

Morbus Parkinson:
Untersuchungen zum Aggregationsverhalten von
 α -Synuklein und zur Inhibition Mikroglia-
vermittelter Neuroinflammation



DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

eingereicht von

May Bungeroth

Kiel

2016

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Roeder

2. Gutachter: Prof. Dr. Ralph Lucius

Tag der mündlichen Prüfung: 14.04.2016

Akzeptiert zur Publikation am: 14.04.2016

gez. Prof. Dr. Wolfgang Duschl, Dekan

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die Parkinson-Erkrankung	1
1.1.1 Morbus Parkinson.....	1
1.1.2 Neuropathologische und neurophysiologische Charakteristika.....	3
1.1.3 Oxidativer und nitrosativer Stress.....	3
1.1.4 Protein-Qualitätskontrolle in eukaryotischen Zellen	4
1.1.5 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS).....	5
1.1.6 Autophagie und lysosomaler Proteinabbau.....	6
1.1.7 Proteinaggregation und proteasomale Fehlfunktion.....	6
1.2 α-Synuklein	7
1.2.1 Die Isoformen des α -Synukleins.....	9
1.3 Proneuroinflammatorische, residente Zellen des ZNS	10
1.3.1 Der Zusammenhang zwischen α -Synuklein und Mikroglia in der Parkinson-Erkrankung ..	10
1.3.2 Inflammatorische Botenstoffe - Zytokine und Chemokine	11
1.4 α-Synuklein und <i>Toll-like</i> Rezeptoren	12
1.4.1 Die Immunantwort im zentralen Nervensystem.....	13
1.4.2 Mustererkennende Rezeptoren (PRRs).....	13
1.4.3 <i>Toll-like</i> Rezeptoren (TLR)	14
1.4.4 Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (PAMPs)	15
1.4.5 Lipopolysaccharide (LPS).....	15
1.4.6 Peptidoglykan (PGN).....	16
1.4.7 Polyinosinic-polycytidylic acid (Poly(I:C))	16
1.5 Auswahl der Kandidatenstoffe	16
1.5.1 Coumestrol	17
1.5.2 Curcumin	17
1.5.3 Sulforaphan	18
1.6 Transkriptionsfaktoren	18
1.6.1 Der nukleäre Faktor kappa B (NF- κ B).....	19

2	ZIELSETZUNG	20
3	MATERIAL	22
3.1	Geräte	22
3.2	Chemikalien und Reagenzien	22
3.3	Kits	23
3.4	Enzyme	24
3.5	Puffer, Medien und Stammlösungen	24
3.5.1	Medien, Serum und Lösungen für die Zellkultur	24
3.5.2	Puffer und Stammlösungen	24
3.6	Bakterienstämme	25
3.7	Oligonukleotide	25
3.8	Antikörper	26
3.9	Software	27
3.10	Vektoren	27
4	METHODEN	28
4.1	Zellkultur	28
4.1.1	Mikrogliazellen (N11-Zellen)	28
4.1.2	HEK293T	28
4.1.3	Aggregation von α -Synuklein	28
4.1.4	Endotoxintest des rekombinanten α -Synukleins	29
4.1.5	LPS-, PGN-, Poly(I:C)-Stimulation	29
4.1.6	Coumestrol-, Curcumin- und Sulforaphan-Behandlung	30
4.1.7	Bestimmung der Lactatdehydrogenaseaktivität (LDH)	30
4.2	Molekularbiologische Methoden	31
4.2.1	Die Gateway® Technology	31
4.2.2	Klonierung	31
4.2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	32
4.2.4	Gelelution und PCR-Aufreinigung	33
4.2.5	Restriktionsverdau	33
4.2.6	DNA-Sequenzierung	34
4.2.7	Isolation von RNA	34

Inhaltsverzeichnis	III
4.2.8 Reverse Transkription	35
4.2.9 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)	35
4.2.10 Spezifität der Oligonukleotide	36
4.2.11 Eignung der ausgewählten Referenzgene	36
4.3 Immunzytochemische Methoden	36
4.3.1 Immunfluoreszenzanalyse	37
4.3.2 Durchflusszytometrische Analysen	37
4.4 Mikrobiologische Methoden	38
4.4.1 Allgemeine Bemerkungen zur Bakterienkultur	38
4.4.2 Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	38
4.4.3 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	38
4.4.4 Plasmid-Isolierung aus <i>Escherichia coli</i>	39
4.4.5 Herstellung von SNCA140, SNCA126 und SNCA98	39
4.5 Transfektionen der eukaryotischen Zellen	40
4.5.1 Transiente Transfektion HEK293T-Zellen	40
4.6 Statistische Methoden	40
5 ERGEBNISSE	41
5.1 Unterschiedliche Aggregationseigenschaften der verschiedenen α-Synuklein Isoformen	41
5.1.1 Die α -Synuklein Fusionskonstrukte	41
5.1.2 α -Synuklein bildet Aggregate und Aggresome in HEK293T-Zellen	42
5.1.3 Unterschiedliche Aggregationseigenschaften der α -Synuklein Isoformen	43
5.1.4 Unterschiede in der Fibrillformation der α -Synuklein Isoformen	45
5.1.5 Expression von SNCA-Isoformen in verschiedenen Bereichen des Gehirns	47
5.2 Die Wirkung von 3 Naturstoffen auf die Parkinson-assoziierte Neuroinflammation	47
5.2.1 Keine erhöhte LDH-Aktivität durch die Stimulanzien und Naturstoffe	48
5.3 Naturstoffe reduzieren die Expression proinflammatorischer Moleküle	49
5.3.1 Konzentrations-abhängige Hemmung der TNF- α -Expression durch die 3 Naturstoffe	50
5.3.2 Effekte der Naturstoffe auf TLR-Expressionprofile	52
5.3.3 Hemmung der PGN-vermittelten TLR2-Expression	52
5.3.4 Hemmung der Poly(I:C)-vermittelten TLR3-Expression	53
5.3.5 Hemmung der LPS-vermittelten TLR4-Expression	54
5.4 Hemmung der LPS-, PGN- und Poly(I:C)-vermittelten iNOS-Expression	55
5.4.1 Hemmung der iNOS-Expression durch die 3 Naturstoffe	55
5.5 Verminderte nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors NF-κB	58

Inhaltsverzeichnis	IV
5.6 Synthese von oligomerem α-Synuklein	63
5.6.1 Anreicherung von oligomerem α -Synuklein	63
5.6.2 Keine <i>in vitro</i> Inflammation durch α -Synuklein Oligomere	64
6 DISKUSSION	66
6.1 Unterschiedliche α-Synuklein Isoformen zeigen unterschiedliche Aggregationseigenschaften	67
6.2 Synthese von α-Synuklein Aggregaten	69
6.3 Naturstoffe reduzieren die Expression proinflammatorischer Moleküle	70
6.3.1 TNF-a	70
6.3.2 Effekt der Naturstoffe auf die Expression verschiedener TLR	71
6.3.3 iNOS	72
6.4 NF-κB	72
6.5 Therapeutische Verwendung der untersuchten Naturstoffe	73
6.5.1 Sulforaphan	73
6.5.2 Curcumin	74
6.5.3 Coumestrol	75
6.6 Reflektion und Ausblick	75
7 ZUSAMMENFASSUNG	77
8 SUMMARY	79
9 DANKSAGUNG	81
10 LEBENS LAUF	82
11 PUBLIKATIONS LISTE	83
12 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	84
13 LITERATURVERZEICHNIS	85

Abkürzungsverzeichnis

Neben den Standardeinheiten des *Système international d'unités* (SI), Symbolen chemischer Elemente und dem ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren wurden in dieser Arbeit folgende Abkürzungen verwendet:

Abb.	Abbildung
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i> (dt. amyloides Vorläuferprotein)
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bsw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CO ₂	Kohlendioxid
CMA	Chaperone-mediated autophagy (dt. Chaperon-vermittelte Autophagie)
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dbSNP	öffentliche SNP Datenbank
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (dt. enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
FCS	Fetales Kälberserum
FSC	<i>Forward-Scatter</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPx	Glutathion-Peroxidasen
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEK293	<i>human embryonic kidney cell line 293</i> (dt. humane embryonale Nierenzelllinie 293)
HO [·]	Hydroxyl-Radikal

Hsp	Hitzeschockprotein
Hz	Hertz
IκB	Inhibitorisches kappa B
IL	Interleukin
INF	Interferon
iNOS	induzierbare NO-Synthetase (NOS II)
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
kDa	Kilodalton
LBP	LPS-bindendes Protein
LDH	L-Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	<i>leucine-rich region</i> (dt. Leucin-reiche Region)
M	Molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mM	Millimolar
mm	Millimeter
ml	Milliliter
min	Minute(n)
Mio.	Million
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar
NAC	<i>non-amyloid-β component</i>
NF-κB	nukleäre Faktor kappa B
NO	Stickstoffoxid
ng	Nanogramm
O ₂ ⁻	Superoxid-Radikal
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i> (dt. Pathogen-assoziierte molekulare Struktur)
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (dt. phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (dt. Polymerase-Kettenreaktion)
PD	Parkinson's Disease (dt. Parkinson-Krankheit)
PGN	Peptidoglykan
Poly(I:C)	Polyinosinic:polycytidylic acid

PRR	<i>pattern recognition receptor</i> (dt. Mustererkennende Rezeptoren)
RNS	<i>reactive nitrogen species</i> (dt. Reaktive Stickstoffspezies)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (dt. Reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Raumtemperatur
rpm	Rotationen pro Minute
S-SCAM	<i>synaptic scaffolding molecule</i>
SCC	<i>Side-Scatter</i>
SN	<i>Substantia nigra</i>
SOD	Superoxid-Dismutasen
sog.	sogenannte
Tab.	Tabelle
TIR	Toll/IL-1R
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
u.a.	unter anderem
UCH	Ubiquitin-C-terminale Hydroxylase
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Die Parkinson-Erkrankung

1.1.1 Morbus Parkinson

Die Parkinson-Krankheit ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung und die häufigste hypokinetische motorische Störung weltweit (Hughes *et al.* 1992). Der Morbus Parkinson wurde nach dem englischen Arzt James Parkinson (1755-1824) benannt, der 1817 in seiner Monographie „*Essay on the Shaking Palsy*“ (Abhandlung über die Schüttellähmung) erstmals die Erkrankung beschrieb. Die langsame Entwicklung des Krankheitsbildes und unspezifische Frühsymptome machen eine Frühdiagnose schwierig.



Abb. 1: Illustration des Habitus eines Parkinson-Patienten nach (Gowers 1896).

Eine relativ zuverlässige klinische Diagnose kann nach den *UK Brainbank Criteria* gestellt werden, wenn verlangsamte Bewegungen bis hin zur Bewegungslosigkeit (Bradykinese bzw. Akinese) und mindestens ein weiteres der folgenden Symptome vorliegt: Muskelsteife (Rigor), ein Ruhetremor mit einer Frequenz von 4-6 Hz oder eine Haltungsinstabilität (Hughes *et al.* 1992, Fahn 2003) (vgl. Abb. 1).

Das Muskelzittern (Tremor) ist zwar ein Kernsymptom, aber nicht bei allen Patienten zu finden. Hinzu kommen oft eine Reihe vegetativer und psychischer Symptome. Über 40 % der Patienten leiden unter Depressionen und Darmträgheit.

Bei mehr als 85 % der Parkinson-Patienten tritt die Krankheit sporadisch auf und die Ursache der Krankheit ist zurzeit noch nicht vollständig bekannt. In diesen Fällen wird jedoch eine genetische Komplexität durch das Zusammenspiel mehrerer Gene und Umweltfaktoren vermutet. Bei weniger als 15 % der Patienten ist die Erkrankung monogenen Ursprungs, d.h. durch eine Veränderung in einem Gen bedingt und wird nach den Mendel'schen Vererbungsregeln zumeist autosomal dominant oder autosomal rezessiv vererbt (Bekris *et al.* 2010). Überwiegend tritt die Parkinson-Krankheit im höheren Lebensalter auf. Das Manifestationsalter der Erkrankung liegt in der Regel zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr, wobei 1,4 % der 55 Jährigen und 3,4 % der 75 Jahre alten Bevölkerung betroffen sind (de Rijk *et al.* 1997).

In der Pathogenese der Parkinson-Krankheit spielen unterschiedliche Mechanismen eine wichtige Rolle, zu denen eine Störung des zellulären Energiehaushaltes (mitochondriale Dysfunktion) und eine Störung des Proteinabbaus (lysosomale und proteasomale Dysfunktion) zählen. Eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Parkinson-Krankheit nimmt das Protein α -Synuklein ein, das an vielen intrazellulären Funktionen, bzw. deren Störung bei der Parkinson-Krankheit beteiligt ist (Lashuel *et al.* 2013). Durch aggregiertes α -Synuklein werden eine Reihe wichtiger zellulärer Prozesse inhibiert. Die Störung dieser Prozesse führt nun ihrerseits zu einer verstärkten Aggregation von α -Synuklein. Die Proteinefehlfaltung, die Aggregation und die Akkumulation aggregierten α -Synukleins ist ein Hauptmerkmal der Parkinson-Krankheit. Im Verlauf der Krankheit kommt es zu einer Entzündungsreaktion im Gehirn (Neuroinflammation), an der vor allem Mikrogliazellen beteiligt sind. Die genauen Auslöser der Neuroinflammation sind nicht bekannt. Man weiß aber, dass aggregiertes α -Synuklein und Neuromelanin in der Lage sind Mikroglia zu aktivieren (Wilms *et al.* 2009). Im Zuge der Neuroinflammation kommt es zu einer Änderung der Expression von *Toll-like* Rezeptoren (TLR) auf den Mikrogliazellen (Beraud und Maguire-Zeiss 2012).

Zusammenfassend gesagt, spielt bei Morbus Parkinson sowohl die Aggregation von Proteinen, vornehmlich α -Synuklein als auch eine im Verlauf auftretende

Neuroinflammation mit Mikrogliaaktivierung im Gehirn von Parkinson-Patienten eine Rolle in der Pathogenese der Krankheit.

1.1.2 Neuropathologische und neurophysiologische Charakteristika

Pathophysiologisch ist die Parkinson-Erkrankung durch einen zunächst weitgehend selektiven Verlust dopaminerger Neurone in der *Substantia nigra* (SN) gekennzeichnet (Forno 1996). Später sind auch andere Hirnareale von der Krankheit betroffen. Der Verlust dopaminerger Neurone bedingt eine reduzierte Dopaminkonzentration an den striatalen Dopaminrezeptoren. Erst wenn ungefähr 60 – 70 % aller dopaminergen Zellen in der SN zugrunde gegangen sind, treten klinische Symptome der Parkinson-Erkrankung auf. Der striatale Dopamingehalt ist zu diesem Zeitpunkt bereits um nahezu 80 % reduziert (Becker *et al.* 2002). Pathognomonisch für die Parkinson-Krankheit sind in den noch lebenden Nervenzellen auftretende zytoplasmatischen Einschlüsse, die so genannten Lewy-Körperchen (Duffy und Tennyson 1965). Diese sind lichtmikroskopisch durch einen eosinophilen Kern und einen blassen Hof („Halo“) gekennzeichnet und bestehen aus verschiedenen Proteinen, unter denen α -Synuklein, Ubiquitin, Neurofilamente und Hitzeschockproteine in besonders hoher Konzentration vorhanden sind (Spillantini *et al.* 1997).

1.1.3 Oxidativer und nitrosativer Stress

Sauerstoff ist für das menschliche Leben und das Leben aller aeroben Organismen unabdingbar. Nahezu der gesamte molekulare Sauerstoff wird in der Atmungskette in den Mitochondrien in Energie umgewandelt (DiMauro und Schon 2003). Hierbei entstehen auch reaktive Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) als Nebenprodukt. Reaktive Sauerstoffspezies sind toxische Formen des Sauerstoffs, zu denen das Superoxid-Radikal ($O_2^{\cdot-}$), das hochreaktive Hydroxyl-Radikal (HO^{\cdot}) und stabilere Oxidantien wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gehören. Unter oxidativem Stress versteht man ein Ungleichgewicht zwischen der Bildung und Abbau von ROS. Durch dieses Ungleichgewicht kommt es zur Oxidation von Lipiden und Proteinen, sowie zur Degradation der DNA (Trachootham *et al.* 2008). Der gesunde Körper verfügt über anti-oxidative Systeme, wie Glutathion-Peroxidasen (GPx) und Superoxid-Dismutasen (SOD). Diese bilden ein anti-oxidatives System zum Abbau von ROS und reduzieren so die oxidative Modifizierung von Biomolekülen (Dringen 2000).

Der nitrosative Stress ist eine Sonderform des oxidativen Stresses und beschreibt die Umwandlung von Stickstoffverbindungen und reaktiven Sauerstoff-Verbindungen zu reaktiven Stickstoff-Sauerstoff-Verbindungen (Reaktive Stickstoffspezies, engl. *reactive nitrogen species*, RNS). Zu den reaktiven Stickstoffspezies gehört das freie Radikal Stickstoffmonoxid (NO), aber vor allem sein Folgeprodukt Peroxinitrit. Peroxinitrit entsteht durch die Reaktion von Superoxid (O_2^-) und Stickstoffmonoxid und ist aufgrund seines hohen Redoxpotentials wesentlich aggressiver als seine Vorläufermoleküle. So wie ROS können auch RNS-Proteine modifizieren, die mitochondriale Atmungskette hemmen und die DNA beschädigen (Gille und Sigler 1995, Halliwell 2007).

Erhöhter oxidativer Stress spielt eine Rolle in der Pathogenese verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen, besonders aber beim Morbus Parkinson. Die Expression von Glutathion-Peroxidasen ist in der SN von Parkinson-Patienten reduziert und es konnte eine vermehrte oxidative Modifizierung von Lipiden und Proteinen gezeigt werden (Sian *et al.* 1994, Pearce *et al.* 1997). Im Gehirn von Parkinson-Patienten kommt es zu einer Immunreaktion mit Aktivierung von Mikrogliazellen. Mikrogliazellen sind Teil des angeborenen Immunsystems im zentralen Nervensystem (ZNS), deren Aktivierung zur Überexpression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) führt. Die Aktivität der iNOS führt zur Oxidation von L-Arginin an einem Stickstoff-Atom, wodurch große Mengen an Stickstoffmonoxid synthetisiert (Wiesinger 2001). Neben der induzierbaren NOS in Mikrogliazellen sind weitere Isoformen dieses Enzyms bekannt. Diese sind an der Innenseite von Endothelzellen lokalisiert (eNOS) oder wirken in den Neuronen im ZNS (nNOS). Alle drei Isoformen sind im Körper ständig vorhanden. iNOS wird jedoch bei Entzündungsreaktionen extrem hoch exprimiert und ist an der unspezifischen, angeborenen Abwehrreaktion beteiligt. Die Expression der iNOS wird unter anderem durch bakterielle Produkte (LPS) (Arizono *et al.* 1995), sowie durch die proinflammatorischen Zytokine (TNF- α , INF- γ , IL-1 β) induziert. Die Aktivität der iNOS wird außerdem vom Substratangebot (L-Arginin) bestimmt (Marletta *et al.* 1998).

1.1.4 Protein-Qualitätskontrolle in eukaryotischen Zellen

Im Folgenden wird die Bedeutung der Protein-Qualitätskontrolle für die Pathogenese der Parkinson-Krankheit beschrieben. Die Protein-Qualitätskontrolle ist ein zellulärer Schutzmechanismus eukaryotischer Zellen. Proteine bestehen aus linearen

Polypeptidketten von Aminosäuren. Die zelluläre Funktion von Proteinen wird wesentlich durch deren Sekundär- und Tertiärstruktur definiert, welche wiederum durch Faltung der linearen Polypeptidketten zu dreidimensionalen Strukturen entsteht. Die Proteinfaltung ist ein komplexer Vorgang, der in hohem Maße anfällig für Fehler ist und zur Bildung von falsch gefalteten Proteinen führen kann. Zytoplasmatisches α -Synuklein weist teilweise keine streng definierte Faltung auf und wird deswegen als "nativ ungefaltetes Protein" bezeichnet. Durch die Oligomerisierung mehrerer α -Synuklein Moleküle entstehen oligomere dysfunktionale Proteinkomplexe (Breydo *et al.* 2012). Die Oligomere sind Zwischenprodukte und können anschließend zu Fibrillen heranwachsen (Rochet und Lansbury 2000). Nativ ungefaltete Proteine sind aus Gründen, die in Absatz 1.2 besprochen werden, besonders zur Aggregation prädisponiert. Ursachen der Aggregation von Proteinen sind z.B. eine veränderte Primärstruktur, aber auch oxidativer und nitrosativer Stress (Jahn und Radford 2008). Veränderungen der Primärstruktur werden durch Mutationen, RNA-Modifikationen oder translationale Fehler ausgelöst (Kopito 2000). Auf fehlgefaltete Proteine reagiert die Zelle mit Aktivierung des Protein-Qualitätskontrollsystems. Das Protein-Qualitätskontrollsystem kann richtig gefaltete von falsch gefalteten Proteinen unterscheiden und letztere abbauen (Jahn und Radford 2008). Zum Protein-Qualitätskontrollsystem gehören verschiedene Gruppen von Proteinen, wie z.B. die der Gruppe der Chaperone zu denen auch Mitglieder der Hitzeschockproteinfamilie (Hsp70/Hsp60) gehören. Falsch gefaltete Proteine können über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) oder durch lysosomalen Abbau abgebaut werden, der letztlich auch die Endstrecke der Autophagie darstellt, mit deren Hilfe auch größere Proteinaggregate abgebaut werden können.

1.1.5 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Im Rahmen des Abbaus fehlgefalteter Proteine durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) wird das falsch gefaltete Protein ubiquitinyliert und dann vom Proteasom gebunden. Die Ubiquitinylierung ist essentiell für die proteosomale Degradation und wird durch drei unterschiedliche Enzyme vermittelt: das ubiquitinaktivierende Enzym (E1), das ubiquitinkonjugierende Enzym (E2) und die Ubiquitin-Protein-Ligase (E3). Ubiquitin-Monomere werden von E1 in einer ATP-abhängigen Reaktion aktiviert und auf E2 überführt. Zuletzt wird das aktivierte Ubiquitin durch die E3-Ligase auf das Zielprotein übertragen (Pickart und Eddins 2004).

So können native Proteine von fehlgefalteten Proteinen über die Ubiquitylierung unterschieden werden. Das Proteasom bindet ubiquitylierte Proteine und degradiert diese durch ATP-abhängige Proteolyse. Die Ubiquitinmoleküle werden dabei recycelt und in weiteren Abbauprozessen wieder verwendet. Eine Störung in diesem System führt durch Proteinanhäufungen in der Zelle zum Zelltod (McNaught *et al.* 2003). Bei der Parkinson-Erkrankung führt eine Hemmung des UPS zu einer Anhäufung von falsch gefaltetem α -Synuklein und Ubiquitin-haltigen Einschlusskörperchen, sowie zum Verlust dopaminerger Neurone (Rideout *et al.* 2004). Störungen des UPS fördern die Entstehung von α -Synuklein Aggregaten, die bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen (Recchia *et al.* 2004).

1.1.6 Autophagie und lysosomaler Proteinabbau

Autophagie wurde zuerst von Christian De Duve 1963 als zellulärer Prozess beschrieben, in dem ein Vesikel mit einer Doppelmembran, das Autophagosom, zytoplasmatische Bestandteile zum Abbau und zum Recyceln zu den Lysosomen liefert (De Duve 1963). Die Autophagie lässt sich in drei Hauptprozesse einteilen: in die Makroautophagie, die Mikroautophagie und die Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA).

Makroautophagie ist der Hauptabbauweg von großen Proteinaggregaten und beschädigten Organellen. Hierrüber werden auch α -Synuklein Aggregate abgebaut (Banerjee *et al.* 2010). Mikroautophagie beinhaltet die Pinozytose kleinster Flüssigkeitsmengen und der darin gelösten Substanzen. Bei der Chaperon-vermittelten Autophagie bindet ein Chaperon-Protein spezifisch abzubauende Proteine und begünstigt deren Translokation durch die Membranen der Lysosomen. Über diesen Abbauweg werden die meisten α -Synuklein Monomere abgebaut (Vogiatzi *et al.* 2008).

1.1.7 Proteinaggregation und proteasomale Fehlfunktion

Das Auftreten von Proteinaggregaten und somit eine Störung der Protein-Homöostase ist charakteristisch für die Parkinson-Erkrankung. Toxisch sind wahrscheinlich nicht die Endprodukte des Aggregationsprozesses, sondern oligomere Intermediate, die als Vorstufen der sogenannten reifen Aggregate auftreten und mit diesen und mit den α -Synuklein in einem dynamischen Gleichgewicht stehen (Rochet und Lansbury 2000). Bei der Parkinson-Erkrankung stellen die reifen α -Synuklein Aggregate einen Hauptbestandteil der zytosolischen

Lewy-Körperchen dar. Eine große Anzahl der in Lewy-Körperchen aggregierten Proteine sind oxidativ oder nitrosativ modifiziert (Schulz-Schaeffer 2010). Der Abbau von intrazellulären Proteinen durch das UPS und das Lysosom ist ein komplexer und streng regulierter Prozess, der essentiell für die Zelle ist. Durch Hemmung der Ubiquitin-C-terminalen Hydroxylase (UCH) konnte experimentell die Bildung von Lewy-Körperchen induziert werden (McNaught und Olanow 2006).

1.2 α -Synuklein

α -Synuklein gehört zur Familie der Synukleine, welche beim Menschen die drei Isoformen α -, β - und γ -Synuklein umfasst. Die Namensgebung erfolgte aufgrund der Lokalisation in der Nähe der Synapsen und des Nucleus von Neuronen (Maroteaux *et al.* 1988), doch zeigte es sich später, dass α -Synuklein in Neuronen physiologischerweise im Wesentlichen im präsynaptischen Terminus zu finden ist (Jakes *et al.* 1994). Die humane Form des α -Synukleins wird durch das SNCA Gen kodiert, welches auf Chromosom 4q21 lokalisiert ist. Es besteht aus sieben Exons, wovon fünf translatiert werden (Spillantini *et al.* 1995, Davidson *et al.* 1998, Mizuno *et al.* 2001). Die kanonische Isoform des Proteins besteht aus 140 Aminosäuren und besitzt eine Molekülmasse von ungefähr 14 kDa (George 2002). Die Aminosäuresequenz lässt sich in drei unterschiedliche Abschnitte einteilen. Der amphipathische N-Terminus des α -Synukleins reicht von Aminosäure 7 bis 87. Er enthält sieben nicht vollständig identische Wiederholungen eines aus elf Aminosäureresten bestehenden Motivs mit der Sequenz **XKTKEGVXXXX** (Bisaglia *et al.* 2009). Diese Sequenz bildet, vor allem bei der Bindung an Membranen, eine alpha-Helix Struktur (Clayton und George 1998). Der Mittelteil des α -Synukleins ist durch hydrophobe Seitenketten der Aminosäuren gekennzeichnet und beinhaltet die *non-amyloid- β component* (NAC) Domäne (Position 61-95), sowie innerhalb der NAC Domäne das sogenannte GAV-Motiv (Position 68-76). Die NAC-Domäne und insbesondere das GAV-Motiv sind für die Aggregation und Bildung von Protofibrillen des α -Synukleins essentiell (el-Agnaf und Irvine 2002, Du *et al.* 2003). Die Protofibrillen, welche eine β -Faltblattstruktur ausbilden, sind zunächst noch wasserlöslich. Im weiteren Verlauf entstehen reife α -Synuklein Fibrillen. Diese sind wasserunlöslich und resistent gegen proteasomale Degradation (Goedert *et al.* 1998, Serpell *et al.* 2000, Conway *et al.* 2001). Die reifen α -Synuklein Fibrillen weisen wesentliche Merkmale einer pathologischen Proteinstruktur, des sogenannten Amyloids, auf. Kernmerkmal des Amyloids sind antiparallele, vielfach wiederholte

β -Faltblattstrukturen. Nicht nur beim α -Synuklein, sondern auch bei zahlreichen anderen Proteinen kann eine amyloidogene Fehlfaltung pathogen wirken. Hierzu gehört im Bereich der neurodegenerativen Krankheiten das Amyloid *Precursor* Protein (APP), welches bei der Entstehung der Alzheimer-Krankheit eine wichtige Rolle spielt. Der dritte Bereich des α -Synukleins ist ein stark negativ geladener C-Terminus, welcher hauptsächlich aus den sauren Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure besteht. Die C-terminale Region des Proteins definiert dabei die Löslichkeit und weist einige Phosphorylierungsstellen auf (George 2002, Recchia *et al.* 2004, Bisaglia *et al.* 2009). Deletion des C-terminalen Bereichs von α -Synuklein vermindert seine Löslichkeit und erhöht die Aggregationsneigung.

