemmt und mit IL-10 zeitgleich die anti-inflammatorischen Mechanismen der Mikroglia unterstützt.

Dass rAV17 die IL-10-Expression bereits in Ruhe steigert, wurde auch für Makrophagen gezeigt [419, 525] und kann für die Parkinsonpathologie von besonderer Bedeutung sein. Während die genaue Ätiologie dieser Erkrankung weiterhin unklar ist, sprechen Untersuchungen an Tiermodellen für eine „Immunsensitivierungs-Theorie“ der Neurodegeneration [526-528]. Demnach können systemische Erkrankungen im Laufe des Lebens zu einer Sensitivierung der SN-Neurone im Hinblick auf nachfolgende Umwelttoxin-Expositionen führen, indem sie zu einer Art Voraktivierung (engl. *priming*) der Mikroglia führen. Purisai und Kollegen (2007) zeigen, dass die *in vivo*-Exposition der SN-Neurone mit einer nicht-toxischen Dosis des Umwelttoxins Paraquat zu keinen neurodegenerativen Veränderungen führt, während die Voraktivierung der Mikroglia mit einer ebenfalls nicht-toxischen LPS-Dosis bei derselben Paraquatdosis den Untergang von Nervenzellen bedingt. Die Inhibition der proinflammatorischen Voraktivierung der Mikroglia hebt diesen Effekt auf [527, 528]. Die Hypothese wird dadurch unterstützt, dass die periphere Applikation von LPS tatsächlich zu einer Mikrogliaaktivierung in der SN führt [309] und die proinflammatorischen Reaktionen von Mikroglia auf Substanzen wie extrazelluläres α -Synuclein nach peripherer LPS-Gabe deutlich stärker ausfallen [478]. Eine rAV17-bedingte IL-10-Steigerung in Ruhe kann möglicherweise den anti-inflammatorischen Phänotyp der Mikroglia unterstützen und auf diese Weise einer proinflammatorischen Voraktivierung durch periphere Immunreaktionen und Umwelttoxine (prophylaktisch) entgegenwirken.

5.1.2.2 rAV17 beeinflusst immunologisch relevante Signalkaskaden aktivierter Mikroglia

Evidenz für die Bedeutung des NF- κ B-Signalweges im Rahmen der Neurodegeneration wurde bereits im Zusammenhang mit den Zytokinen geliefert (\rightarrow 5.1.2.1). Zahlreiche Studien zeigen durch die Hemmung dieses Signalweges eine Reduktion der proinflammatorischen Mikrogliaantwort und einen neuroprotektiven Effekt im *in vitro*- [21, 67, 311, 448] und *in vivo*-Parkinsonmodell [502, 505, 506, 529]. Der Immunmodulator rAV17 blockiert unter LPS-Stress eindrücklich die Translokation des NF- κ B-Transkriptionsfaktors in den Zellkern der Mikroglia, sodass potentielle neuroprotektive Effekte des rAV17 offensichtlich über diesen Signalweg vermittelt werden.

Über die Oberflächenrezeptoren und die zellulären Signalwege des rAV17 ist noch wenig bekannt [418]. Allerdings lässt die Kinetik der IL-10-Expression in dieser Arbeit einen rAV17-abhängigen indirekten Inhibitionsmechanismus über IL-10 vermuten, welcher in vielerlei Hinsicht die Ergebnisse dieser Arbeit erklären kann. Mikroglia besitzen auf ihrer Zelloberfläche IL-10-Rezeptoren (IL-10-R) und eine Vorstellung über den immunregulierenden IL-10-Mechanismus ist die autokrine Inhibition derselbigen über eine negative IL-10-*feedback*-Schleife [530]. IL-10 hemmt in Mikroglia bzw. den verwandten Monozyten den NF- κ B-Signalweg [259, 516, 531, 532]. Die rAV17-bedingte Aktivierung dieser indirekten IL-10-Regelschleife kann ein Erklärungsmodell für die verzögerte Reduktion der proinflammatorischen Mediatoren nach erst 24 Stunden sein.

Die Regulation der einzelnen Mediatoren ist jedoch weitaus komplexer, als dass diese durch einen einzigen Signalweg erklärt werden kann. Eine Inhibition des ERK-Signalweges wird ebenfalls mit neuroprotektiven Effekten assoziiert und reduziert die proinflammatorischen Mikroglia-mediatoren im *in vitro*-[67, 439, 448, 533] und *in vivo*-Parkinsonmodell [534, 535]. Der Immunmodulator vermag nach 15-minütiger Stimulationszeit die transiente ERK1/2-Phosphorylierung zu reduzieren, sodass auch dieser Signalweg als potentieller Vermittler möglicher neuroprotektiver Effekte von rAV17 in Frage kommt. Als Parallele zu den eigenen Ergebnissen führt rAV17 bei den ontogenetisch verwandten Makrophagen zu einer pERK1/2-abhängigen frühen Steigerung der IL-10-Expression und zur nachfolgenden ERK1/2-Hemmung [419, 525]. Diese Immunmodulation der Makrophagen geht mit reduzierten allergischen Entzündungsreaktionen in Tiermodellen zur Asthmaerkrankung einher [418]. Die mathematische Modellierung der rAV17-Effekte bei Makrophagen spricht für einen negativen Rückkopplungsmechanismus auf den ERK-Signalweg über IL-10 und sogenannte DUSPs (*dual specificity phosphatases*) [525]. DUSPs und SOCS (*suppressor of cytokine signaling*)-Proteine stellen zelluläre Regulatoren der IL-10-Rückkopplung dar, indem sie den für Zytokine relevanten NF- κ B-Signalweg und möglicherweise die MAPK-Signalwege hemmen [525, 536-538]. Auch in dieser Dissertationsarbeit kommt es tendenziell zu einer initialen Aktivierung des ERK1/2-Signalweges nach 10 Minuten und zu einer frühen Expressionssteigerung der IL-10-mRNA. Allerdings sind die ERK-Untersuchungen nach 10 Minuten aufgrund der hohen Kontrollaktivierung und der großen Streuung der Versuchswerte nur eingeschränkt aussagekräftig.

Außer den hemmenden Effekten einer IL-10-Rückkopplung auf proinflammatorische Signalmuster sind positive Rückkopplungseffekte auf die eigene IL-10-Expression beschrieben [537, 539]. Diese können den erneuten Anstieg der IL-10-Expression durch rAV17 nach 24 Stunden bei LPS-aktivierten Mikroglia erklären und Ausdruck einer anhaltenden Aktivierung der negativen Rückkopplungsschleife sein. Die beschriebenen Experimente bei Makrophagen zeigen, dass eine initiale pERK1/2-Aktivierung differenziert betrachtet werden muss, obgleich eine pERK1/2-Inhibition bei Mikroglia im Allgemeinen mit neuroprotektiven Effekten assoziiert wird. Für diese These sprechen auch die Ergebnisse von Merighi und Kollegen (2011). Diese untersuchten den Einfluss von Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten (CBA) bei LPS-stimulierten Mikroglia. CBA vermitteln bei Mikroglia pERK1/2-abhängige neuroprotektive Effekte über IL-10 [540, 541]. Während CBA bei ruhenden Mikroglia den ERK1/2-Signalweg aktivieren, bewirkt die Zugabe von LPS eine verzögerte Hemmung der initialen pERK1/2-Aktivierung über einen NO-abhängigen Mechanismus [542]. Das intrazelluläre NO scheint ein wichtiger Regulator des ERK1/2-Signalweges zu sein [542], sodass außer den DUSPs und SOCS-Proteinen - für eine eher längerfristige Regulation - das kurzlebige NO die Deaktivierung der initialen ERK1/2-Phosphorylierung vermitteln kann. Merighi und Kollegen sehen in ihren Ergebnissen eine Form der Immunregulation, indem erst bei Zugabe eines zweiten, proinflammatorischen Stimulus die Überaktivierung der Mikroglia durch Hemmung des ERK1/2-Signalweges verhindert wird. Tatsächlich zeigen Untersuchungen, dass nur eine anhaltende Toxin-induzierte ERK-Aktivierung neurotoxische Effekte vermittelt, während eine transiente ERK-Aktivierung eher das Überleben von Nervenzellen fördert [543]. Die geschilderten Befunde sollen verdeutlichen, dass eine frühe Aktivierung des ERK1/2-Signalweges keinesfalls einer neuroprotektiven Wirkung des Immunmodulators widersprechen muss.

Zusammengefasst liegen auch auf der Signalwegesebene eindeutige Hinweise für ein neuroprotektives Potential des Immunmodulators rAV17 vor. Dieser blockiert die NF- κ B-Translokation und inhibiert zeitabhängig den MAPK-Signalweg bei Zugabe von LPS. Die beschriebenen Signalwege lassen diesbezüglich eine immunregulierende Funktion des IL-10 vermuten. Für den ERK1/2-Signalweg ist in Monozyten / Mikroglia eine frühe Regulation der IL-10 Genexpression beschrieben [419, 540, 541, 544, 545], sodass die rAV17-bedingte Steigerung der IL-10-Expression über die frühe Aktivierung des ERK1/2-Signalweges in den Mikroglia zustande kommen kann und nachfolgend im Sinne einer negativen Rückkopplungsschleife die Hemmung des ERK1/2- und NF- κ B-Signalweges bedingt.

Wenn auch der tatsächliche Wirkmechanismus noch komplexer ist, sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit für eine phänotypische Neudifferenzierung der LPS-aktivierten Mikroglia durch rAV17 hin zu einem eher anti-inflammatorischen Phänotyp. Die Hypothese über den zentralen Wirkmechanismus des parasitären Immunmodulators rAV17 bei LPS-aktivierten neurotoxischen Mikroglia ist die Unterstützung eines natürlichen Immunregulationsmechanismus über das anti-inflammatorische IL-10.

Die grafische Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit zeigt Abbildung 14 im Überblick.

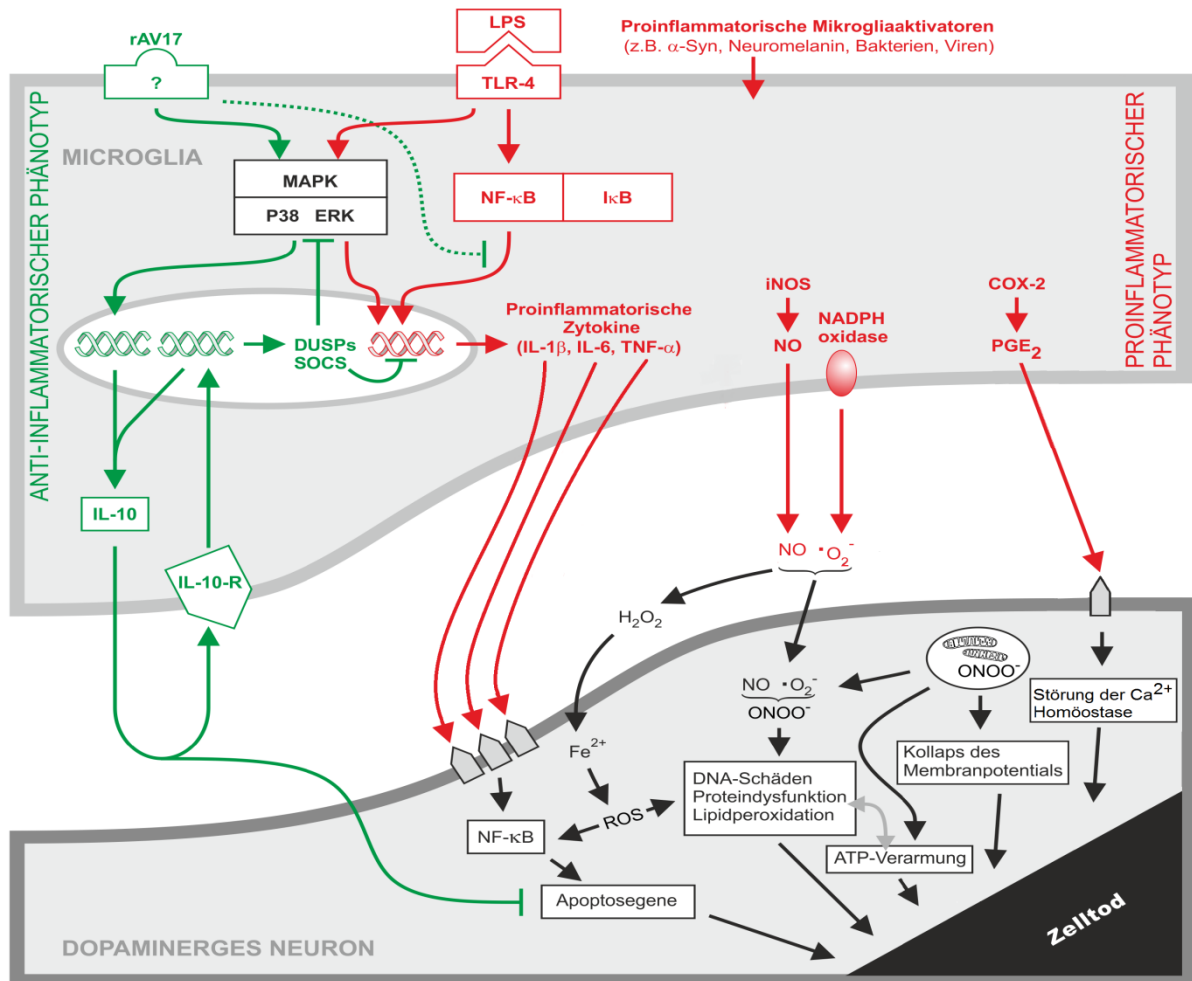


Abbildung 14: Zusammenfassende Darstellung eines möglichen Erklärungsmodells der Effekte von rAV17 bei LPS-aktivierten Mikroglia. Die Unterstützung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 stellt eine physiologische Form der Immunregulation dar. Möglicherweise aktiviert rAV17 über einen bisher unbekanntem Rezeptor eine ERK1/2-abhängige frühe IL-10-Expression. Diese aktiviert eine autokrine Rückkopplungsschleife über den IL-10-Rezeptor (IL-10-R) und bewirkt auf diese Weise die sekundäre Hemmung des NF- κ B-Signalweges und der MAPK-Signalkaskaden. Mögliche Regulatoren hierbei können die DUSPs und SOCS sein. Höchstwahrscheinlich sind die exakten zellulären Mechanismen weitaus komplexer (angedeutet durch gestrichelte grüne Linie). Die Neuorientierung mikroglialer Zellfunktionen auf mehreren Ebenen durch rAV17 spricht für einen anti-inflammatorischen Phänotypen-switch. Außer der Beeinflussung mikroglialer Zellfunktionen hemmt IL-10 direkt die Neuroapoptose in den dopaminergen Neuronen der SNpc.

5.1.2.3 Relativierung der Ergebnisse

Im Allgemeinen gelten Kulturversuche als eine enorme Simplifizierung der weitaus komplexeren Situation *in vivo*, sodass die Ergebnisse dieser Arbeit allenfalls als ein Hinweis auf das neuroprotektive Potential des Immunmodulators rAV17 im Rahmen des IPS zu verstehen sind.

Schmid und Kollegen (2009) demonstrieren mittels differenzierten Genexpressions-Analysen deutliche Unterschiede zwischen kultivierten und *in vivo*-Mikrogliazellen [546] und auch die Abstammung der Mikrogliazellen hat einen deutlichen Einfluss auf die Versuchsergebnisse im LPS-Modell [547]. Methodische Unterschiede zu Versuchen mit ähnlicher Fragestellung bestehen darüber hinaus in der eingesetzten Menge LPS zur Mikroglia-stimulation, der Konzentration des untersuchten Moleküls, der Stimulationszeit et cetera. Demzufolge ist der Vergleich mit den Ergebnissen ähnlicher Versuchsansätze hinsichtlich der Frage eines neuroprotektiven Potentials von rAV17 schwierig. Ein entscheidender methodischer Unterschied zu verwandten Untersuchungen an LPS-stimulierten Mikroglia besteht in deren Vorbehandlung der Mikroglia mit dem zu untersuchenden Reagenz. In dieser Arbeit wurden die Mikrogliazellen gleichzeitig mit LPS und dem zu untersuchenden Reagenz (rAV17) stimuliert (Ausnahme: Western-Blot-Versuche), da dieses eher der physiologischen Situation *in vivo* entspricht. Dennoch ist auch dieser methodische Faktor für die zeitlich verzögerten Effekte unter rAV17 nach erst 24 Stunden in Betracht zu ziehen, während entsprechende Experimente an vorbehandelten Mikroglia häufig bereits Effekte nach 6 Stunden zeigen [439, 448].

Eine weitere Einschränkung dieser Arbeit besteht in der Untersuchung von mRNA-Genexpressionen, welche keine post-translationalen Modifikationen berücksichtigen (Ausnahme: NO und TNF- α). Die tendenziell übereinstimmenden Ergebnisse der Parameter iNOS-mRNA/NO und TNF- α -mRNA/TNF- α -Protein sprechen jedoch für eine hinreichende Genauigkeit der gezogenen Schlussfolgerungen.