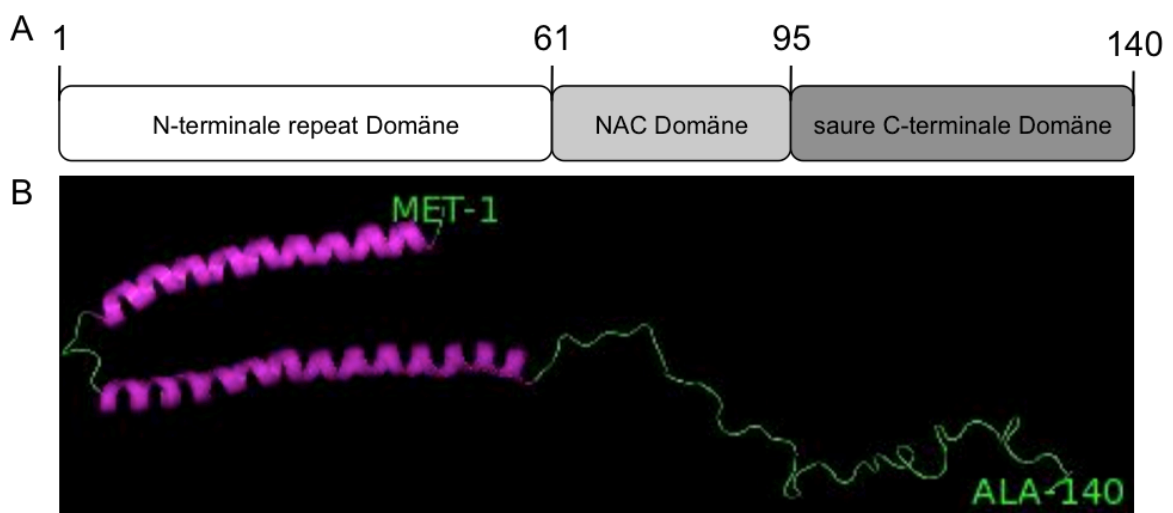


Abb. 2: (A) Die schematische Darstellung der Proteinsequenz zeigt die drei Domänen in die α -Synuklein eingeteilt wird, verändert nach (Recchia *et al.* 2004) (B) In der dreidimensionalen Darstellung der membranassoziierten Form des α -Synukleins zeigen sich die N-terminalen α -Helix Strukturen pink, sowie die C-terminalen Bereiche ohne definierte Sekundärstruktur in grün.

α -Synuklein ist ein sogenanntes nativ ungefaltetes Protein, d.h. es nimmt im Zytoplasma der Zelle keine definierte Sekundärstruktur ein. Nativ ungefaltete Proteine zeigen oft eine Neigung, spontan zu aggregieren. Die vermehrte Aggregation von α -Synuklein ist neben dem Neuronenverlust ein pathologisches Hauptmerkmal der Parkinson-Krankheit. Die Aggregation von α -Synuklein verläuft über neurotoxische oligomere Zwischenstufen und kann zu einer Neurodegeneration führen (Uversky und Eliezer 2009). Aggregiertes α -Synuklein ist außerdem Hauptbestandteil der sogenannten Lewy-Körperchen, intraneuronaler Proteinablagerungen, die das pathologische Hauptmerkmal der Parkinson-Krankheit sind (Houlden und Singleton 2012).

Neben dem verminderten Abbau von α -Synuklein durch eine Hemmung des UPS-Systems können Punktmutationen des *SNCA* Gens auch alleinige Ursache der Krankheit sein und eine vermehrte Aggregation von α -Synuklein bewirken (Ikebe *et al.* 1995). So führen die Mutationen Park1 und Park4 im *SNCA* Gen zu Formen der familiären Parkinson-Erkrankung (Krüger *et al.* 2007). Fünf Punktmutationen im *SNCA* Gen sind bereits bekannt. Zuerst wurde die Punktmutation A53T, die einen Austausch von Alanin zu Threonin an Position 53 zeigt, bei einer italienischen und einer griechischen Familie identifiziert (Polymeropoulos *et al.* 1997). Die zweite Mutation A30P wurde in einer deutschen Familie nachgewiesen. Hierbei wird an Position 30 Alanin gegen Prolin ausgetauscht (Krüger *et al.* 1998). Die dritte Mutation E46K mit einem Austausch von Glutaminsäure zu Lysin an Position 46 konnte in einer spanischen Familie nachgewiesen werden (Bisaglia *et al.* 2009, Gasser 2009). Kürzlich wurden zwei weitere familiäre Mutationen (G51D und H50Q) identifiziert. Die H50Q Mutation, wobei an Position 50 Histidin mit Glutamin ausgetauscht wird, geht mit einem späten Auftreten der Parkinson-Krankheit einher (Khalaf *et al.* 2014), wobei die G51D Mutation mit einem Austausch von Glycin zu Asparaginsäure an Position 51 mit einem frühen Krankheitsbeginn assoziiert wird (Lesage *et al.* 2013). Da auch Duplikationen und Triplikationen des *SNCA* Gens – bezeichnet als PARK4 – eine monogene Parkinson-Krankheit verursachen, wird deutlich, dass bereits eine relativ geringe Überexpression von α -Synuklein im Bereich von 150 - 200 % des normalen Expressionsniveau eine Parkinson-Krankheit verursachen kann (Farrer *et al.* 2004).

1.2.1 Die Isoformen des α -Synukleins

Durch alternatives Spleißen des *SNCA* Gens werden mindestens vier alternative Isoformen von α -Synuklein generiert. Die Hauptisoform besteht aus 140 Aminosäuren. Den drei weiteren Isoformen mit 126, 112 oder 98 Aminosäuren fehlen dabei das Exon 3 (AS 40-55), das Exon 5 (AS 103-131) bzw. Exon 3 und Exon 5 (Beyer 2006) (Abb. 3). Da diese Exons im proteinkodierenden Bereich von *SNCA* liegen, führt das Fehlen eines oder mehrerer Exone zu einem Verlust von Strukturinformationen. Auf dem dritten Exon liegen z.B. Teile der Informationen für den N-terminalen Sequenzabschnitt des α -Synukleins und drei der fünf bekannten Parkinson-verursachenden *missense*-Mutationen. Dieser Abschnitt bildet außerdem die α -Helices, über die es zu einer Membranbindung des Proteins kommt (Bisaglia *et*

al. 2006). Der größtenteils durch das Exon 5 kodierte C-Terminus hingegen verfügt über antiaggregatorische Eigenschaften (Beyer 2006).

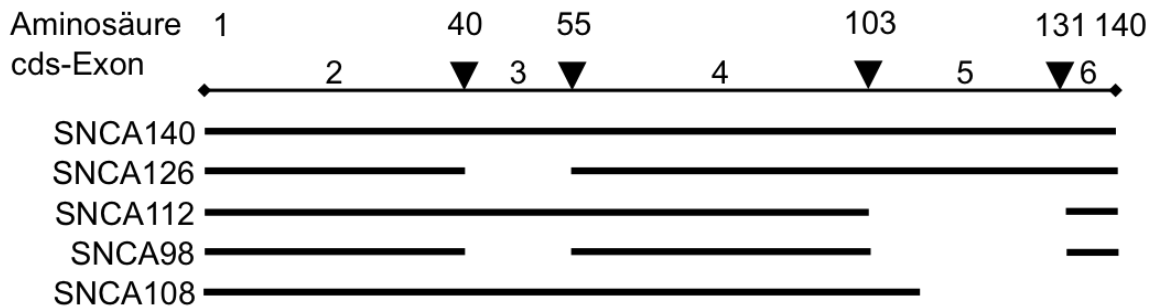


Abb. 3: Übersicht über die Isoformen des α -Synukleins.

1.3 Proneuroinflammatorische, residente Zellen des ZNS

Schon früh wurden in der SN von Parkinson-Patienten reaktive Mikroglia nachgewiesen. McGeer hebt das Vorhandensein reaktiver Mikroglia in der Parkinson-Erkrankung 1988 hervor und sieht reaktive Mikroglia als einen wichtigen Bestandteil des Pathomechanismus der Parkinson-Krankheit an, der mit der Intensität des Krankheitsprozesses korreliert ist (McGeer *et al.* 1988). Dopaminerge Neurone der SN sind besonders empfindlich für oxidativen Stress und Entzündungsprozesse. Gliazellen, die normalerweise neuroprotektive Rollen übernehmen, können nach Stimulation zu schädlichen, chronischen Entzündungen beitragen (McGeer und McGeer 2008). Dies zeigt, dass nicht nur Zellen des Immunsystems aktiv an der Inflammation teilnehmen, sondern auch Zellen des ZNS eine fundamentale Rolle in diesem Prozess spielen. Neurone, sowie Astrozyten, insbesondere aber Mikroglia sind in der Lage, ein breites Spektrum immunologisch relevanter und inflammatorischer Moleküle zu produzieren (McGeer und McGeer 2001, Chavarría und Alcocer-Varela 2004).

1.3.1 Der Zusammenhang zwischen α -Synuklein und Mikroglia in der Parkinson-Erkrankung

In vielen neurodegenerativen Erkrankungen führt die α -Synuklein-vermittelte Aktivierung der Mikroglia zu einer Störung der neuronalen Homöostase und somit zur Ausprägung pathologischer Zustände (Su *et al.* 2008). Die Aktivierung der Mikroglia umfasst dabei die Veränderung der Form von ramifiziert zu amöboide (Sanchez-Lopez *et al.* 2014). Neuere Studien im murinen Modell zeigen darüber hinaus, dass eine Überexpression von α -Synuklein zu einer gesteigerten Mikroglia-Aktivierung und nachfolgend zu einem verstärkten Absterben von Nervenzellen führen (Beraud *et al.*

2011). Des Weiteren haben sich mehrere *in vitro* Studien um den Effekt von α -Synuklein auf primäre Mikroglia fokussiert. Diese haben gezeigt, dass extrazelluläres α -Synuklein proinflammatorische Faktoren, unter anderem TNF- α (Couch *et al.* 2011) und iNOS (Lee *et al.* 2009), hervorruft. Andere Arbeitsgruppen haben den Effekt von oligomerem oder aggregiertem/fibrillärem α -Synuklein auf primäre Mikroglia untersucht und dieselbe Erhöhung unter anderem von TNF- α (Beraud *et al.* 2011) und oxidativem/reaktiven Stress (Zhang *et al.* 2005, Thomas *et al.* 2007) festgestellt.

Die Gliazellen des zentralen Nervensystems gliedern sich in zwei Hauptgruppen. Diese sind die Gruppe der Makrogliazellen mit den Astrozyten und Oligodendrozyten, sowie die Gruppe der Mikrogliazellen (Benveniste 1997). Mikrogliazellen sind die residenten Makrophagen des ZNS und werden als der antigenpräsentierende Zelltyp angesehen. Mikrogliazellen reagieren sehr empfindlich gegenüber kleinsten Veränderungen des physiologischen Milieus in ihrer Umgebung mit der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle und morphologischen Veränderungen (Kreutzberg 1996). Dieser Prozess wird als Mikroglia-Aktivierung bezeichnet. Man unterscheidet drei Hauptstadien von Mikrogliazellen: (I) die ruhenden, ramifizierten Mikrogliazellen, wie sie im normalen ausgereiften ZNS vorkommen, (II) die aktivierten, nicht phagozytotischen Mikrogliazellen, wie sie in Bereichen der beginnenden ZNS Entzündung vorkommen und (III) die reaktiven, phagozytierenden Mikrogliazellen, die bei Infektionen und anderen Immunprozessen auftreten (Minagar *et al.* 2002).

Während einer Schädigung des Gewebes des ZNS im Rahmen einer Entzündung, kontrollieren und regulieren Mikrogliazellen den Zustand ihrer Umgebung (Neumann 2001). Hierfür benötigen sie Rezeptoren und Ionenkanäle, durch welche sie Erscheinung, ungewöhnliche Konzentrationen oder veränderte Formen von Faktoren detektieren und so Schäden oder Störungen registrieren. Die Wechselwirkung zwischen den einzelnen Zellen basiert wesentlich auf Signalwegen von Zytokinen und Chemokinen (Hanisch 2002).

1.3.2 Inflammatorische Botenstoffe - Zytokine und Chemokine

Während einer Entzündung wird ein breites Spektrum an Zytokinen ausgeschüttet. Dazu zählt man unter anderem Interleukine, TNF- α und Interferone (INF). Aktivierte Mikrogliazellen präsentieren das Fremd-Antigen in Konjugation mit Klasse-II-MHC-Molekülen den CD4⁺ T-Helferzellen. Diese werden aktiviert und sekretieren Zytokine

wie $\text{INF-}\gamma$, welche wiederum eine weitere Aktivierung der Mikrogliazellen bewirken. Das von ihnen dann produzierte $\text{TNF-}\alpha$ und Stickstoffoxid kann hier zu Oligodendrozytenschädigung führen (Kreutzberg 1996).

1.4 α -Synuklein und *Toll-like* Rezeptoren

In den letzten Jahren, d.h. während der Anfertigung dieser Arbeit, wurde nachgewiesen, dass α -Synuklein eine Mikroglia-vermittelte Neuroinflammation induzieren kann, die die Entwicklung der Parkinson-Krankheit begleitet und möglicherweise zur Progredienz der Krankheit beiträgt. Die Mikrogliazellen werden direkt von α -Synuklein in einem klassischen Aktivierungsweg stimuliert, der Veränderungen in der Expression der *Toll-like* Rezeptoren umfasst (Abb. 4).

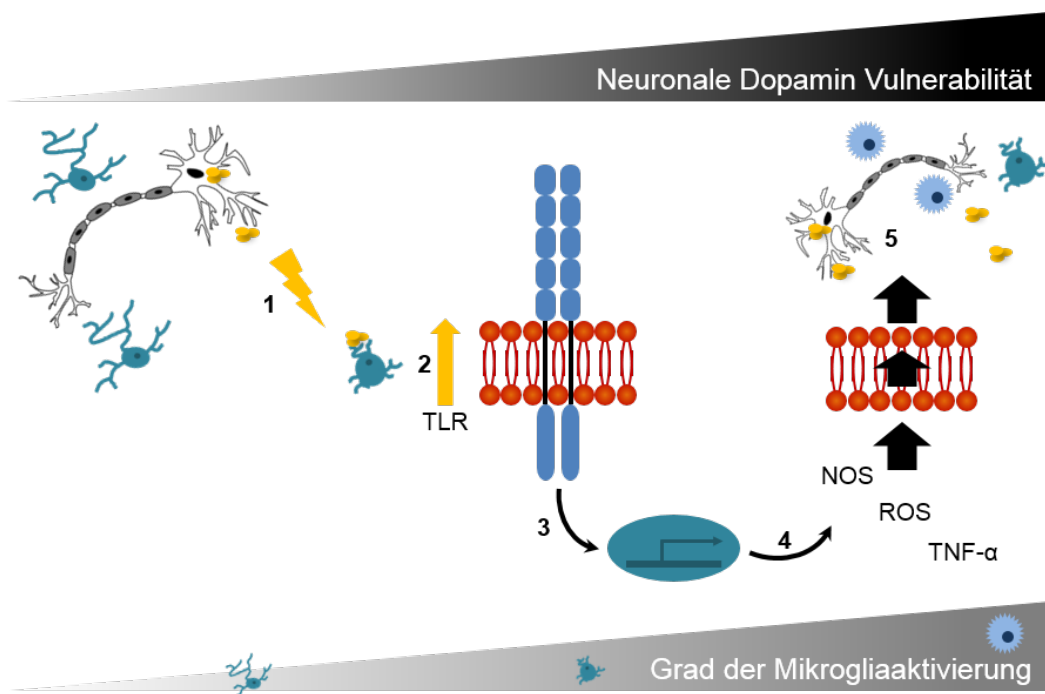


Abb. 4: α -Synuklein-induzierte, *Toll-like* Rezeptor-vermittelte Mikrogliaaktivierung. α -Synuklein wird von Neuronen oder präsynaptischen Enden (z.B. Aktivität-abhängige Freisetzung oder als Folge der anhaltenden Neurodegeneration) freigesetzt und führt zur Aktivierung von Mikroglia was häufig mit einer Veränderung der Morphologie von stark verzweigten Zellen hin zu abgerundeten Zellen mit geringer Verzweigung einhergeht [1]. Diese α -Synuklein-vermittelte Aktivierung der Mikroglia führt zu einem Anstieg der Expression verschiedenerer *Toll-like* Rezeptoren (Parks *et al.* 2007). Der Anstieg der TLR-Expression beeinflusst nachgeschaltete Signalwege, was unter anderem zur Translokation des Transkriptionsfaktors $\text{NF-}\kappa\text{B}$ in den Nucleus führt (Kobayashi *et al.* 1993). Durch das translozierte $\text{NF-}\kappa\text{B}$ wird schließlich die Expression verschiedener proinflammatorischer Moleküle induziert [4], welche dann einen neurodegenerativen Effekt auf dopaminerge Neuronen haben [5]. Abbildung nach (Beraud und Maguire-Zeiss 2012).

Mikroglia reagieren kontinuierlich auf ihre Mikroumgebung und können spezifisch durch mustererkennende Rezeptoren (PRRs), welche spezifisch für pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (PAMPs) sind, aktiviert werden (Block *et al.* 2007).

Diese Rezeptoren sind an Mikrogliaembranen und in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert. Zu ihnen gehört die Familie der *Toll-like* Rezeptoren (Beraud *et al.* 2011).

1.4.1 Die Immunantwort im zentralen Nervensystem

Zellen des angeborenen Immunsystems, wie z.B. Mikrogliazellen, erkennen Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen von Pathogenen (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) (Medzhitov und Janeway 1997). PAMPs sind beispielsweise Moleküle wie Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglykane (PGN) oder doppelsträngige RNA, die in vielen Pathogenklassen vorkommen und für den Erreger bedeutend sind. Diese Strukturen haben mehrere Gemeinsamkeiten: (I) sie werden nur von Mikroorganismen und nicht vom Wirt selbst gebildet, (II) sie sind essentiell für die Pathogenität des Mikroorganismus und (III) sie kommen bei vielen Erregern einer Gruppe vor (Medzhitov und Janeway 2000). PAMPs werden von mustererkennenden Rezeptoren (*pattern recognition receptor*, PRRs) auf der Oberfläche von Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt. Bei der adaptiven Immunität spielen dagegen B- und T-Lymphozyten eine wichtige Rolle. Hierbei trägt jede ungeprägte B- oder T-Zelle nur Rezeptoren einer einzigen, eng umgrenzten Spezifität, die von einem einzigartigen genetischen Mechanismus während der Entwicklung der Zelle festgelegt werden.

1.4.2 Mustererkennende Rezeptoren (PRRs)

PRRs werden sowohl intrazellulär als auch auf der Oberfläche verschiedener Zellen exprimiert. Sie können auch in Blut oder in Gewebsflüssigkeiten sezerniert werden. Neutrophile und eosinophile Granulozyten, Killerzellen, Makrophagen und dendritische Zellen besitzen PRRs. Sie sind bei verschiedenen Aktivitäten, wie z.B. der Opsonierung, der Aktivierung pro-inflammatorischer Signalwege und der Induktion von Apoptose beteiligt (Medzhitov und Janeway 2000).

Zu den sezernierten PRRs gehört das LPS-bindende Protein (*LPS-binding protein*, LBP). LBP ist bei der Erkennung bakterieller LPS involviert, indem es mit LPS einen Komplex bildet, der anschließend zum LPS-Rezeptorprotein CD14 transferiert wird (Medzhitov und Janeway 2000). CD14 ist ein Glykoprotein und gehört zu der Gruppe der auf der Zelloberfläche vorkommenden PRRs. Es wird auf myelomonozytischen

Zellen exprimiert, wo es über einen Phosphoinosit-Glykolipid-Schwanz an der Zelloberfläche gebunden vorkommt (Kaisho und Akira 2002).

1.4.3 Toll-like Rezeptoren (TLR)

Eine Gruppe der PRRs sind die *Toll-like* Rezeptoren. Durch die immunstimulierenden und immunmodulierenden Eigenschaften nehmen sie eine zentrale Stellung in der angeborenen Immunantwort ein (Medzhitov *et al.* 1997). *Toll* Gene wurden erstmalig in *Drosophila melanogaster* im Zusammenhang mit der embryonalen Entwicklung entdeckt (Anderson *et al.* 1985).

Aktuell sind 13 Mitglieder (TLR1-13) identifiziert und charakterisiert worden (Tabeta *et al.* 2004). Unterschiede finden sich bei den verschiedenen Rezeptoren sowohl im strukturellen Aufbau als auch in der Affinität zu bestimmten Liganden. So bindet beispielsweise Peptidoglykan als Bestandteil in der Zellwand von Bakterien als Agonist an TLR2 (Takeuchi *et al.* 1999). Doppelsträngige virale RNA interagiert mit TLR3 (Sarkar *et al.* 2003), wobei Polyinosinic-polycytidylic acid (Poly(I:C)) als synthetisches Analogon zu doppelsträngiger RNA dient (Alexopoulou *et al.* 2001). TLR4 hingegen zeigt Affinität zu Lipopolysacchariden (LPS), die in der Zellwand Gram-negativer Bakterien vorkommen (Tapping *et al.* 2000). *Toll-like* Rezeptoren sind Transmembranproteine, die in ihrem zytoplasmatischen Anteil eine TIR Domäne (Toll/IL-1R Domäne) und in der extrazellulären Domäne eine Leucin-reiche Region (*leucine-rich repeat*, LRR) aufweisen (Medzhitov *et al.* 1997). Proteine mit einer LRR-Domäne sind in zahlreiche wichtige biologische Prozesse involviert. Eine Hauptfunktion scheint die Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen zu sein, wie die Erkennung und Bindung von Liganden, und die Signalübertragung (Kobe und Kajava 2001). Ein Glykoprotein mit einer LRR-Domäne ist z.B. der frei im Plasma oder auf der Oberfläche von myelomonozytischen Zellen vorkommende LPS-Rezeptor cCD14/CD14, der gemeinsam mit TLR4 eine zentrale Rolle in der Erkennung von LPS gram-negativer Bakterien spielt (Takeuchi und Akira 2001). In Bezug auf die α -Synuklein-induzierte Zytotoxizität konnten Stefanova und Kollegen zeigen, dass ein Mangel an TLR4 in einem transgenen Mausmodell, welches humanes α -Synuklein in den Oligodendrozyten überexprimiert zu einer verstärkten, Dopamin-abhängigen Neurodegeneration führt. Der beobachtete Anstieg des neuronalen Zelltodes ging dabei mit einem erhöhten α -Synuklein Gehalt, einem reduzierten Phagozytosevermögen, sowie einer verstärkten, TNF- α -vermittelten, proinflammatorischen Reaktion einher. Dies deutet einerseits auf eine TLR4-

vermittelte, phagozytotische Aufnahme von α -Synuklein hin, doch konnte eine Reduktion des TLR4-Gehaltes die inflammatorische Reaktion nicht vollständig eliminieren, was auf einen parallelen, TLR4-unabhängigen Mechanismus hindeutet (Stefanova *et al.* 2011).

1.4.4 Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (PAMPs)

Pathogen-assoziierte molekulare Muster sind in der Evolution hoch konservierte Struktur motive. Mit ihrer Hilfe können Zellen des angeborenen Immunsystems das Eindringen von Pathogenen erkennen und Abwehrmechanismen aktivieren. PAMPs einer bestimmten Gruppe von Mikroorganismen sind einander sehr ähnlich, sodass z.B. alle gram-negativen Bakterien in ihrer äußeren Zellwand LPS aufweisen und diese anhand der biologischen Struktur des Lipid A-Teils erkannt werden. Daher ist es durch die angeborene Immunität möglich, mit einer relativ kleinen Anzahl keimbahncodierter Rezeptoren eine Vielzahl von Pathogenen zu erkennen und abzuwehren (Dudley 1992).

1.4.5 Lipopolysaccharide (LPS)

LPS sind in der äußeren Membran gram-negativer Bakterien enthalten. Die Zellhülle hat einen mehrschichtigen Aufbau. Neben einer dünnen Mureinschicht weist sie eine äußere Membran auf, in deren äußerer Lamellenhälfte LPS als integraler Bestandteil vorkommt. LPS sind Glykolipide mit drei Teilbereichen. Lipid A bildet den inneren Bereich von LPS, wovon Lipid A den biologisch aktiven Anteil darstellt und zugleich für die Verankerung in der Membran verantwortlich ist. An das Lipid A ist die Kernregion gebunden, die aus einem Heterooligosaccharid besteht. Verschiedene Serotypen können sich in ihren Kernanteilen unterscheiden. An die Kernregion schließt der dritte, äußere Bereich an. Dieser aus Polysacchariden bestehende Teil besteht aus 1-8 verschiedenen Saccharidresten, die in unterschiedlicher Reihenfolge aneinander gereiht sind. Dieses Polysaccharid wird als O-spezifisches Polysaccharid bezeichnet, weil dieser Teil das O-Antigen des Bakteriums definiert (Rietschel *et al.* 1991).

LPS ist als Endotoxin ein potentes Antigen und kann innerhalb kurzer Zeit eine Inflammationsreaktion auslösen. Werden Makrophagen mit LPS stimuliert, produzieren sie Zytokine wie TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 und IL-10. Frei im Blut vorkommendes LPS wird sofort von dem LPS-bindenden Protein gebunden und zum Oberflächenrezeptor CD14 oder dessen lösliche Form sCD14 transportiert. TLR4

und das sezernierte, an die extrazelluläre Domäne von TLR4 gebundene Protein MD-2 binden den LPS/LBP/CD14-Komplex. CD14 und MD-2 weisen keine transmembran-Domänen auf, sodass die Signaltransduktion erst über den kompletten Komplex mit TLR4 erfolgt (Guha und Mackman 2001, Akira und Hemmi 2003).

1.4.6 Peptidoglykan (PGN)

Die Zellhülle gram-positiver und gram-negativer Bakterien ist im Wesentlichen aus Peptidoglykan (PGN) bzw. Murein aufgebaut. Bei gram-positiven Bakterien existiert eine mehrschichtige Peptidoglykanschicht, bei gram-negativen Bakterien dagegen nur eine einschichtige Peptidoglykanschicht zwischen der Zellmembran und der äußeren Membran. Das PGN der Bakterienzellwand ist aus zwei glykosidisch miteinander verbundenen Strängen aus N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure aufgebaut. Die Zuckerketten sind außerdem mit Oligopeptiden quervernetzt und das so entstehende Netzwerk ist für die Form und die Stabilität der Bakterienzelle verantwortlich. Neben der Anzahl an Peptidoglykanschichten unterscheiden sich gram-positive und gram-negative Bakterien auch in ihren Oligopeptiden. Das PGN gram-negativer Bakterien besteht aus Muramyltripeptiden und das PGN gram-positiver Bakterien aus Muramyl-dipeptiden. Eine Stimulation mit PGN induziert in Makrophagen einen Anstieg von TNF- α , vermittelt über den TLR2 Rezeptor (Philpott und Girardin 2004).

1.4.7 Polyinosinic-polycytidylic acid (Poly(I:C))

Poly(I:C) ist strukturell identisch mit doppelsträngiger viraler RNA, welche als virales PAMP fungiert und im Laufe einer viralen Infektion produziert wird. TLR3 und das Adaptermolekül *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF) erkennt virale doppelsträngige RNA oder Poly(I:C) im Endolysosom (Kato *et al.* 2005). Die doppelsträngige RNA oder das Poly(I:C) bindet dann an das N-terminale und das C-terminale Ende der LRR-Region. Die Aktivierung des TLRs führt in Makrophagen zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. TNF- α oder IL-6 (Kumar *et al.* 2006).

1.5 Auswahl der Kandidatenstoffe

In den vorausgehenden Abschnitten wurde gezeigt, dass sowohl die Aggregation von Proteinen, vornehmlich α -Synuklein als auch eine im Verlauf auftretende

Mikrogliaaktivierung im Gehirn von Parkinson-Patienten eine Rolle in der Pathogenese der Krankheit spielt. Daher liegt es nahe, dass Stoffe, die Proteinaggregation und Neuroinflammation reduzieren den Nervenzelluntergang bei der Parkinson-Krankheit möglicherweise verzögern könnten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Naturstoffe eingesetzt, denen bereits neuroprotektive Eigenschaften zugeschrieben wurden: (I) Coumestrol (Liu *et al.* 2011), (II) Curcumin (Thapa *et al.* 2013) und (III) Sulforaphan (Brandenburg *et al.* 2010). Diese Stoffe wurden hinsichtlich ihrer Neuroinflammation modulierenden Wirkung, speziell im Hinblick auf die Expression von TLRs untersucht.

1.5.1 Coumestrol

Coumestrol aus der Gruppe der Polyphenole gehört zu den Phytoöstrogenen welche sich in drei Strukturklassen einteilen lassen: (I) den Isoflavonen, (II) den Lignanen und (III) den Coumestanen. Eine gemeinsame Eigenschaft aller Phytoöstrogene ist ihre östrogene Aktivität, da sie im Körper ähnlich wie das weibliche Sexualhormon 17 β -Östradiol wirken (Kuiper *et al.* 1998). Die chemische Form des Coumestrols weist zwei Hydroxy-Gruppen auf, die an der gleichen Position wie die zwei Hydroxylgruppen des 17 β -Östradiol liegen, sodass durch Interaktion mit dem Östrogenrezeptors die Aktivität des endogenen Steroidhormons gehemmt werden kann (Blomquist *et al.* 2005). Coumestrol ist der wichtigste Vertreter der Coumestane, da es von allen bekannten Phytoöstrogenen die höchste östrogene Aktivität besitzt. Enthalten ist Coumestrol in den Pflanzenarten der Hülsenfrüchte, Sojabohnen, Rosenkohl, Spinat und Klee (Amin und Buratovich 2007).

1.5.2 Curcumin

Curcumin ist ein intensiv gelber, natürlicher Farbstoff aus der Gelbwurz (bot. *Curcuma longa*) aus der Familie der Ingwergewächse, welche in Indien und Südostasien heimisch ist. In der Naturheilkunde gilt Curcumin heute als antioxidative und antiinflammatorische Substanz, welche bei vielen chronischen Entzündungen angewandt wird (Menon und Sudheer 2007). In diesem Zusammenhang wurde bereits die Inhibition der Aggregation von α -Synuklein durch Curcumin *in vitro* gezeigt (Pandey *et al.* 2008). Daneben vermindert Curcumin die Toxizität der α -Synuklein Oligomere in verschiedenen Zellkulturmodellen (Masuda *et al.* 2006). Curcumin bindet bevorzugt an oligomeres oder fibrilläres α -Synuklein, modelliert die

hydrophobe Oberfläche und reduziert so die zelluläre Toxizität (Singh *et al.* 2013) (Abb. 5).

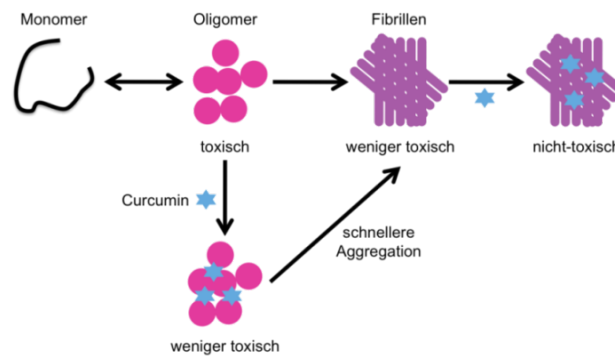


Abb. 5: In der schematischen Darstellung wird gezeigt, wie Curcumin die Toxizität der α -Synuclein Oligomere beeinflusst, verändert nach (Singh *et al.* 2013).

1.5.3 Sulforaphan

Sulforaphan (1-isothiocyanate-(4R)-(methylsulfinyl)butane) ist ein sekundärer Pflanzenstoff aus bestimmten Kreuzblütlergewächsen wie z.B. Brokkoli und Kohl (Zhang *et al.* 1994). Sulforaphan ist ein starkes indirektes Antioxidans, d.h. es kann die unerwünschte Oxidationen anderer Substanzen gezielt verhindern (Guerrero-Beltran *et al.* 2012). Des Weiteren wirken Antioxidantien als Radikalfänger. Sulforaphan neutralisiert freie Radikale dabei nicht direkt, sondern indirekt, indem es Phase-II-Enzyme aktiviert. Hierdurch werden antioxidative Abwehrmechanismen des Körpers ausgelöst und die Zelle von oxidativem Stress befreit (Zhang *et al.* 1994).

1.6 Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren sind konstitutionell aktive oder induzierbare DNA-Bindeproteine, die an der Kontrolle der Transkription beteiligt sind. Diese können direkt an sogenannte Promotor-Regionen der DNA binden, wodurch die Bindung der Transkriptionsmaschinerie und somit die Transkription der DNA in mRNA ermöglicht wird. Transkriptionsfaktoren verfügen meist über mindestens drei Domänen. Die erste Domäne fungiert als Erkennungsbereich, die der Bindung der aktiven Liganden dient. Eine weitere Domäne dient zur Bindung an die Promotor-Region der Gene, deren Transkription durch den jeweiligen Faktor aktiviert wird und mindestens eine weitere Domäne dient zur Stabilisierung. Nach Aktivierung durch Ligandenbindung, meist im Zytoplasma, translozieren sie in den Zellkern, um dort an die zugehörige Promotorregion der DNA zu binden und die Transkription spezifischer Zielgene zu induzieren (Schulze-Luehrmann und Ghosh 2006).

Extrazelluläre α -Synuklein Protofibrillen vermitteln die Induktion verschiedener Signalwege, darunter NF- κ B *in vitro* und vermitteln die mikrogliale Aktivierung und den nachfolgenden Zelltod in einem Ratten-Modell *in vivo*. Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen das Modell, dass Protofibrillen das verantwortliche Element für neuronalen Zelltod darstellen (Manning-Bog *et al.* 2003).

1.6.1 Der nukleäre Faktor kappa B (NF- κ B)

Der nukleäre Faktor kappa B (NF- κ B) wurde von Sen und Baltimore 1986 erstmalig beschrieben und dort zunächst als Aktivator des Immunglobulin κ -Leichtketten-Gens nachgewiesen (Sen und Baltimore 1986). Kurze Zeit später stellte sich heraus, dass NF- κ B als ein im Organismus ubiquitärer Transkriptionsfaktor fungiert, welcher eine wichtige Rolle bei inflammatorischen Prozessen spielt. Er dient als schnell aktivierbarer Regulator im Kontext verschiedener biologischer Abwehrprozesse (Barnes 1997). Rosenstiel und Kollegen konnten zeigen, dass in mikroglialen Zellen verschiedene Signalwege, wie der des NF- κ B durch extrazelluläres, protofibrilläres α -Synuklein aktiviert wird. Über NF- κ B wird darüber hinaus auch die Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokin-Gene, wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 reguliert. Somit kann α -Synuklein als ein wichtiger Mediator der mikroglialen Aktivierung angesehen werden, wobei die DNA-Bindeaktivität von NF- κ B als essentielles Schlüsselement zu fungieren scheint (Rosenstiel *et al.* 2001, Wilms *et al.* 2009). Die durch NF- κ B regulierten Gene nehmen somit eine wichtige Stellung in der Kontrolle der Immunantwort ein und sind an der Regulierung der Zellproliferation und an der Apoptose beteiligt (Barkett und Gilmore 1999, Tak und Firestein 2001). In den meisten Zellen liegt NF- κ B im Zytoplasma als Komplex mit inhibitorischen I κ B-Proteinen vor, wodurch NF- κ B in einem inaktiven Zustand gehalten wird. Erst die Abspaltung von I κ B ermöglicht schließlich die Translokation von NF- κ B in den Zellkern. Die Kerntranslokation von NF- κ B kann daher für die meisten Zelllinien als Surrogatmarker für die NF- κ B-Aktivität verwendet werden. Lediglich in Antikörperproduzierenden B-Zellen, aktivierten T-Zellen und Makrophagen liegt NF- κ B grundsätzlich in seiner aktivierten Form im Zellkern vor (Sen und Baltimore 1986, Baeuerle und Baltimore 1988).

2 Zielsetzung

Das Protein α -Synuklein spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der monogenen und sporadischen Parkinson-Erkrankung. Bei beiden Formen kommt es zur Ablagerung von aggregiertem α -Synuklein im Gehirn. Der monogene Morbus Parkinson kann unter anderem durch verschiedene Punktmutationen (und Duplikationen/Triplikationen) im *SNCA* Gen verursacht werden, welche das Aggregationsverhalten ändern. Aggregiertes und vor allem oligomeres α -Synuklein ist neurotoxisch und hat daher eine neurodegenerative Wirkung, welche zu den typischen Symptomen der Parkinson-Erkrankung führt.

Neben diesen, durch Mutation auftretenden α -Synuklein Formen, sind eine Reihe von natürlich auftretenden Isoformen bekannt, welche durch alternatives Spleißen entstehen. Beyer und Kollegen konnten dabei zeigen, dass diese unterschiedlichen Isoformen im Kontext verschiedener Synukleinopathien unterschiedlich exprimiert werden (Beyer 2006). Da bisher jedoch keine Daten zu möglichen, unterschiedlichen Aggregationseigenschaften dieser natürlichen Isoformen existieren, bestand ein Ziel dieser Arbeit in der Charakterisierung der Aggregationseigenschaften der verschiedenen α -Synuklein Isoformen SNCA98, SNCA112 und SNCA126 im Vergleich zur kanonischen Variante SNCA140.

In der Vergangenheit wurde auch die Verwendung verschiedener Naturstoffe als mögliche Therapeutika für die Parkinson-Erkrankung diskutiert. In Bezug auf die Parkinson-Erkrankung sind dabei die propagierten antiinflammatorischen und antiaggregatorischen Eigenschaften dieser Naturstoffe von Bedeutung. Da die Parkinson-assoziierte Neuroinflammation scheinbar auch durch die Aktivität verschiedener *Toll-like* Rezeptoren vermittelt wird, könnte eine antiinflammatorische Wirkung dieser Naturstoffe so zum Beispiel über die Hemmung der über verschiedenen TLR-Agonisten vermittelten Mikroglia-Aktivierung erfolgen. Die Untersuchung dreier ausgewählter und in verschiedenen Nahrungsmitteln vorkommenden Naturstoffe (Coumestrol, Curcumin und Sulforaphan) in Bezug auf die TLR-vermittelte Aktivierung von Mikrogliazellen war daher ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Mittlerweile wurden diesen Naturstoffen auch eine antiaggregatorische Wirkung auf das Parkinson-assoziierte Protein α -Synuklein zugeschrieben sowie ein

hemmender Effekt auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und die Inhibition von neurodegenerativen Erscheinungen im Tiermodell. Die Aufklärung einer dualen Funktion dieser Naturstoffe als antiinflammatorischer und antiaggregatorischer Wirkstoff war dabei ein übergeordnetes Ziel dieser Arbeit.

3 Material

3.1 Geräte

Gerät

ABI StepOnePlus™ Real-Time PCR
 Alphamager EC
 Ausschwingrotor A-4-81
 Autoklav Systec V-150
 AxioCam MRm Rev. 3 FireWire
 Centrifuge 5810R
 Centrifuge 5410
 Centrifuge 5430
 Durchflusszytometer Epics XL
 Durchflusszytometer FACS Calibur
 FlexCycler
 Gelelektrophoresekammer (Maxi horizontal)
 Heiz-Magnetrührer CB 162
 Inkubationsschüttler KS 4000i control
 Lichtquelle HXP-120 Leistungselektronik
 Mikroskop Axio Observer.A1
 Netzgerät Power Source 250V
 Mikrowelle mit Grill
 pH-Meter CyberScan Ion510/41S
 Präzisions-Brutschrank mit
 forciertes Umluft Binder BF53
 Qubit® 2.0 Fluorometer
 Schüttelwasserbad GFL-1083
 Schüttelrührer UZUSIO VTX-3000L
 Sprout™ Mini-Zentrifuge
 Sterile Werkbank MSC-Advantage
 Stuart roller mixer SRT6
 ThermoCell cooling & heating block
 ThermoMixer: Mixing Block MB-102
 TRIAD™ Series Multimode Detector
 Vakuumpumpe Atmolit 26
 Waage S-234
 Waage S-403
 Zellkultur CO₂ Incubator

Hersteller

Applied Biosystems
 Alpha Innotech
 Eppendorf AG
 Systec GmbH
 Carl Zeiss
 Eppendorf AG
 Eppendorf AG
 Eppendorf AG
 Beckman Coulter
 BD Biosciences
 Analytik Jena AG
 G&P Kunststofftechnik GbR
 Roth
 IKA® Werke GmbH & Co.KG
 Jena GmbH
 Carl Zeiss
 VWR International GmbH
 Severin
 Eutech Instruments
 Binder GmbH

 Life Technologies
 Polzin Laborbedarf
 LMS Co.
 Biozym
 Thermo Scientific
 Thermo Scientific
 Biozym Scientific GmbH
 Biozym Scientific GmbH
 Dynex Technologies
 Atmos MedizinTechnik GmbH&Co.KG
 Denver Instrument GmbH
 Denver Instrument GmbH
 MCO-20AIC Sanyo

3.2 Chemikalien und Reagenzien

Agarose
 Ampicillin
 α-Synuklein
 Bacto-Agar
 Bacto Trypton

Biozym Diagnostik GmbH
 Roth
 AJ Roboscreen GmbH
 Becton Dickinson and Company
 Becton Dickinson and Company

Bacto Yeast Extract	Becton Dickinson and Company
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Roth
Chloramphenicol	Roth
Chloroform	Roth
Coumestrol	Sigma-Aldrich
Curcumin	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid	Roth
dNTP Mix 10 mM	Thermo Scientific
EDTA	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus	Thermo Scientific
Glycin	Roth
Glycogen	Sigma-Aldrich
HCl	Merck
Immu-Mount	Fisher Scientific GmbH
Isopropanol	Roth
Kanamycin	Roth
L-Sulforaphan	Sigma-Aldrich
Lipopolysaccharide	Sigma-Aldrich
<i>Lipofectamine®2000 Transfection Reagent</i>	Life Technologies
Milchpulver	Reformhaus
Na ₂ EDTA	Roth
NaCl	Roth
NaOH	Merck
Natriumnitrit	Merck
Ortho-Phosphorsäure	Merck
Peptidoglykan	Sigma-Aldrich
Poly-D-lysine hydrobromide	Sigma-Aldrich
Polyinosinic-polycytidylic acid sodium salt	Sigma-Aldrich
Random Hexamer	Thermo Scientific
Saccharose	Merck
SDS	Roth
SOC-Medium	Life Technologies
Thioflavin-T	Sigma-Aldrich
Tris	Roth
TRIzol® Reagent	Life Technologies
<i>TurboFect in vitro Transfection Reagent</i>	Thermo Scientific
Tween20	Roth

3.3 Kits

<i>CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay</i>	Promega
<i>Gateway® System</i>	Life Technologies
JETQUICK Gel <i>Extraction</i> Spin Kit	Genomed GmbH
JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit	Genomed GmbH
JETSTAR Plasmid <i>Purification</i> Midiprep Kit	Genomed GmbH
JETQUICK Plasmid Maxiprep Spin Kit	Genomed GmbH
Limulus Amebocyte Lysate Kinetic-QCL	Lonza
RQ1 RNase-Free DNase	Promega

3.4 Enzyme

<i>AccuTherm™ Taq-DNA Polymerase</i>	GeneCraft
<i>AflII</i>	Thermo Scientific
<i>HindIII</i>	Thermo Scientific
<i>Hot Star Taq-DNA Polymerase</i>	Qiagen
<i>NotI</i>	Thermo Scientific
<i>PvuII</i>	Thermo Scientific
<i>RevertAid H Minus Reverse Transcriptase</i>	Thermo Scientific
SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems

3.5 Puffer, Medien und Stammlösungen

3.5.1 Medien, Serum und Lösungen für die Zellkultur

D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagles Medium mit Glutamax (DMEM)	Life Technologies
Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 (DMEM / F-12)	Life Technologies
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Life Technologies
Gibco Fetal Calf Serum (FCS)	Life Technologies
Gibco 0,05 % Trypsin/EDTA	Life Technologies
Pen/Strep-PreMix (10.000 I.U./mL Pen; 10 mg/mL Strep)	Roth

3.5.2 Puffer und Stammlösungen

10x G-Puffer mit BSA	Thermo Scientific
10x Ladepuffer	0,16 M EDTA, 0,5 g SDS, 1,5 M Saccharose, 0,125 g Bromphenolblau, in 100 ml H ₂ O (HPLC-grade) gelöst und sterilfiltriert
50x TAE	242 g Tris, 57,19 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA-Lösung, mit H ₂ O auf 1 L auffüllen und auf pH 8,5 bringen
10x TBE	108 g Tris, 55 g Borsäure, 7,4 g Na ₂ EDTA, in 1 L H ₂ O (HPLC-grade)
10x TBST	80 g NaCl, 24,2 g Tris, 1 ml Tween20, in 1 L H ₂ O (HPLC-grade) gelöst und mit HCl auf pH 7,6 einstellen
10x TE	100 mM Tris (12,144 g/L), 10 mM EDTA (3,722 g/L) mit H ₂ O auf 900 ml und mit einigen ml rauchender HCl auf pH 8,0 bringen, auf 1 L auffüllen und autoklavieren
10x PCR Buffer	Qiagen

3.6 Bakterienstämme

Tab. 1: Übersicht über Eigenschaften verwendeter Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Genotyp	Hersteller
<i>Library Efficiency</i> [®] <i>DH5α</i> TM <i>Competent Cells</i>	<i>F- φ80lacZΔM15 Δ ((lacZYA-argF)U169 recA1endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-</i>	Life Technologies
<i>One Shot</i> [®] <i>Mach1</i> TM <i>T1 Phage-Resistant Chemically Competent</i>	<i>F-φ80(lacZ)ΔM15 ΔlacX74 hsdR(rK-mK⁺) ΔrecA1398 endA1 tonA</i>	Life Technologies

3.7 Oligonukleotide

Die für Polymerasekettenreaktionen (PCR), Klonierungen und Real-Time PCR verwendeten Oligonukleotide wurde mit Hilfe des Programms „Primer3“ (Version 0.4.0; frodo.wi.mit.edu/) designed und von der Firma Eurofins MWG Operon bezogen. Mit Hilfe des *Human Genome Browser* wurde überprüft, dass die Oligonukleotide *in silico* nur einmal binden. Eine Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide und deren Eigenschaften gibt die nachfolgende Tabelle (Tab. 2).

Tab. 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Oligonukleotide für die Real-Time PCR	
Oligonukleotid	Sequenz [5' → 3']
Rn_TNF_RT_F	CAAATGGGCTCCCTCTCAT
Rn_TNF_RT_R	CTACGACGTGGGCTACGG
Rn_NOS2_RT_F	GTTCCCTCACTGGGACTGCAC
Rn_NOS2_RT_R	CCCAGTTTTTGATCCTCACG
Rn_Rps18_RT_F	CTTCCACAGGAGGCCTACAC
Rn_Rps18_RT_R	TGAGTACTCGCAGGATGTGC
Rn_ACTB_RT_F	GTCTTCCCCTCCATCGTG
Rn_ACTB_RT_R	TCTTGCTCTGGGCCTCGT
Rn_HPRT_RT_F	TCATGGACTGATTATGGACAGG
Rn_HPRT_RT_R	AATCCAGCAGGTCAGCAAAG
Rn_B2M_RT_F	CCTGGTCTTTCTGGTGCTTG
Rn_B2M_RT_R	CGGGTGGAAGTGTGTTACG
Rn_CYC1_RT_F	GGCTCCTCCCATCTACACAG
Rn_CYC1_RT_R	TCATGCTCTGGTTCTGATGC
Rn_LALBA_RT_F	TTGGATGACGAGTTGGATGA
Rn_LALBA_RT_R	ACGCCACTGTTCAAGCTTCT
Rn_FAS_RT_F	TGGACAAGAACCATTATGCTG
Rn_FAS_RT_R	TATTCTGGGTCAGGGTGCAG
Rn_UCHL3_RT_F	CCATTGCGAACAACAAGAC
Rn_UCHL3_RT_R	GCTCTCTTTCAGGGCTCATT
Rn_PPIA_RT_F	CACCGTGTTCTTCGACATCA
Rn_PPIA_RT_R	AGCCAAATCCTTTCTCTCCA
Rn_TLR2_RT_F	TAGGGGCTTCACTTCTCTGC
Rn_TLR2_RT_R	CCACCAAGATCCAGAAGAGC
Rn_TLR3_RT_F	GCGTTGCGAAGTGAAGAACT

Rn_TLR3_RTR	TTCAAGAGGAGGGCGAATAA
Rn_TLR4_RTF	ATCTGAGCTTCAACCCCTTG
Rn_TLR4_RTR	ATGCCATGCCTTGTCTTCA
Oligonukleotide für die Kolonie-PCR	
Oligonukleotid	Sequenz [5' → 3']
SNCA-140F2	GAGCAAGTGACAAATGTTGGAG
pcDNA-DEST53R	GATGGCTGGCAACTAGAAGG
PDZ-SCAM-F	GAACATTCTCAGCACCACC
pcDNA-DEST53R	GATGGCTGGCAACTAGAAGG
IRES-GFP-2AF2	CGAACCACGGGGACGTGGTTTTTC
SNCA-140R1	GTTCGTAGTCTTGATACCTTC
Oligonukleotide für Klonierungen	
Oligonukleotid	Sequenz [5' → 3']
SNCA-pDONR-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGATGTATTCA TGAAAGGAC
SNCA-pDONR-RS	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTAGGCTTCAGGTTCTAGTC
SNCA-pDONR-FSD	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAGAAGGAGATAGA ACCATGGATGTATTCATGAAAGGAC
SNCA-pDONR-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTCGGCTTCAGGTTTCGTAGTC
SNCA-pET-F	TATACATATGCACCATCATCATCATTCTTCTGGTGACGACGA CGACAAGATGGATGTATTCATGAAAGGAC
SNCA-pET-R	TATGCTCGAGTCATTAGGCTTCAGGTTTCGTAGTC
Oligonukleotide für die Real-Time PCR der SNCA-Isoformen	
Oligonukleotid	Sequenz [5' → 3']
SNCA140 Ex3F	GGGAGTGGTGCATGGTGT
SNCA140 Ex5R	TCCAGAATTCCTTCCTGTGG
SNCA126 Ex2-4FN	AAAGAGGGTGTCTCTATGTAGTGG
SNCA126 Ex5RN	TGTGGGGCTCCTTCTTCAT
SNCA112 Ex3F	GGGAGTGGTGCATGGTGT
SNCA112 Ex4-6R	ATACCCTTCCTTGCCCAACT
SNCA98 Ex2-4FN	AAAGAGGGTGTCTCTATGTAGTGG
SNCA98 Ex4-6RN	GATACCCTTCCTTGCCCAAC

3.8 Antikörper

Im Rahmen der durchgeführten Immunfluoreszenz-Analysen wurden verschiedene Primär- und Sekundärantikörper verwendet. Eine Übersicht über diese Antikörper gibt Tabelle 3.

Tab. 3: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper.

Name	Verdünnung	Hersteller
NF-κB p65	1 :50	Santa Cruz
Goat anti-mouse IgG Alexa Fluor® 488	1 :1000	Invitrogen

3.9 Software

AxioVision Rel. 4.8
 EditSeq 5.0
 MapDraw 5.0
 SeqMan 5.0
 StepOne Software v2.1

Carl Zeiss
 DNASTAR
 DNASTAR
 DNASTAR
 Life Technologies

3.10 Vektoren

Die in dieser Arbeit zur Klonierung der Plasmide verwendeten Vektoren wurden von der Firma Invitrogen von Life Technologies bezogen.

Als Eingangsvektor wurde der pDONRTM221 verwendet. Dieser Vektor besitzt zur Selektion ein Kanamycin-Resistenzgen (Abb. 6 A). Der Zielvektor pcDNA-DEST53 GatewayTMVektor kann über das Resistenzgen für Neomycin und Ampicillin selektioniert werden (Abb. 6 B).

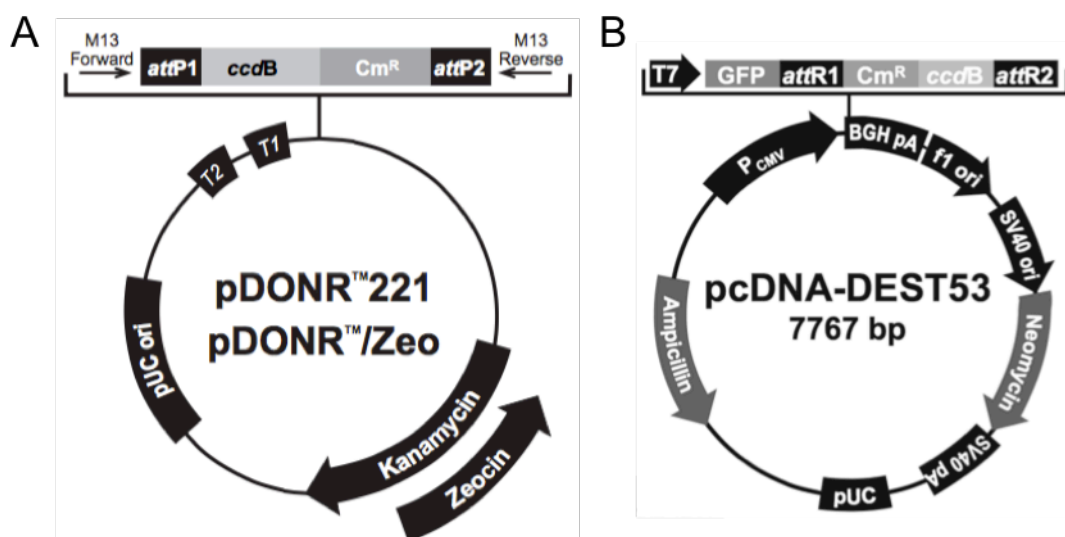


Abb. 6: Restriktionskarten der verwendeten Plasmidvektoren.