5.2 Ausblick: rAV17 als potentiell Therapeutikum

Der moderate Erfolg der bisherigen „anti-inflammatorischen“ Therapie beim IPS führte zu der Therapievorstellung einer Immunmodulation, bei der die Wirkstoffe über einen multi-strategischen Wirkmechanismus die Neuroinflammation reduzieren und gleichzeitig das physiologische Potential zur Neuroregeneration im ZNS erhalten bzw. unterstützen [10, 169, 193, 398, 411, 412]. Anhand der *in vitro*-Versuche dieser Arbeit kann angenommen werden, dass der parasitäre Immunmodulator rAV17 zu einer Neuorganisation zahlreicher Mikrogliafunktionen führt. Die konsequente Reduktion proinflammatorischer Mediatoren und Enzyme und die gleichzeitige Stärkung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 in Ruhe und unter LPS-Konfrontation liefern starke Hinweise auf eine neuroprotektive Phänotypendifferenzierung der Mikroglia. Diese Hypothese wird maßgeblich durch die Untersuchungen mit rAV17 an den ontogenetisch verwandten peripheren Monozyten gestützt. Hier induziert rAV17 in ähnlicher Weise den anti-inflammatorischen und gewebe-regenerativen M2-Phänotyp der Makrophagen [418, 419, 519] und reduziert auf diese Weise überschießende und unkontrollierte Immunreaktionen in Tiermodellen zur Allergie und Kolitis (\rightarrow 1.5.1).

Darüber hinaus sind vorteilhafte Effekte beim Menschen und bei Tieren durch Helminthen-Infektionen beschrieben, indem diese eine eher anti-inflammatorische T_{reg} - T_H2 -T-Zellantwort induzieren und somit allergische und autoimmune Reaktionen dämpfen [415, 416, 418, 522, 548-550].

Immunmodulatoren wie rAV17 sind (z.B. über IL-10) entscheidend an derartigen Veränderungen beteiligt [416, 418] und es ist vorstellbar, dass sich rAV17 auf diese Weise auch vorteilhaft auf die neurotoxische T_H1 - T_H17 -Dominanz in der SN beim IPS (\rightarrow 1.3.2) aufwirken kann. Insbesondere T_{reg} -Zellen sind mit zahl-reichen neuroprotektiven Effekten im Rahmen des PS assoziiert, sodass ein aktueller Ansatz zur Immunmodulation in dem adoptiven Transfer speziell aktivierter T_{reg} -Zellen besteht [298, 551, 552]. Demnach kann rAV17 möglicherweise vor dem Hintergrund eines multi-strategischen Ansatzes nicht nur den mikroglialen Phänotyp modulieren, sondern in zahlreiche Schaltstellen der Immunregulation eingreifen. Ein derart umfassender Effekt des Immunmodulators rAV17 auf den gesamten Immunstatus wird besser nachvollziehbar, wenn man bedenkt, dass sich dieses natürliche Regulationspeptid in jahrelanger Koevolution von Wirt und Parasit entwickelt hat. Zusammengefasst liefern die Ergebnisse dieser Arbeit und die Hinweise aus anderen Arbeitsgruppen ausreichende Evidenz für die weitere Erforschung des rAV17.

Interessanterweise zeigen die Effekte von rAV17 deutliche Parallelen zu den klinisch bereits erfolgreich angewandten PPAR-Immunmodulatoren, die das anti-inflammatorische Potential von Mikroglia über IL-10 fördern und die proinflammatorischen Zytokine, die ROS, die COX-2 und den NF- κ B-Signalweg hemmen [412].

Die weitere Evaluierung des neuroprotektiven Potentials von rAV17 kann in dessen Anwendung bei humanen Mikroglia, in Neuronen-Mikroglia-Mischkulturen oder in *in vivo*-Tiermodellen zur Parkinsonerkrankung bestehen. Für die *in vivo*-Anwendung spricht das differenzierte Wirkspektrum des Immunmodulators rAV17. Darüber hinaus sollten sich weitere Arbeiten mit möglichen Applikationsformen und pharmakokinetischen Eigenschaften des rAV17 beschäftigen.

Neueste Untersuchungen (2012) zeigen bereits den erfolgreichen Einsatz einer parasitären Immunmodulation bei der Multiplen Sklerose (MS). Die Administration parasitärer Immunmodulatoren in die Peritonealhöhle von Mäusen zeigt eine signifikante klinische Besserung im experimentellen MS-Modell [553]. Darüber hinaus wurde eine immunmodulatorische Wurmtherapie (Phase-1-Studie) mit dem nicht-humanpathogenen Schweinepeitschenwurm (*Trichuris suis*) kürzlich bei ersten MS-Patienten angewandt. Die Therapie zeigt einen positiven Effekt auf die schädliche T_H1 - T_H17 -Dominanz dieser Erkrankung, erhöhte Serumwerte der anti-inflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 und eine Reduktion akuter Krankheitsherde im ZNS (Gadolinium-anreichernde Läsionen im MRT) [554, 555].

Diese Ergebnisse unterstützen die Aktualität der in dieser Arbeit untersuchten Mechanismen und sprechen für eine Weiterverfolgung des immunmodulatorischen Therapieansatzes als eine neuartige Variante der bisher nur mäßig erfolgreichen anti-inflammatorischen Therapie.

6 Zusammenfassung

Neurodegenerative Erkrankungen werden im Zuge der demografischen Entwicklung eine stark zunehmende klinische und gesundheitsökonomische Bedeutung erfahren. Das IPS stellt die zweithäufigste Erkrankung aus diesem Formenkreis dar und geht aus medizinischen Gesichtspunkten mit einem hohen subjektiven Leidensdruck einher.

Morphologisches Korrelat dieser Erkrankung ist der Untergang einer speziellen Neuronenpopulation in der SNpc, was zu den Kardinalsymptomen der Parkinsonerkrankung - Rigor, Tremor, Akinese und posturale Instabilität - führt. Die detaillierte Betrachtung zeigt degenerative Prozesse in weiteren Hirnarealen und ausgeprägte nicht-motorische Symptome. Derzeitige Therapieoptionen sind ausschließlich symptomatischer Natur und führen nach einiger Zeit zu relevanten Nebenwirkungen. Darüber hinaus setzt die Therapie zu einem Zeitpunkt ein, zu welchem bereits 50-70% der dopaminergen Neurone in der SNpc untergegangen sind. Trotz modernster Diagnoseinstrumente, die den Degenerationsprozess bereits vor der eigentlichen Symptompräsentation aufdecken könnten, fehlt es weiterhin an Therapieoptionen, die die Krankheitsprogression aufhalten können.

Ein zentrales Pathologiemerkmal des IPS und Ansatz therapeutischer Bemühungen ist die begleitende Neuroinflammation. Während die Ätiologie des IPS weiterhin unklar bleibt, wird der Neuroinflammationsprozess maßgeblich für die chronische Progression des IPS verantwortlich gemacht. Das zentrale Element der Neuroinflammation stellen die Mikrogliazellen dar. Diese unterhalten über die exzessive Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren und reaktiver Sauerstoffspezies den Degenerationsprozess in der SNpc und werden nachfolgend durch Bestandteile der absterbenden dopaminergen Neurone reaktiviert. Daher beschäftigen sich therapeutische Bemühungen mit der Unterbrechung dieses *circulus vitiosus*.

Eine Neuerung auf dem Gebiet der anti-inflammatorischen Therapiestrategie besteht in der zunehmenden Berücksichtigung der neuroprotektiven Kapazitäten des ZNS. Aktivierte Mikrogliazellen scheinen in Abhängigkeit ihres Umgebungsmilieus eher neuroregenerative oder neurotoxische Funktionen vermitteln zu können. Der Therapieansatz einer Immunmodulation beabsichtigt die neurotoxische Mikrogliaaktivierung im Rahmen des IPS in einen neuroregenerativen Phänotyp zurückzuführen. Auf der Suche nach derartigen Substanzen wurde in dieser Arbeit der natürliche Immunmodulator rAV17 des Nematoden *Acanthocheilonema vitae* untersucht. Parasitäre Immunmodulatoren stellen eine Form der Immunevasion dar, indem sie das sie attackierende Wirts-Immunsystem dahingehend modulieren, dass es ihre chronische Persistenz toleriert. Die Idee dieser Arbeit bestand in der Transformation dieses natürlichen Immunevasionsmechanismus auf den Mikroglia-vermittelten Neuroinflammationsvorgang im Rahmen des IPS. Dazu wurde der Einfluss des Immunmodulators auf *in vitro* isolierte Mikrogliazellen im künstlichen LPS-Entzündungsmodell untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine zeitabhängige, aber konsequente Reduktion zahlreicher Mediatoren und Enzyme, welche mit neurotoxischen Effekten beim IPS assoziiert werden. RAV17 reduzierte nach 24 Stunden die mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α) und der Enzyme iNOS

und COX-2. Darüber hinaus reduziert rAV17 die Freisetzung von TNF- α und NO und blockierte entscheidende Signalwege der Neuroinflammation (NF- κ B- und ERK1/2-Signalweg). Demgegenüber steigerte rAV17 die mRNA-Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10.

Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass rAV17 die LPS-induzierte neurotoxische Mikroglia-aktivierung in einen eher neuroprotektiven Phänotyp überführt. Diese Interpretation steht im Einklang mit den Untersuchungen an den ontogenetisch verwandten Makrophagen, bei welchen rAV17 zur Induktion des gewebergenerativen M2-Phänotyps beiträgt. Gemeinsam mit der Modulation des Helferzellverhältnisses führt die Immunmodulation über rAV17 dort zur Verbesserung pathologischer Immunsituationen im Tiermodell zur Allergie und Kolitis.

Zusammengefasst stellt die immunmodulatorische Therapiestrategie des IPS ein gleichermaßen herausforderndes wie vielversprechendes Therapiekonzept dar. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern ausreichend Hinweise für die weitere Evaluierung des parasitären Immunmodulators rAV17 im experimentellen Tiermodell zur Parkinsonerkrankung.

7 Literaturverzeichnis

1. Tanner CM, Goldman SM. (1996) Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin*, 14, 317-35.
2. Morens DM, Davis JW, Grandinetti A, Ross GW, Popper JS, White LR. (1996) Epidemiologic observations on Parkinson's disease: incidence and mortality in a prospective study of middle-aged men. *Neurology*, 46, 1044-50.
3. Bennett DA, Beckett LA, Murray AM, Shannon KM, Goetz CG, Pilgrim DM, Evans DA. (1996) Prevalence of parkinsonian signs and associated mortality in a community population of older people. *N Engl J Med*, 334, 71-6.
4. Przedborski S, Vila M, Jackson-Lewis V. (2003) Neurodegeneration: what is it and where are we? *J Clin Invest*, 111, 3-10.
5. Tretiakoff MC. (1919) Contribution a l'Etude de L'Anatomie pathologique du Locus Niger de Soemmering. Université de Paris, Paris.
6. Pal PK, Netravathi M. (2005) Management of neurodegenerative disorders: Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *J Indian Med Assoc*, 103, 168-70, 172, 174-6.
7. Bossy-Wetzell E, Schwarzenbacher R, Lipton SA. (2004) Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med*, 10 Suppl, S2-9.
8. K.F. Masuhr MN. (2007) Duale Reihe: Neurologie,6. Thieme-Verlag, Stuttgart.
9. Goetz CG. (2011) The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 1, a008862.
10. Tansey MG, Goldberg MS. (2010) Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis*, 37, 510-8.
11. Dauer W, Przedborski S. (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39, 889-909.
12. M.Gerlach, Heinz Reichmann, P. Riederer. (2007) Die Parkinson-Krankheit. Grundlagen, Klinik, Therapie,4. Springer-Verlag, Wien.
13. Hans Chr. Diener, Norman Putzki, Peter Berlit. (2005) Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie,3. Thieme-Verlag, Stuttgart.
14. Fearnley JM, Lees AJ. (1991) Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain*, 114 (Pt 5), 2283-301.
15. Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F. (1973) Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci*, 20, 415-55.
16. Carlsson A. (1964) Evidence for a Role of Dopamine in Extrapyrmidal Functions. *Acta Neuroveg (Wien)*, 26, 484-93.
17. Birkmayer W, Hornykiewicz O. (1961) The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia, *Wien Klin Wochenschr*, 73, 787-8.
18. Ehringer H, Hornykiewicz O. (1960) Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. *Klin Wochenschr*, 38, 1236-9.
19. Carlsson A. (1959) The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol Rev*, 11, 490-3.
20. Riederer P, Wuketich S. (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.
21. Wilms H, Zecca L, Rosenstiel P, Sievers J, Deuschl G, Lucius R. (2007) Inflammation in Parkinson's diseases and other neurodegenerative diseases: cause and therapeutic implications. *Curr Pharm Des*, 13, 1925-8.
22. Leenders KL, Salmon EP, Tyrrell P, Perani D, Brooks DJ, Sager H, Jones T, Marsden CD, Frackowiak RS. (1990) The nigrostriatal dopaminergic system assessed in vivo by positron emission tomography in healthy volunteer subjects and patients with Parkinson's disease. *Arch Neurol*, 47, 1290-8.
23. Braak H, Rub U, Sandmann-Keil D, Gai WP, de Vos RA, Jansen Steur EN, Arai K, Braak E. (2000) Parkinson's disease: affection of brain stem nuclei controlling premotor and motor neurons of the somatomotor system. *Acta Neuropathol*, 99, 489-95.

24. Hirsch EC, Hunot S. (2009) Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol*, 8, 382-97.
25. Braak H, Braak E. (2000) Pathoanatomy of Parkinson's disease. *J Neurol*, 247 Suppl 2, I13-10.
26. de Vos RA, Jansen EN, Stam FC, Ravid R, Swaab DF. (1995) 'Lewy body disease': clinicopathological correlations in 18 consecutive cases of Parkinson's disease with and without dementia. *Clin Neurol Neurosurg*, 97, 13-22.
27. Rub U, Del Tredici K, Schultz C, Ghebremedhin E, de Vos RA, Jansen Steur E, Braak H. (2002) Parkinson's disease: the thalamic components of the limbic loop are severely impaired by alpha-synuclein immunopositive inclusion body pathology. *Neurobiol Aging*, 23, 245-54.
28. Jellinger KA. (1991) Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol Chem Neuropathol*, 14, 153-97.
29. Shulman JM, De Jager PL, Feany MB. (2011) Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Pathol*, 6, 193-222.
30. Braak H, Braak E, Yilmazer D, Schultz C, de Vos RA, Jansen EN. (1995) Nigral and extranigral pathology in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 46, 15-31.
31. F.H.Lewy E.Fa. (1912) Paralysis agitans. In: *Handbuch der Neurologie* (ed. M.Lewandowsky). Springer Verlag Berlin.
32. Gibb WR, Lees AJ. (1988) The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 51, 745-52.
33. Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 24, 197-211.
34. Trepel M. (2008) *Neuroanatomie: Struktur und Funktion*. Urban&Fischer, München.
35. Teravainen HC, D.B. (1983) Motor system in normal aging and Parkinson's disease. In: *The Neurology of Aging* (ed. RT Katzmann, R.). F.A. Davis Co, Philadelphia.
36. Collier TJ, Kanaan NM, Kordower JH. (2011) Ageing as a primary risk factor for Parkinson's disease: evidence from studies of non-human primates. *Nat Rev Neurosci*, 12, 359-66.
37. McGeer PL, Itagaki S, Akiyama H, McGeer EG. (1988) Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. *Ann Neurol*, 24, 574-6.
38. Paulus W, Jellinger K. (1991) The neuropathologic basis of different clinical subgroups of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 50, 743-55.
39. R.Hassler. (1938) Zur Pathogenie der Paralysis agitans und des postenzephalitischen Parkinsonismus. *Journal für Psychologie und Neurologie*, 48, 387-467.
40. Gibb WR. (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.
41. Gibb WR, Lees AJ. (1991) Anatomy, pigmentation, ventral and dorsal subpopulations of the substantia nigra, and differential cell death in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 54, 388-96.
42. Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. (1999) The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain*, 122 (Pt 8), 1437-48.
43. Giasson BI, Duda JE, Murray IV, Chen Q, Souza JM, Hurtig HI, Ischiropoulos H, Trojanowski JQ, Lee VM. (2000) Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science*, 290, 985-9.
44. Sies H. (1991) Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*, 91, 31S-38S.
45. Naoi M, Maruyama W. (1999) Cell death of dopamine neurons in aging and Parkinson's disease. *Mech Ageing Dev*, 111, 175-88.
46. Langston JW, Forno LS, Tetrud J, Reeves AG, Kaplan JA, Karluk D. (1999) Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol*, 46, 598-605.
47. Nicklas WJ, Youngster SK, Kindt MV, Heikkila RE. (1987) MPTP, MPP+ and mitochondrial function. *Life Sci*, 40, 721-9.
48. Greenamyre JT, Sherer TB, Betarbet R, Panov AV. (2001) Complex I and Parkinson's disease. *IUBMB Life*, 52, 135-41.