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Mikrogliazellen (N11-Zellen)

Bei den N11-Zellen handelt es sich um eine Mikrogliazelllinie der Maus, die durch retrovirale Transfektion aus Primärzellen generiert wurde. Die Zellen exprimieren Phänotypenmarker für Mikrogliazellen und weisen typische Mikrogliazell-Eigenschaften wie FcR-vermittelte Phagozytose und Cytokinproduktion auf (Righi *et al.* 1989). Zum subkultivieren der N11-Zellen wurde das Kulturmedium (DMEM/10 % FCS) abgenommen und die Zellen mit 10 ml 0,05 % Trypsin/EDTA ca. 1 min im Brutschrank inkubiert, bis sich diese ablösten. Alle Lösungen und Kulturmedien wurden vor dem Passagieren im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Zellsuspension wurde in 30 ml warmes DMEM/10 % FCS überführt und 5 min bei 1.300 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und die Zellen wurden in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde ein Milliliter dieser Zellsuspension in eine Kulturflasche transferiert und nach Zugabe von 19 ml frischem Kulturmedium bis zum Erreichen einer Konfluenz von 70 bis 80 % bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

4.1.2 HEK293T

Die Zelllinie HEK293T basiert auf der Zelllinie HEK293, die aus einer menschlichen embryonalen Nierenzelle (*Human Embryonic Kidney*) gewonnen und durch Transfektion mit DNA des humanen Adenovirus 5 immortalisiert wurde (Graham *et al.* 1977). Durch Transfektion der Zelllinie HEK293 mit dem SV large T-Antigen des SV40-Virus entstand die Zelllinie HEK293T (DuBridg *et al.* 1987). Die Subkultivierung der HEK293T erfolgte, wie bereits für die N11-Zellen beschrieben (4.1.1).

4.1.3 Aggregation von α -Synuklein

Um aus rekombinantem α -Synuklein Aggregate herzustellen, wurde wässrige Lösung der Konzentration 2 mg/ml von α -Synuklein in einem hermetisch verschlossenen Glastiegel mit Hilfe eines Magnetrührers bei 37 °C mehrere Tage

gerührt. Die α -Synuklein Aggregation wurde durch den Thioflavin-T-Test *in vitro* gemessen (Wolfe *et al.* 2010). In der medizinischen Diagnostik wird Thioflavin-T zur Charakterisierung pathologischer Amyloidablagerungen (Cooper 1969), zur Quantifizierung von *in vitro* gebildeter fibrillärer Strukturen und zur Analyse des Formationsprozesses amyloiden Fibrillen verwendet (Naiki *et al.* 1989, LeVine 1993). Das Extinktionsmaximum des ungebundenen Thioflavins liegt dabei bei einer Wellenlänge von 385 nm, während Licht mit einer Wellenlänge von 445 nm emittiert wird. Bindet das Thioflavin-T an β -Faltblatt-reichen Strukturen von α -Synuklein Aggregaten, so kommt es zu einer Verschiebung von Extinktions- und Emissionsmaximum hin zu einer Wellenlänge von 450 nm, bzw 490 nm. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Thioflavin-T verwendet um die Bildung synthetischer α -Synuklein Aggregate zu dokumentieren. Dazu wurde Thioflavin-T (2 mM) in zweistündigem Abstand zu einem Aliquot von 37,5 μ l gerührtem α -Synuklein gegeben und die Extinktion bei 560 nm, sowie die Emission bei 590 nm, an einem Photometer gemessen. Eine Zunahme der Fluoreszenzintensität korreliert dabei mit einer zunehmenden Aggregation von α -Synuklein. Unterschiedliche Aggregationszustände des α -Synuklein wurden schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.1.4 Endotoxintest des rekombinanten α -Synukleins

Der Endotoxingehalt des aggregierten und des unaggregierten α -Synukleins wurde mit Hilfe des *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) *Kinetic-QCL*[™] Kit bestimmt. Hierdurch kann *in vitro* Endotoxin bestimmt werden. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren.

4.1.5 LPS-, PGN-, Poly(I:C)-Stimulation

Um die Expression von Entzündungsmediatoren von mikroglialen Zellen zu induzieren bzw. deren Induktion mit den Naturstoffen zu hemmen, wurden Stimulationsversuche durchgeführt. Zur Vorbereitung wurde für jede Stimulation zuerst eine Konzentrationsreihe mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt, die nach Literaturangaben ausgewählt waren. Es wurden die Substanzen Lipopolysaccharid (LPS) (10 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml, 2500 ng/ml, 5000 ng/ml), Peptidoglykan (PGN) (10 μ g/ml, 20 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 500 μ g/ml, 1000 μ g/ml) und Poly(I:C) (0,1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 1000 μ g/ml, 5000 μ g/ml) untersucht. Die Konzentrationen die nach der Testung ausgewählt wurden betragen für LPS 100 ng/ml (Brandenburg *et al.* 2010), für PGN

100 µg/ml (Matsubara *et al.* 2004) und für Poly(I:C) 1000 µg/ml (Omagari *et al.* 2009). Nach 24-stündigem Wachstum der Mikrogliazellen auf Deckgläschen in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen erfolgte eine 10-minütige Vorinkubation der Zellen mit LPS, PGN oder Poly(I:C) bei 37 °C, bevor die Zellen mit den Naturstoffen behandelt wurden.

4.1.6 Coumestrol-, Curcumin- und Sulforaphan-Behandlung

Um die Wirkung der Naturstoffe auf die Expression von Entzündungsmediatoren zu untersuchen, wurden vorher Stimulationsversuche durchgeführt (vgl. 4.1.5). Zur Vorbereitung der jeweiligen Naturstoffbehandlung wurde für jede Stimulation zuerst eine Konzentrationsreihe mit verschiedenen Konzentrationen aus der Literatur durchgeführt. Es wurden die Substanzen Coumestrol (1 µM, 10 µM, 100 µM, 1000 µM, 10000 µM, 100000 µM), Curcumin (0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM, 1000 µM) und Sulforaphan (0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 10 µM, 20 µM, 100 µM) untersucht. Die Konzentrationen die nach der Testung ausgewählt wurden betragen für Coumestrol 1000 µM und 10000 µM (Wang und Kurzer 1997), für Curcumin 10 µM und 100 µM (Aggarwal und Harikumar 2009) und für Sulforaphan 20 µM und 100 µM (Zhang *et al.* 1994). Nach der Vorinkubation der Stimulanzien (vgl. 4.1.5), erfolgte eine anschließende Behandlung der Zellen mit den angegebenen Konzentrationen der drei Naturstoffe für sechs Stunden bei 37 °C.

4.1.7 Bestimmung der Lactatdehydrogenaseaktivität (LDH)

Um auszuschließen, dass die beobachtete Stickstoffproduktion auf toxischer Zellschädigung beruht, wurde die Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) im Kulturmedium bestimmt (Crisp *et al.* 1991). Im Falle einer Zellschädigung würde vermehrt LDH aus dem Intrazellularraum in das Medium übertreten. Die Aktivitätsmessung beruht auf folgender, von der LDH katalysierten Reaktion (Abb. 7).

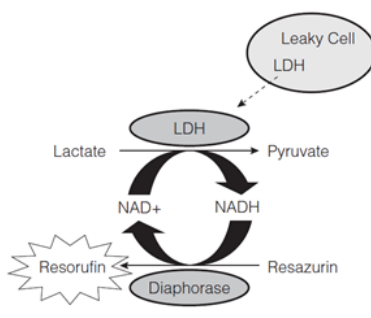


Abb. 7: Der Entstehungsweg von LDH in der Zelle (Promega).

Zur Untersuchung wurde das CytoTox-ONE™ *Homogeneous Membrane Integrity Assay* verwendet. Hierbei wurden 50 µl des Kulturmediums bei 14.000 rpm zentrifugiert, in eine Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen gegeben und mit 50 µl CytoTox-ONE™ Reagenz vermischt. Nach zehnminütiger Inkubation bei 22 °C wurden 25 µl *Stop Solution* hinzugefügt und es wurde die Extinktion bei 560 nm, sowie die Emission bei 590 nm, an einem Fluoreszenzdetektor gemessen.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Die Gateway® Technology

Das *Gateway*-System ist ein modernes auf homologer Rekombination beruhendes Klonierungssystem der Firma *Life Technologies*. Dieses System bietet verschiedene Vorteile gegenüber der klassischen Klonierungsmethode. Der Wechsel der klonierten DNA (*Insert*) von einem Vektor in den nächsten ist im *Gateway*-System sehr einfach. Die Effektivität der *Gateway*-Klonierung liegt zwischen 90 und 99 %. Ein weiterer Vorteil ist, dass bei der Herstellung des Expressionsklons auf Restriktionsenzyme und Ligasen verzichtet wird. Des Weiteren ist ein gleichzeitiges Klonieren von bis zu vier Fragmenten in einen Expressionsvektor möglich und eine spezifische Reihenfolge und Orientierung der DNA-Sequenzen ist durch spezielle Sequenzen der Rekombinationsstellen gewährleistet. Die *Gateway*-Technologie basiert auf Rekombinationsreaktionen, die durch zwei verschiedene Enzyme vermittelt werden. Im einfachsten Fall wird ein zu exprimierendes DNA-Fragment über ein PCR-Produkt durch die sequenzspezifische Rekombination der BP-Clonase in einen Eingangsvektor (pDONR™221) kloniert. Aus dem Eingangsvektor wird das DNA-Fragment durch die Reaktion der LR-Clonase in die Zielvektoren (pcDNA-DEST53*Gateway*™) nach Angaben des Herstellers überführt.

4.2.2 Klonierung

Zur Quantifizierung der Aggregation von humanem α -Synuklein (SNCA140) und dessen Isoformen (SNCA126, SNCA112, SNCA108 und SNCA98) in Zellen sollten Fusionskonstrukte aus α -Synuklein und dessen Isoformen erzeugt werden. Da die direkte Kopplung des relativ kleinen α -Synuklein an ein wesentlich größeres fluoreszierendes Protein möglicherweise die Aggregationseigenschaften beeinflusst, wurde die von Opazo und Kollegen beschriebene bicistronische Expressionsstrategie verwendet (Opazo *et al.* 2008). Das erste Cistron besteht aus dem rot-

fluoreszierenden *mCherry* Protein gekoppelt mit der PDZ-Domäne von S-SCAM (NP_446073). Nach diesem Cistron folgt eine interne ribosomale Eintrittsstelle (*internal ribosomal entry site* (IRES)), gefolgt von einem weiteren Cistron, welches für jeweils eine der fünf verschiedenen *SNCA* Isoformen kodiert und diese Isoform dabei mit der Sequenz für das PDZ-Bindemotiv (NP_446320) koppelt. Als Negativkontrolle dient ein Konstrukt, welches ausschließlich *mCherry*-PDZ enthält. Alle Klonierungsprozeduren wurden unter Verwendung des *MultiSite Gateway Pro* System nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die PDZ-Domäne und die *SNCA*-PDZ-Bindemotive wurden durch Eurofins MWG Operon synthetisiert. Alle Elemente wurden mittels PCR amplifiziert. Anschließend erfolgte die simultane Klonierung dieser drei Elemente in den pDONR221 P1-P4 Vektor (PDZ-Domäne, Element 1), pDONR221 P4R-P3R (interne ribosomale Eintrittsstelle, Element 2) und pDONR221 P3-P2 (*SNCA*140, *SNCA*126, *SNCA*112, *SNCA*98, *SNCA*108, alle mit dem PDZ-Bindemotiv fusioniert, Element 3). Diese drei Elemente wurden dann gleichzeitig auf den pcDNA-DEST53*cherry*-Plasmidvektor, mittels Ersatz des grün fluoreszierenden Protein durch das rot fluoreszierende *mcherry* Protein, kloniert.

4.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*; PCR) ist ein Verfahren zur exponentiellen Amplifikation eines DNA-Fragments mit Hilfe zweier, den zu amplifizierenden Bereich des als Matrix dienenden DNA-*Templates* flankierenden, Oligonukleotiden (Mullis *et al.* 1986, Saiki *et al.* 1988), einem dNTP-Mix und einer thermostabilen Polymerase. Die Polymerasekettenreaktion beruht auf der Abfolge dreier Reaktionsschritte, welche beliebig oft wiederholt werden können: (A) Denaturierung des DNA-*Templates* durch starkes Erhitzen, (B) Spezifische Anlagerung der Primer an das denaturierte Template und (C) Elongation der Primer durch eine thermostabile Polymerase.

4.2.3.1 PCR für die Gateway-Technologie

Für jeden Ansatz wurden 5 µl des 10x *AccuTherm*TMPuffers, 0,4 µl der *AccuTherm*TM*Taq*-Polymerase, 1 µl dNTP-Mix, je 1 µl des Oligonukleotidpaares (Tab. 2), 3 µl DNA und 30,6 µl H₂O verwendet. Das verwendete PCR-Programm sah eine dreiminütige Aktivierung der *AccuTherm*TM*Taq*-DNA Polymerase bei 94 °C vor, gefolgt von 20 Zyklen mit je 30 sec Denaturierung bei 94 °C, 30 sec *Annealing* bei 60 °C und 2 min DNA-Elongation bei 72 °C, sowie einer weiteren Elongationsphase

für 10 min bei 72 °C. Anschließend wurden die PCR-Produkte auf ein 1 %-iges Agarosegel in TAE-Puffer aufgetragen.

4.2.3.2 Kolonie-PCR

Von jedem Transformationsansatz wurden acht einzelne Klone pro Plasmid gepickt und zur weiteren Kultivierung auf neuem antibiotikahaltigen LB-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Um die DNA einzelner Klone zu kontrollieren, wurde ein Teil des Bakterienausstrichs von der jeweiligen Agarplatte abgenommen und in ein PCR-Reaktionsgefäß mit 100 µl H₂O aufgenommen. Nach 10 min bei 98 °C im PCR-Cycler, wurde von jedem Ansatz je 1 µl für die Kolonie-PCR verwendet. Die für die Kolonie-PCR verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2 aufgeführt. Das erste Oligonukleotidpaar (Tab. 2) amplifiziert die Gensequenz der SNCA108-Isoform. Das zweite Oligonukleotidpaar (Tab. 2) dient zur Amplifikation der Negativkontrolle PDZ. Mit Hilfe des dritten Oligonukleotidpaares (Tab. 2) können sowohl die Gensequenzen der SNCA140-, SNCA126-, SNCA112-, als auch die SNCA98-Isoform amplifiziert werden. Für den Master-Mix wurde pro Reaktion 1 µl *Hot Star* 10x Puffer, 0,05 µl *Hot Star Taq* DNA Polymerase, 0,25 µl dNTPs und 5,7 µl H₂O verwendet. Dem Master-Mix wurde jeweils 1 µl Oligonukleotid 1 und Oligonukleotid 2 und 1 µl Plasmid DNA zugegeben. Nach 15 minütiger initialer DNA-Denaturierung bei 95 °C und 30 Zyklen mit je 30 sec DNA-Denaturierung (95 °C), 30 sec *Annealing* (53 °C) und 1 min DNA-Elongation (72 °C), gefolgt von einer finalen Elongationsphase von 5 min bei 72 °C, wurden die PCR-Produkte mit einem 10x Ladepuffer versetzt und auf einem 1,5 %-igen Agarosegel in TBE-Puffer aufgetragen. Die Geldokumentation erfolgte anschließend unter UV-Licht. Als „positive“ Klone wurden die Klone bewertet, deren DNA nach dem Restriktionsverdau Fragmente der richtigen Größe aufwies.

4.2.4 Gelelektion und PCR-Aufreinigung

Nach einer DNA-Gelelektrophorese wurden die gewünschten DNA-Fragmente unter UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten. Die anschließende Extraktion erfolgte mit Hilfe des JETQUICK Gel *Extraction Spin* Kit nach Angaben des Herstellers.

4.2.5 Restriktionsverdau

Mit Hilfe des Restriktionsverdau von Plasmiden wurde die Länge der geschnittenen Fragmente der DNA überprüft. Durch den Vergleich der Länge der geschnittenen

DNA-Fragmente mit der über Restriktionskarten berechneten Länge kann überprüft werden, ob die Fragmentgrößen des geschnittenen Plasmids mit den erwarteten Fragmentgrößen aus der DNA-Sequenz übereinstimmt. Um den Restriktionsverdau durchzuführen, wurde 1 µl 10x G-Puffer oder *FastDigest* Puffer, 0,2 - 0,4 µl der jeweiligen Enzyme und 1 µl der zu untersuchenden Plasmid-DNA in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und mit H₂O auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt. Der Verdau erfolgte durch eine zehnmütige Inkubation bei 37 °C, 15 min bei 90 °C und 15 min bei 20 °C im *PCR-Cycler*. Die Restriktionskarten wurden mit Hilfe des Programms *MapDraw* erstellt.

4.2.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde von den Mitarbeitern des Instituts für klinische Molekularbiologie (IKMB, UK S-H Campus Kiel, AG Rosenstiel) durchgeführt. Zur Vorbereitung der Sequenzierung wurde 3 µl von der Plasmid-DNA (je 100 ng/µl) in PCR-Gefäße vorgelegt und in verschiedenen Ansätzen zusätzlich entweder 1 µl des Vorwärts-Oligonukleotids oder 1 µl des Rückwärts-Oligonukleotids (je 4,8 µM) ergänzt.

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programms *SeqMan* aus dem Programmpaket DNASTar. Die DNA-Sequenzierung diente dem Ausschluss von Mutationen in den verwendeten Plasmiden.

4.2.7 Isolation von RNA

Die RNA-Isolation erfolgte unter Verwendung von Trizol. Die Zellen wurden nach Entfernen des Mediums in 1 ml Trizol-Reagenz bedeckt und mit einem Zellschaber abgelöst und anschließend in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Der Suspension wurden dann 200 µl Chloroform zugegeben und das Gemisch anschließend für 15 sec per Hand geschüttelt. Nach dreiminütiger Inkubation bei 24 °C, wurden die Proben für 15 min bei 4 °C und 12.000 x g zentrifugiert. Dadurch entsteht eine untere, rote Phenol-Chloroformphase, in der sich die DNA und die Proteine befinden. Oberhalb der milchig-trüben Interphase entsteht eine farblose wässrige Phase, welche die RNA enthielt und vorsichtig in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt wird. Diesem Gemisch wurden 1 µl Glycogen und 500 µl Isopropanol hinzugefügt und dieses dann, nach zehnmütiger Inkubation bei 24 °C, für 10 min bei 4 °C und 12.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml 75 % Ethanol gelöst. Nach weiteren 5 min Zentrifugation bei 4 °C und 7.500 x g, wurde der

Überstand erneut verworfen und das Pellet ca. 10 min an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl RNase-freiem Wasser gelöst und 10 min bei 57 °C inkubiert. Die extrahierte RNA wurde anschließend bei -80 °C gelagert.

4.2.8 Reverse Transkription

Die isolierte, einzelsträngige Gesamt-RNA wurde mit der *RevertAid H Minus Reverse Transcriptase* in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Insgesamt wurde 1 µg RNA in 8 µl RNase-freiem Wasser eingesetzt. Zusammen mit 10x Reaktionspuffer und 1 µl RQ1 RNase freie DNase wurde die RNA bei 37 °C 15 min inkubiert. Anschließend wurde 1 µl Stopplösung hinzugegeben und das Gemisch für 10 min bei 65 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl *Random Hexamer* Oligonukleotiden wurde alles für 5 min bei 70 °C inkubiert und anschließend 4 µl Reaktions-Puffer, 2 µl dNTP Mix und 1 µl RNase-freies Wasser zu jeder Probe hinzugefügt. Nach fünfminütiger Inkubation bei 25 °C wurden schließlich 1 µl der *RevertAid H Minus Reverse Transcriptase* zugegeben und die cDNA-Synthese nach folgendem Programm in einem FlexCycler durchgeführt: 10 min bei 25 °C, 60 min bei 42 °C und 10 min bei 70 °C. Die fertigen cDNA-Proben wurden bei -20 °C gelagert.

4.2.9 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Die Real-Time Polymerasekettenreaktion ist eine etablierte, präzise und sensitive Methode zur Genexpressionsanalyse (qPCR) (Heid *et al.* 1996, Grove 1999). Durch die exponentielle Amplifikation der Zielsequenz vor der Quantifizierung, erreicht die Real-Time PCR eine hohe Sensitivität. Durch die Messung des Fluoreszenz-Farbstoffes SYBR-Green, der in doppelsträngige DNA interkaliert, ist es möglich, während des Verlaufs der PCR das entstehende PCR-Produkt kontinuierlich quantifizieren zu können. Die Real-Time PCR wurde unter Verwendung von dem ABI *StepOnePlus* Real-Time PCR System mit einem Gesamtreaktionsvolumen von 10 µl durchgeführt. Der Reaktionsansatz besteht aus 2 µl Wasser, jeweils 0,5 µl der verwendeten Oligonukleotide (vgl. Tab. 2), 5 µl SYBR® Green PCR Master Mix und 2 µl cDNA. Die Temperaturzyklen belaufen sich bei der *Pre-denaturation* auf 95 °C für 10 min, gefolgt von 40 Zyklen *Denaturation* bei 95 °C für 15 sec und einer anschließenden *Annealing*- und *Extension*-Temperatur von 60 °C für 60 sec. Am Ende von jedem Durchgang wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um nicht-spezifische Signale feststellen zu können. Bei jeder Real-Time PCR wurde der Schwellenwert-Zyklus (Ct-Wert) bestimmt, um jedes DNA-Produkt quantifizieren zu

können (Livak und Schmittgen 2001). Jeder Durchgang wurde dreifach durchgeführt und die Mittelwerte wurden für weitere Berechnungen verwendet. Für die Normalisierung wurden stets die Expression der beiden internen Haushaltsgene von beta-Aktin (*Actb*) und dem ribosomalen Protein S18 (*Rps18*) gemessen.

4.2.10 Spezifität der Oligonukleotide

In Vorversuchen wurde zunächst überprüft, ob mit den gewählten Oligonukleotiden (Tab. 2) ein spezifisches PCR-Produkt amplifiziert werden kann. Hierzu wurde eine PCR mit der cDNA der Positivkontrolle als Proben-DNA und den jeweiligen Oligonukleotiden durchgeführt. Bei der gewählten Temperatur von 60 °C für die Anlagerung der Oligonukleotide erhielt man jeweils nur ein PCR-Produkt, dessen Größe auf einem 1,5 %-igen Agarosegel überprüft wurde und das mit der erwarteten Größe übereinstimmte. Die Spezifität der Oligonukleotide konnte damit nachgewiesen werden. In der Regel sollten Oligonukleotide so gestaltet sein, dass der amplifizierte DNA-Abschnitt über eine Intron-Exon-Grenze reicht. So wird ausgeschlossen, dass in der PCR genomische DNA ebenfalls amplifiziert wird.

4.2.11 Eignung der ausgewählten Referenzgene

Bei der Kontrolle der Einsetzbarkeit der Referenzgene muss eine sehr geringe Schwankung der Expressionsrate zwischen den untersuchten Proben festgestellt werden. Hierfür wurden signifikante Unterschiede von acht möglichen Referenzgenen (*Cyc1*, *Fas*, *Uchl3*, *B2m*, *Hprt*, *Actb*, *Ppia*, *Rps18*) in der Expressionsrate mittels geNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) überprüft. Berechnet wurden die Expressionswerte nach den Vorgaben von Vandesompele und Kollegen (Vandesompele *et al.* 2002). Als geeignete Referenzgene eingestuft wurden dann die zwei Gene, wobei keine signifikanten Unterschiede in der Expressionsrate feststellbar waren (*Actb* und *Rps18*).

4.3 Immunzytochemische Methoden

In der Immunzytochemie gibt es verschiedene Techniken, um mit Hilfe von Antikörpern entsprechende Epitope in einem Präparat sichtbar zu machen, darunter die Immunfluoreszenzmikroskopie und die FACS-Analyse.

4.3.1 Immunfluoreszenzanalyse

Nach durchschnittlich 24-stündigem Wachstum der N11-Zellen bei 37 °C auf Deckgläschen erfolgte eine sechsstündige Inkubation mit den verschiedenen, zu untersuchenden Substanzen. Bei Kombination mehrerer Substanzen wurde die zweite Substanz dem Medium 10 min nach der ersten Stimulation hinzugefügt. Anschließend wurden die Präparate einmal mit PBS gespült, um sie danach 10 min mit 3,5 % PFA in PBS zu fixieren. Es folgte dreimal ein weiterer Waschdurchgang mit PBS jeweils für 10 min, bevor der erste Blockierungsschritt mit der Antikörperlösung 15 - 20 min folgte. Der erste Antikörper wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Präparate erneut dreimal mit PBS gewaschen, bevor der zweite Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach einem erneuten, dreimaligen Waschen mit PBS, wurden die Zellen DAPI gefärbt, um nach einem letzten PBS-Waschgang in Immu-Mount Einbettungsmedium eingebettet zu werden. Die erzeugten Präparate wurden anschließend mit Hilfe des Fluoreszenz-Mikroskops betrachtet und analysiert.

4.3.2 Durchflusszytometrische Analysen

Ein Durchflusszytometer ist, vereinfacht ausgedrückt, ein automatisiertes Fluoreszenzmikroskop, welches auf Einzelzellebene morphologische Eigenschaften von Zellen, aber auch Fluoreszenzen erfassen kann. Zusätzlich messen Durchflusszytometer die Streuung des Laserlichtes, wobei die Streuung im 0 ° bis 10 °-Winkel als Forward-Scatter (FSC), die Ablenkung des Lichts im 90 °-Winkel (entspricht dem Refraktionsindex) als Side-Scatter bezeichnet wird. Der FSC entspricht dem Zellgrößendurchmesser, der SCC hingegen charakterisiert grob die extra- und intrazellulären Bestandteile der Zellen.

Hierfür wurden jeweils 150.000 HEK293T-Zellen in einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen ausgesät und nach 24-stündigem Wachstum für 6 h mit den verwendeten Naturstoffen inkubiert. Danach wurden die Zellen abgelöst und kurz zentrifugiert. Danach folgte ein zweimaliger Waschschrift mit einem Waschpuffer, bevor die Zellen in 10 % PFA in PBS aufgenommen und bis zur Untersuchung im Kühlschrank gelagert wurden. Die erzeugten Präparate wurden anschließend mit Hilfe des Durchflusszytometers FACS-Calibur betrachtet und analysiert.

4.4 Mikrobiologische Methoden

4.4.1 Allgemeine Bemerkungen zur Bakterienkultur

Die Bakterien wurden auf LB-Platten (\varnothing 9,0 cm), die zur Selektion die Antibiotika Ampicillin oder Kanamycin enthielten, angezogen. Zur Herstellung des LB-Mediums wurden 5 g NaCl, 5 g Bacto *Yeast Extract* und 10 g Bacto Trypton mit H₂O auf 1 Liter aufgefüllt und auf den pH-Wert 7,2 eingestellt. Das fertige Medium wurde autoklaviert. Für LB-Agar-Platten wurde dem flüssigen LB-Medium vor dem Autoklavieren 15 g Bacto-Agar pro Liter zugesetzt. Nachdem das LB-Medium auf ca. 55 °C abgekühlt war, wurde dem Medium das benötigte Antibiotikum hinzugefügt. Sowohl Kanamycin als auch Ampicillin wurden stets mit einer Konzentration von 100 µg/ml verwendet. Alle Agarplatten wurden mit einem Volumen von ca. 20 ml gegossen, über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in verschlossenen Plastikschläuchen bei 4 °C gelagert.