49. Janetzky B, Hauck S, Youdim MB, Riederer P, Jellinger K, Pantucek F, Zochling R, Boissl KW, Reichmann H. (1994) Unaltered aconitase activity, but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 169, 126-8.
50. Youdim MB. (1988) Iron in the brain: implications for Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Mt Sinai J Med*, 55, 97-101.
51. Anglade P, Vyas S, Javoy-Agid F, Herrero MT, Michel PP, Marquez J, Mouatt-Prigent A, Ruberg M, Hirsch EC, Agid Y. (1997) Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol*, 12, 25-31.
52. Mochizuki H, Goto K, Mori H, Mizuno Y. (1996) Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 137, 120-3.
53. Graham DG. (1978) Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol*, 14, 633-43.
54. Sulzer D. (2007) Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends Neurosci*, 30, 244-50.
55. Munoz P, Huenchuguala S, Paris I, Segura-Aguilar J. (2012) Dopamine oxidation and autophagy. *Parkinsons Dis*, 2012, 920-953.
56. Alam ZI, Jenner A, Daniel SE, Lees AJ, Cairns N, Marsden CD, Jenner P, Halliwell B. (1997) Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem*, 69, 1196-203.
57. Sanchez-Ramos. (1994) A marker of oxyradical-mediated DNA-damage (8-hydroxy-2'-desoxyguanosine) is increased in nigro-striatum of Parkinson-disease brain. *Neurodegeneration* 3 (3): 197-204.
58. Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, Jenner P, Marsden CD. (1994) Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol*, 36, 348-55.
59. Boll MC, Alcaraz-Zubeldia M, Montes S, Rios C. (2008) Free copper, ferroxidase and SOD1 activities, lipid peroxidation and NO(x) content in the CSF. A different marker profile in four neurodegenerative diseases. *Neurochem Res*, 33, 1717-23.
60. Venkateshappa C, Harish G, Mythri RB, Mahadevan A, Bharath MM, Shankar SK. (2012) Increased oxidative damage and decreased antioxidant function in aging human substantia nigra compared to striatum: implications for Parkinson's disease. *Neurochem Res*, 37, 358-69.
61. Beyer K, Ariza A. (2012) Alpha-Synuclein Posttranslational Modification and Alternative Splicing as a Trigger for Neurodegeneration. *Mol Neurobiol*. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-012-8330-5>
62. Alberio T, Lopiano L, Fasano M. (2012) Cellular models to investigate biochemical pathways in Parkinson's disease. *FEBS J*, 279, 1146-55.
63. Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, Johnson WG, Ide SE, Di Iorio G, Sanges G, Stenroos ES, Pho LT, Schaffer AA, Lazzarini AM, Nussbaum RL, Duvoisin RC. (1996) Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science*, 274, 1197-9.
64. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276, 2045-7.
65. George JM. (2002) The synucleins. *Genome Biol*, 3, 1-6.
66. Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Epplen JT, Schols L, Riess O. (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet*, 18, 106-8.
67. Wilms H, Rosenstiel P, Romero-Ramos M, Arlt A, Schafer H, Seegert D, Kahle PJ, Odoy S, Claassen JH, Holzknecht C, Brandenburg LO, Deuschl G, Schreiber S, Kirik D, Lucius R. (2009) Suppression of MAP kinases inhibits microglial activation and attenuates neuronal cell death induced by alpha-synuclein protofibrils. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 22, 897-909.
68. Bussell R, Jr., Eliezer D. (2001) Residual structure and dynamics in Parkinson's disease-associated mutants of alpha-synuclein. *J Biol Chem*, 276, 45996-6003.
69. Goedert M. (1997) Familial Parkinson's disease. The awakening of alpha-synuclein. *Nature*, 388, 232-3.

-
70. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. (2010) Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140, 918-34.
 71. Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH. (1988) Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci*, 8, 2804-15.
 72. Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, Ge N, Flanagan L, de Silva HA, Kittel A, Saitoh T. (1995) The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron*, 14, 467-75.
 73. Jakes R, Spillantini MG, Goedert M. (1994) Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett*, 345, 27-32.
 74. Clayton DF, George JM. (1998) The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci*, 21, 249-54.
 75. Irizarry MC, Kim TW, McNamara M, Tanzi RE, George JM, Clayton DF, Hyman BT. (1996) Characterization of the precursor protein of the non-A beta component of senile plaques (NACP) in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*, 55, 889-95.
 76. Chandra S, Gallardo G, Fernandez-Chacon R, Schluter OM, Sudhof TC. (2005) Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell*, 123, 383-96.
 77. Burre J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Sudhof TC. (2010) Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science*, 329, 1663-7.
 78. Bayir H, Kapralov AA, Jiang J, Huang Z, Tyurina YY, Tyurin VA, Zhao Q, Belikova NA, Vlasova, II, Maeda A, Zhu J, Na HM, Mastroberardino PG, Sparvero LJ, Amoscato AA, Chu CT, Greenamyre JT, Kagan VE. (2009) Peroxidase mechanism of lipid-dependent cross-linking of synuclein with cytochrome C: protection against apoptosis versus delayed oxidative stress in Parkinson disease. *J Biol Chem*, 284, 15951-69.
 79. Uversky VN, Yamin G, Munishkina LA, Karymov MA, Millett IS, Doniach S, Lyubchenko YL, Fink AL. (2005) Effects of nitration on the structure and aggregation of alpha-synuclein. *Brain Res Mol Brain Res*, 134, 84-102.
 80. Conway KA, Harper JD, Lansbury PT. (1998) Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat Med*, 4, 1318-20.
 81. Ives NJ, Stowe RL, Marro J, Counsell C, Macleod A, Clarke CE, Gray R, Wheatley K. (2004) Monoamine oxidase type B inhibitors in early Parkinson's disease: meta-analysis of 17 randomised trials involving 3525 patients. *Bmj*, 329, 593.
 82. Fernandez HH. (2012) Updates in the medical management of Parkinson disease. *Cleve Clin J Med*, 79, 28-35.
 83. Crosby N, Deane KH, Clarke CE. (2003) Amantadine in Parkinson's disease. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003468.
 84. Crosby NJ, Deane KH, Clarke CE. (2003) Amantadine for dyskinesia in Parkinson's disease. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003467.
 85. Poewe W. (2009) Treatments for Parkinson disease--past achievements and current clinical needs. *Neurology*, 72, S65-73.
 86. Benabid AL, Chabardes S, Mitrofanis J, Pollak P. (2009) Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for the treatment of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, 8, 67-81.
 87. Volkmann J, Albanese A, Kulisevsky J, Tornqvist AL, Houeto JL, Pidoux B, Bonnet AM, Mendes A, Benabid AL, Fraix V, Van Blercom N, Xie J, Obeso J, Rodriguez-Oroz MC, Guridi J, Schnitzler A, Timmermann L, Gironell AA, Molet J, Pascual-Sedano B, Rehncrona S, Moro E, Lang AC, Lozano AM, Bentivoglio AR, Scerrati M, Contarino MF, Romito L, Janssens M, Agid Y. (2009) Long-term effects of pallidal or subthalamic deep brain stimulation on quality of life in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 24, 1154-61.
 88. Benazzouz A, Gross C, Feger J, Boraud T, Bioulac B. (1993) Reversal of rigidity and improvement in motor performance by subthalamic high-frequency stimulation in MPTP-treated monkeys. *Eur J Neurosci*, 5, 382-9.
 89. Limousin P, Krack P, Pollak P, Benazzouz A, Ardouin C, Hoffmann D, Benabid AL. (1998) Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med*, 339, 1105-11.
 90. Limousin P, Pollak P, Benazzouz A, Hoffmann D, Le Bas JF, Broussolle E, Perret JE, Benabid AL. (1995) Effect of parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. *Lancet*, 345, 91-5.

91. Benabid AL, Pollak P, Gross C, Hoffmann D, Benazzouz A, Gao DM, Laurent A, Gentil M, Perret J. (1994) Acute and long-term effects of subthalamic nucleus stimulation in Parkinson's disease. *Stereotact Funct Neurosurg*, 62, 76-84.
92. Deuschl G, Schade-Brittinger C, Krack P, Volkmann J, Schafer H, Botzel K, Daniels C, Deutschlander A, Dillmann U, Eisner W, Gruber D, Hamel W, Herzog J, Hilker R, Klebe S, Kloss M, Koy J, Krause M, Kupsch A, Lorenz D, Lorenzl S, Mehdorn HM, Moringlane JR, Oertel W, Pinsker MO, Reichmann H, Reuss A, Schneider GH, Schnitzler A, Steude U, Sturm V, Timmermann L, Tronnier V, Trottenberg T, Wojtecki L, Wolf E, Poewe W, Voges J. (2006) A randomized trial of deep-brain stimulation for Parkinson's disease. *N Engl J Med*, 355, 896-908.
93. Rodrigues JP, Walters SE, Watson P, Stell R, Mastaglia FL. (2007) Globus pallidus stimulation improves both motor and nonmotor aspects of quality of life in advanced Parkinson's disease. *Mov Disord*, 22, 1866-70.
94. Kriks S, Shim JW, Piao J, Ganat YM, Wakeman DR, Xie Z, Carrillo-Reid L, Auyeung G, Antonacci C, Buch A, Yang L, Beal MF, Surmeier DJ, Kordower JH, Tabar V, Studer L. (2011) Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature*, 480, 547-51.
95. Ganat YM, Calder EL, Kriks S, Nelander J, Tu EY, Jia F, Battista D, Harrison N, Parmar M, Tomishima MJ, Rutishauser U, Studer L. (2012) Identification of embryonic stem cell-derived midbrain dopaminergic neurons for engraftment. *J Clin Invest*, 122, 2928-39
96. Richardson RM, Broaddus WC, Holloway KL, Fillmore HL. (2005) Grafts of adult subependymal zone neuronal progenitor cells rescue hemiparkinsonian behavioral decline. *Brain Res*, 1032, 11-22.
97. Kiskinis E, Eggan K. (2010) Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells. *J Clin Invest*, 120, 51-9.
98. Bonnamain V, Neveu I, Naveilhan P. (2012) Neural stem/progenitor cells as a promising candidate for regenerative therapy of the central nervous system. *Front Cell Neurosci*, 6, 17.
99. Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine-Paton M, Isacson O, Jaenisch R. (2008) Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 5856-61.
100. Ebben JD, Zorniak M, Clark PA, Kuo JS. (2011) Introduction to induced pluripotent stem cells: advancing the potential for personalized medicine. *World Neurosurg*, 76, 270-5.
101. Laurent LC, Ulitsky I, Slavin I, Tran H, Schork A, Morey R, Lynch C, Harness JV, Lee S, Barrero MJ, Ku S, Martynova M, Semechkin R, Galat V, Gottesfeld J, Izipisua Belmonte JC, Murry C, Keirstead HS, Park HS, Schmidt U, Laslett AL, Muller FJ, Nievergelt CM, Shamir R, Loring JF. (2011) Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell*, 8, 106-18.
102. LeWitt PA, Rezai AR, Leehey MA, Ojemann SG, Flaherty AW, Eskandar EN, Kostyk SK, Thomas K, Sarkar A, Siddiqui MS, Tatter SB, Schwalb JM, Poston KL, Henderson JM, Kurlan RM, Richard IH, Van Meter L, Sapan CV, Doring MJ, Kaplitt MG, Feigin A. (2011) AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet Neurol*, 10, 309-19.
103. Rodnitzky RL. (2012) Upcoming treatments in Parkinson's disease, including gene therapy. *Parkinsonism Relat Disord*, 18 Suppl 1, S37-40.
104. Akiyama H. (1994) Inflammatory response in Alzheimer's disease. *Tohoku J Exp Med*, 174, 295-303.
105. McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. (1988) Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*, 38, 1285-91.
106. McGeer PL, McGeer EG. (2008) Glial reactions in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 23, 474-83.
107. Block ML, Hong JS. (2007) Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity. *Biochem Soc Trans*, 35, 1127-32.

108. Gerhard A, Pavese N, Hotton G, Turkheimer F, Es M, Hammers A, Eggert K, Oertel W, Banati RB, Brooks DJ. (2006) In vivo imaging of microglial activation with [¹¹C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 21, 404-12.
109. Banati RB, Graeber MB. (1994) Surveillance, intervention and cytotoxicity: is there a protective role of microglia? *Dev Neurosci*, 16, 114-27.
110. Gehrman J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW. (1995) Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev*, 20, 269-87.
111. Gebicke-Haerter PJ, Van Calker D, Norenberg W, Illes P. (1996) Molecular mechanisms of microglial activation. A. Implications for regeneration and neurodegenerative diseases. *Neurochem Int*, 29, 1-12.
112. Kreutzberg GW. (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 19, 312-8.
113. Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. (1999) Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol*, 57, 563-81.
114. Minghetti L, Levi G. (1998) Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog Neurobiol*, 54, 99-125.
115. Stoll G, Jander S. (1999) The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol*, 58, 233-47.
116. Shirai Y. (1921) On the Transplantation of the Rat Sarcoma in Adult Heterogeneous Animals *Japan Med World*, 1:14-15.
117. Medawar PB. (1948) Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol*, 29, 58-69.
118. Traugott U, Reinherz EL, Raine CS. (1983) Multiple sclerosis. Distribution of T cells, T cell subsets and Ia-positive macrophages in lesions of different ages. *J Neuroimmunol*, 4, 201-21.
119. Zindler E, Zipp F. (2012) Neuronal injury in chronic CNS inflammation. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 24, 551-62.
120. Matyszak MK, Perry VH. (1996) The potential role of dendritic cells in immune-mediated inflammatory diseases in the central nervous system. *Neuroscience*, 74, 599-608.
121. Flugel A, Bradl M, Kreutzberg GW, Graeber MB. (2001) Transformation of donor-derived bone marrow precursors into host microglia during autoimmune CNS inflammation and during the retrograde response to axotomy. *J Neurosci Res*, 66, 74-82.
122. Lüllmann-Rauch R. (2003) Taschenlehrbuch Histologie,3. Thieme-Verlag, Stuttgart.
123. Correale J, Villa A. (2007) The blood-brain-barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting. *Autoimmunity*, 40, 148-60.
124. Stone LA, Smith ME, Albert PS, Bash CN, Maloni H, Frank JA, McFarland HF. (1995) Blood-brain barrier disruption on contrast-enhanced MRI in patients with mild relapsing-remitting multiple sclerosis: relationship to course, gender, and age. *Neurology*, 45, 1122-6.
125. Brochard V, Combadiere B, Prigent A, Laouar Y, Perrin A, Beray-Berthat V, Bonduelle O, Alvarez-Fischer D, Callebert J, Launay JM, Duyckaerts C, Flavell RA, Hirsch EC, Hunot S. (2009) Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J Clin Invest*, 119, 182-92.
126. Starr JM, Farrall AJ, Armitage P, McGurn B, Wardlaw J. (2009) Blood-brain barrier permeability in Alzheimer's disease: a case-control MRI study. *Psychiatry Res*, 171, 232-41.
127. Farrall AJ, Wardlaw JM. (2009) Blood-brain barrier: ageing and microvascular disease--systematic review and meta-analysis. *Neurobiol Aging*, 30, 337-52.
128. Zlokovic BV. (2005) Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci*, 28, 202-8.
129. Desai BS, Monahan AJ, Carvey PM, Hendey B. (2007) Blood-brain barrier pathology in Alzheimer's and Parkinson's disease: implications for drug therapy. *Cell Transplant*, 16, 285-99.
130. Aloisi F, Ria F, Adorini L. (2000) Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol Today*, 21, 141-7.
131. Perry VH. (1998) A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *J Neuroimmunol*, 90, 113-21.
132. Galea I, Bechmann I, Perry VH. (2007) What is immune privilege (not)? *Trends Immunol*, 28, 12-8.

133. Wucherpfennig KW. (1994) Autoimmunity in the central nervous system: mechanisms of antigen presentation and recognition. *Clin Immunol Immunopathol*, 72, 293-306.
134. Matsumoto Y, Fujiwara M. (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.
135. Aloisi F, Ria F, Columba-Cabezas S, Hess H, Penna G, Adorini L. (1999) Relative efficiency of microglia, astrocytes, dendritic cells and B cells in naive CD4⁺ T cell priming and Th1/Th2 cell restimulation. *Eur J Immunol*, 29, 2705-14.
136. Aloisi F, Ria F, Penna G, Adorini L. (1998) Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 cell activation. *J Immunol*, 160, 4671-80.
137. Wilbanks GA, Streilein JW. (1992) Fluids from immune privileged sites endow macrophages with the capacity to induce antigen-specific immune deviation via a mechanism involving transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol*, 22, 1031-6.
138. Streilein JW. (1993) Immune privilege as the result of local tissue barriers and immunosuppressive microenvironments. *Curr Opin Immunol*, 5, 428-32.
139. Cserr HF, Knopf PM. (1992) Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. *Immunol Today*, 13, 507-12.
140. Hailer NP, Heppner FL, Haas D, Nitsch R. (1998) Astrocytic factors deactivate antigen presenting cells that invade the central nervous system. *Brain Pathol*, 8, 459-74.
141. Bechmann I, Mor G, Nilsen J, Eliza M, Nitsch R, Naftolin F. (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.
142. Flugel A, Schwaiger FW, Neumann H, Medana I, Willem M, Wekerle H, Kreutzberg GW, Graeber MB. (2000) Neuronal FasL induces cell death of encephalitogenic T lymphocytes. *Brain Pathol*, 10, 353-64.
143. Schwartz M, Moalem G, Leibowitz-Amit R, Cohen IR. (1999) Innate and adaptive immune responses can be beneficial for CNS repair. *Trends Neurosci*, 22, 295-9.
144. Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen IR, Schwartz M. (1999) Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med*, 5, 49-55.
145. Schwartz M, London A, Shechter R. (2009) Boosting T-cell immunity as a therapeutic approach for neurodegenerative conditions: the role of innate immunity. *Neuroscience*, 158, 1133-42.
146. Rapalino O, Lazarov-Spiegler O, Agranov E, Velan GJ, Yoles E, Fraidakis M, Solomon A, Gepstein R, Katz A, Belkin M, Hadani M, Schwartz M. (1998) Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat Med*, 4, 814-21.
147. Streit WJ. (2002) Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia*, 40, 133-9.
148. Napoli I, Neumann H. (2010) Protective effects of microglia in multiple sclerosis. *Exp Neurol*, 225, 24-8.
149. P.d.Rio-Hortega. (1932 originally published; reprinted 1965 without change) *Microglia: cytology & cellular pathology of the nervous system*. Hanfer Pub., New York.
150. Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 39, 151-70.
151. Thomas WE. (1992) Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res Brain Res Rev*, 17, 61-74.
152. Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R. (2001) Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol*, 101, 249-55.
153. Ling EA, Wong WC. (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia*, 7, 9-18.
154. Ransohoff RM, Cardona AE. (2010) The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature*, 468, 253-62.
155. McKercher SR, Torbett BE, Anderson KL, Henkel GW, Vestal DJ, Baribault H, Klemsz M, Feeney AJ, Wu GE, Paige CJ, Maki RA. (1996) Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *Embo J*, 15, 5647-58.

156. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, 330, 841-5.
157. Cuadros MA, Navascues J. (1998) The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol*, 56, 173-89.
158. Lichanska AM, Browne CM, Henkel GW, Murphy KM, Ostrowski MC, McKercher SR, Maki RA, Hume DA. (1999) Differentiation of the mononuclear phagocyte system during mouse embryogenesis: the role of transcription factor PU.1. *Blood*, 94, 127-38.
159. Wilms H, Wollmer MA, Sievers J. (1999) In vitro-staining specificity of the antibody 5-D-4 for microglia but not for monocytes and macrophages indicates that microglia are a unique subgroup of the myelomonocytic lineage. *J Neuroimmunol*, 98, 89-95.
160. Dalmau I, Vela JM, Gonzalez B, Finsen B, Castellano B. (2003) Dynamics of microglia in the developing rat brain. *J Comp Neurol*, 458, 144-57.
161. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM. (2007) Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci*, 10, 1538-43.
162. Eglitis MA, Mezey E. (1997) Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 4080-5.
163. Perry VH, Hume DA, Gordon S. (1985) Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience*, 15, 313-26.
164. Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK. (2004) Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev*, 17, 942-64, table of contents.
165. Rosenstiel P, Lucius R, Deuschl G, Sievers J, Wilms H. (2001) From theory to therapy: implications from an in vitro model of ramified microglia. *Microsc Res Tech*, 54, 18-25.
166. Rezaie P, Trillo-Pazos G, Greenwood J, Everall IP, Male DK. (2002) Motility and ramification of human fetal microglia in culture: an investigation using time-lapse video microscopy and image analysis. *Exp Cell Res*, 274, 68-82.
167. Voyvodic JT. (1996) Cell death in cortical development: How much? Why? So what? *Neuron*, 16, 693-6.
168. Ferrer I, Bernet E, Soriano E, del Rio T, Fonseca M. (1990) Naturally occurring cell death in the cerebral cortex of the rat and removal of dead cells by transitory phagocytes. *Neuroscience*, 39, 451-8.
169. Hanisch UK, Kettenmann H. (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*, 10, 1387-94.
170. Ford AL, Foulcher E, Lemckert FA, Sedgwick JD. (1996) Microglia induce CD4 T lymphocyte final effector function and death. *J Exp Med*, 184, 1737-45.
171. Yang I, Han SJ, Kaur G, Crane C, Parsa AT. (2010) The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology. *J Clin Neurosci*, 17, 6-10.
172. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*, 8, 752-8.
173. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308, 1314-8.
174. Trapp BD, Wujek JR, Criste GA, Jalabi W, Yin X, Kidd GJ, Stohlman S, Ransohoff R. (2007) Evidence for synaptic stripping by cortical microglia. *Glia*, 55, 360-8.
175. Cullheim S, Thams S. (2007) The microglial networks of the brain and their role in neuronal network plasticity after lesion. *Brain Res Rev*, 55, 89-96.
176. Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. (2009) Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci*, 29, 3974-80.
177. Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM. (2002) Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61, 1013-21.
178. Laflamme N, Soucy G, Rivest S. (2001) Circulating cell wall components derived from gram-negative, not gram-positive, bacteria cause a profound induction of the gene-encoding Toll-like receptor 2 in the CNS. *J Neurochem*, 79, 648-57.

179. Olson JK, Miller SD. (2004) Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol*, 173, 3916-24.
180. Peterson PK, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Anderson WR, Ulevitch RJ, Tobias PS, Gustafson KV, Molitor TW, Chao CC. (1995) CD14 receptor-mediated uptake of nonopsonized *Mycobacterium tuberculosis* by human microglia. *Infect Immun*, 63, 1598-602.
181. Marzolo MP, von Bernhardi R, Inestrosa NC. (1999) Mannose receptor is present in a functional state in rat microglial cells. *J Neurosci Res*, 58, 387-95.
182. Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, Wright GJ, Goddard R, Zurawski SM, Blom B, Homola ME, Streit WJ, Brown MH, Barclay AN, Sedgwick JD. (2000) Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science*, 290, 1768-71.
183. Harrison JK, Jiang Y, Chen S, Xia Y, Maciejewski D, McNamara RK, Streit WJ, Salafraanca MN, Adhikari S, Thompson DA, Botti P, Bacon KB, Feng L. (1998) Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 10896-901.
184. Cardona AE, Sasse ME, Liu L, Cardona SM, Mizutani M, Savarin C, Hu T, Ransohoff RM. (2008) Scavenging roles of chemokine receptors: chemokine receptor deficiency is associated with increased levels of ligand in circulation and tissues. *Blood*, 112, 256-63.
185. Barclay AN, Wright GJ, Brooke G, Brown MH. (2002) CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends Immunol*, 23, 285-90.
186. Eliason DA, Cohen SA, Baratta J, Yu J, Robertson RT. (2002) Local proliferation of microglia cells in response to neocortical injury in vitro. *Brain Res Dev Brain Res*, 137, 75-9.
187. Carbonell WS, Murase SI, Horwitz AF, Mandell JW. (2005) Infiltrative microgliosis: activation and long-distance migration of subependymal microglia following periventricular insults. *J Neuroinflammation*, 2, 5.
188. Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan WB, Julius D. (2006) The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci*, 9, 1512-9.
189. Glezer I, Simard AR, Rivest S. (2007) Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience*, 147, 867-83.
190. Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar AE, Pluchino S, Martino G, Schwartz M. (2006) Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci*, 31, 149-60.
191. Mirrione MM, Konomos DK, Gravanis I, Dewey SL, Aguzzi A, Heppner FL, Tsirka SE. (2010) Microglial ablation and lipopolysaccharide preconditioning affects pilocarpine-induced seizures in mice. *Neurobiol Dis*, 39, 85-97.
192. Wyss-Coray T, Mucke L. (2002) Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron*, 35, 419-32.
193. Perry VH, Nicoll JA, Holmes C. (2010) Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*, 6, 193-201.
194. Reynolds AD, Glanzer JG, Kadiu I, Ricardo-Dukelow M, Chaudhuri A, Ciborowski P, Cerny R, Gelman B, Thomas MP, Mosley RL, Gendelman HE. (2008) Nitrated alpha-synuclein-activated microglial profiling for Parkinson's disease. *J Neurochem*, 104, 1504-25.
195. Lucin KM, Wyss-Coray T. (2009) Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? *Neuron*, 64, 110-22.
196. Ransohoff RM. (2009) Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. *Immunity*, 31, 711-21.
197. Ransohoff RM, Brown MA. (2012) Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest*, 122, 1164-71.
198. van Rossum D, Hanisch UK. (2004) Microglia. *Metab Brain Dis*, 19, 393-411.
199. Kuhn DM, Francescutti-Verbeem DM, Thomas DM. (2006) Dopamine quinones activate microglia and induce a neurotoxic gene expression profile: relationship to methamphetamine-induced nerve ending damage. *Ann N Y Acad Sci*, 1074, 31-41.
200. Gillardon F, Schmid R, Draheim H. (2012) Parkinson's disease-linked leucine-rich repeat kinase 2(R1441G) mutation increases proinflammatory cytokine release from activated primary microglial cells and resultant neurotoxicity. *Neuroscience*, 208, 41-8.

201. Ransohoff RM, Perry VH. (2009) Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol*, 27, 119-45.
202. Broom L, Marinova-Mutafchieva L, Sadeghian M, Davis JB, Medhurst AD, Dexter DT. (2011) Neuroprotection by the selective iNOS inhibitor GW274150 in a model of Parkinson disease. *Free Radic Biol Med*, 50, 633-40.
203. Dawson VL, Dawson TM. (1996) Nitric oxide neurotoxicity. *J Chem Neuroanat*, 10, 179-90.
204. Stewart VC, Heales SJ. (2003) Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration. *Free Radic Biol Med*, 34, 287-303.
205. Nathan C, Xie QW. (1994) Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*, 269, 13725-8.
206. Hunot S, Boissiere F, Faucheux B, Brugg B, Mouatt-Prigent A, Agid Y, Hirsch EC. (1996) Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 72, 355-63.
207. Knott C, Stern G, Wilkin GP. (2000) Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Mol Cell Neurosci*, 16, 724-39.
208. Arimoto T, Bing G. (2003) Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in the substantia nigra by lipopolysaccharide causes microglial activation and neurodegeneration. *Neurobiol Dis*, 12, 35-45.
209. Mandrioli J, Del Rio D, Zini A, Nichelli P, Merelli E, Beltrami D, Cesari C, Pellegrini N, Brighenti F, Sola P. (2006) Total antioxidant capacity of cerebrospinal fluid is decreased in patients with motor neuron disease. *Neurosci Lett*, 401, 203-8.
210. Jenner P, Dexter DT, Sian J, Schapira AH, Marsden CD. (1992) Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. The Royal Kings and Queens Parkinson's Disease Research Group. *Ann Neurol*, 32 Suppl, S82-7.
211. Shergill JK, Cammack R, Cooper CE, Cooper JM, Mann VM, Schapira AH. (1996) Detection of nitrosyl complexes in human substantia nigra, in relation to Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 228, 298-305.
212. Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. (1990) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem*, 54, 823-7.
213. Lee DY, Oh YJ, Jin BK. (2005) Thrombin-activated microglia contribute to death of dopaminergic neurons in rat mesencephalic cultures: dual roles of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Glia*, 51, 98-110.
214. Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS. (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*, 364, 626-32.
215. O'Banion MK. (1999) Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol*, 13, 45-82.
216. Kreutzberg GW. (1996) Principles of neuronal regeneration. *Acta Neurochir Suppl*, 66, 103-6.
217. Hirsch EC. (2000) Glial cells and Parkinson's disease. *J Neurol*, 247 Suppl 2, II58-62.
218. Zhang W, Wang T, Pei Z, Miller DS, Wu X, Block ML, Wilson B, Zhang W, Zhou Y, Hong JS, Zhang J. (2005) Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J*, 19, 533-42.
219. Hunter RL, Dragicevic N, Seifert K, Choi DY, Liu M, Kim HC, Cass WA, Sullivan PG, Bing G. (2007) Inflammation induces mitochondrial dysfunction and dopaminergic neurodegeneration in the nigrostriatal system. *J Neurochem*, 100, 1375-86.
220. Teismann P, Tieu K, Choi DK, Wu DC, Naini A, Hunot S, Vila M, Jackson-Lewis V, Przedborski S. (2003) Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 5473-8.
221. Wang T, Pei Z, Zhang W, Liu B, Langenbach R, Lee C, Wilson B, Reece JM, Miller DS, Hong JS. (2005) MPP⁺-induced COX-2 activation and subsequent dopaminergic neurodegeneration. *FASEB J*, 19, 1134-6.
222. Mattammal MB, Strong R, Lakshmi VM, Chung HD, Stephenson AH. (1995) Prostaglandin H synthetase-mediated metabolism of dopamine: implication for Parkinson's disease. *J Neurochem*, 64, 1645-54.

-
223. Hoozemans JJ, Rozemuller AJ, Janssen I, De Groot CJ, Veerhuis R, Eikelenboom P. (2001) Cyclooxygenase expression in microglia and neurons in Alzheimer's disease and control brain. *Acta Neuropathol*, 101, 2-8.
 224. Hsieh YC, Mounsey RB, Teismann P. (2011) MPP(+)-induced toxicity in the presence of dopamine is mediated by COX-2 through oxidative stress. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 384, 157-67.
 225. Gupta A, Kumar A, Kulkarni SK. (2011) Targeting oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neuroinflammatory signaling by selective cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors mitigates MPTP-induced neurotoxicity in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 35, 974-81.
 226. Herrera AJ, Tomas-Camardiel M, Venero JL, Cano J, Machado A. (2005) Inflammatory process as a determinant factor for the degeneration of substantia nigra dopaminergic neurons. *J Neural Transm*, 112, 111-9.
 227. Yokoyama H, Uchida H, Kuroiwa H, Kasahara J, Araki T. (2011) Role of glial cells in neurotoxin-induced animal models of Parkinson's disease. *Neurol Sci*, 32, 1-7.
 228. Hanisch UK. (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, 40, 140-55.
 229. Zalcman S, Green-Johnson JM, Murray L, Nance DM, Dyck D, Anisman H, Greenberg AH. (1994) Cytokine-specific central monoamine alterations induced by interleukin-1, -2 and -6. *Brain Res*, 643, 40-9.
 230. Nolan Y, Maher FO, Martin DS, Clarke RM, Brady MT, Bolton AE, Mills KH, Lynch MA. (2005) Role of interleukin-4 in regulation of age-related inflammatory changes in the hippocampus. *J Biol Chem*, 280, 9354-62.
 231. Belarbi K, Jopson T, Tweedie D, Arellano C, Luo W, Greig NH, Rosi S. (2012) TNF-alpha protein synthesis inhibitor restores neuronal function and reverses cognitive deficits induced by chronic neuroinflammation. *J Neuroinflammation*, 9, 23.
 232. Menza M, Dobkin RD, Marin H, Mark MH, Gara M, Bienfait K, Dicke A, Kusnekov A. (2010) The role of inflammatory cytokines in cognition and other non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Psychosomatics*, 51, 474-9.
 233. Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A. (2000) Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 277-90.
 234. Mogi M, Harada M, Kondo T, Riederer P, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T. (1994) Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neurosci Lett*, 180, 147-50.
 235. Mogi M, Nagatsu T. (1999) Neurotrophins and cytokines in Parkinson's disease. *Adv Neurol*, 80, 135-9.
 236. Mogi M, Togari A, Tanaka K, Ogawa N, Ichinose H, Nagatsu T. (2000) Increase in level of tumor necrosis factor-alpha in 6-hydroxydopamine-lesioned striatum in rats is suppressed by immunosuppressant FK506. *Neurosci Lett*, 289, 165-8.
 237. Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, Ichinose H, Nagatsu T. (2000) Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain. *J Neural Transm*, 107, 335-41.
 238. Long-Smith CM, Sullivan AM, Nolan YM. (2009) The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 89, 277-87.
 239. Mogi M, Harada M, Riederer P, Narabayashi H, Fujita K, Nagatsu T. (1994) Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci Lett*, 165, 208-10.
 240. McCoy MK, Martinez TN, Ruhn KA, Szymkowski DE, Smith CG, Botterman BR, Tansey KE, Tansey MG. (2006) Blocking soluble tumor necrosis factor signaling with dominant-negative tumor necrosis factor inhibitor attenuates loss of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 26, 9365-75.
 241. Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schaffer AA, Noyan F, Perro M, Diestelhorst J, Allroth A, Murugan D, Hatscher N, Pfeifer D, Sykora KW, Sauer M, Kreipe H, Lacher M, Nustede R, Woellner C, Baumann U, Salzer U, Koletzko S, Shah N, Segal AW, Sauerbrey A, Buderus S, Snapper SB, Grimbacher B, Klein C. (2009) Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med*, 361, 2033-45.
 242. Glocker EO, Kotlarz D, Klein C, Shah N, Grimbacher B. (2011) IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. *Ann N Y Acad Sci*, 1246, 102-7.