4.4.2 Anzucht von *Escherichia coli*

Zur *E. coli*-Anzucht wurde LB-Flüssigmedium verwendet. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und 300 rpm im Inkubationsschüttler.

4.4.3 Transformation von *Escherichia coli*

Für Transformationen wurden im Rahmen dieser Arbeit die kommerziell erhältlichen *E. coli* Stämme *One Shot[®] Mach1TM T1 Phage-Resistant Chemically Competent* und *Library Efficiency[®] DH5 α TM Competent Cells* eingesetzt. Diese zeichnen sich durch eine besonders hohe Transformationseffizienz und schnelles Wachstum aus.

Jeweils 25 µl *E. coli* wurden mit 1,5 µl Plasmid-DNA oder Ligationsansatz in vorgekühlten Reaktionsgefäße vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde bei 42 °C ein Hitzeschock für 30 sec durchgeführt, bevor der Ansatz 2 min auf Eis gekühlt wurde. Nun wurden 300 µl vorgewärmtes SOC-Medium zu jedem Ansatz hinzugefügt und die Suspension anschließend für eine Stunde bei 37 °C und 450 rpm inkubiert. Danach wurde der Transformationsansatz auf antibiotikahaltigem LB-Agar (100 mg/L Ampicillin, 20 mg/L Chloramphenicol oder 50 mg/L Kanamycin) ausplattiert und bei 37 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert. Der Nachweis einer erfolgreichen Transformation erfolgte über eine Kolonie-PCR (siehe 4.2.3.2).

4.4.4 Plasmid-Isolierung aus *Escherichia coli*

Bei der Plasmid-Minipräparation wurde die Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen im kleinen Maßstab isoliert. Es wurden als „positiv“ bewertete Klone gepickt und in einem Volumen von 3 ml antibiotikahaltigen LB-Medium überführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Inkubationsschüttler bei 37 °C und 300 rpm. Die Aufreinigung von Plasmiden erfolgte mit dem JETQUICK Plasmid Miniprep *Spin* Kit nach Angaben des Herstellers. Bei der Plasmid-Midipräparation wurde eine größere Menge Ausgangsmaterial eingesetzt. Hierbei wurden die „positiv“ bewerteten Klone in 25 ml antibiotikahaltigen LB-Medium überführt und auch über Nacht im Inkubationsschüttler inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte mit dem JETSTAR Plasmid *Purification* Midiprep Kit nach Angaben des Herstellers.

4.4.5 Herstellung von SNCA140, SNCA126 und SNCA98

Die verschiedenen α -Synuklein Isoformen wurden aus den bereits genannten Konstrukten mittels PCR amplifiziert. Unter Verwendung entsprechender Oligonukleotide (Tab. 2) wurden dabei die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und/oder *XhoI* im Rahmen einer PCR eingefügt. Die PCR Produkte wurden über die Restriktionsstellen und dann in den bakteriellen Expressionsvektor pET-30a(b) kloniert. Die DNA Sequenzen wurden mittels Sanger Sequenzierung überprüft. Nach der Proteinexpression wurden die Bakterien mittels Zentrifugation geerntet und in Benzonase-haltigem PBS gewaschen. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss unter Zusatz von einem Protease-Inhibitor-Mix ohne Ethylendiamintetraessigsäure durch Ultraschall. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand auf eine Nickelsäule (Ni-HiTrap-Säule), welche zuvor mit PBS äquilibriert wurde, geladen. Das gebundene Protein wurde durch zunehmende Imidazolkonzentration eluiert. Fraktionen, die das Zielprotein enthielten, wurden durch Größenausschlusschromatographie (Superdex75 16/60) weiter aufgereinigt. Das bakteriell exprimierte α -Synuklein wurde lyophilisiert und kurz vor Gebrauch in PBS gelöst, sodass eine Konzentration von 2 mg/ml erreicht wurde. In dieser Konzentration wurde das α -Synuklein unter stetigem Rühren in einem geschlossenen Glasgefäß für 1 Woche bei 37 °C aggregiert.

4.5 Transfektionen der eukaryotischen Zellen

4.5.1 Transiente Transfektion HEK293T-Zellen

Die Isoformen SNCA140, SNCA126, SNCA112, SNCA108 und SNCA98 wurden in dieser Arbeit mit Hilfe des *TurboFect in vitro Transfection Reagent* in HEK293T-Zellen transient transfiziert. Es wurden jeweils 25.000 HEK293T-Zellen pro Zellkulturplatte mit sechs Vertiefungen auf Deckgläschen ausgesät. Nach einer Kulturzeit von 72 h wurde das Medium über den Zellen gewechselt und die Zellen anschließend mit den unterschiedlichen α -Synuklein Isoformen transfiziert. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Es folgte eine 48 h lange Inkubationszeit, nach der die transfizierten Zellen fixiert und mit DAPI angefärbt wurden. Nach dem Einbetten der Deckgläschen in Immu-Mount, wurden die Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop gezählt.

4.6 Statistische Methoden

Die statistischen Signifikanzen wurden mit dem 2-seitigen Student T-Test bewertet. Die Signifikanzschwelle wurde in der Aggregatbildung von SNCA140 bei einem p -Wert von $p < 0,05$ gesetzt (n.s. $p \geq 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Vergleichbare Expressionsniveaus zwischen den verschiedenen Konstrukten wurden durch die Messung der roten Fluoreszenz der HEK293T-Zellen mit den verschiedenen transfizierten Konstrukten in einem Coulter Epics XL Durchflusszytometer sichergestellt. Die Signifikanzschwelle wurde bei den Expressionsversuchen bei einem p -Wert von $p < 0,1$ gesetzt (n.s. $p \geq 0,1$, * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$). Hierbei wurden die Mediumwerte jeweils mit dem Wert von DMSO und dem Wert der jeweiligen Stimulanz (LPS, PGN oder Poly(I:C)) verglichen. Mit dem DMSO-Wert wurden jeweils die drei untersuchten Naturstoffe verglichen, da diese alle in DMSO gelöst sind. Alle untersuchten Kombinationen aus einer Stimulanz und einem Naturstoff wurden mit dem Wert der jeweiligen Stimulanz verglichen um zu sehen, ob eine Inhibition der Naturstoffe im Vergleich zur Stimulationsbedingung vorliegt.

5 Ergebnisse

5.1 Unterschiedliche Aggregationseigenschaften der verschiedenen α -Synuklein Isoformen

Eine Zielsetzung dieser Arbeit bestand in der Etablierung von fluoreszierenden Fusionsproteinen von α -Synuklein und seinen bekannten Isoformen in Kombination mit dem rot-fluoreszierenden Protein *mCherry*. Diese Fusionskonstrukte wurden schließlich für die Transfektion in HEK293T-Zellen (siehe Abschnitt 4.5) verwendet, um diese auf eventuell unterschiedliches Aggregationsverhalten von α -Synuklein und seinen Isoformen hin zu untersuchen.

5.1.1 Die α -Synuklein Fusionskonstrukte

Alle in diesem Zusammenhang verwendeten Fusionskonstrukte basieren auf einer Idee von Opazo und Kollegen (Opazo *et al.* 2008). Für diese Arbeit wurden Fusionskonstrukte aller α -Synuklein Isoformen in Zusammenarbeit mit Dipl.-Biol. Annika Regulin hergestellt. Die Fusionskonstrukte sind jeweils als bicistronische Vektoren konzipiert, das heißt, es werden zwei Transkriptionseinheiten cis über eine *internal ribosomal entry site* (IRES) verknüpft und es werden zwei separate Proteine gekoppelt exprimiert. Dieses System basiert auf der spezifischen Bindung zwischen der PDZ-Domäne und der dazugehörigen PDZ-Bindedomäne. Das erste Cistron besteht aus dem rot-fluoreszierenden Protein *mCherry* und der PDZ-Domäne. Das zweite Cistron exprimiert ein Fusionsprodukt aus α -Synuklein und der sehr kleinen (6 AS) PDZ-Bindedomäne. Dazwischen liegt ein IRES-Element, wodurch das zweite Cistron überhaupt erst exprimiert werden kann (Abb. 8) (Opazo *et al.* 2008). Wenn beide Cistronen abgelesen werden, kann die PDZ-Domäne mit der PDZ-Bindedomäne hochaffin und spezifisch interagieren. Hierdurch kommt es zu einer starken Fluoreszenzfärbung von aggregiertem α -Synuklein. In dieser Arbeit wurde *mCherry* verwendet, ein rot-fluoreszierendes Protein (Shaner *et al.* 2005). Die verwendete PDZ-Domäne entsprach der Sequenz der PDZ-Domäne des *synaptic scaffolding molecule* (S-SCAM). Eine C-terminale Deletionsmutante des α -Synuklein (SNCA108), von der bereits eine besonders hohe Aggregationsneigung bekannt war,

diente als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurde ein Konstrukt verwendet, welches nur das fluoreszierende Protein, fusioniert mit der PDZ-Domäne exprimiert.

Schließlich konnten so für α -Synuklein (SNCA140) und alle drei zuvor beschriebenen Isoformen (SNCA126, SNCA112 und SNCA98), sowie für die Positivkontrolle (SNCA108) und für die Negativkontrolle (PDZ) entsprechende Fusionskonstrukte hergestellt werden.

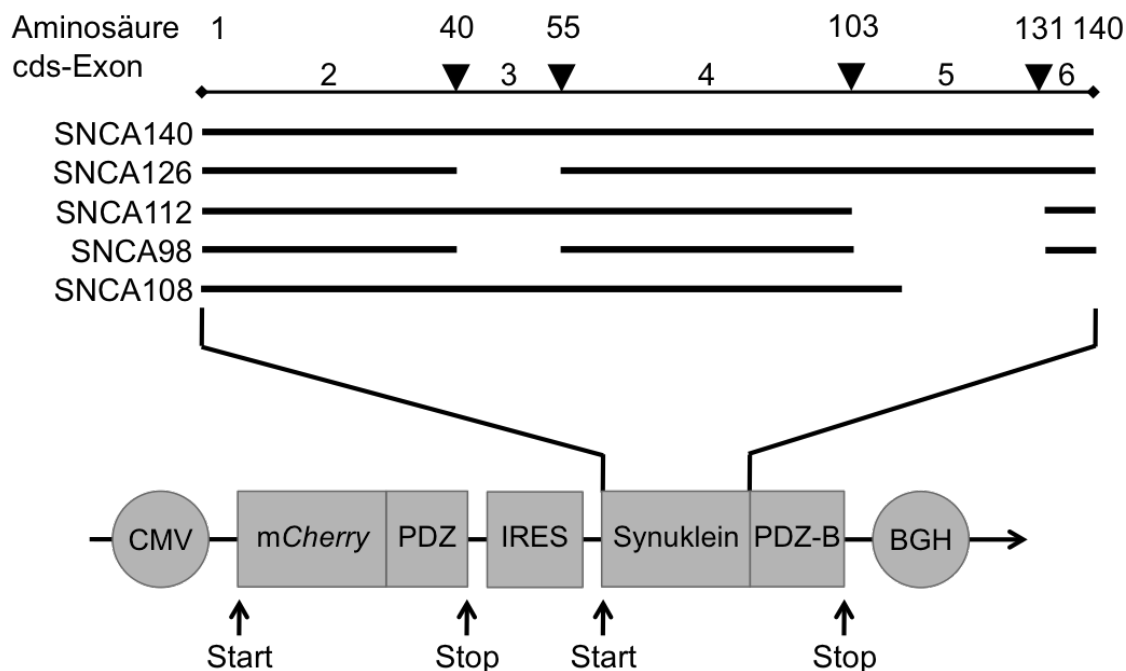


Abb. 8: Schematische Übersicht über die Exon-Struktur (oben) der kanonischen α -Synuklein Isoform (SNCA140), die Isoformen SNCA126, SNCA112 und SNCA98, sowie die Positivkontrolle SNCA108 (Bungeroth *et al.* 2014). Das bicistronische Konstrukt basiert auf dem Vektor pcDNA-DEST53 und beginnt mit dem CMV-Promotor. Das erste Cistron besteht aus einem Start-Codon, dem rot-fluoreszierenden mCherry Protein, der PDZ-Domäne und einem Stop-Codon. Das zweite Cistron beginnt auch mit einem Start-Codon, darauf folgt die Sequenz für jeweils eine der α -Synuklein-Isoformen, die PDZ-Bindedomäne und ein Stop-Codon. Beide Cistrone sind über ein IRES-Element verbunden, welches essentiell für das Ablesen beider Cistrone ist.

5.1.2 α -Synuklein bildet Aggregate und Aggresome in HEK293T-Zellen

Zunächst wurden HEK293T-Zellen mit den oben beschriebenen Fusionskonstrukten transfiziert. Die Fähigkeit, dass das bicistronische Konstrukt über das IRES-Element verbunden aggregiert, ist in der nachfolgenden Abbildung (Abb. 9) dargestellt.

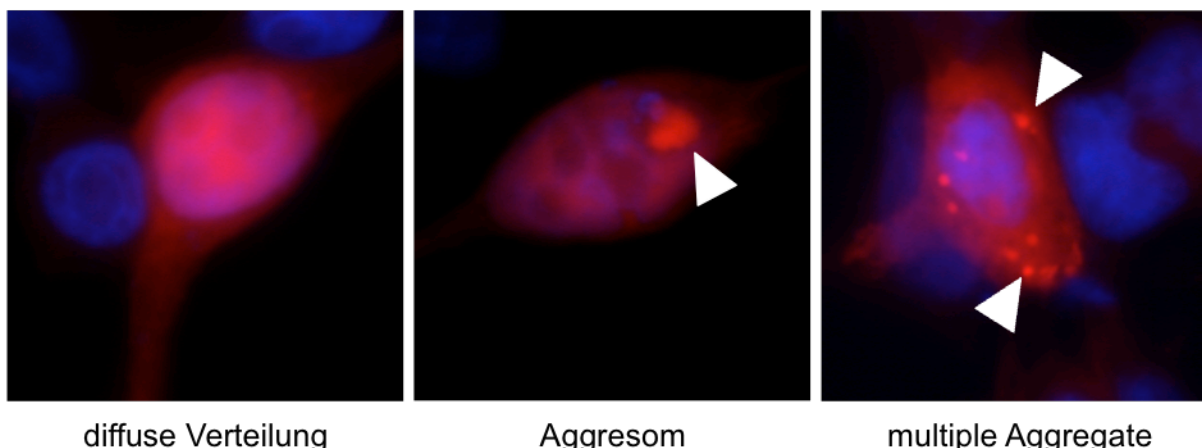


Abb. 9: Unterschiedliche Aggregationsstufen des kanonischen α -Synukleins in HEK293T-Zellen nach Transfektion mit dem mCherry-SNCA140-Fusionsprotein (Bungeroth *et al.* 2014). Vor der Bildung von Aggregaten ist lediglich eine diffuse zytoplasmatische Verteilung des mCherry-SNCA140 zu beobachten. Das mCherry-SNCA140-Fusionsprotein kann in zwei unterschiedlichen Aggregationsformen vorliegen: einem einzelnen großen Aggresom oder mehreren kleinen Aggregaten.

Nach Transfektion von HEK293T-Zellen können dabei drei unterschiedliche Formen des α -Synuklein in diesem System unterschieden werden, welche sich durch unterschiedliche zytoplasmatische Fluoreszenzsignale auszeichnen. Ohne Ausbildung von Aggregaten ist lediglich ein diffuses Fluoreszenzsignal im Zytoplasma sichtbar (Abb. 9, links). Dies entspricht auch den zuvor gemachten Beobachtungen nach der Transfektion der HEK293T-Zellen mit dem mCherry-PDZ-Fusionskonstrukt als Negativkontrolle. Aggregation des kanonischen α -Synukleins resultiert entweder in einem einzigen, großen Aggregat, von dem bereits in vorausgehenden Arbeiten von Opazo und Kollegen gezeigt wurde, dass es sich um ein Aggresom handelt (Opazo *et al.* 2008) (Abb. 9, Mitte, weißer Pfeil) oder – wie in den meisten Fällen – in mehreren kleinen Aggregaten, welche sich durch besonders scharfe Fluoreszenzsignale auszeichnen (Abb. 9, rechts, weiße Pfeile). Alle drei Aggregationsformen zeigen sich in unterschiedlichen Zellen, welche mit dem α -Synuklein-Fusionskonstrukten transfiziert wurden.

5.1.3 Unterschiedliche Aggregationseigenschaften der α -Synuklein Isoformen

Um Aussagen über eventuell unterschiedliche Aggregationseigenschaften der verschiedenen α -Synuklein Isoformen machen zu können, wurden HEK293T-Zellen mit den verschiedenen Konstrukten in drei unterschiedlichen Ansätzen transfiziert. Je Transfektion wurden insgesamt 300 Zellen auf die Verteilung der vorliegenden Aggregationsformen untersucht. Die Ergebnisse dieser quantitativen Analyse sind nachfolgend dargestellt (Abb. 10).

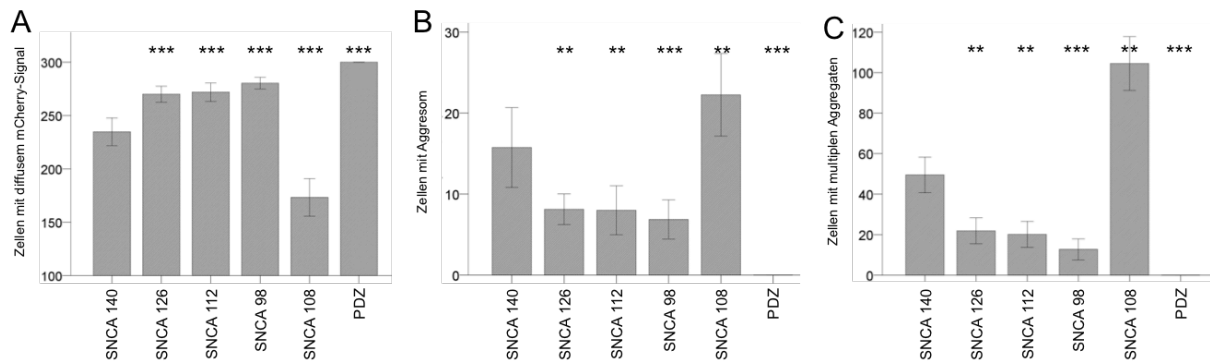


Abb. 10: Quantitative Analyse des Auftretens von (A) diffusen, zytoplasmatischen Fluoreszenzsignalen, (B) Aggregaten und (C) multiplen Aggregaten in HEK293T-Zellen, welche mit den entsprechenden mCherry-SNCA-Fusionskonstrukten transfiziert wurden (Bungeroth *et al.* 2014). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) aus der Auszählung der verschiedenen Aggregationsformen in jeweils 300 Zellen aus drei unabhängigen Ansätzen. Die Signifikanz der Unterschiede im Aggregationsverhalten im Vergleich zur kanonischen Isoform SNCA140 ist wie folgt angegeben: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (zweiseitiger Student t-Test).

Während das als Negativkontrolle dienende Fusionskonstrukt mCherry-PDZ (Abb. 10 A, PDZ) keinerlei Aggregation zeigt (Abb. 10 B und C, PDZ), zeigt die Positivkontrolle mCherry-SNCA108 eine starke Ausprägung von Aggregaten, auch wenn viele Zellen eine eher diffuse Signalverteilung und somit keine Aggregation zeigen (Abb. 10, SNCA108). Im Vergleich zur kanonischen Form zeigen die Isoformen, welche durch das Fehlen lediglich eines Exons (SNCA126 und SNCA112) entstehen, eine verstärkt diffuse Verteilung und somit eine reduzierte Aggregation (Abb. 10, SNCA126 und SNCA112). Die Isoform SNCA98 zeigt die geringste Aggregation (Abb. 10, SNCA98). Somit zeigen die kanonische Form von α -Synuklein im Vergleich zu den Isoformen SNCA98, SNCA112 und SNCA126 ein erhöhtes Aggregationsverhalten, welches jedoch deutlich geringer ausfällt, als die Aggregation der Positivkontrolle SNCA108.

Aufgrund dieser Beobachtung wurden Ko-Transfektionen mit der kanonischen Variante SNCA140 und jeweils einer der drei Isoformen durchgeführt, um mögliche inhibitorische Effekte dieser Isoformen auf die Aggregation der kanonischen Variante zu untersuchen. In Abbildung 11 sind die Ergebnisse dieser quantitativen Analyse dargestellt.

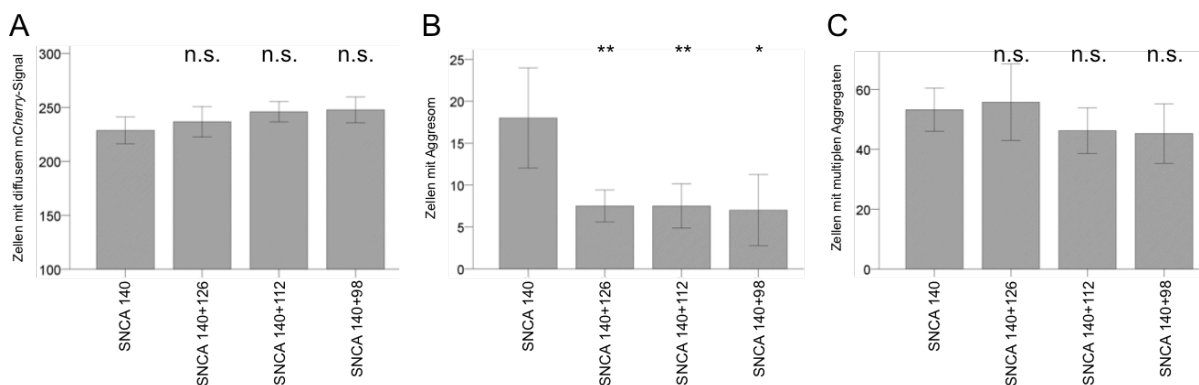


Abb. 11: Quantitative Analyse des Auftretens von (A) diffusen, zytoplasmatischen Fluoreszenzsignalen, (B) Aggresomen und (C) multiplen Aggregaten in HEK293T-Zellen nach Transfektion mit der kanonischen α -Synuklein Variante (SNCA140), sowie nach Ko-Transfektion mit den Isoformen SNCA126, SNCA112 bzw. SNCA98 in einem 4:1-Verhältnis (Bungeroth *et al.* 2014). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) aus der Auszählung der verschiedenen Aggregationsformen in jeweils 300 Zellen aus drei unabhängigen Ansätzen. Die Signifikanz der Unterschiede im Aggregationsverhalten im Vergleich zur kanonischen Isoform SNCA140 ist wie folgt angegeben: n.s. $p \geq 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$ (zweiseitiger Student t-Test).**

In den kotransfizierten HEK293T-Zellen konnte dabei eine verminderte Aggresombildung beobachtet werden (Abb. 11 B), doch bleibt eine Verminderung der Bildung multipler Aggregate (Abb. 11 C) und eine damit einhergehende Verstärkung der diffusen Verteilung (Abb. 11 A) aus. Die untersuchten Isoformen hemmen somit nicht die erhöhten Aggregationseigenschaften der kanonischen SNCA140-Variante.

5.1.4 Unterschiede in der Fibrillformation der α -Synuklein Isoformen

Um zu untersuchen, ob die veränderten Aggregationseigenschaften der untersuchten α -Synuklein Isoformen auch zu morphologischen Unterschieden in der *in vitro* Aggregatbildung führen, wurden die kanonische Variante SNCA140 sowie die Isoformen SNCA126, SNCA112 und SNCA98 in den pET-30a(+)-Vektor kloniert und nach chemischer Transformation in *Escherichia coli* exprimiert. Die Proteinaufreinigung selbst erfolgte durch Dr. Inken Lorenzen (Institut für Biochemie, CAU Kiel). Die Isoform SNCA112 konnte aus unbekanntem Grund nicht aufgereinigt werden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen (Dr. W. Völker, Universität Münster) der resultierenden Fibrillen sind nachfolgend (Abb. 12) dargestellt.

Die kanonische Variante SNCA140 bildet die längsten Fibrillen mit einer durchschnittlichen Länge von 362 nm und mit einer geraden Form der Fibrillen (Abb. 12). Die von der Isoform SNCA126, welche sich durch das Fehlen von Exon 3 auszeichnet, geformten Fibrillen weisen mit durchschnittlich 131 nm lediglich etwas mehr als ein Drittel der Länge der Variante SNCA140 auf und unterscheiden sich

auch in der Fibrillenmorphologie. Hier bildet SNCA126 Bündel von parallelen Fibrillen (Abb. 12). SNCA98, dem die Exone 3 und 5 fehlen, zeigt im EM ringförmige Aggregate, die einen durchschnittlichen Durchmesser von 77 nm aufweisen. Die Morphologie von aggregiertem SNCA112 konnte nicht untersucht werden, da uns die Aufreinigung des rekombinanten Proteins nicht gelang. Im Vergleich zu der kanonischen Form von α -Synuklein (SNCA140) zeigen die verschiedenen Isoformen (SNCA126 und SNCA98) somit eine verminderte Aggregationsneigung und eine elektronenmikroskopisch differenzierbare Morphologie der Fibrillen.

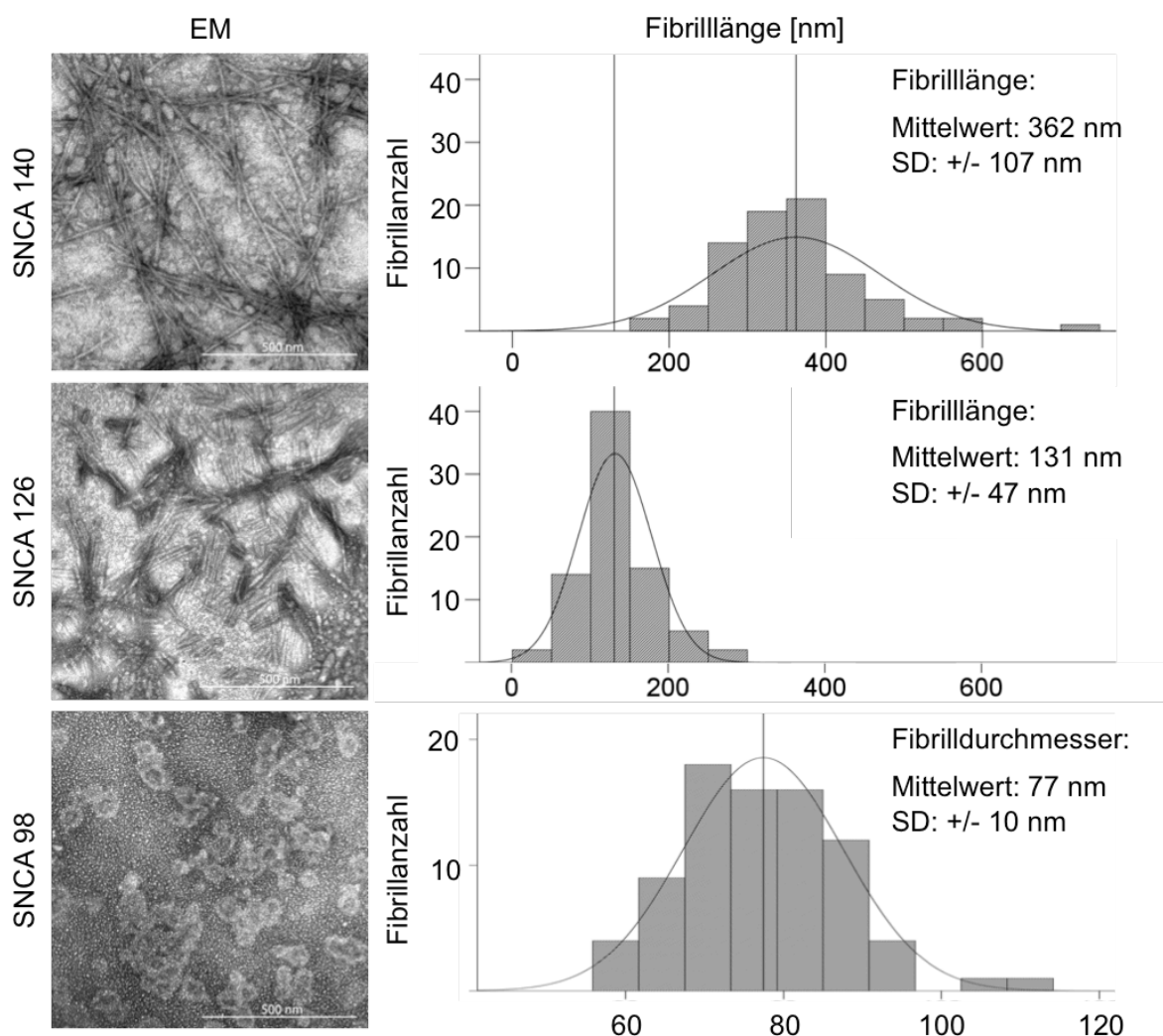


Abb. 12: Unterschiede in der Fibrillformation von kanonischem α -Synuklein (SNCA140) und den Isoformen SNCA126 und SNCA98 *in vitro* (Bungeroth *et al.* 2014). Dargestellt sind elektronenmikroskopische Aufnahmen (EM) von formierten Fibrillen, sowie die Anzahl und Länge der beobachteten Fibrillen. Im Falle der deutlich kugelförmigen Aggregate der Isoform SNCA98 entsprechen die angegebenen Werte dem Durchmesser. Für alle Varianten sind jeweils die Mittelwerte, sowie die Standardabweichung (SD) angegeben.