243. Kotlarz D, Beier R, Murugan D, Diestelhorst J, Jensen O, Boztug K, Pfeifer D, Kreipe H, Pfister ED, Baumann U, Puchalka J, Bohne J, Egritas O, Dalgic B, Kolho KL, Sauerbrey A, Buderus S, Gungor T, Enninger A, Koda YK, Guariso G, Weiss B, Corbacioglu S, Socha P, Uslu N, Metin A, Wahbeh GT, Husain K, Ramadan D, Al-Herz W, Grimbacher B, Sauer M, Sykora KW, Koletzko S, Klein C. (2012) Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: implications for diagnosis and therapy. *Gastroenterology*, 143, 347-55.
244. Moran CJ, Walters TD, Guo CH, Kugathasan S, Klein C, Turner D, Wolters VM, Bandsma RH, Mouzaki M, Zachos M, Langer JC, Cutz E, Benseler SM, Roifman CM, Silverberg MS, Griffiths AM, Snapper SB, Muise AM. (2012) IL-10R polymorphisms are associated with very-early-onset ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. <http://dx.doi.org/10.1002/ibd.22974>
245. Zhou Z, Peng X, Insolera R, Fink DJ, Mata M. (2009) IL-10 promotes neuronal survival following spinal cord injury. *Exp Neurol*, 220, 183-90.
246. Bachis A, Colangelo AM, Vicini S, Doe PP, De Bernardi MA, Brooker G, Mocchetti I. (2001) Interleukin-10 prevents glutamate-mediated cerebellar granule cell death by blocking caspase-3-like activity. *J Neurosci*, 21, 3104-12.
247. Dietrich WD, Busto R, Bethea JR. (1999) Postischemic hypothermia and IL-10 treatment provide long-lasting neuroprotection of CA1 hippocampus following transient global ischemia in rats. *Exp Neurol*, 158, 444-50.
248. Knoblach SM, Faden AI. (1998) Interleukin-10 improves outcome and alters proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol*, 153, 143-51.
249. Grilli M, Barbieri I, Basudev H, Brusa R, Casati C, Lozza G, Ongini E. (2000) Interleukin-10 modulates neuronal threshold of vulnerability to ischaemic damage. *Eur J Neurosci*, 12, 2265-72.
250. Xiao BG, Bai XF, Zhang GX, Link H. (1998) Suppression of acute and protracted-relapsing experimental allergic encephalomyelitis by nasal administration of low-dose IL-10 in rats. *J Neuroimmunol*, 84, 230-7.
251. Spera PA, Ellison JA, Feuerstein GZ, Barone FC. (1998) IL-10 reduces rat brain injury following focal stroke. *Neurosci Lett*, 251, 189-92.
252. Kiyota T, Ingraham KL, Swan RJ, Jacobsen MT, Andrews SJ, Ikezu T. (2012) AAV serotype 2/1-mediated gene delivery of anti-inflammatory interleukin-10 enhances neurogenesis and cognitive function in APP+PS1 mice. *Gene Ther*, 19, 724-33.
253. Sloane E, Ledebor A, Seibert W, Coats B, van Strien M, Maier SF, Johnson KW, Chavez R, Watkins LR, Leinwand L, Milligan ED, Van Dam AM. (2009) Anti-inflammatory cytokine gene therapy decreases sensory and motor dysfunction in experimental Multiple Sclerosis: MOG-EAE behavioral and anatomical symptom treatment with cytokine gene therapy. *Brain Behav Immun*, 23, 92-100.
254. Lee YB, Nagai A, Kim SU. (2002) Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia. *J Neurosci Res*, 69, 94-103.
255. Sheng WS, Hu S, Kravitz FH, Peterson PK, Chao CC. (1995) Tumor necrosis factor alpha upregulates human microglial cell production of interleukin-10 in vitro. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2, 604-8.
256. Park KW, Lee HG, Jin BK, Lee YB. (2007) Interleukin-10 endogenously expressed in microglia prevents lipopolysaccharide-induced neurodegeneration in the rat cerebral cortex in vivo. *Exp Mol Med*, 39, 812-9.
257. Williams K, Dooley N, Ulvestad E, Becher B, Antel JP. (1996) IL-10 production by adult human derived microglial cells. *Neurochem Int*, 29, 55-64.
258. Arimoto T, Choi DY, Lu X, Liu M, Nguyen XV, Zheng N, Stewart CA, Kim HC, Bing G. (2007) Interleukin-10 protects against inflammation-mediated degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra. *Neurobiol Aging*, 28, 894-906.
259. Heyen JR, Ye S, Finck BN, Johnson RW. (2000) Interleukin (IL)-10 inhibits IL-6 production in microglia by preventing activation of NF-kappaB. *Brain Res Mol Brain Res*, 77, 138-47.
260. Qian L, Block ML, Wei SJ, Lin CF, Reece J, Pang H, Wilson B, Hong JS, Flood PM. (2006) Interleukin-10 protects lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in primary midbrain cultures by inhibiting the function of NADPH oxidase. *J Pharmacol Exp Ther*, 319, 44-52.

261. Johnston LC, Su X, Maguire-Zeiss K, Horovitz K, Ankoudinova I, Guschin D, Hadaczek P, Federoff HJ, Bankiewicz K, Forsayeth J. (2008) Human interleukin-10 gene transfer is protective in a rat model of Parkinson's disease. *Mol Ther*, 16, 1392-9.
262. Ledebroer A, Breve JJ, Poole S, Tilders FJ, Van Dam AM. (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.
263. Molina-Holgado F, Grecis R, Rothwell NJ. (2001) Actions of exogenous and endogenous IL-10 on glial responses to bacterial LPS/cytokines. *Glia*, 33, 97-106.
264. Bonifati DM, Kishore U. (2007) Role of complement in neurodegeneration and neuroinflammation. *Mol Immunol*, 44, 999-1010.
265. Fiszer U, Piotrowska K, Korlak J, Czlonkowska A. (1991) The immunological status in Parkinson's disease. *Med Lab Sci*, 48, 196-200.
266. Fiszer U, Mix E, Fredrikson S, Kostulas V, Link H. (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, 160-6.
267. Bas J, Calopa M, Mestre M, Mollevi DG, Cutillas B, Ambrosio S, Buendia E. (2001) Lymphocyte populations in Parkinson's disease and in rat models of parkinsonism. *J Neuroimmunol*, 113, 146-52.
268. Gruden MA, Sewell RD, Yanamandra K, Davidova TV, Kucheryanu VG, Bocharov EV, Bocharova OR, Polyschuk VV, Sherstnev VV, Morozova-Roche LA. (2011) Immunoprotection against toxic biomarkers is retained during Parkinson's disease progression. *J Neuroimmunol*, 233, 221-7.
269. Baba Y, Kuroiwa A, Uitti RJ, Wszolek ZK, Yamada T. (2005) Alterations of T-lymphocyte populations in Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 11, 493-8.
270. Calopa M, Bas J, Callen A, Mestre M. (2010) Apoptosis of peripheral blood lymphocytes in Parkinson patients. *Neurobiol Dis*, 38, 1-7.
271. Migliore L, Petrozzi L, Lucetti C, Gambaccini G, Bernardini S, Scarpato R, Trippi F, Barale R, Frenzilli G, Rodilla V, Bonuccelli U. (2002) Oxidative damage and cytogenetic analysis in leukocytes of Parkinson's disease patients. *Neurology*, 58, 1809-15.
272. Blandini F, Sinforiani E, Pacchetti C, Samuele A, Bazzini E, Zangaglia R, Nappi G, Martignoni E. (2006) Peripheral proteasome and caspase activity in Parkinson disease and Alzheimer disease. *Neurology*, 66, 529-34.
273. Muftuoglu M, Elibol B, Dalmizrak O, Ercan A, Kulaksiz G, Ogus H, Dalkara T, Ozer N. (2004) Mitochondrial complex I and IV activities in leukocytes from patients with parkin mutations. *Mov Disord*, 19, 544-8.
274. Fiszer U, Mix E, Fredrikson S, Kostulas V, Olsson T, Link H. (1994) gamma delta+ T cells are increased in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 121, 39-45.
275. Selmaj K, Brosnan CF, Raine CS. (1991) Colocalization of lymphocytes bearing gamma delta T-cell receptor and heat shock protein hsp65+ oligodendrocytes in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 6452-6.
276. Kjeldsen-Kragh J, Quayle A, Kalvenes C, Forre O, Sorskaar D, Vinje O, Thoen J, Natvig JB. (1990) T gamma delta cells in juvenile rheumatoid arthritis and rheumatoid arthritis. In the juvenile rheumatoid arthritis synovium the T gamma delta cells express activation antigens and are predominantly V delta 1+, and a significant proportion of these patients have elevated percentages of T gamma delta cells. *Scand J Immunol*, 32, 651-9.
277. Born WK, Harshan K, Modlin RL, O'Brien RL. (1991) The role of gamma delta T lymphocytes in infection. *Curr Opin Immunol*, 3, 455-9.
278. Born WK, O'Brien RL, Modlin RL. (1991) Antigen specificity of gamma delta T lymphocytes. *Faseb J*, 5, 2699-705.
279. Marttila RJ, Kalimo KO, Ziola BR, Halonen PE, Rinne UK. (1978) Herpes simplex virus subunit antibodies in patients with Parkinson's disease. *Arch Neurol*, 35, 668-71.
280. Marttila RJ, Rinne UK, Halonen P, Madden DL, Sever JL. (1981) Herpesviruses and parkinsonism. Herpes simplex virus types 1 and 2, and cytomegalovirus antibodies in serum and CSF. *Arch Neurol*, 38, 19-21.

281. Vilensky JA, Duvosin RC, Gilman S. (2010) The diagnosis of postencephalitic parkinsonism at the neurological unit of Boston City Hospital, 1930-1981. *Neurol Sci*, 32, 343-6.
282. Vilensky JA, Gilman S, McCall S. (2010) Does the historical literature on encephalitis lethargica support a simple (direct) relationship with postencephalitic Parkinsonism? *Mov Disord*, 25, 1124-30.
283. Vilensky JA, Gilman S, McCall S. (2010) A historical analysis of the relationship between encephalitis lethargica and postencephalitic parkinsonism: a complex rather than a direct relationship. *Mov Disord*, 25, 1116-23.
284. McRae-Degueurce A, Rosengren L, Haglid K, Booj S, Gottfries CG, Granerus AC, Dahlstrom A. (1988) Immunocytochemical investigations on the presence of neuron-specific antibodies in the CSF of Parkinson's disease cases. *Neurochem Res*, 13, 679-84.
285. Carvey PM, McRae A, Lint TF, Ptak LR, Lo ES, Goetz CG, Klawans HL. (1991) The potential use of a dopamine neuron antibody and a striatal-derived neurotrophic factor as diagnostic markers in Parkinson's disease. *Neurology*, 41, 53-8; discussion 59-60.
286. McRae Degueurce A, Gottfries CG, Karlsson I, Svennerholm L, Dahlstrom A. (1986) Antibodies in the CSF of a Parkinson patient recognizes neurons in rat mesencephalic regions. *Acta Physiol Scand*, 126, 313-5.
287. Chen S, Le WD, Xie WJ, Alexianu ME, Engelhardt JI, Siklos L, Appel SH. (1998) Experimental destruction of substantia nigra initiated by Parkinson disease immunoglobulins. *Arch Neurol*, 55, 1075-80.
288. Orr CF, Rowe DB, Mizuno Y, Mori H, Halliday GM. (2005) A possible role for humoral immunity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Brain*, 128, 2665-74.
289. Dahlstrom A, Wigander A, Lundmark K, Gottfries CG, Carvey PM, McRae A. (1990) Investigations on auto-antibodies in Alzheimer's and Parkinson's diseases, using defined neuronal cultures. *J Neural Transm Suppl*, 29, 195-206.
290. He Y, Le WD, Appel SH. (2002) Role of Fcγ receptors in nigral cell injury induced by Parkinson disease immunoglobulin injection into mouse substantia nigra. *Exp Neurol*, 176, 322-7.
291. Wang XJ, Yan ZQ, Lu GQ, Stuart S, Chen SD. (2007) Parkinson disease IgG and C5a-induced synergistic dopaminergic neurotoxicity: role of microglia. *Neurochem Int*, 50, 39-50.
292. Levin EC, Acharya NK, Han M, Zavareh SB, Sedeyn JC, Venkataraman V, Nagele RG. (2010) Brain-reactive autoantibodies are nearly ubiquitous in human sera and may be linked to pathology in the context of blood-brain barrier breakdown. *Brain Res*, 1345, 221-32.
293. Han M, Nagele E, DeMarshall C, Acharya N, Nagele R. (2012) Diagnosis of Parkinson's disease based on disease-specific autoantibody profiles in human sera. *PLoS One*, 7, e32383.
294. Jindal S, Dudani AK, Singh B, Harley CB, Gupta RS. (1989) Primary structure of a human mitochondrial protein homologous to the bacterial and plant chaperonins and to the 65-kilodalton mycobacterial antigen. *Mol Cell Biol*, 9, 2279-83.
295. Gaston JS. (1991) Heat shock proteins and autoimmunity. *Semin Immunol*, 3, 35-42.
296. Jellinger KA. (1989) Cytoskeletal pathology of parkinsonism and aging brain. In: *Parkinsonism and aging* (ed. CG Calne DB, Grippa D), pp 35-56. Raven Press, New York.
297. Benner EJ, Banerjee R, Reynolds AD, Sherman S, Pisarev VM, Tshiperson V, Nemachek C, Ciborowski P, Przedborski S, Mosley RL, Gendelman HE. (2008) Nitrated alpha-synuclein immunity accelerates degeneration of nigral dopaminergic neurons. *PLoS One*, 3, e1376.
298. Reynolds AD, Stone DK, Hutter JA, Benner EJ, Mosley RL, Gendelman HE. (2010) Regulatory T cells attenuate Th17 cell-mediated nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in a model of Parkinson's disease. *J Immunol*, 184, 2261-71.
299. Cao JJ, Li KS, Shen YQ. (2011) Activated immune cells in Parkinson's disease. *J Neuroimmune Pharmacol*, 6, 323-9.
300. Reynolds AD, Stone DK, Mosley RL, Gendelman HE. (2009) Nitrated {alpha}-synuclein-induced alterations in microglial immunity are regulated by CD4⁺ T cell subsets. *J Immunol*, 182, 4137-49.
301. Ouchi Y, Yoshikawa E, Sekine Y, Futatsubashi M, Kanno T, Ogusu T, Torizuka T. (2005) Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 57, 168-75.

302. Akiyama H, McGeer PL. (1989) Microglial response to 6-hydroxydopamine-induced substantia nigra lesions. *Brain Res*, 489, 247-53.
303. He Y, Appel S, Le W. (2001) Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain Res*, 909, 187-93.
304. Depino AM, Earl C, Kaczmarczyk E, Ferrari C, Besedovsky H, del Rey A, Pitossi FJ, Oertel WH. (2003) Microglial activation with atypical proinflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*, 18, 2731-42.
305. McGeer PL, Schwab C, Parent A, Doudet D. (2003) Presence of reactive microglia in monkey substantia nigra years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration. *Ann Neurol*, 54, 599-604.
306. Zhou H, Zhang F, Chen SH, Zhang D, Wilson B, Hong JS, Gao HM. (2003) Rotenone activates phagocyte NADPH oxidase by binding to its membrane subunit gp91phox. *Free Radic Biol Med*, 52, 303-13.
307. Su X, Maguire-Zeiss KA, Giuliano R, Prifti L, Venkatesh K, Federoff HJ. (2008) Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 29, 1690-701.
308. Herrera AJ, Castano A, Venero JL, Cano J, Machado A. (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, 429-47.
309. Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, Knapp DJ, Crews FT. (2007) Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*, 55, 453-62.
310. Zecca L, Wilms H, Geick S, Claasen JH, Brandenburg LO, Holzknecht C, Panizza ML, Zucca FA, Deuschl G, Sievers J, Lucius R. (2008) Human neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat substantia nigra: implications for Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*, 116, 47-55.
311. Wilms H, Rosenstiel P, Sievers J, Deuschl G, Zecca L, Lucius R. (2003) Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease. *Faseb J*, 17, 500-2.
312. Su X, Federoff HJ, Maguire-Zeiss KA. (2009) Mutant alpha-synuclein overexpression mediates early proinflammatory activity. *Neurotox Res*, 16, 238-54.
313. Sherer TB, Betarbet R, Kim JH, Greenamyre JT. (2003) Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 341, 87-90.
314. Rodriguez-Pallares J, Parga JA, Munoz A, Rey P, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. (2007) Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: the role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurochem*, 103, 145-56.
315. Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, Tieu K, Teismann P, Vadseth C, Choi DK, Ischiropoulos H, Przedborski S. (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.
316. Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, Dawson VL, Dawson TM, Przedborski S. (1999) Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med*, 5, 1403-9.
317. Castano A, Herrera AJ, Cano J, Machado A. (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.
318. Kim WG, Mohny RP, Wilson B, Jeohn GH, Liu B, Hong JS. (2000) Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci*, 20, 6309-16.
319. Wu DC, Teismann P, Tieu K, Vila M, Jackson-Lewis V, Ischiropoulos H, Przedborski S. (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, 6145-50.
320. Teismann P, Ferger B. (2001) Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease. *Synapse*, 39, 167-74.
321. Kurkowska-Jastrzebska I, Wronska A, Kohutnicka M, Czlonkowski A, Czlonkowska A. (1999) MHC class II positive microglia and lymphocytic infiltration are present in the substantia nigra and striatum in mouse model of Parkinson's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 59, 1-8.