5.1.5 Expression von SNCA-Isoformen in verschiedenen Bereichen des Gehirns

Die SNCA-Isoformen wurden auf mRNA-Ebene mittels qPCR analysiert. RNA wurde aus verschiedenen menschlichen Hirnregionen revers transkribiert und mittels qPCR mit SNCA-Isoform-spezifischen Oligonukleotiden analysiert (Abb. 13). Normalisiert wurde die Expression der alternativen Isoformen auf die Expressionswerte der kanonischen Isoform SNCA140, die als 100 % gesetzt wurde. Abbildung 13 zeigt, dass SNCA126, SNCA112 und SNCA98 ein niedriges Expressionsniveau zwischen 1 % und 3 % der kanonischen Isoform aufweisen. Durch die Wahl Intron-überspannender Oligonukleotidpaare wurde die Amplifikation genomischer DNA hier und in allen folgenden qPCR-Analysen weitgehend ausgeschlossen.

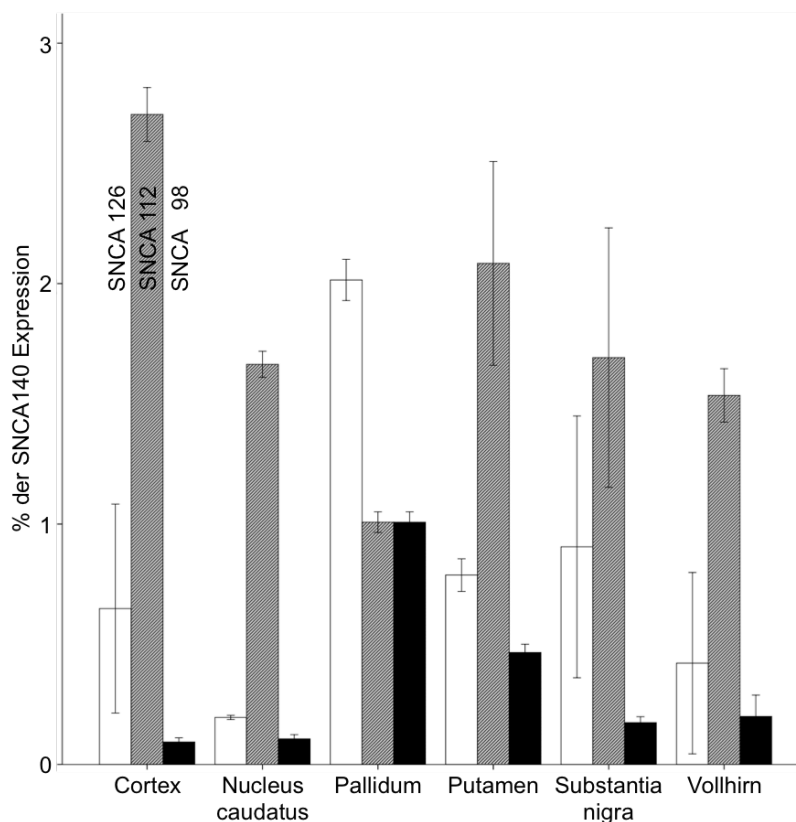


Abb. 13: Expressionsanalyse alternativer α -Synuklein Isoformen in verschiedenen Hirnregionen (Bungeroth *et al.* 2014). Die Expression der kleineren SNCA-Isoformen in verschiedenen Hirngeweben wurden durch qPCR analysiert und auf die Expression von SNCA140 normalisiert auf 100 %.

5.2 Die Wirkung von 3 Naturstoffen auf die Parkinson-assoziierte Neuroinflammation

Bei der Parkinson-Erkrankung handelt es sich um eine neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems, die von einer Neuroinflammation begleitet wird. Eine zentrale Ursache dieser Erkrankung liegt in der Aggregation von

α -Synuklein. Von anderen Gruppen wurde bereits gezeigt, dass TLRs bei der Neuroinflammation der Parkinson-Erkrankung eine wichtige Rolle spielen (Beraud *et al.* 2011, Beraud und Maguire-Zeiss 2012). Auch α -Synuklein vermittelt einen Teil seines Inflammationspotenzials über TLR, daher wurden in dieser Arbeit TLR-Stimulanzen verwendet, um eine Neuroinflammation künstlich zu induzieren. Daraufhin wurden mit den drei Naturstoffen Coumestrol, Curcumin und Sulforaphan die antiinflammatorische Wirkung getestet. Um eventuelle zytotoxische Effekte der verwendeten Stimulanzen und Naturstoffe ausschließen zu können, wurden mikrogliale N11-Zellen *in vitro* mit den Stimulanzen und Naturstoffen behandelt und diese anschließend auf Zelllyse untersucht.

5.2.1 Keine erhöhte LDH-Aktivität durch die Stimulanzen und Naturstoffe

Zum Ausschluss toxischer Zellschädigungen durch Stimulanzen oder die verwendeten Naturstoffe wurde die Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) mit Hilfe des CytoTox-One™ Kits in Zellkulturüberständen von unstimulierten Zellen (Negativkontrolle) sowie in den Kulturüberständen von Zellen, welche mit den verschiedenen Naturstoffen und Stimulanzen sowie der Kombination aus Naturstoffen und Stimulanzen stimuliert wurden (Proben), quantifiziert. Zusätzlich dienten Zelllysate als Positivkontrolle. Die nachfolgende Abbildung (Abb. 14) zeigt für alle untersuchten Zelllinien die Ergebnisse dieser Untersuchung in Proben von N11-Zellen. Deutlich zu sehen ist eine starke LDH-Aktivität in dem als Positivkontrolle dienenden Zelllysat. Die drei untersuchten Negativkontrollen (frisches unkonditioniertes Medium, konditioniertes Medium sowie Medium mit DMSO) hingegen zeigen lediglich eine minimale LDH-Aktivität, gleichwohl der Kontakt des Mediums zu Zellen und der Zusatz von DMSO zu einem leichten Anstieg der LDH-Aktivität im Vergleich zu dem unkonditionierten Medium führen. Die gemessenen LDH-Aktivitäten nach Stimulation der Zellen mit den Stimulanzen LPS, PGN und Poly(I:C) und nach der Zugabe der verschiedenen Naturstoffe sowie den verschiedenen Kombinationen daraus, bewegen sich alle zwischen den beobachteten Negativkontrollen des frischen unkonditionierten Mediums und des konditionierten Mediums. Somit bewirkt keine der verwendeten Substanzen eine toxische Zellschädigung.

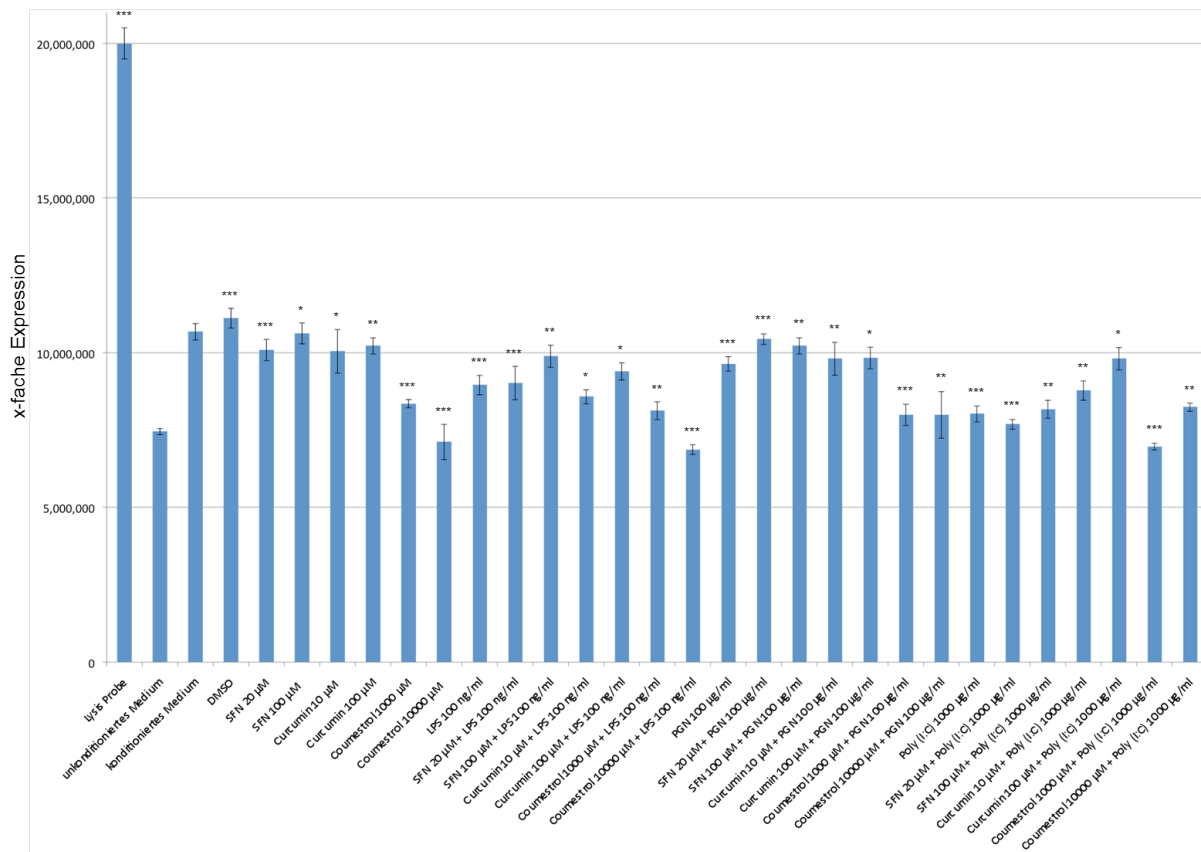


Abb. 14: LDH-Aktivität in Lysaten und Kulturüberständen stimulierter und unstimulierter N11-Zellen. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus einem Versuch mit drei unabhängigen Ansätzen. Die Signifikanz der LDH-Expressionsunterschiede ist wie folgt angegeben: * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$ (zweiseitiger Student t-Test).

5.3 Naturstoffe reduzieren die Expression proinflammatorischer Moleküle

Um eine mögliche antiinflammatorische Wirkung der zu untersuchenden Naturstoffe auf mikrogliale N11-Zellen zu untersuchen, wurden Zellen mit den TLR-Agonisten LPS, PGN und Poly(I:C) und den potenziell antiinflammatorischen Naturstoffen, einzeln und in Kombination, inkubiert und anschließend die Expression der *Toll-like* Rezeptorgene (TLR2, TLR3 und TLR4) und des proinflammatorischen Zytokins TNF- α mittels Real-Time PCR (qPCR) analysiert. Ziel dieser Untersuchung war die Identifizierung potentieller immunmodulatorischer Effekte der zu untersuchenden Naturstoffe. In diesem Zusammenhang wurden, zur Induktion von Entzündungsprozessen das Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglykan (PGN) sowie Poly(I:C) verwendet, da synthetische α -Synuklein Oligomere *in vitro* in unseren Untersuchungen keine proinflammatorischen Effekte zeigten (siehe Abschnitt 5.6.2).

5.3.1 Konzentrations-abhängige Hemmung der TNF- α -Expression durch die 3 Naturstoffe

Mit Hilfe von Real-Time PCR-Analysen wurde zunächst die Expression von TNF- α untersucht. Beispielhaft für die Zelllinie N11 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung in den nachfolgenden Abbildungen (Abb. 15, Abb. 16 und Abb. 17) dargestellt. Als Stimulanzen dienten dabei die bekannten Induktoren der TNF- α -Expression Lipopolysaccharid (LPS; Abb. 15), Peptidoglykan (PGN; Abb. 16) und Poly(I:C) (Abb. 17).

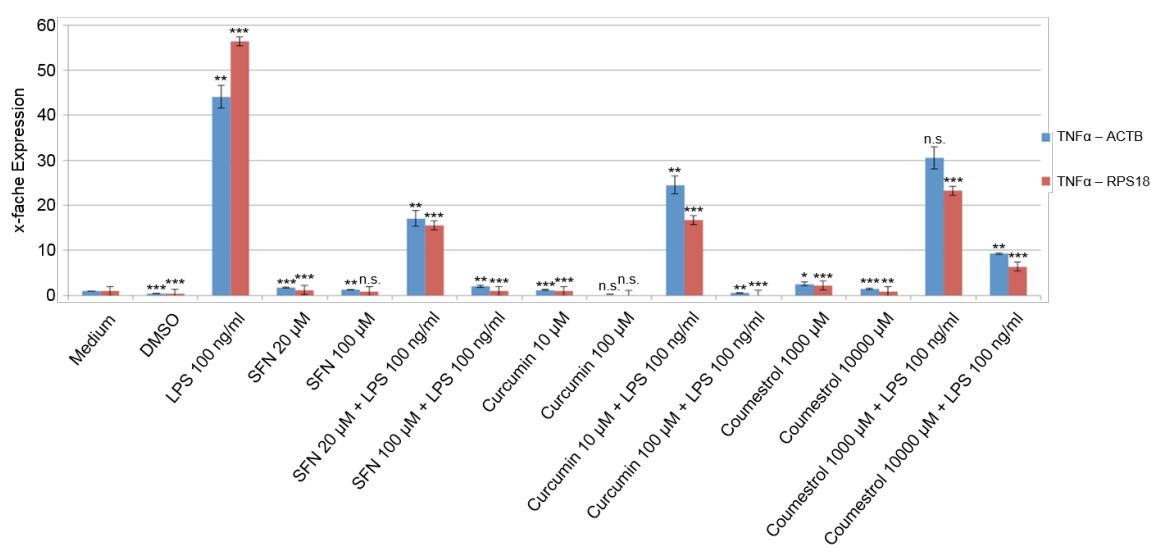


Abb. 15: Effekt der untersuchten Naturstoffe auf die LPS-vermittelte TNF- α -Expression in mikroglialen N11-Zellen in Relation zu den Haushaltsgenen Aktin- β (*Actb*, blau) und dem ribosomalen Protein S18 (*Rps18*, rot). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen. Die Signifikanz der Expressionsunterschiede ist wie folgt angegeben: n.s. $p \geq 0,1$, * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$ (zweiseitiger Student t-Test).

Im Vergleich zu unbehandelten N11-Zellen (Abb. 15, 16, 17, jeweils Medium und DMSO) führt die Stimulation mit LPS, PGN und Poly(I:C) zu einem Anstieg der TNF- α -Expression um den Faktor 45 (Abb. 15), 35 (Abb. 16) bzw. 30 (Abb. 17).

Im Gegensatz zum Anstieg der TNF- α -Expression mittels LPS, PGN und Poly(I:C) führt die Behandlung der N11-Zellen mit den untersuchten Naturstoffen Sulforaphan (SFN), Curcumin und Coumestrol zu keinem Anstieg der TNF- α -Expression. Der kombinierte Einsatz dieser Naturstoffe mit den oben erwähnten Induktoren der TNF- α -Expression führt zu einer verminderten TNF- α -Expression im Vergleich zu dem Effekt der Induktoren alleine. Des Weiteren zeigen alle verwendeten Naturstoffe einen Konzentrations-abhängigen Effekt auf die TNF- α -Expression, da höhere Konzentration zu einer stärkeren Reduktion der Expression führen.

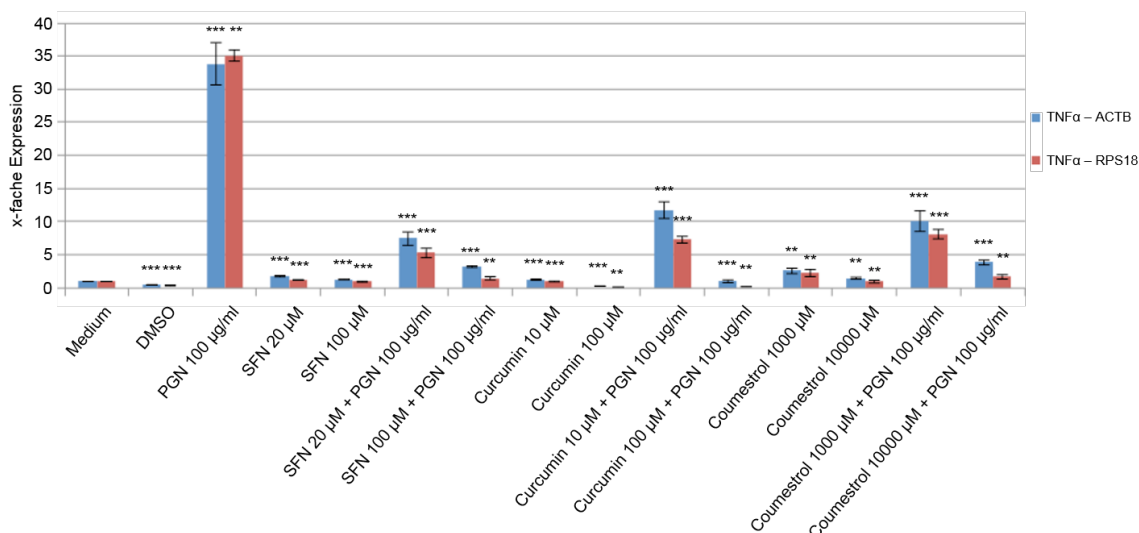


Abb. 16: Effekt der untersuchten Naturstoffe auf die PGN-vermittelte TNF- α -Expression in mikroglialen N11-Zellen in Relation zu den Haushaltsgenen Aktin- β (*Actb*, blau) und dem ribosomalen Protein S18 (*Rps18*, rot). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen. Die Signifikanz der Expressionsunterschiede ist wie folgt angegeben: * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$ (zweiseitiger Student t-Test).

Somit wirken alle untersuchten Naturstoffe reprimierend auf die LPS-, PGN- und Poly(I:C)-vermittelte Expression des proinflammatorischen Zytokins TNF- α . Hierbei fällt auch die Konzentrations-abhängige hemmende Wirkung der Naturstoffe auf. Die höhere Konzentration der Naturstoffe übt eine stärkere Wirkung auf die jeweilige Stimulanz LPS, PGN oder Poly(I:C) aus.

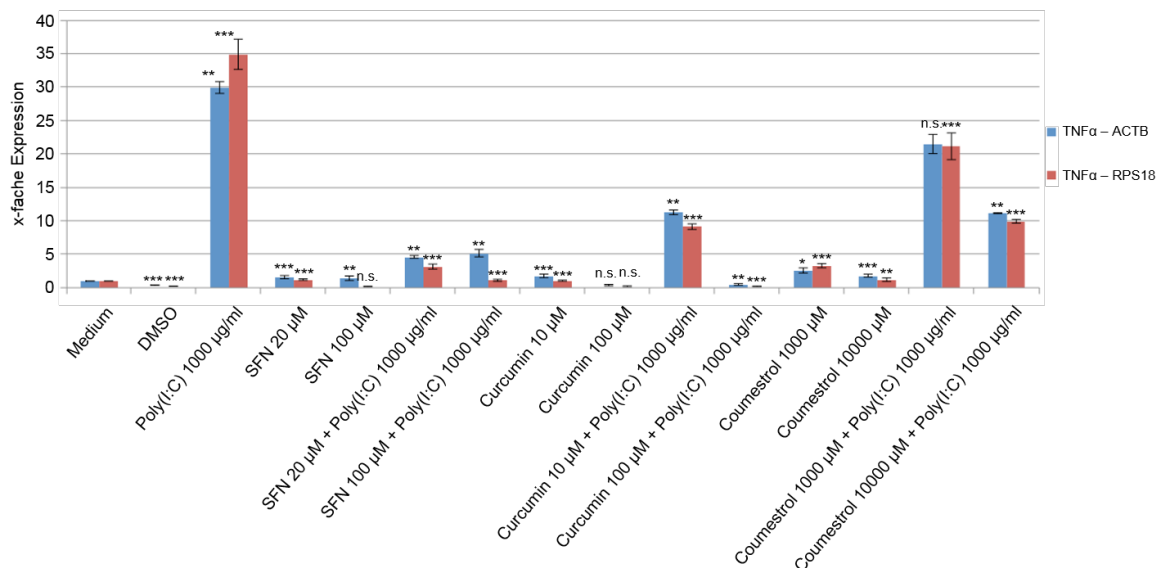


Abb. 17: Effekt der untersuchten Naturstoffe auf die Poly(I:C)-vermittelte TNF- α -Expression in mikroglialen N11-Zellen in Relation zu den Haushaltsgenen Aktin- β (*Actb*, blau) und dem ribosomalen Protein S18 (*Rps18*, rot). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen. Die Signifikanz der Expressionsunterschiede ist wie folgt angegeben: n.s. $p \geq 0,1$, * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$ (zweiseitiger Student t-Test).

5.3.2 Effekte der Naturstoffe auf TLR-Expressionprofile

Auch α -Synuklein vermittelt einen Teil seines Inflammationspotenzials über TLRs, deshalb wurde die Wirkung der verwendeten Naturstoffe auf die TLR-Expressionsprofile untersucht. Hierbei wurde der Effekt der Stimulation mit den Naturstoffen auf die Expression verschiedener *Toll-like* Rezeptorgene (TLR) mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR analysiert. Da die Rezeptoren TLR2, TLR3 und TLR4 bekannte Agonisten für PGN (Lin *et al.* 2010), Poly(I:C) (Zhou *et al.* 2013) und LPS (Lu *et al.* 2008) sind, wurde die Expression dieser Gene untersucht. Erneut wurden dazu Zellen der Mikroglia-Zelllinie N11 mit LPS, PGN bzw. Poly(I:C) stimuliert und anschließend mit bereits etablierten Konzentrationen der Naturstoffe behandelt.

5.3.3 Hemmung der PGN-vermittelten TLR2-Expression

Da mit α -Synuklein vorinkubierte Mikroglia eine erhöhte TLR2-Expression zeigen (Roodveldt *et al.* 2013), wurde in dieser Arbeit als Vermittler der Bakterien-assoziierten Immunantwort der Effekt der Stimulation von N11-Zellen mit Peptidoglykan (PGN) auf die Expression des *Toll-like* Rezeptors 2 (TLR2) untersucht.

Abbildung 18 zeigt, dass die Stimulation der N11-Zellen mit dem TLR2-Antagonisten Peptidoglykan (PGN) zu einem vierfachen Anstieg der TLR2-Expression führt. Als Negativkontrollen dienten Proben von Zellen, welche ausschließlich in Medium kultiviert wurden oder mit DMSO inkubiert wurden. Alle ermittelten Messwerte wurden gegen den Wert der Mediumkontrolle normalisiert. Die Behandlung der N11-Zellen mit den Naturstoffen Sulforaphan (SFN), Curcumin und Coumestrol führt stets zu einer Reduktion der PGN-vermittelten TLR2-Expression. Der kombinierte Einsatz von PGN und jeweils einem der drei Naturstoffe resultiert stets in einer Reduktion der TLR2-Expression unter das Niveau der unstimulierten Zellen. Bei dem hier beobachteten hemmenden Effekt der drei Naturstoffe auf die TLR2-Expression kann eine leichte Konzentrationsabhängigkeit beobachtet werden. Außerdem wurde auch untersucht, ob die Naturstoffe allein auch eine hemmende oder aktivierende Wirkung haben. Hier liegen alle Naturstoffe unter dem Wert der Mediumkontrolle.

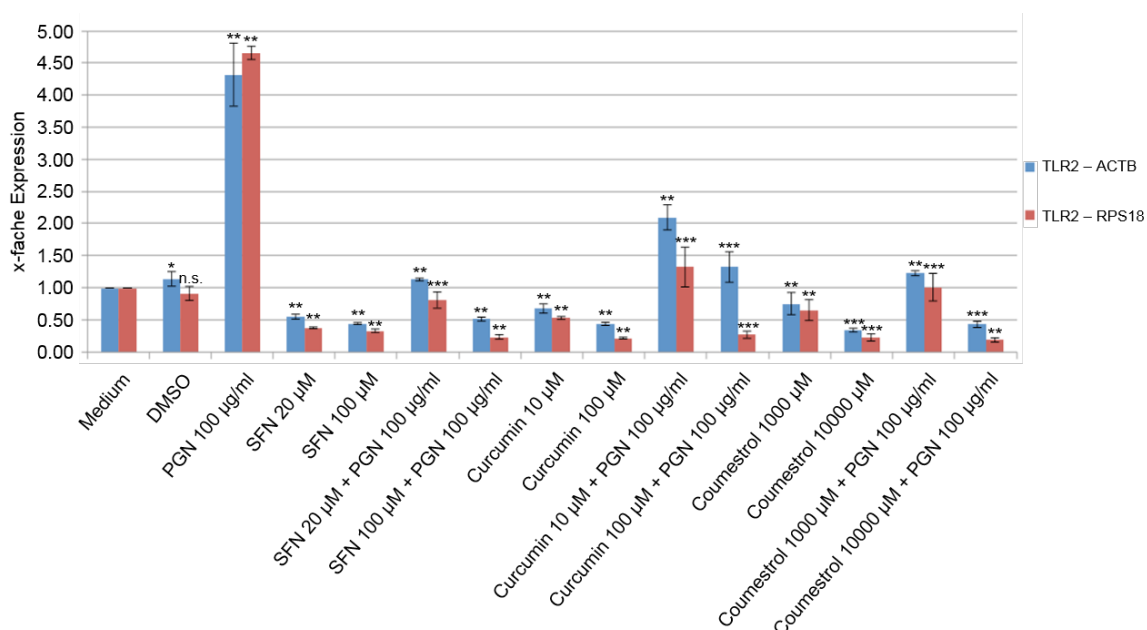


Abb. 18: Hemmung der PGN-vermittelten TLR2-Expression durch die untersuchten Naturstoffe in mikroglialen N11-Zellen in Relation zu den Haushaltsgenen Aktin- β (*Actb*, blau) und dem ribosomalen Protein S18 (*Rps18*, rot). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen. Die Signifikanz der Expressionsunterschiede ist wie folgt angegeben: * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$ (zweiseitiger Student t-Test).