-
322. Stolp HB, Dziegielewska KM. (2009) Review: Role of developmental inflammation and blood-brain barrier dysfunction in neurodevelopmental and neurodegenerative diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 35, 132-46.
 323. Wong D, Prameya R, Dorovini-Zis K. (1999) In vitro adhesion and migration of T lymphocytes across monolayers of human brain microvessel endothelial cells: regulation by ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and PECAM-1. *J Neuropathol Exp Neurol*, 58, 138-52.
 324. Farkas E, De Jong GI, Apro E, De Vos RA, Steur EN, Luiten PG. (2000) Similar ultrastructural breakdown of cerebrocortical capillaries in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and experimental hypertension. What is the functional link? *Ann N Y Acad Sci*, 903, 72-82.
 325. Mollenhauer B, Trautmann E, Otte B, Ng J, Spreer A, Lange P, Sixel-Doring F, Hakimi M, Vonsattel JP, Nussbaum R, Trenkwalder C, Schlossmacher MG. (2012) Alpha-synuclein in human cerebrospinal fluid is principally derived from neurons of the central nervous system. *J Neural Transm*, 119, 739-46.
 326. Bartels AL. (2011) Blood-brain barrier P-glycoprotein function in neurodegenerative disease. *Curr Pharm Des*, 17, 2771-7.
 327. Kortekaas R, Leenders KL, van Oostrom JC, Vaalburg W, Bart J, Willemsen AT, Hendrikse NH. (2005) Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. *Ann Neurol*, 57, 176-9.
 328. Babcock AA, Kuziel WA, Rivest S, Owens T. (2003) Chemokine expression by glial cells directs leukocytes to sites of axonal injury in the CNS. *J Neurosci*, 23, 7922-30.
 329. Fasano M, Lopiano L. (2008) Alpha-synuclein and Parkinson's disease: a proteomic view. *Expert Rev Proteomics*, 5, 239-48.
 330. Alberio T, Bossi AM, Milli A, Parma E, Gariboldi MB, Tosi G, Lopiano L, Fasano M. (2010) Proteomic analysis of dopamine and alpha-synuclein interplay in a cellular model of Parkinson's disease pathogenesis. *Febs J*, 277, 4909-19.
 331. Mosharov EV, Staal RG, Bove J, Prou D, Hananiya A, Markov D, Poulsen N, Larsen KE, Moore CM, Troyer MD, Edwards RH, Przedborski S, Sulzer D. (2006) Alpha-synuclein overexpression increases cytosolic catecholamine concentration. *J Neurosci*, 26, 9304-11.
 332. Teismann P, Vila M, Choi DK, Tieu K, Wu DC, Jackson-Lewis V, Przedborski S. (2003) COX-2 and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 991, 272-7.
 333. Hirsch EC. (2006) Altered regulation of iron transport and storage in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 201-4.
 334. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 219, 979-80.
 335. Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE. (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.
 336. Chan P, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW, Di Monte D. (1991) Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain. *J Neurochem*, 57, 348-51.
 337. Hasegawa E, Takeshige K, Oishi T, Murai Y, Minakami S. (1990) 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) induces NADH-dependent superoxide formation and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. *Biochem Biophys Res Commun*, 170, 1049-55.
 338. Fabre E, Monserrat J, Herrero A, Barja G, Leret ML. (1999) Effect of MPTP on brain mitochondrial H₂O₂ and ATP production and on dopamine and DOPAC in the striatum. *J Physiol Biochem*, 55, 325-31.
 339. Vila M, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Djaldetti R, Liberatore G, Offen D, Korsmeyer SJ, Przedborski S. (2001) Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 2837-42.
 340. Tatton NA, Kish SJ. (1997) In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining. *Neuroscience*, 77, 1037-48.
 341. Novikova L, Garris BL, Garris DR, Lau YS. (2006) Early signs of neuronal apoptosis in the substantia nigra pars compacta of the progressive neurodegenerative mouse 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine/probenecid model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 140, 67-76.

342. Gao HM, Liu B, Zhang W, Hong JS. (2003) Synergistic dopaminergic neurotoxicity of MPTP and inflammogen lipopolysaccharide: relevance to the etiology of Parkinson's disease. *Faseb J*, 17, 1957-9.
343. Gao HM, Liu B, Zhang W, Hong JS. (2003) Critical role of microglial NADPH oxidase-derived free radicals in the in vitro MPTP model of Parkinson's disease. *Faseb J*, 17, 1954-6.
344. Nagatsu T, Sawada M. (2005) Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines. *Curr Pharm Des*, 11, 999-1016.
345. Mandel S, Grunblatt E, Maor G, Youdim MB. (2002) Early and late gene changes in MPTP mice model of Parkinson's disease employing cDNA microarray. *Neurochem Res*, 27, 1231-43.
346. Tieu K, Ischiropoulos H, Przedborski S. (2003) Nitric oxide and reactive oxygen species in Parkinson's disease. *IUBMB Life*, 55, 329-35.
347. Mogi M, Togari A, Ogawa M, Ikeguchi K, Shizuma N, Fan D, Nakano I, Nagatsu T. (1998) Effects of repeated systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) to mice on interleukin-1beta and nerve growth factor in the striatum. *Neurosci Lett*, 250, 25-8.
348. Sriram K, Matheson JM, Benkovic SA, Miller DB, Luster MI, O'Callaghan JP. (2002) Mice deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: implications for Parkinson's disease. *Faseb J*, 16, 1474-6.
349. Sriram K, Matheson JM, Benkovic SA, Miller DB, Luster MI, O'Callaghan JP. (2006) Deficiency of TNF receptors suppresses microglial activation and alters the susceptibility of brain regions to MPTP-induced neurotoxicity: role of TNF-alpha. *Faseb J*, 20, 670-82.
350. Ungerstedt U, Arbuthnott GW. (1970) Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res*, 24, 485-93.
351. Lee EY, Lee JE, Park JH, Shin IC, Koh HC. (2012) Rosiglitazone, a PPAR-gamma agonist, protects against striatal dopaminergic neurodegeneration induced by 6-OHDA lesions in the substantia nigra of rats. *Toxicol Lett*, 213, 332-44.
352. Tian LP, Zhang S, Xu L, Li W, Wang Y, Chen SD, Ding JQ. (2012) Selenite benefits embryonic stem cells therapy in Parkinson's disease. *Curr Mol Med*, 12, 1005-14.
353. Ungerstedt U. (1968) 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol*, 5, 107-10.
354. Cohen G. (1984) Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology*, 5, 77-82.
355. Blesa J, Phani S, Jackson-Lewis V, Przedborski S. (2012) Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 845-618.
356. Hanrott K, Gudmunson L, O'Neill MJ, Wonnacott S. (2006) 6-hydroxydopamine-induced apoptosis is mediated via extracellular auto-oxidation and caspase 3-dependent activation of protein kinase Cdelta. *J Biol Chem*, 281, 5373-82.
357. Cicchetti F, Brownell AL, Williams K, Chen YI, Livni E, Isacson O. (2002) Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. *Eur J Neurosci*, 15, 991-8.
358. Ouchi Y, Yagi S, Yokokura M, Sakamoto M. (2009) Neuroinflammation in the living brain of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 15 Suppl 3, S200-4.
359. Rietschel ET, Seydel U, Zahring U, Schade UF, Brade L, Loppnow H, Feist W, Wang MH, Ulmer AJ, Flad HD, et al. (1991) Bacterial endotoxin: molecular relationships between structure and activity. *Infect Dis Clin North Am*, 5, 753-79.
360. Rivest S, Lacroix S, Vallieres L, Nadeau S, Zhang J, Laflamme N. (2000) How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med*, 223, 22-38.
361. Galea E, Reis DJ, Fox ES, Xu H, Feinstein DL. (1996) CD14 mediate endotoxin induction of nitric oxide synthase in cultured brain glial cells. *J Neuroimmunol*, 64, 19-28.
362. Laflamme N, Echchannaoui H, Landmann R, Rivest S. (2003) Cooperation between toll-like receptor 2 and 4 in the brain of mice challenged with cell wall components derived from gram-negative and gram-positive bacteria. *Eur J Immunol*, 33, 1127-38.
363. Boje KM, Arora PK. (1992) Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res*, 587, 250-6.
364. Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Peterson PK. (1992) Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol*, 149, 2736-41.

-
365. Gayle DA, Ling Z, Tong C, Landers T, Lipton JW, Carvey PM. (2002) Lipopolysaccharide (LPS)-induced dopamine cell loss in culture: roles of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and nitric oxide. *Brain Res Dev Brain Res*, 133, 27-35.
 366. Ajmone-Cat MA, Nicolini A, Minghetti L. (2003) Prolonged exposure of microglia to lipopolysaccharide modifies the intracellular signaling pathways and selectively promotes prostaglandin E2 synthesis. *J Neurochem*, 87, 1193-203.
 367. Tufekci KU, Genc S, Genc K. (2010) The endotoxin-induced neuroinflammation model of Parkinson's disease. *Parkinsons Dis*, 2011, 487450.
 368. Castano A, Herrera AJ, Cano J, Machado A. (1998) Lipopolysaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction and damage in nigrostriatal dopaminergic system. *J Neurochem*, 70, 1584-92.
 369. Saijo K, Winner B, Carson CT, Collier JG, Boyer L, Rosenfeld MG, Gage FH, Glass CK. (2009) A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell*, 137, 47-59.
 370. Czapski GA, Cakala M, Chalimoniuk M, Gajkowska B, Strosznajder JB. (2007) Role of nitric oxide in the brain during lipopolysaccharide-evoked systemic inflammation. *J Neurosci Res*, 85, 1694-703.
 371. Graham DG. (1979) On the origin and significance of neuromelanin. *Arch Pathol Lab Med*, 103, 359-62.
 372. Fenichel GM, Bazelon M. (1968) Studies on neuromelanin. II. Melanin in the brainstems of infants and children. *Neurology*, 18, 817-20.
 373. Li J, Scheller C, Koutsilieri E, Griffiths F, Beart PM, Mercer LD, Halliday G, Kettle E, Rowe D, Riederer P, Gerlach M, Rodriguez M, Double KL. (2005) Differential effects of human neuromelanin and synthetic dopamine melanin on neuronal and glial cells. *J Neurochem*, 95, 599-608.
 374. Zecca L, Zucca FA, Wilms H, Sulzer D. (2003) Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics. *Trends Neurosci*, 26, 578-80.
 375. Zucca FA, Giaveri G, Gallorini M, Albertini A, Toscani M, Pezzoli G, Lucius R, Wilms H, Sulzer D, Ito S, Wakamatsu K, Zecca L. (2004) The neuromelanin of human substantia nigra: physiological and pathogenic aspects. *Pigment Cell Res*, 17, 610-7.
 376. Herrero MT, Hirsch EC, Kastner A, Ruberg M, Luquin MR, Laguna J, Javoy-Agid F, Obeso JA, Agid Y. (1993) Does neuromelanin contribute to the vulnerability of catecholaminergic neurons in monkeys intoxicated with MPTP? *Neuroscience*, 56, 499-511.
 377. Kastner A, Hirsch EC, Lejeune O, Javoy-Agid F, Rascol O, Agid Y. (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.
 378. Fasano M, Bergamasco B, Lopiano L. (2006) Is neuromelanin changed in Parkinson's disease? Investigations by magnetic spectroscopies. *J Neural Transm*, 113, 769-74.
 379. Halliday GM, Ophof A, Broe M, Jensen PH, Kettle E, Fedorow H, Cartwright MI, Griffiths FM, Shepherd CE, Double KL. (2005) Alpha-synuclein redistributes to neuromelanin lipid in the substantia nigra early in Parkinson's disease. *Brain*, 128, 2654-64.
 380. Berg D, Gerlach M, Youdim MB, Double KL, Zecca L, Riederer P, Becker G. (2001) Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem*, 79, 225-36.
 381. Sian-Hulsmann J, Mandel S, Youdim MB, Riederer P. (2011) The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem*, 118, 939-57.
 382. Cavallarin N, Vicario M, Negro A. (2010) The role of phosphorylation in synucleinopathies: focus on Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 9, 471-81.
 383. Gao HM, Kotzbauer PT, Uryu K, Leight S, Trojanowski JQ, Lee VM. (2008) Neuroinflammation and oxidation/nitration of alpha-synuclein linked to dopaminergic neurodegeneration. *J Neurosci*, 28, 7687-98.
 384. Sanchez-Guajardo V, Febbraro F, Kirik D, Romero-Ramos M. (2010) Microglia acquire distinct activation profiles depending on the degree of alpha-synuclein neuropathology in a rAAV based model of Parkinson's disease. *PLoS One*, 5, e8784.
 385. Kirik D, Rosenblad C, Burger C, Lundberg C, Johansen TE, Muzyczka N, Mandel RJ, Bjorklund A. (2002) Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. *J Neurosci*, 22, 2780-91.

-
386. Decressac M, Mattsson B, Lundblad M, Weikop P, Bjorklund A. (2012) Progressive neurodegenerative and behavioural changes induced by AAV-mediated overexpression of alpha-synuclein in midbrain dopamine neurons. *Neurobiol Dis*, 45, 939-53.
387. Lin X, Parisiadou L, Sgobio C, Liu G, Yu J, Sun L, Shim H, Gu XL, Luo J, Long CX, Ding J, Mateo Y, Sullivan PH, Wu LG, Goldstein DS, Lovinger D, Cai H. (2012) Conditional expression of Parkinson's disease-related mutant alpha-synuclein in the midbrain dopaminergic neurons causes progressive neurodegeneration and degradation of transcription factor nuclear receptor related 1. *J Neurosci*, 32, 9248-64.
388. Klegeris A, Pelech S, Giasson BI, Maguire J, Zhang H, McGeer EG, McGeer PL. (2008) Alpha-synuclein activates stress signaling protein kinases in THP-1 cells and microglia. *Neurobiol Aging*, 29, 739-52.
389. Kurkowska-Jastrzebska I, Litwin T, Joniec I, Ciesielska A, Przybylkowski A, Czlonkowska A, Czlonkowska A. (2004) Dexamethasone protects against dopaminergic neurons damage in a mouse model of Parkinson's disease. *Int Immunopharmacol*, 4, 1307-18.
390. Huo Y, Rangarajan P, Ling EA, Dheen ST. (2011) Dexamethasone inhibits the Nox-dependent ROS production via suppression of MKP-1-dependent MAPK pathways in activated microglia. *BMC Neurosci*, 12, 49.
391. Esposito E, Di Matteo V, Benigno A, Pierucci M, Crescimanno G, Di Giovanni G. (2007) Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 205, 295-312.
392. Chen H, Zhang SM, Hernan MA, Schwarzschild MA, Willett WC, Colditz GA, Speizer FE, Ascherio A. (2003) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. *Arch Neurol*, 60, 1059-64.
393. Chen H, Jacobs E, Schwarzschild MA, McCullough ML, Calle EE, Thun MJ, Ascherio A. (2005) Nonsteroidal antiinflammatory drug use and the risk for Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 58, 963-7.
394. Hernan MA, Logroscino G, Garcia Rodriguez LA. (2006) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the incidence of Parkinson disease. *Neurology*, 66, 1097-9.
395. Sanchez-Pernaute R, Ferree A, Cooper O, Yu M, Brownell AL, Isacson O. (2004) Selective COX-2 inhibition prevents progressive dopamine neuron degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation*, 1, 6.
396. Samii A, Etminan M, Wiens MO, Jafari S. (2009) NSAID use and the risk of Parkinson's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Drugs Aging*, 26, 769-79.
397. Rees K, Stowe R, Patel S, Ives N, Breen K, Clarke CE, Ben-Shlomo Y. (2011) Non-steroidal anti-inflammatory drugs as disease-modifying agents for Parkinson's disease: evidence from observational studies. *Cochrane Database Syst Rev*, CD008454.
398. Becker C, Jick SS, Meier CR. (2011) NSAID use and risk of Parkinson disease: a population-based case-control study. *Eur J Neurol*, 18, 1336-42.
399. Manthripragada AD, Schernhammer ES, Qiu J, Friis S, Wermuth L, Olsen JH, Ritz B. (2011) Non-steroidal anti-inflammatory drug use and the risk of Parkinson's disease. *Neuroepidemiology*, 36, 155-61.
400. Ryan ME, Ashley RA. (1998) How do tetracyclines work? *Adv Dent Res*, 12, 149-51.
401. Kim HS, Suh YH. (2009) Minocycline and neurodegenerative diseases. *Behav Brain Res*, 196, 168-79.
402. Du Y, Ma Z, Lin S, Dodel RC, Gao F, Bales KR, Triarhou LC, Chernet E, Perry KW, Nelson DL, Luecke S, Phebus LA, Bymaster FP, Paul SM. (2001) Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 14669-74.
403. Investigators NN-P. (2008) A pilot clinical trial of creatine and minocycline in early Parkinson disease: 18-month results. *Clin Neuropharmacol*, 31, 141-50.
404. Chaturvedi RK, Beal MF. (2008) PPAR: a therapeutic target in Parkinson's disease. *J Neurochem*, 106, 506-18.
405. Quinn LP, Crook B, Hows ME, Vidgeon-Hart M, Chapman H, Upton N, Medhurst AD, Virley DJ. (2008) The PPARgamma agonist pioglitazone is effective in the MPTP mouse model of Parkinson's disease through inhibition of monoamine oxidase B. *Br J Pharmacol*, 154, 226-33.
406. Kaundal RK, Sharma SS. (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists as neuroprotective agents. *Drug News Perspect*, 23, 241-56.