5.3.4 Hemmung der Poly(I:C)-vermittelten TLR3-Expression

Da bereits gezeigt wurde, dass extrazelluläres α -Synuklein als PAMP in Mikroglia wirkt und die *Toll-like* Rezeptor 3 Expression erhöht (Beraud *et al.* 2011), wurde in dieser Arbeit die Expression des TLR3 nach Stimulation der N11-Zellen mit Poly(I:C) untersucht, da der TLR3 virale Pathogen-assoziierte molekulare Muster erkennt.

Wie Abbildung 19 zeigt, führt die Stimulation der N11-Zellen mit dem TLR3-Antagonisten Poly(I:C) zu einem sechsfachen Expressionsanstieg. Als Negativkontrolle dienten zum einen Proben von Zellen, welche ausschließlich in Medium kultiviert wurden. Alle anderen Messwerte wurden gegen diesen Wert normalisiert. Als eine weitere Negativkontrolle diente eine Probe aus Zellen, die mit DMSO inkubiert wurden. Die Stimulation der N11-Zellen mit den Naturstoffen Sulforaphan (SFN), Curcumin und Coumestrol führt stets zu einer Reduktion der TLR3-Expression. Der kombinierte Einsatz von Poly(I:C) und jeweils einem der drei Naturstoffe resultiert stets in einer Reduktion der Poly(I:C)-induzierten TLR3-Expression auf das Niveau der unstimulierten Zellen. Auch in Bezug auf die TLR3-Expression kann ein leichter, konzentrationsabhängiger Effekt der Naturstoffe beobachtet werden. Somit zeigen alle untersuchten Naturstoffe einen hemmenden Effekt auf die Poly(I:C)-abhängige TLR3-Expression. Die Naturstoffe alleine zeigen

keine Hochregulation in der TLR3-Expression, sie befinden sich alle im Bereich der Mediumkontrolle.

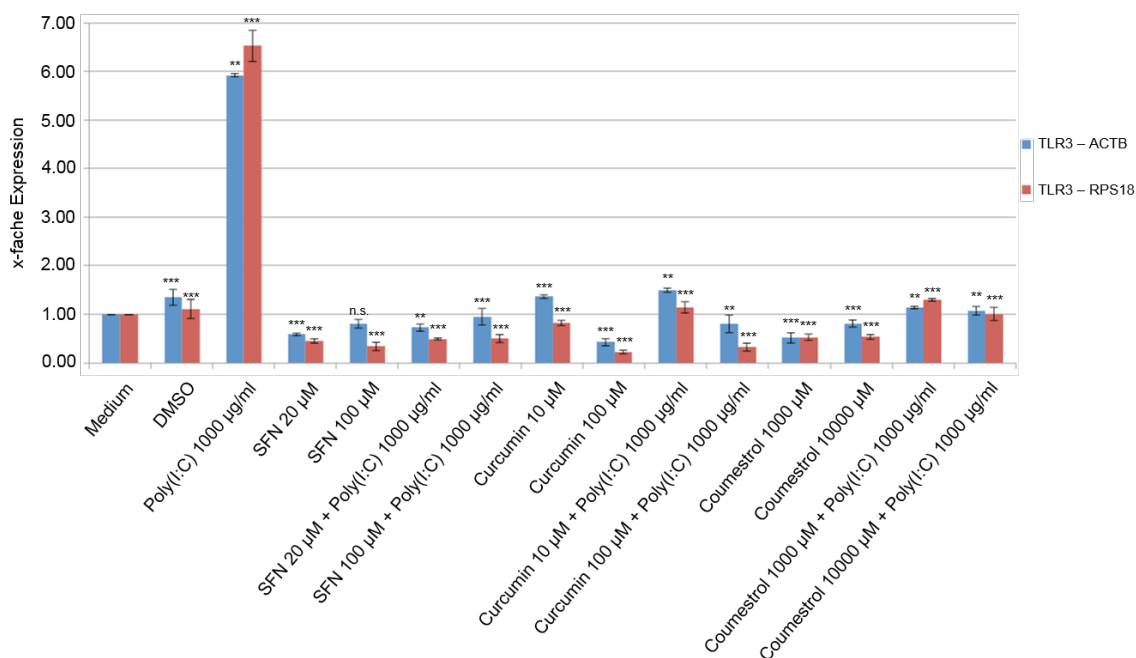


Abb. 19: Hemmung der Poly(I:C)-vermittelten TLR3-Expression durch Naturstoffe in mikroglialen N11-Zellen in Relation zu den Haushaltsgenen Aktin- β (*Actb*, blau) und dem ribosomalen Protein S18 (*Rps18*, rot). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen. Die Signifikanz der Expressionsunterschiede ist wie folgt angegeben: n.s. $p \geq 0,1$, * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$ (zweiseitiger Student t-Test).

5.3.5 Hemmung der LPS-vermittelten TLR4-Expression

Schließlich wurde die Expression des *Toll-like* Rezeptor 4 (TLR4), der schon als Mediator der Mikroglia-Aktivierung (Watson *et al.* 2012) bekannt ist und insbesondere das Lipopolysaccharid (LPS) erkennt, in Bezug auf die verschiedenen Naturstoffe untersucht. Nachfolgend sind die Ergebnisse der entsprechenden qPCR-Analyse dargestellt (Abb. 20).

Wie in den vorangegangenen Beispielen, wurden auch die ermittelten Genexpressionswerte des TLR4 Gens gegen Proben von Zellen, welche ausschließlich in unkonditioniertem Medium kultiviert wurden, normalisiert. Die als Negativkontrolle dienende Probe von DMSO-behandelten Zellen zeigt eine geringfügig reduzierte TLR4-Expression (Abb. 20). Im Gegensatz zur Induktion der *Toll-like* Rezeptoren TLR2 und TLR3 durch die jeweiligen Rezeptorantagonisten führt die Behandlung der N11-Zellen mit LPS zu einer reduzierten TLR4-Expression im Vergleich zur Mediumkontrolle. Auch die Behandlung der Zellen mit den drei Naturstoffen führt zu einer reduzierten TLR4-Expression. Dieser liegt jedoch über

dem Wert der für die LPS-Behandlung ermittelten Expression. Der kombinierte Einsatz von LPS und jeweils einem der drei Naturstoffe führt zu Expressionswerten für TLR4, welche sich zwischen denen für die jeweils einzelne Behandlung der Zellen mit LPS oder einem der Naturstoffe bewegen. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen, führen die drei Naturstoffe zwar zu einer reduzierten TLR4-Expression, doch konnte kein LPS-vermittelter Anstieg der TLR4-Expression beobachtet werden.

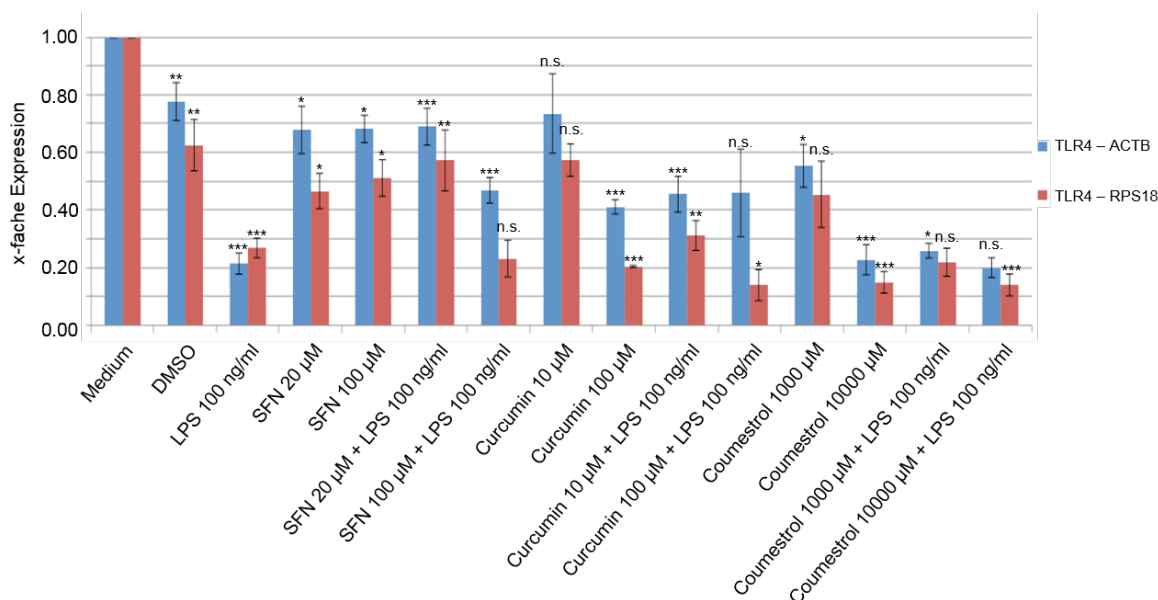


Abb. 20: Effekt der drei Naturstoffe auf die LPS-vermittelte TLR4-Expression in mikroglialen N11-Zellen in Relation zu den Haushaltsgenen Aktin- β (*Actb*, blau) und dem ribosomalen Protein S18 (*Rps18*, rot). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen. Die Signifikanz der Expressionsunterschiede ist wie folgt angegeben: n.s. $p \geq 0,1$, * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$ (zweiseitiger Student t-Test).

5.4 Hemmung der LPS-, PGN- und Poly(I:C)-vermittelten iNOS-Expression

Als Bestandteil des Schutzes des Zentralnervensystems vor mikrobiologischen Erregern können Mikrogliazellen über die iNOS-vermittelte Produktion von Stickoxid (NO) diese Erreger bekämpfen. Da die Expression von iNOS auch durch Pathogen-assoziierte molekulare Muster (z.B. LPS) induziert werden kann, wodurch diese reaktive Stickstoffspezies (RNS) erzeugt wird, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch ein möglicher Effekt der Naturstoffe auf die iNOS-Expression untersucht.

5.4.1 Hemmung der iNOS-Expression durch die 3 Naturstoffe

Im Vergleich zu unbehandelten N11-Zellen (konditioniertes Medium) führt die Stimulation mit LPS, PGN und Poly(I:C) zu einem Anstieg der iNOS-Expression um den Faktor 1000, 300 bzw. 800 (Abb. 21, 22 und 23). Als Negativkontrolle dienen

zum einen Proben von Zellen, welche ausschließlich in Medium kultiviert wurden. Alle anderen Messwerte wurden gegen diesen Wert normalisiert. Als eine weitere Negativkontrolle diente eine Probe aus Zellen, die mit DMSO inkubiert wurden.

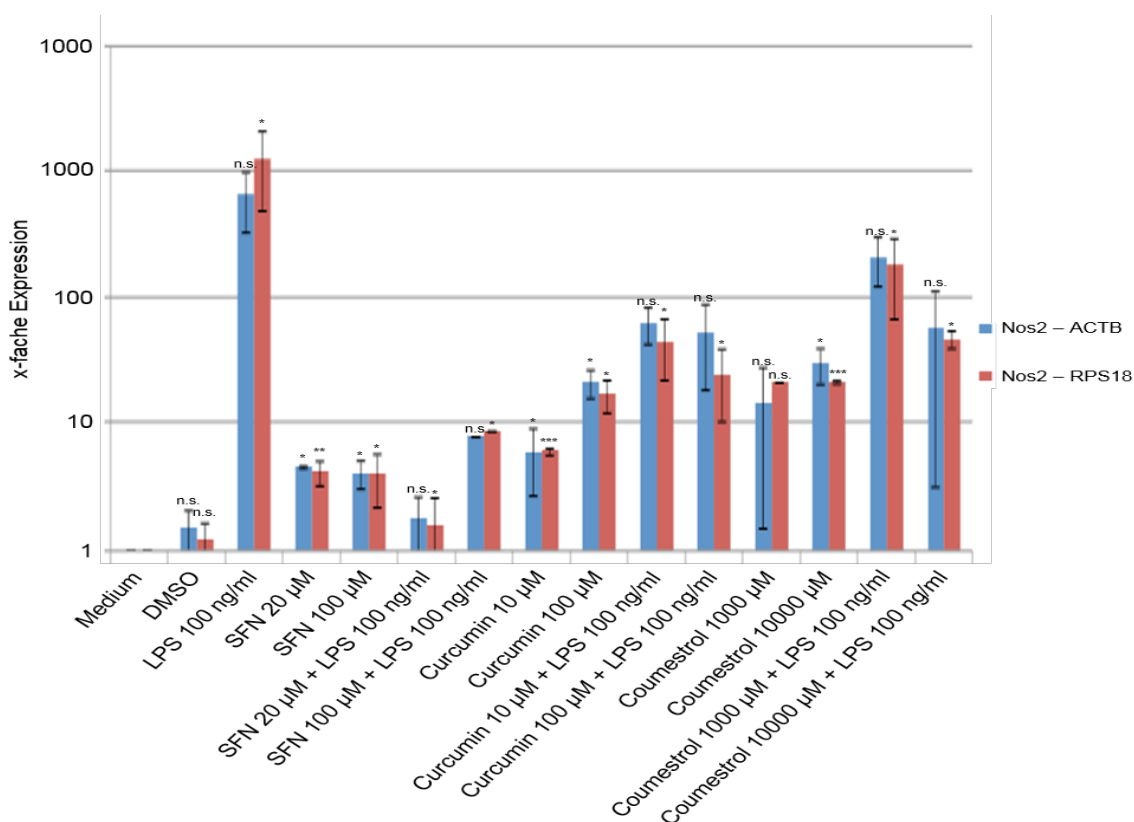


Abb. 21: Effekt der untersuchten Naturstoffe auf die LPS-vermittelte iNOS-Expression in Relation zu den Haushaltsgenen Aktin- β (*Actb*, blau) und dem ribosomalen Protein S18 (*Rps18*, rot) in N11-Zellen. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen. Die Signifikanz der Expressionsunterschiede ist wie folgt angegeben: n.s. $p \geq 0,1$, * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$ (zweiseitiger Student t-Test).

Mit Hilfe von Real-Time PCR-Analysen wurde die Expression von iNOS untersucht. Für die Zelllinie N11 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung in den Abbildungen (Abb. 21, Abb. 22 und Abb. 23) dargestellt. Als Stimulanz dienten dabei die bekannten Induktoren der iNOS-Expression Lipopolysaccharid (LPS; Abb. 21), Peptidoglykan (PGN; Abb. 22) und Poly(I:C) (Abb. 23). Die Behandlung der N11-Zellen mit den untersuchten Naturstoffen Sulforaphan (SFN), Curcumin und Coumestrol alleine führte bereits zu einem geringen Anstieg der iNOS-Expression. Der Kombinierte Einsatz dieser Naturstoffe mit den oben erwähnten Induktoren der iNOS-Expression führt zu einer verminderten iNOS-Expression im Vergleich zu dem Effekt der Induktoren alleine. Des Weiteren zeigen alle verwendeten Naturstoffe einen Konzentrations-abhängigen Effekt auf die iNOS-Expression, da höhere Konzentration zu einer stärkeren Reduktion der Expression führen.

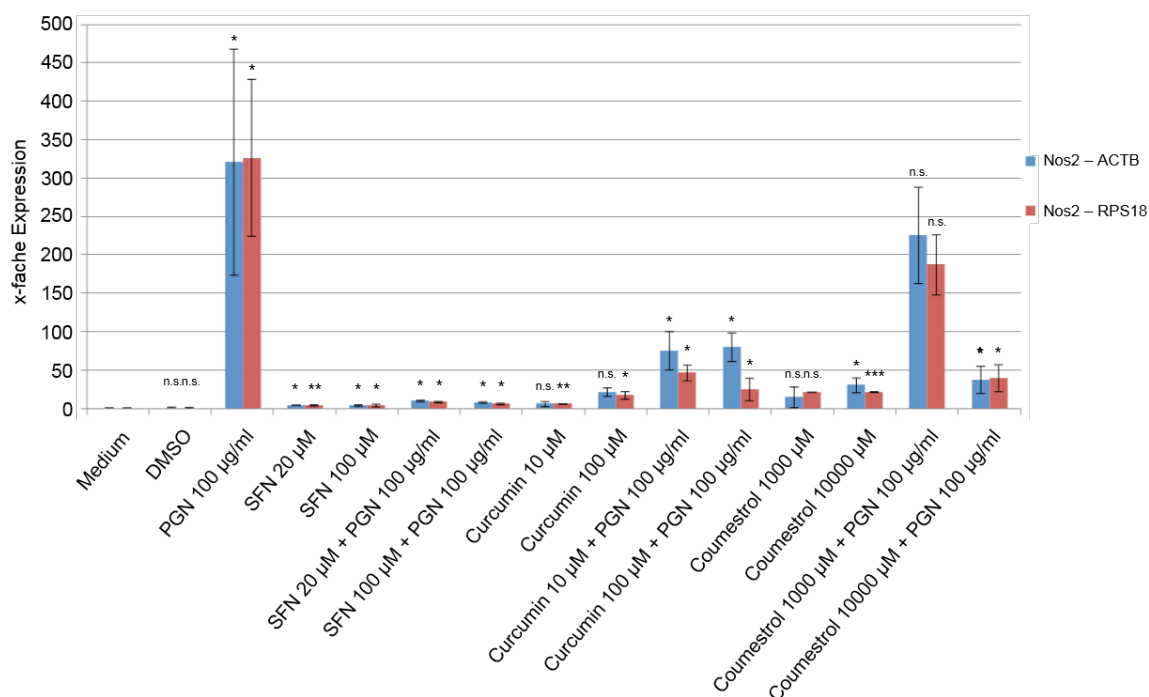


Abb. 22: Effekt der untersuchten Naturstoffe auf die PGN-vermittelte iNOS-Expression in Relation zu den Haushaltsgenen Aktin- β (*Actb*, blau) und dem ribosomalen Protein S18 (*Rps18*, rot) in N11-Zellen. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen. Die Signifikanz der Expressionsunterschied ist wie folgt angegeben: n.s. $p \geq 0,1$, * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$ (zweiseitiger Student t-Test).

Auch die Stimulation der N11-Zellen mit Peptidoglykan führt zu einem massiven Anstieg der iNOS-Expression im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu führt die Behandlung der N11-Zellen mit den untersuchten Naturstoffen Sulforaphan (SFN), Curcumin und Coumestrol nur zu einem geringen Anstieg der iNOS-Expression. Der kombinierte Einsatz dieser Naturstoffe mit dem oben erwähnten Induktor der iNOS-Expression führt zu einer verminderten iNOS-Expression im Vergleich zu dem Effekt der Induktoren alleine. Des Weiteren zeigen alle verwendeten Naturstoffe einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die iNOS-Expression, da höhere Konzentration zu einer stärkeren Reduktion der Expression führen.

Die Stimulation der N11-Zellen mit Poly(I:C) führt auch zu einem hohen Anstieg der iNOS-Expression im Vergleich zur Mediumkontrolle (Abb. 23). Die untersuchten Naturstoffe Sulforaphan (SFN), Curcumin und Coumestrol führen dagegen nur zu einem geringen Anstieg der iNOS-Expression. Die Kombination aus Poly(I:C) und den jeweiligen Naturstoffen zeigen eine Konzentrations-abhängige Hemmung der induzierten iNOS-Expression.

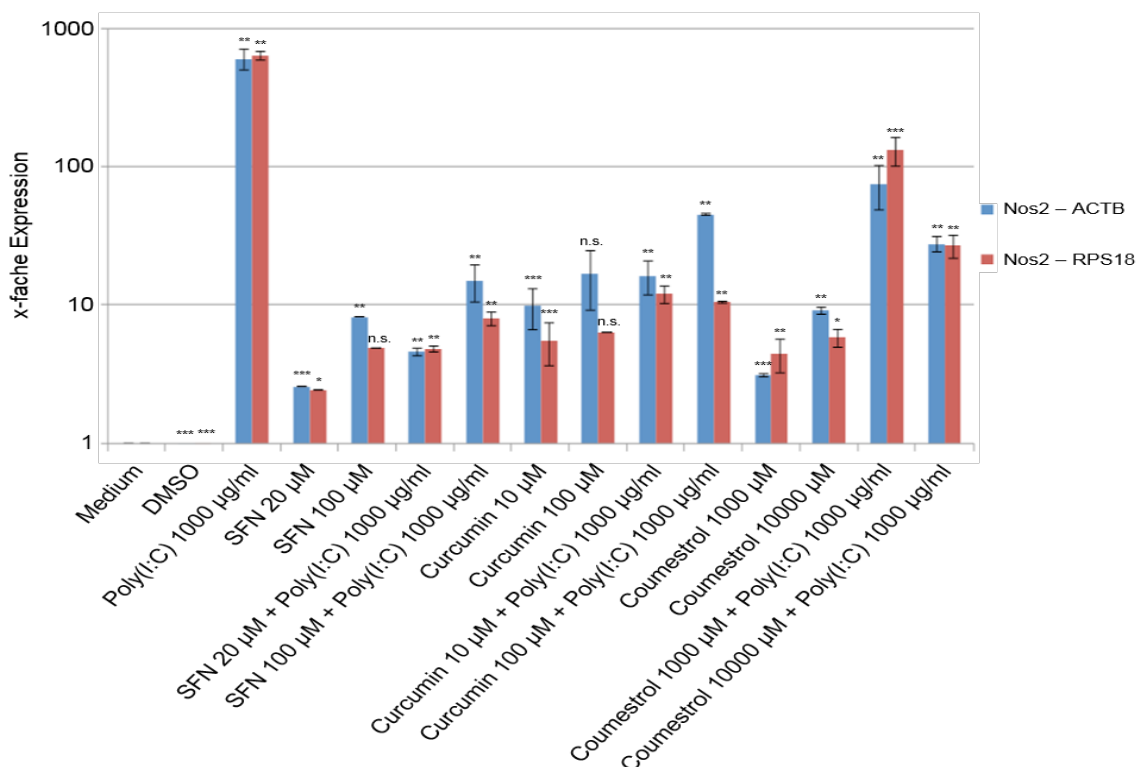


Abb. 23: Effekt der untersuchten Naturstoffe auf die Poly(I:C)-vermittelte iNOS-Expression in Relation zu den Haushaltsgenen Aktin- β (*Actb*, blau) und dem ribosomalen Protein S18 (*Rps18*, rot) in N11-Zellen. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen. Die Signifikanz der Expressionsunterschiede ist wie folgt angegeben: n.s. $p \geq 0,1$, * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$ (zweiseitiger Student t-Test).

Somit wirken alle untersuchten Naturstoffe reprimierend auf die LPS-, PGN- und Poly(I:C)-vermittelte Expression der iNOS.

5.5 Verminderte nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B

Ein bekannter Modulator der Expression verschiedener immunmodulatorischer Gene ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B. Um mögliche Auswirkungen der Behandlung von mikroglialen N11-Zellen mit den zu untersuchenden Naturstoffen auf die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors zu untersuchen, wurden diese Zellen mit den bereits bekannten Immunstimulanzen LPS, PGN und Poly(I:C) sowie mit den Naturstoffen Sulforaphan, Curcumin und Coumestrol und in Kombination behandelt und die nukleäre Translokation von NF- κ B anschließend fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet (Abb. 24, Abb. 25, Abb. 26 und Abb. 27). Da die Aktivierung von NF- κ B als ausschlaggebend für die Entstehung von Entzündungen gilt, wurden in diesem Versuch die hemmende Wirkung der Naturstoffe auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B untersucht. Die Aktivierung von NF- κ B durch die Abspaltung des inhibierenden I κ B-Proteins geht dabei mit einer Translokation des NF- κ B in den Zellkern einher, sodass

die Translokation von NF- κ B an sich als Surrogatmarker für dessen Aktivierung angesehen werden kann.

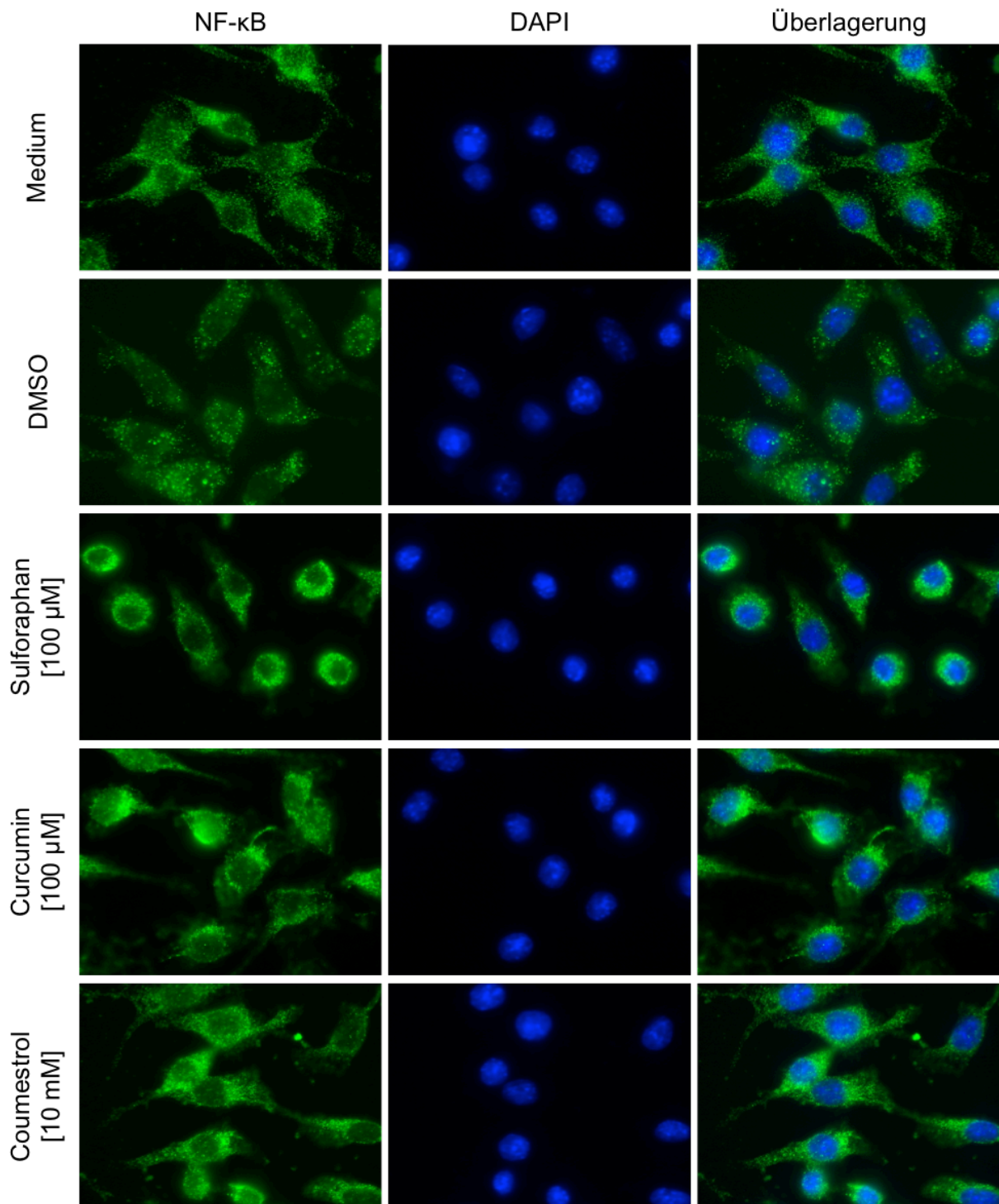


Abb. 24: Zelluläre Lokalisation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in mikroglialen N11-Zellen ohne weitere Stimulation sowie nach Behandlung mit DMSO und den drei Naturstoffen Sulforaphan, Coumestrol und Curcumin.