-
407. Wyss-Coray T. (2006) Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med*, 12, 1005-15.
 408. Marchetti B, Abbracchio MP. (2005) To be or not to be (inflamed)--is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Pharmacol Sci*, 26, 517-25.
 409. Gordon PH, Moore DH, Miller RG, Florence JM, Verheijde JL, Doorish C, Hilton JF, Spitalny GM, MacArthur RB, Mitsumoto H, Neville HE, Boylan K, Mozaffar T, Belsh JM, Ravits J, Bedlack RS, Graves MC, McCluskey LF, Barohn RJ, Tandan R. (2007) Efficacy of minocycline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a phase III randomised trial. *Lancet Neurol*, 6, 1045-53.
 410. Polazzi E, Monti B. (2010) Microglia and neuroprotection: from in vitro studies to therapeutic applications. *Prog Neurobiol*, 92, 293-315.
 411. Khandelwal PJ, Herman AM, Moussa CE. (2011) Inflammation in the early stages of neurodegenerative pathology. *J Neuroimmunol*, 238, 1-11.
 412. Carta AR, Pisanu A. (2012) Modulating Microglia Activity with PPAR-gamma Agonists: A Promising Therapy for Parkinson's Disease? *Neurotox Res*, 23, 112-123
 413. Yang L, Sugama S, Chirichigno JW, Gregorio J, Lorenzl S, Shin DH, Browne SE, Shimizu Y, Joh TH, Beal MF, Albers DS. (2003) Minocycline enhances MPTP toxicity to dopaminergic neurons. *J Neurosci Res*, 74, 278-85.
 414. Aubin N, Curet O, Deffois A, Carter C. (1998) Aspirin and salicylate protect against MPTP-induced dopamine depletion in mice. *J Neurochem*, 71, 1635-42.
 415. R. Lucius BL-F. (2008) *Biologie von Parasiten*, 2. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
 416. Hartmann S, Kyewski B, Sonnenburg B, Lucius R. (1997) A filarial cysteine protease inhibitor down-regulates T cell proliferation and enhances interleukin-10 production. *Eur J Immunol*, 27, 2253-60.
 417. R. Lucius, T. Hiepe, B. Gottstein. (2005) *Allgemeine Parasitologie: mit Grundzügen der Immunologie, Diagnostik und Bekämpfung*. Thieme-Verlag, Stuttgart.
 418. Schnoeller C, Rausch S, Pillai S, Avagyan A, Wittig BM, Loddenkemper C, Hamann A, Hamelmann E, Lucius R, Hartmann S. (2008) A helminth immunomodulator reduces allergic and inflammatory responses by induction of IL-10-producing macrophages. *J Immunol*, 180, 4265-72.
 419. Klotz C, Ziegler T, Figueiredo AS, Rausch S, Hepworth MR, Obsivac N, Sers C, Lang R, Hammerstein P, Lucius R, Hartmann S. (2010) A helminth immunomodulator exploits host signaling events to regulate cytokine production in macrophages. *PLoS Pathog*, 7, e1001248.
 420. Schierack P, Lucius R, Sonnenburg B, Schilling K, Hartmann S. (2003) Parasite-specific immunomodulatory functions of filarial cystatin. *Infect Immun*, 71, 2422-9.
 421. Schonemeyer A, Lucius R, Sonnenburg B, Brattig N, Sabat R, Schilling K, Bradley J, Hartmann S. (2001) Modulation of human T cell responses and macrophage functions by onchocystatin, a secreted protein of the filarial nematode *Onchocerca volvulus*. *J Immunol*, 167, 3207-15.
 422. Summers RW, Elliott DE, Urban JF, Jr., Thompson R, Weinstock JV. (2005) *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. *Gut*, 54, 87-90.
 423. Summers RW, Elliott DE, Urban JF, Jr., Thompson RA, Weinstock JV. (2005) *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial. *Gastroenterology*, 128, 825-32.
 424. Weinstock JV, Elliott DE. (2012) Translatability of helminth therapy in inflammatory bowel diseases. *Int J Parasitol*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.016>
 425. Nakamura Y. (2002) Regulating factors for microglial activation. *Biol Pharm Bull*, 25, 945-53.
 426. Grisham MB, Johnson GG, Lancaster JR, Jr. (1996) Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymol*, 268, 237-46.
 427. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*, 4, 357-62.
 428. Saijo K, Glass CK. (2011) Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 11, 775-87.

-
429. Olah M, Biber K, Vinet J, Boddeke HW. (2011) Microglia phenotype diversity. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 10, 108-18.
 430. Perry VH, Cunningham C, Holmes C. (2007) Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nat Rev Immunol*, 7, 161-7.
 431. Perry VH, Cunningham C, Boche D. (2002) Atypical inflammation in the central nervous system in prion disease. *Curr Opin Neurol*, 15, 349-54.
 432. Stadelmann C, Kerschensteiner M, Misgeld T, Bruck W, Hohlfeld R, Lassmann H. (2002) BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprotective interactions between immune and neuronal cells? *Brain*, 125, 75-85.
 433. Palin K, Cunningham C, Forse P, Perry VH, Platt N. (2008) Systemic inflammation switches the inflammatory cytokine profile in CNS Wallerian degeneration. *Neurobiol Dis*, 30, 19-29.
 434. Boven LA, Van Meurs M, Van Zwam M, Wierenga-Wolf A, Hintzen RQ, Boot RG, Aerts JM, Amor S, Nieuwenhuis EE, Laman JD. (2006) Myelin-laden macrophages are anti-inflammatory, consistent with foam cells in multiple sclerosis. *Brain*, 129, 517-26.
 435. Batchelor PE, Porritt MJ, Martinello P, Parish CL, Liberatore GT, Donnan GA, Howells DW. (2002) Macrophages and Microglia Produce Local Trophic Gradients That Stimulate Axonal Sprouting Toward but Not beyond the Wound Edge. *Mol Cell Neurosci*, 21, 436-53.
 436. Smith MP, Cass WA. (2007) GDNF reduces oxidative stress in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 412, 259-63.
 437. Tomac A, Lindqvist E, Lin LF, Ogren SO, Young D, Hoffer BJ, Olson L. (1995) Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature*, 373, 335-9.
 438. Phani S, Loike JD, Przedborski S. (2012) Neurodegeneration and inflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 18 Suppl 1, S207-9.
 439. Wilms H, Sievers J, Rickert U, Rostami-Yazdi M, Mrowietz U, Lucius R. (2010) Dimethylfumarate inhibits microglial and astrocytic inflammation by suppressing the synthesis of nitric oxide, IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 in an in-vitro model of brain inflammation. *J Neuroinflammation*, 7, 30.
 440. Fujita H, Tanaka J, Toku K, Tateishi N, Suzuki Y, Matsuda S, Sakanaka M, Maeda N. (1996) Effects of GM-CSF and ordinary supplements on the ramification of microglia in culture: a morphometrical study. *Glia*, 18, 269-81.
 441. Sievers J, Parwaresch R, Wottge HU. (1994) Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: morphology. *Glia*, 12, 245-58.
 442. Floden AM, Combs CK. (2007) Microglia repetitively isolated from in vitro mixed glial cultures retain their initial phenotype. *J Neurosci Methods*, 164, 218-24.
 443. Nakamura Y, Si QS, Kataoka K. (1999) Lipopolysaccharide-induced microglial activation in culture: temporal profiles of morphological change and release of cytokines and nitric oxide. *Neurosci Res*, 35, 95-100.
 444. Waetzig V, Czeloth K, Hidding U, Mielke K, Kanzow M, Brecht S, Goetz M, Lucius R, Herdegen T, Hanisch UK. (2005) c-Jun N-terminal kinases (JNKs) mediate pro-inflammatory actions of microglia. *Glia*, 50, 235-46.
 445. Du ZY, Li XY. (1998) Cytokine and nitric oxide production by rat microglia stimulated with lipopolysaccharides in vitro. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, 19, 257-60.
 446. Gao HM, Jiang J, Wilson B, Zhang W, Hong JS, Liu B. (2002) Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem*, 81, 1285-97.
 447. Dawson VL, Brahmabhatt HP, Mong JA, Dawson TM. (1994) Expression of inducible nitric oxide synthase causes delayed neurotoxicity in primary mixed neuronal-glia cortical cultures. *Neuropharmacology*, 33, 1425-30.
 448. Brandenburg LO, Kipp M, Lucius R, Pufe T, Wruck CJ. (2010) Sulforaphane suppresses LPS-induced inflammation in primary rat microglia. *Inflamm Res*, 59, 443-50.
 449. Lund S, Christensen KV, Hedtjarn M, Mortensen AL, Hagberg H, Falsig J, Hasseldam H, Schratzenholz A, Porzgen P, Leist M. (2006) The dynamics of the LPS triggered inflammatory response of murine microglia under different culture and in vivo conditions. *J Neuroimmunol*, 180, 71-87.

-
450. Pospel H, Noack H, Putzke J, Wolf G, Sies H. (2000) Selective upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by lipopolysaccharide (LPS) and cytokines in microglia: in vitro and in vivo studies. *Glia*, 32, 51-9.
451. Wang T, Qin L, Liu B, Liu Y, Wilson B, Eling TE, Langenbach R, Taniura S, Hong JS. (2004) Role of reactive oxygen species in LPS-induced production of prostaglandin E2 in microglia. *J Neurochem*, 88, 939-47.
452. Lijia Z, Zhao S, Wang X, Wu C, Yang J. (2012) A self-propelling cycle mediated by reactive oxygen species and nitric oxide exists in LPS-activated microglia. *Neurochem Int.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2012.09.002>
453. Qin L, Liu Y, Wang T, Wei SJ, Block ML, Wilson B, Liu B, Hong JS. (2004) NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia. *J Biol Chem*, 279, 1415-21.
454. Mihm MJ, Schanbacher BL, Wallace BL, Wallace LJ, Uretsky NJ, Bauer JA. (2001) Free 3-nitrotyrosine causes striatal neurodegeneration in vivo. *J Neurosci*, 21, RC149.
455. Pennathur S, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Heinecke JW. (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.
456. Good PF, Hsu A, Werner P, Perl DP, Olanow CW. (1998) Protein nitration in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 57, 338-42.
457. Yu Z, Xu X, Xiang Z, Zhou J, Zhang Z, Hu C, He C. (2010) Nitrated alpha-synuclein induces the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra of rats. *PLoS One*, 5, e9956.
458. Ara J, Przedborski S, Naini AB, Jackson-Lewis V, Trifiletti RR, Horwitz J, Ischiropoulos H. (1998) Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 7659-63.
459. Blanchard-Fillion B, Souza JM, Friel T, Jiang GC, Vrana K, Sharov V, Barron L, Schoneich C, Quijano C, Alvarez B, Radi R, Przedborski S, Fernando GS, Horwitz J, Ischiropoulos H. (2001) Nitration and inactivation of tyrosine hydroxylase by peroxynitrite. *J Biol Chem*, 276, 46017-23.
460. Skulachev VP. (1996) Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Lett*, 397, 7-10.
461. Koppula S, Kumar H, Kim IS, Choi DK. (2012) Reactive oxygen species and inhibitors of inflammatory enzymes, NADPH oxidase, and iNOS in experimental models of Parkinson's disease. *Mediators Inflamm*, 2012, 823-902.
462. Nathan C, Calingasan N, Nezezon J, Ding A, Lucia MS, La Perle K, Fuortes M, Lin M, Ehrt S, Kwon NS, Chen J, Vodovotz Y, Kipiani K, Beal MF. (2005) Protection from Alzheimer's-like disease in the mouse by genetic ablation of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med*, 202, 1163-9.
463. Choi SH, Aid S, Bosetti F. (2009) The distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2 in neuroinflammation: implications for translational research. *Trends Pharmacol Sci*, 30, 174-81.
464. Minghetti L. (2004) Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol*, 63, 901-10.
465. Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem*, 271, 33157-60.
466. Wu L, Wang Q, Liang X, Andreasson K. (2007) Divergent effects of prostaglandin receptor signaling on neuronal survival. *Neurosci Lett*, 421, 253-8.
467. Tzeng SF, Hsiao HY, Mak OT. (2005) Prostaglandins and cyclooxygenases in glial cells during brain inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 4, 335-40.
468. Lima IV, Bastos LF, Limborco-Filho M, Fiebich BL, de Oliveira AC. (2012) Role of prostaglandins in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. *Mediators Inflamm*, 2012, 946-813.
469. Shie FS, Montine KS, Breyer RM, Montine TJ. (2005) Microglial EP2 is critical to neurotoxicity from activated cerebral innate immunity. *Glia*, 52, 70-7.

-
470. Milatovic D, Zaja-Milatovic S, Montine KS, Shie FS, Montine TJ. (2004) Neuronal oxidative damage and dendritic degeneration following activation of CD14-dependent innate immune response in vivo. *J Neuroinflammation*, 1, 20.
471. Montine TJ, Milatovic D, Gupta RC, Valyi-Nagy T, Morrow JD, Breyer RM. (2002) Neuronal oxidative damage from activated innate immunity is EP2 receptor-dependent. *J Neurochem*, 83, 463-70.
472. Liu D, Wu L, Breyer R, Mattson MP, Andreasson K. (2005) Neuroprotection by the PGE2 EP2 receptor in permanent focal cerebral ischemia. *Ann Neurol*, 57, 758-61.
473. McCullough L, Wu L, Haughey N, Liang X, Hand T, Wang Q, Breyer RM, Andreasson K. (2004) Neuroprotective function of the PGE2 EP2 receptor in cerebral ischemia. *J Neurosci*, 24, 257-68.
474. Aid S, Parikh N, Palumbo S, Bosetti F. (2010) Neuronal overexpression of cyclooxygenase-2 does not alter the neuroinflammatory response during brain innate immune activation. *Neurosci Lett*, 478, 113-8.
475. Hoang T, Choi DK, Nagai M, Wu DC, Nagata T, Prou D, Wilson GL, Vila M, Jackson-Lewis V, Dawson VL, Dawson TM, Chesselet MF, Przedborski S. (2009) Neuronal NOS and cyclooxygenase-2 contribute to DNA damage in a mouse model of Parkinson disease. *Free Radic Biol Med*, 47, 1049-56.
476. Li Z, Jansen M, Ogburn K, Salvatierra L, Hunter L, Mathew S, Figueiredo-Pereira ME. (2004) Neurotoxic prostaglandin J2 enhances cyclooxygenase-2 expression in neuronal cells through the p38MAPK pathway: a death wish? *J Neurosci Res*, 78, 824-36.
477. Aid S, Bosetti F. (2011) Targeting cyclooxygenases-1 and -2 in neuroinflammation: Therapeutic implications. *Biochimie*, 93, 46-51.
478. Couch Y, Alvarez-Erviti L, Sibson NR, Wood MJ, Anthony DC. (2011) The acute inflammatory response to intranigral alpha-synuclein differs significantly from intranigral lipopolysaccharide and is exacerbated by peripheral inflammation. *J Neuroinflammation*, 8, 166.
479. Chen H, O'Reilly EJ, Schwarzschild MA, Ascherio A. (2008) Peripheral inflammatory biomarkers and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol*, 167, 90-5.
480. Depino A, Ferrari C, Pott Godoy MC, Tarelli R, Pitossi FJ. (2005) Differential effects of interleukin-1beta on neurotoxicity, cytokine induction and glial reaction in specific brain regions. *J Neuroimmunol*, 168, 96-110.
481. De Lella Ezcurra AL, Chertoff M, Ferrari C, Graciarena M, Pitossi F. (2009) Chronic expression of low levels of tumor necrosis factor-alpha in the substantia nigra elicits progressive neurodegeneration, delayed motor symptoms and microglia/macrophage activation. *Neurobiol Dis*, 37, 630-40.
482. Barcia C, Ros CM, Annese V, Gomez A, Ros-Bernal F, Aguado-Yera D, Martinez-Pagan ME, de Pablos V, Fernandez-Villalba E, Herrero MT. (2011) IFN-gamma signaling, with the synergistic contribution of TNF-alpha, mediates cell specific microglial and astroglial activation in experimental models of Parkinson's disease. *Cell Death Dis*, 2, e142.
483. Ferrari CC, Pott Godoy MC, Tarelli R, Chertoff M, Depino AM, Pitossi FJ. (2006) Progressive neurodegeneration and motor disabilities induced by chronic expression of IL-1beta in the substantia nigra. *Neurobiol Dis*, 24, 183-93.
484. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*, 10, 45-65.
485. Boka G, Anglade P, Wallach D, Javoy-Agid F, Agid Y, Hirsch EC. (1994) Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 172, 151-4.
486. Ferger B, Leng A, Mura A, Hengerer B, Feldon J. (2004) Genetic ablation of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and pharmacological inhibition of TNF-synthesis attenuates MPTP toxicity in mouse striatum. *J Neurochem*, 89, 822-33.
487. Pomerantz JL, Baltimore D. (1999) NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. *Embo J*, 18, 6694-704.
488. Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. (1997) The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell*, 91, 243-52.

-
489. DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. (1997) A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature*, 388, 548-54.
490. Hunot S, Brugg B, Ricard D, Michel PP, Muriel MP, Ruberg M, Faucheux BA, Agid Y, Hirsch EC. (1997) Nuclear translocation of NF- κ B is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 7531-6.
491. Karunakaran S, Ravindranath V. (2009) Activation of p38 MAPK in the substantia nigra leads to nuclear translocation of NF- κ B in MPTP-treated mice: implication in Parkinson's disease. *J Neurochem*, 109, 1791-9.
492. Mogi M, Kondo T, Mizuno Y, Nagatsu T. (2007) p53 protein, interferon-gamma, and NF- κ B levels are elevated in the parkinsonian brain. *Neurosci Lett*, 414, 94-7.
493. Soos J, Engelhardt JI, Siklos L, Havas L, Majtenyi K. (2004) The expression of PARP, NF- κ B and parvalbumin is increased in Parkinson disease. *Neuroreport*, 15, 1715-8.
494. Romero LI, Tatro JB, Field JA, Reichlin S. (1996) Roles of IL-1 and TNF- α in endotoxin-induced activation of nitric oxide synthase in cultured rat brain cells. *Am J Physiol*, 270, R326-32.
495. Liang ZQ, Li YL, Zhao XL, Han R, Wang XX, Wang Y, Chase TN, Bennett MC, Qin ZH. (2007) NF- κ B contributes to 6-hydroxydopamine-induced apoptosis of nigral dopaminergic neurons through p53. *Brain Res*, 1145, 190-203.
496. Panet H, Barzilai A, Daily D, Melamed E, Offen D. (2001) Activation of nuclear transcription factor κ B (NF- κ B) is essential for dopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *J Neurochem*, 77, 391-8.
497. Dutta G, Zhang P, Liu B. (2008) The lipopolysaccharide Parkinson's disease animal model: mechanistic studies and drug discovery. *Fundam Clin Pharmacol*, 22, 453-64.
498. Krady JK, Lin HW, Liberto CM, Basu A, Kremlev SG, Levison SW. (2008) Ciliary neurotrophic factor and interleukin-6 differentially activate microglia. *J Neurosci Res*, 86, 1538-47.
499. Ding M, St Pierre BA, Parkinson JF, Medberry P, Wong JL, Rogers NE, Ignarro LJ, Merrill JE. (1997) Inducible nitric-oxide synthase and nitric oxide production in human fetal astrocytes and microglia. A kinetic analysis. *J Biol Chem*, 272, 11327-35.
500. Chao CC, Hu S, Peterson PK. (1996) Glia: the not so innocent bystanders. *J Neurovirol*, 2, 234-9.
501. Chao CC, Molitor TW, Hu S. (1993) Neuroprotective role of IL-4 against activated microglia. *J Immunol*, 151, 1473-81.
502. Lee JK, Chung J, McAlpine FE, Tansey MG. (2011) Regulator of G-protein signaling-10 negatively regulates NF- κ B in microglia and neuroprotects dopaminergic neurons in hemiparkinsonian rats. *J Neurosci*, 31, 11879-88.
503. Jayasooriya RG, Kang CH, Seo MJ, Choi YH, Jeong YK, Kim GY. (2011) Exopolysaccharide of *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus* downregulates LPS-induced production of NO, PGE(2), and TNF- α in BV2 microglia cells via suppression of the NF- κ B pathway. *Food Chem Toxicol*, 49, 2758-64.
504. Wang YP, Wu Y, Li LY, Zheng J, Liu RG, Zhou JP, Yuan SY, Shang Y, Yao SL. (2011) Aspirin-triggered lipoxin A4 attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses by inhibiting activation of NF- κ B and MAPKs in BV-2 microglial cells. *J Neuroinflammation*, 8, 95.
505. Ghosh A, Roy A, Liu X, Kordower JH, Mufson EJ, Hartley DM, Ghosh S, Mosley RL, Gendelman HE, Pahan K. (2007) Selective inhibition of NF- κ B activation prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 18754-9.
506. Dehmer T, Heneka MT, Sastre M, Dichgans J, Schulz JB. (2004) Protection by pioglitazone in the MPTP model of Parkinson's disease correlates with I κ B α induction and block of NF κ B and iNOS activation. *J Neurochem*, 88, 494-501.
507. Lai AY, Todd KG. (2008) Differential regulation of trophic and proinflammatory microglial effectors is dependent on severity of neuronal injury. *Glia*, 56, 259-70.
508. Saavedra A, Baltazar G, Duarte EP. (2007) Interleukin-1 β mediates GDNF up-regulation upon dopaminergic injury in ventral midbrain cell cultures. *Neurobiol Dis*, 25, 92-104.

-
509. Saavedra A, Baltazar G, Santos P, Carvalho CM, Duarte EP. (2006) Selective injury to dopaminergic neurons up-regulates GDNF in substantia nigra postnatal cell cultures: role of neuron-glia crosstalk. *Neurobiol Dis*, 23, 533-42.
 510. Li XZ, Bai LM, Yang YP, Luo WF, Hu WD, Chen JP, Mao CJ, Liu CF. (2009) Effects of IL-6 secreted from astrocytes on the survival of dopaminergic neurons in lipopolysaccharide-induced inflammation. *Neurosci Res*, 65, 252-8.
 511. Xin J, Wainwright DA, Mesnard NA, Serpe CJ, Sanders VM, Jones KJ. (2011) IL-10 within the CNS is necessary for CD4+ T cells to mediate neuroprotection. *Brain Behav Immun*, 25, 820-9.
 512. Gresa-Arribas N, Vieitez C, Dentesano G, Serratosa J, Saura J, Sola C. (2012) Modelling neuroinflammation in vitro: a tool to test the potential neuroprotective effect of anti-inflammatory agents. *PLoS One*, 7, e45227.
 513. Driessler F, Venstrom K, Sabat R, Asadullah K, Schottelius AJ. (2004) Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF-kappaB activity: a role for p50. *Clin Exp Immunol*, 135, 64-73.
 514. Marques CP, Hu S, Sheng W, Cheeran MC, Cox D, Lokensgard JR. (2004) Interleukin-10 attenuates production of HSV-induced inflammatory mediators by human microglia. *Glia*, 47, 358-66.
 515. Kremlev SG, Palmer C. (2005) Interleukin-10 inhibits endotoxin-induced pro-inflammatory cytokines in microglial cell cultures. *J Neuroimmunol*, 162, 71-80.
 516. Hu S, Chao CC, Ehrlich LC, Sheng WS, Sutton RL, Rockswold GL, Peterson PK. (1999) Inhibition of microglial cell RANTES production by IL-10 and TGF-beta. *J Leukoc Biol*, 65, 815-21.
 517. Boyd ZS, Kriatchko A, Yang J, Agarwal N, Wax MB, Patil RV. (2003) Interleukin-10 receptor signaling through STAT-3 regulates the apoptosis of retinal ganglion cells in response to stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44, 5206-11.
 518. Zhou Z, Peng X, Insolera R, Fink DJ, Mata M. (2009) Interleukin-10 provides direct trophic support to neurons. *J Neurochem*, 110, 1617-27.
 519. Gratchev A, Schledzewski K, Guillot P, Goerdts S. (2001) Alternatively activated antigen-presenting cells: molecular repertoire, immune regulation, and healing. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 14, 272-9.
 520. Wilson MS, Maizels RM. (2004) Regulation of allergy and autoimmunity in helminth infection. *Clin Rev Allergy Immunol*, 26, 35-50.
 521. Wilson MS, Maizels RM. (2006) Regulatory T cells induced by parasites and the modulation of allergic responses. *Chem Immunol Allergy*, 90, 176-95.
 522. Maizels RM, Pearce EJ, Artis D, Yazdanbakhsh M, Wynn TA. (2009) Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. *J Exp Med*, 206, 2059-66.
 523. Rentzos M, Nikolaou C, Andreadou E, Paraskevas GP, Rombos A, Zoga M, Tsoutsou A, Boufidou F, Kapaki E, Vassilopoulos D. (2009) Circulating interleukin-10 and interleukin-12 in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand*, 119, 332-7.
 524. Cadet P, Zhu W, Mantione K, Rymer M, Dardik I, Reisman S, Hagberg S, Stefano GB. (2003) Cyclic exercise induces anti-inflammatory signal molecule increases in the plasma of Parkinson's patients. *Int J Mol Med*, 12, 485-92.
 525. Figueiredo AS, Hofer T, Klotz C, Sers C, Hartmann S, Lucius R, Hammerstein P. (2009) Modelling and simulating interleukin-10 production and regulation by macrophages after stimulation with an immunomodulator of parasitic nematodes. *Febs J*, 276, 3454-69.
 526. Hernandez-Romero MC, Delgado-Cortes MJ, Sarmiento M, de Pablos RM, Espinosa-Oliva AM, Arguelles S, Bandez MJ, Villaran RF, Maurino R, Santiago M, Venero JL, Herrera AJ, Cano J, Machado A. (2012) Peripheral inflammation increases the deleterious effect of CNS inflammation on the nigrostriatal dopaminergic system. *Neurotoxicology*, 33, 347-60.
 527. Purisai MG, McCormack AL, Cumine S, Li J, Isla MZ, Di Monte DA. (2007) Microglial activation as a priming event leading to paraquat-induced dopaminergic cell degeneration. *Neurobiol Dis*, 25, 392-400.
 528. Mangano EN, Hayley S. (2009) Inflammatory priming of the substantia nigra influences the impact of later paraquat exposure: Neuroimmune sensitization of neurodegeneration. *Neurobiol Aging*, 30, 1361-78.

-
529. Mondal S, Roy A, Jana A, Ghosh S, Kordower JH, Pahan K. (2012) Testing NF-kappaB-based therapy in hemiparkinsonian monkeys. *J Neuroimmune Pharmacol*, 7, 544-56.
530. Ledeboer A, Breve JJ, Wierinckx A, van der Jagt S, Bristow AF, Leysen JE, Tilders FJ, Van Dam AM. (2002) Expression and regulation of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells. *Eur J Neurosci*, 16, 1175-85.
531. Ehrlich LC, Hu S, Peterson PK, Chao CC. (1998) IL-10 down-regulates human microglial IL-8 by inhibition of NF-kappaB activation. *Neuroreport*, 9, 1723-6.
532. Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. (1995) Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem*, 270, 9558-63.
533. Bhat NR, Zhang P, Lee JC, Hogan EL. (1998) Extracellular signal-regulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha gene expression in endotoxin-stimulated primary glial cultures. *J Neurosci*, 18, 1633-41.
534. Gomez-Santos C, Ferrer I, Reiriz J, Vinals F, Barrachina M, Ambrosio S. (2002) MPP+ increases alpha-synuclein expression and ERK/MAP-kinase phosphorylation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Brain Res*, 935, 32-9.
535. Miller RL, Sun GY, Sun AY. (2007) Cytotoxicity of paraquat in microglial cells: Involvement of PKCdelta- and ERK1/2-dependent NADPH oxidase. *Brain Res*, 1167, 129-39.
536. Qin H, Roberts KL, Niyongere SA, Cong Y, Elson CO, Benveniste EN. (2007) Molecular mechanism of lipopolysaccharide-induced SOCS-3 gene expression in macrophages and microglia. *J Immunol*, 179, 5966-76.
537. Bode JG, Ehling C, Haussinger D. (2012) The macrophage response towards LPS and its control through the p38(MAPK)-STAT3 axis. *Cell Signal*, 24, 1185-94.
538. Woolson HD, Thomson VS, Rutherford C, Yarwood SJ, Palmer TM. (2009) Selective inhibition of cytokine-activated extracellular signal-regulated kinase by cyclic AMP via Epac1-dependent induction of suppressor of cytokine signalling-3. *Cell Signal*, 21, 1706-15.
539. Staples KJ, Smallie T, Williams LM, Foey A, Burke B, Foxwell BM, Ziegler-Heitbrock L. (2007) IL-10 induces IL-10 in primary human monocyte-derived macrophages via the transcription factor Stat3. *J Immunol*, 178, 4779-85.
540. Correa F, Hernangomez M, Mestre L, Loria F, Spagnolo A, Docagne F, Di Marzo V, Guaza C. (2010) Anandamide enhances IL-10 production in activated microglia by targeting CB(2) receptors: roles of ERK1/2, JNK, and NF-kappaB. *Glia*, 58, 135-47.
541. Correa F, Hernangomez-Herrero M, Mestre L, Loria F, Docagne F, Guaza C. (2011) The endocannabinoid anandamide downregulates IL-23 and IL-12 subunits in a viral model of multiple sclerosis: evidence for a cross-talk between IL-12p70/IL-23 axis and IL-10 in microglial cells. *Brain Behav Immun*, 25, 736-49.
542. Merighi S, Gessi S, Varani K, Simioni C, Fazzi D, Mirandola P, Borea PA. (2011) Cannabinoid CB(2) receptors modulate ERK-1/2 kinase signalling and NO release in microglial cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol*, 165, 1773-88.
543. Dagda RK, Zhu J, Chu CT. (2009) Mitochondrial kinases in Parkinson's disease: converging insights from neurotoxin and genetic models. *Mitochondrion*, 9, 289-98.
544. Lucas M, Zhang X, Prasanna V, Mosser DM. (2005) ERK activation following macrophage Fc gamma R ligation leads to chromatin modifications at the IL-10 locus. *J Immunol*, 175, 469-77.
545. Zhang X, Edwards JP, Mosser DM. (2006) Dynamic and transient remodeling of the macrophage IL-10 promoter during transcription. *J Immunol*, 177, 1282-8.
546. Schmid CD, Melchior B, Masek K, Puntambekar SS, Danielson PE, Lo DD, Sutcliffe JG, Carson MJ. (2009) Differential gene expression in LPS/IFN gamma activated microglia and macrophages: in vitro versus in vivo. *J Neurochem*, 109 Suppl 1, 117-25.
547. Horvath RJ, Nutile-McMenemy N, Alkaitis MS, Deleo JA. (2008) Differential migration, LPS-induced cytokine, chemokine, and NO expression in immortalized BV-2 and HAPI cell lines and primary microglial cultures. *J Neurochem*, 107, 557-69.
548. Nagler-Anderson C. (2006) Helminth-induced immunoregulation of an allergic response to food. *Chem Immunol Allergy*, 90, 1-13.

-
549. McKee AS, Pearce EJ. (2004) CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. *J Immunol*, 173, 1224-31.
 550. Maizels RM. (2005) Infections and allergy - helminths, hygiene and host immune regulation. *Curr Opin Immunol*, 17, 656-61.
 551. Hutter-Saunders JA, Mosley RL, Gendelman HE. (2011) Pathways towards an effective immunotherapy for Parkinson's disease. *Expert Rev Neurother*, 11, 1703-15.
 552. Laurie C, Reynolds A, Coskun O, Bowman E, Gendelman HE, Mosley RL. (2007) CD4+ T cells from Copolymer-1 immunized mice protect dopaminergic neurons in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *J Neuroimmunol*, 183, 60-8.
 553. Kuijk LM, Klaver EJ, Kooij G, van der Pol SM, Heijnen P, Bruijns SC, Kringel H, Pinelli E, Kraal G, de Vries HE, Dijkstra CD, Bouma G, van Die I. (2012) Soluble helminth products suppress clinical signs in murine experimental autoimmune encephalomyelitis and differentially modulate human dendritic cell activation. *Mol Immunol*, 51, 210-8.
 554. Benzel F, Erdur H, Kohler S, Frentsch M, Thiel A, Harms L, Wandinger KP, Rosche B. (2012) Immune monitoring of *Trichuris suis* egg therapy in multiple sclerosis patients. *J Helminthol*, 86, 339-47.
 555. Fleming JO, Isaak A, Lee JE, Luzzio CC, Carrithers MD, Cook TD, Field AS, Boland J, Fabry Z. (2011) Probiotic helminth administration in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 1 study. *Mult Scler*, 17, 743-54.

8 Danksagungen

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ralph Lucius richten. Die Auswahl des Themas und die interessanten Diskussionen über immunologische Reaktionen bei Parasiten und Mikroglia haben mir viel Freude bereitet. Auch über die kritische Auseinandersetzung mit wissenschaftlichen Publikationen und den eigenen Ergebnissen habe ich viel gelernt und möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich für die hervorragende Betreuung bedanken.

Für die Bereitstellung des Promotionsplatzes und die Durchführung der Experimente am Anatomischen Institut zu Kiel sowie die freundliche Betreuung gilt ein großer Dank an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. med. Jobst Sievers.

Für die freundliche Bereitstellung des in dieser Arbeit verwandten Immunmodulators danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Richard Lucius und seiner Arbeitsgruppe an der Humboldt Universität zu Berlin (Institut für Biologie).

Ein großer Dank gilt auch Frau Dr. rer. nat. Uta Rickert für ihre hervorragende Betreuung bei der Ausarbeitung der Doktorarbeit.

Bei meiner Arbeitsgruppe bedanke ich mich sehr für die freundliche Aufnahme, Betreuung und Motivation im Labor. Speziell erwähnen möchte ich hierzu Frau Rosemarie Sprang, Monika Grell, Regine Worm, Herrn Günther Schäfer und Frau Dr. Jessica Spreu. Dr. med. dent. Falk Birkenfeld möchte ich für zahlreiche kleine Ratschläge im Rahmen meiner Promotionsarbeit danken.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Clemens Franke für die Hilfestellung bei der Anfertigung des Schaubildes in dieser Arbeit.

Zuletzt danke ich sehr meiner Familie, meiner Freundin und meinen Freunden für den optimalen Rückhalt und ihre Unterstützung während meines Studiums und der Ausarbeitung dieser Arbeit.

9 Curriculum vitae

Persönliche Daten

| | |
|---------------------|----------------|
| Name | Peter Behrendt |
| Geburtsdatum | 01.12.1986 |
| Geburtsort | Kiel |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |
| Familienstand | ledig |

Schulausbildung

| | |
|-------------------|---|
| 09/1993 - 08/1997 | Grundschule Laboe |
| 09/1997 - 06/2006 | Heinrich-Heine-Gymnasium Heikendorf Abitur 06/2006 |

Zivildienst

| | |
|-------------------|-----------------------------------|
| 07/2006 - 03/2007 | St. Elisabeth Krankenhaus zu Kiel |
|-------------------|-----------------------------------|

Hochschulstudium

| | |
|------------|---|
| WS 07/08 | Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität (CAU) zu Kiel |
| 08/2009 | Erster Teil der Ärztlichen Prüfung |
| Ab 02/2013 | Praktisches Jahr an der: Klinik für Chirurgie am Taranaki Base Hospital (New Plymouth, NZ) Klinik für Chirurgie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel Klinik für Innere Medizin am Friedrich-Ebert-Krankenhaus (Neumünster) Klinik für Anästhesiologie am Universitätsklinikum Schleswig- Holstein (UKSH), Campus Kiel |

Promotion

| | |
|---------|--|
| 10/2009 | Aufnahme der Doktorarbeit am Anatomischen Institut der CAU zu Kiel, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Lucius |
|---------|--|