Wie in Abbildung 24 dargestellt, führte eine Behandlung der mikroglialen N11-Zellen mit den drei untersuchten Naturstoffen Sulforaphan, Curcumin und Coumestrol zu

keinem Anstieg der Kerntranslokation von NF- κ B im Vergleich zu N11-Zellen, welche lediglich in Medium oder in Anwesenheit von DMSO kultiviert wurden.

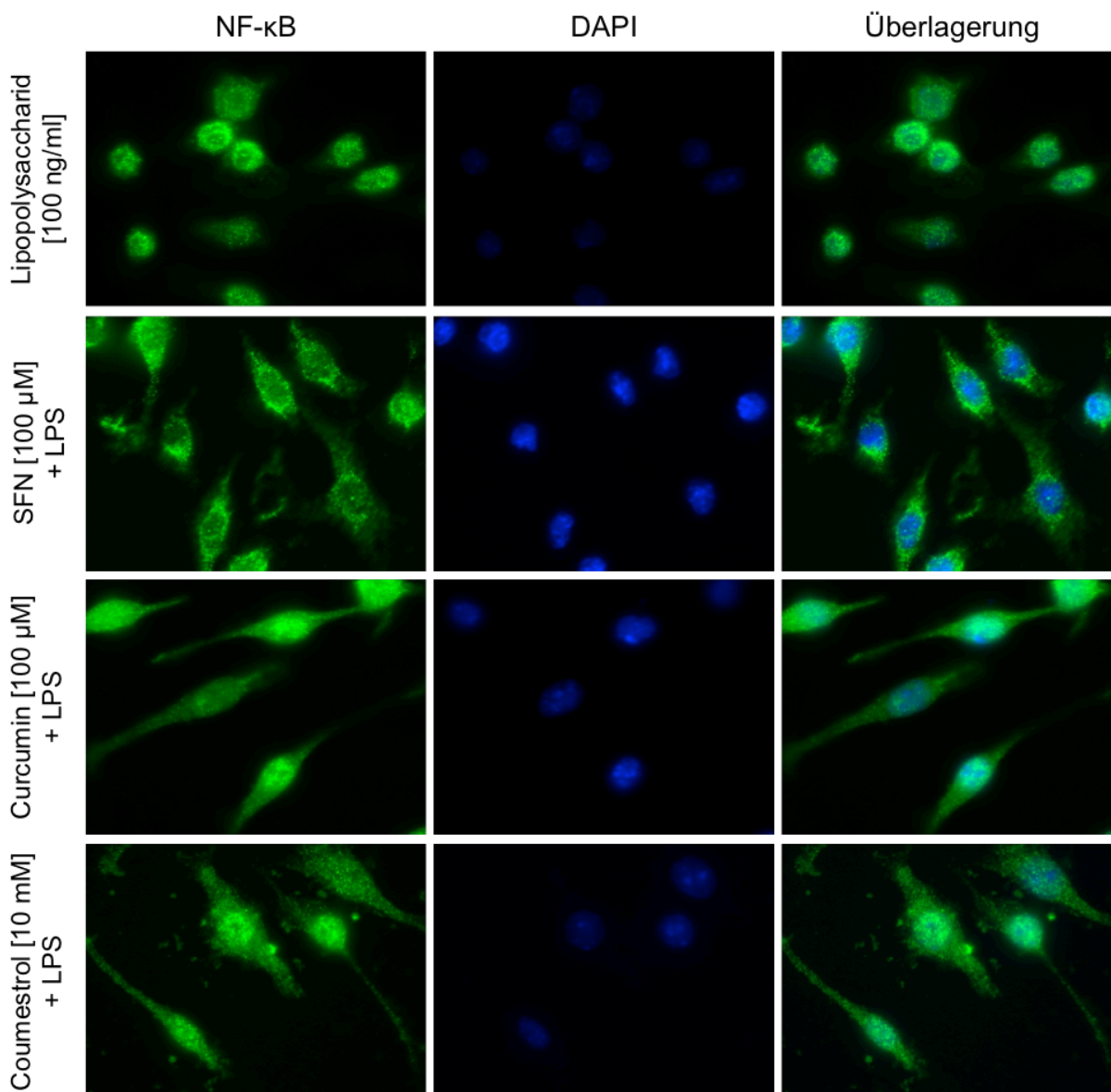


Abb. 25: Zelluläre Lokalisation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in mikroglialen N11-Zellen nach Behandlung mit dem Lipopolysaccharid (LPS) sowie nach kombinierter Behandlung mit LPS und jeweils einem der untersuchten Naturstoffe.

Nach Inkubation der N11-Zellen mit dem Lipopolysaccharid (LPS) liegt hingegen eine rein nukleäre Lokalisierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B vor. Diese LPS-vermittelte Translokation kann durch Sulforaphan nahezu vollständig umgekehrt werden (Abb. 25; SFN). Die Behandlung der LPS-behandelten Zellen mit Curcumin oder Coumestrol resultiert in einer überwiegend zytoplasmatischen Lokalisierung von NF- κ B. Ein Teil des NF- κ B-Gehaltes verbleibt jedoch im Nukleus, sodass die LPS-vermittelte Aktivierung von NF- κ B teilweise revertiert wird.

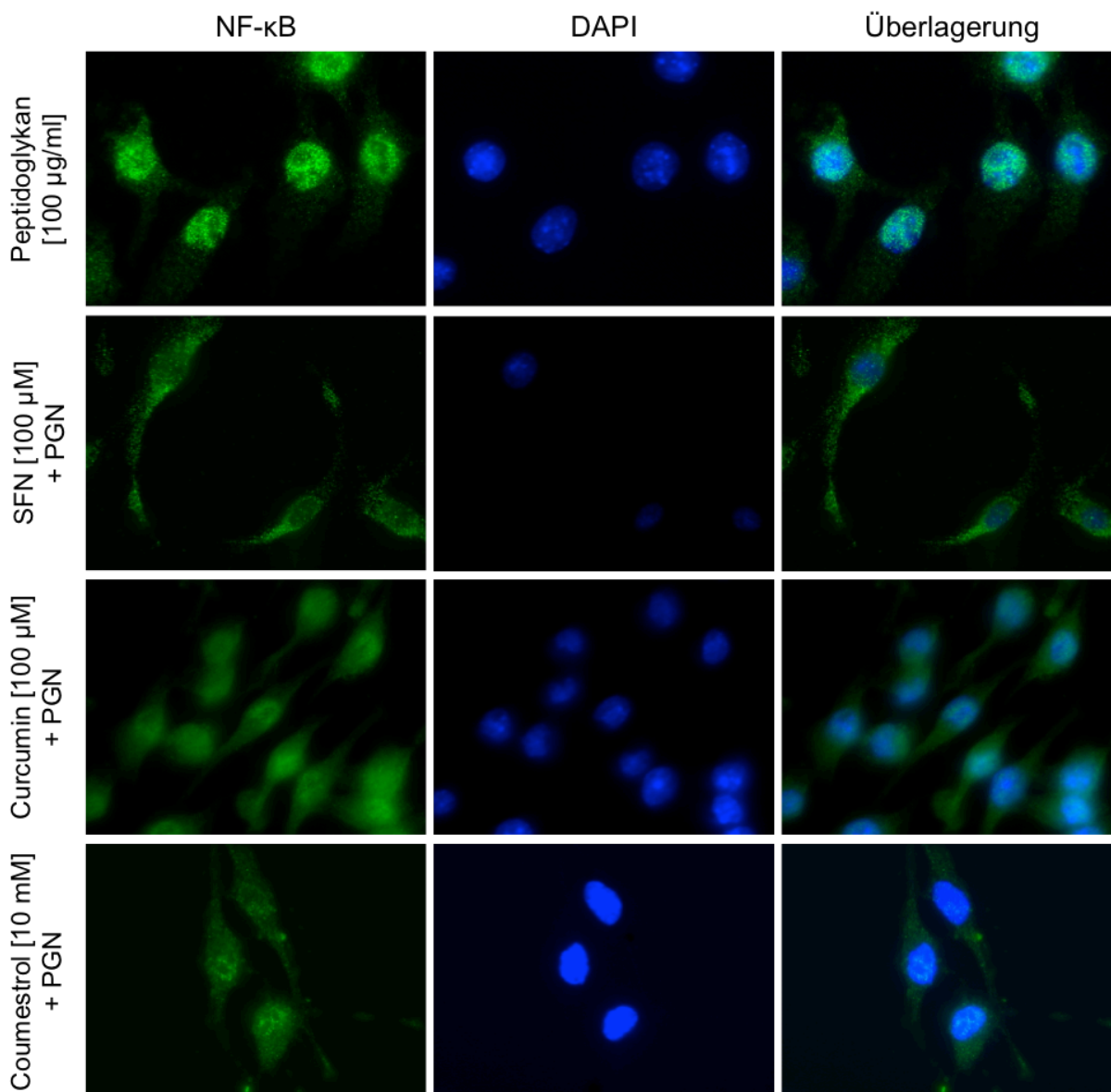


Abb. 26: Zelluläre Lokalisation des Transkriptionsfaktors NF-κB in mikroglialen N11-Zellen nach Behandlung mit dem Peptidoglykan (PGN) sowie nach kombinierter Behandlung mit PGN und jeweils einem der untersuchten Naturstoffe.

Auch die Behandlung der N11-Zellen mit dem Peptidoglykan (PGN) führt zu einer reinen nukleären Lokalisation des Transkriptionsfaktors NF-κB. Wie zuvor bei der LPS-vermittelten Translokation beobachtet, so kann auch der PGN-vermittelte Effekt auf die NF-κB-Lokalisation durch Sulforaphan nahezu vollständig umgekehrt werden (Abb. 26; SFN). Die Behandlung der PGN-behandelten Zellen mit Curcumin oder Coumestrol resultiert in einer überwiegend zytoplasmatischen Lokalisierung von NF-κB, während ein Teil des NF-κB-Gehaltes jedoch im Nukleus verbleibt, sodass die PGN-vermittelte Aktivierung von NF-κB teilweise revertiert wird.

Die Inkubation von N11-Zellen mit Poly(I:C) führt ebenfalls zu einer starken Aktivierung von NF-κB und dessen Translokation in den Nukleus (Abb. 27). Dieser

Effekt kann durch die Ko-Stimulation mit Sulforaphan größtenteils umgekehrt werden, auch wenn in diesem Fall etwas mehr NF- κ B im Nukleus verbleibt, als im Falle der LPS- und PGN-vermittelten Translokation. Der Einsatz von Coumestrol oder Curcumin reduziert die Poly(I:C)-vermittelte NF- κ B-Translokation teilweise. Dieser Effekt fällt jedoch deutlich geringer aus, als im Falle der LPS- und PGN-vermittelten NF- κ B-Translokation.

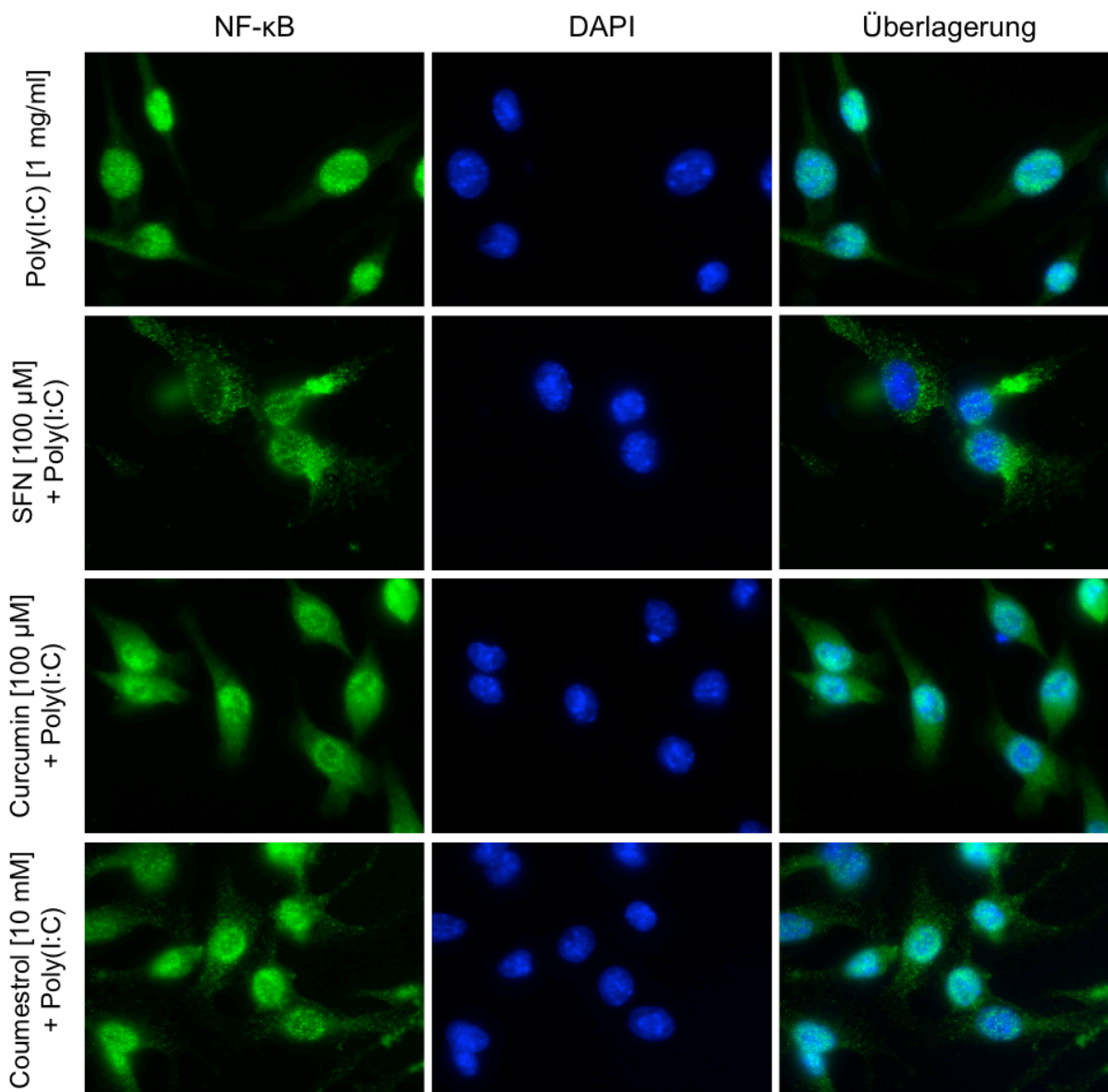


Abb. 27: Zelluläre Lokalisation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in mikroglialen N11-Zellen nach Behandlung mit Poly(I:C) sowie nach kombinierter Behandlung mit Poly(I:C) und jeweils einem der untersuchten Naturstoffe.

Somit zeigt der Naturstoff Sulforaphan den stärksten Effekt auf die Revertierung der LPS-, PGN- und Poly(I:C)-vermittelten Kerntranslokation von NF- κ B, da nach Behandlung der Zellen mit dieser Substanz nahezu kein nukleäres NF- κ B mehr zu beobachten ist. Auch Coumestrol und Curcumin reduzieren die LPS-, PGN- und

Poly(I:C)-vermittelte, nukleäre Lokalisation von NF- κ B, auch wenn dieser Effekt geringer ausfällt als im Falle von Sulforaphan. Generell fällt die antiinflammatorische Wirkung dieser Naturstoffe auf die Poly(I:C)-vermittelte NF- κ B Aktivierung jedoch am geringsten aus.

5.6 Synthese von oligomerem α -Synuklein

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, mögliche antiinflammatorische Effekte der Naturstoffe auf mikrogliale Zellen zu untersuchen, die mit oligomeren und aggregiertem α -Synuklein stimuliert wurden. Dazu wurde oligomeres α -Synuklein aus kommerziell erhältlichen α -Synuklein Monomeren hergestellt und auf seine proinflammatorischen Eigenschaften hin untersucht. Kommerziell erhältliches α -Synuklein wurde verwendet, da das von uns rekombinant hergestellte α -Synuklein beträchtliche Mengen Endotoxin enthielt, welches unabhängig vom α -Synuklein eine Mikrogliaaktivierung verursacht. Mit Hilfe eines kommerziellen Endotoxintests (vgl. 4.1.4) wurde dabei überprüft, dass das kommerziell erhältliche α -Synuklein frei von Endotoxinen (z.B. LPS) ist.

5.6.1 Anreicherung von oligomerem α -Synuklein

Die zunehmende Bildung von aggregiertem α -Synuklein beim Rühren bei 37 °C wurde dabei indirekt mit Hilfe eines Thioflavin-T-Tests beobachtet. Thioflavin-T bindet dabei an Amyloidfibrillen, wodurch eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von Thioflavin-T induziert wird, wodurch sich die α -Synuklein Aggregate quantifizieren lassen (Naiki *et al.* 1989). Um Aussagen über die Bildung von α -Synuklein Aggregaten treffen zu können, wurde die Fluoreszenzemission bei einer Wellenlänge von 590 nm nach vorangegangener Anregung bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen. Ziel war dabei die Anreicherung von α -Synuklein Oligomeren. Laut Naiki und Kollegen (Naiki *et al.* 1989) geht die Formation von Oligomeren mit dem initialen Anstieg der Thioflavin-T Absorption einher, sodass die Aggregation zum Zeitpunkt dieses Anstiegs gestoppt wurde.

Wie in Abbildung 28 deutlich sichtbar, unterschied sich der zeitliche Verlauf der Thioflavin-T Fluoreszenz-Zunahme, selbst bei gleichen Ausgangskonzentrationen von α -Synuklein in unseren Versuchsansätzen, wodurch die standardisierte Anreicherung von α -Synuklein Oligomeren erschwert wird. Dennoch erfolgt die

Anreicherung in einem Zeitraum von 30 bis 40 Stunden nach Ansetzen der Aggregationsreaktion.

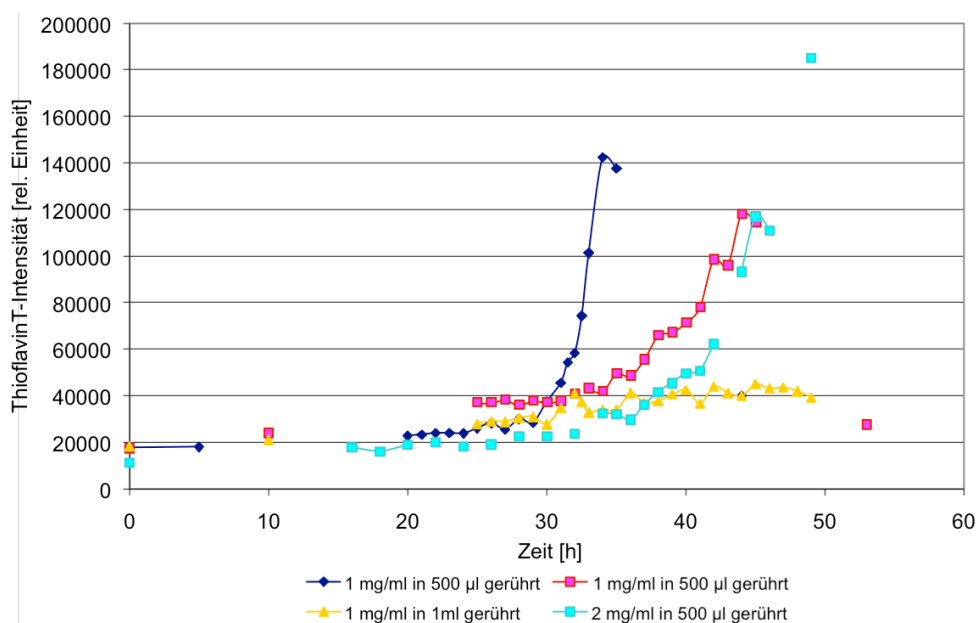


Abb. 28: Thioflavin-T-Test zur Überprüfung der *in vitro* Oligomerisierung von monomerem α -Synuklein. Vierfacher Durchgang der Herstellung von α -Synuklein Aggregaten über mehrere Stunden durch Rühren.

5.6.2 Keine *in vitro* Inflammation durch α -Synuklein Oligomere

Von Wilms und Kollegen konnte gezeigt werden, dass protofibrilläres α -Synuklein Zellen des Immunsystems, vor allem Mikroglia aktivieren kann (Wilms *et al.* 2009). Daher wurden in dieser Arbeit zunächst primäre Mikrogliazellen aus Ratten und später N11-Zellen mit dem toxischen, Oligomer-angereicherten α -Synuklein (vgl. 5.6.1) inkubiert und auf proinflammatorische Effekte durch Betrachtung der Expression von TNF- α mittels Real-Time PCR untersucht.

Während in unserem System LPS zu einem starken Anstieg der Expression von TNF- α führt, kann für die Behandlung der untersuchten Zellen mit monomerem und Oligomer-angereichertem α -Synuklein lediglich ein minimaler Anstieg der TNF- α -Expression beobachtet werden. Zum Teil bewirkt dabei das monomere α -Synuklein einen stärkeren Expressionsanstieg als die verwendeten Oligomere (Abb. 29). Somit haben die Präparationen von monomerem und oligomerem α -Synuklein *in vitro* allenfalls eine sehr geringe proinflammatorische Wirkung auf primäre Mikrogliazellen aus der Ratte. Das gleiche Ergebnis konnte auch im Falle der Verwendung von N11-Zellen beobachtet werden.

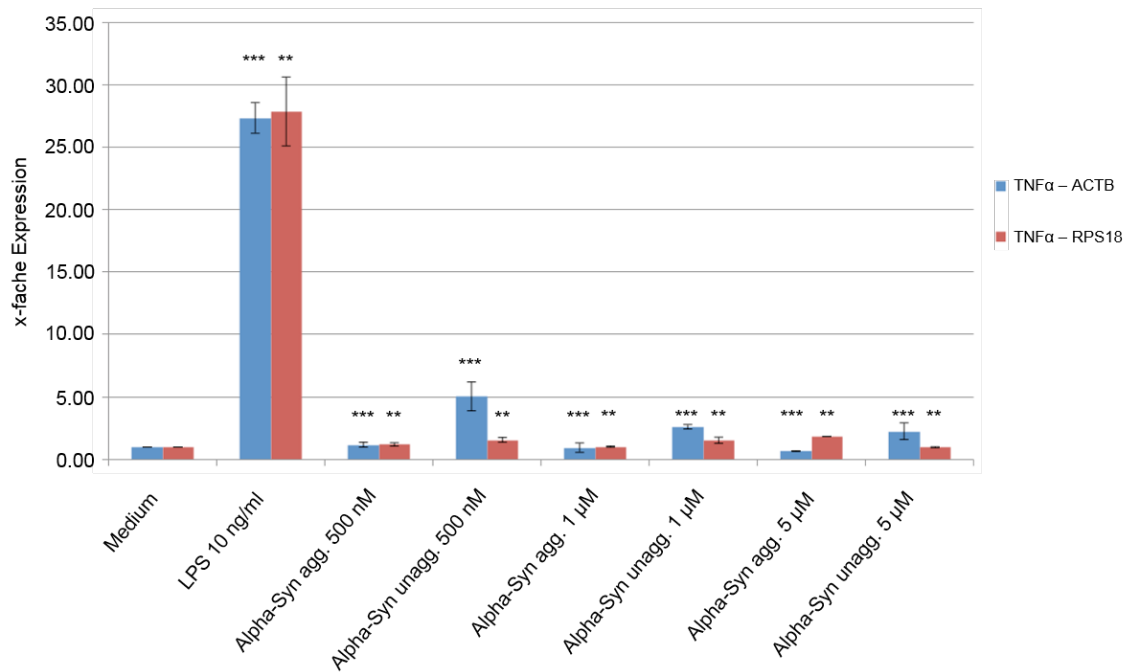


Abb. 29: Effekt von Lipopolysaccharid (LPS), monomerem (unagg) und oligomerem (agg) α -Synuklein (Alpha-Syn) auf die Expression des Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) in Relation zu den Haushaltsgenen Aktin- β (*Actb*, blau) und dem ribosomalen Protein S18 (*Rps18*, rot) in primären Mikrogliazellen aus Ratten. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen. Die Signifikanz der Expressionsunterschiede ist wie folgt angegeben: * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$ (zweiseitiger Student t-Test).

6 Diskussion

Neurodegeneration, das heißt die progressive Dysfunktion und der Verlust von Neuronen im ZNS, ist die Hauptursache von kognitiven und motorischen Störungen. Eine besonders bekannte neurodegenerative Erkrankung stellt dabei die Parkinson-Erkrankung dar. Auch wenn seine genaue Rolle bei dieser Erkrankung bisher nicht identifiziert werden konnte, so wurde in der Vergangenheit besonders ein Protein, das α -Synuklein, als ursächlich für die Parkinson-Erkrankung beschrieben (Uversky und Eliezer 2009). Synukleinopathien sind Krankheiten, deren pathologisches Kernmerkmal unlösliche Aggregate des fehlgefalteten Proteins α -Synuklein im Gehirn sind und bei denen man deshalb vermutet, dass α -Synuklein eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung spielt (Houlden und Singleton 2012).

Auch wenn die funktionellen Effekte der Aggregation von α -Synuklein nicht abschließend geklärt sind, so führen diese Aggregate doch zu Dysfunktionen der betroffenen Nervenzellen, was schließlich zu deren Zelltod und somit zur Neurodegeneration führt (Lashuel *et al.* 2013). *In vivo* ist der neurodegenerative Effekt der Aggregation von fehlgefaltetem α -Synuklein auf das Gehirn in dessen proinflammatorischer Wirkung auf das zerebrale Nervengewebe und der damit verbundenen angeborenen Immunantwort durch die Aktivierung von Mikrogliazellen und der Stimulation der Expression von *Toll-like* Rezeptoren und Zytokinen begründet (Wilms *et al.* 2009, Beraud und Maguire-Zeiss 2012). Antiinflammatorische und neuroprotektive Wirkungen auf die α -Synuklein-vermittelte Inflammation konnten durch Antikörper sowie verschiedener Zytokine und Chemokine, welche durch B- und T-Zellen des adaptiven Immunsystems freigesetzt werden, beobachtet werden. Substanzen, welche antiinflammatorisch auf die Parkinson-assoziierte Neuroinflammation wirken, könnten somit zu einer erfolgreichen Therapientwicklung und zur Verbesserung der Lebensqualität betroffener Patienten beitragen (Amor *et al.* 2014). In der Vergangenheit konnten solche antiinflammatorischen Effekte für verschiedene Naturstoffe beschrieben werden. Besonders populär sind dabei Curcumin, Sulforaphan und Coumestrol (Zhang *et al.* 1994, Wang und Kurzer 1997, Aggarwal und Harikumar 2009). Ein Ziel dieser Arbeit bestand daher in der

Charakterisierung der antiinflammatorischen Effekte dieser drei Naturstoffe auf die Entzündungsprozesse, welche durch α -Synuklein (SNCA140), sowie dessen Isoformen vermittelt werden.

6.1 Unterschiedliche α -Synuklein Isoformen zeigen unterschiedliche Aggregationseigenschaften

Neben der kanonischen Variante von α -Synuklein (SNCA140) sind drei Isoformen bekannt, welche durch alternatives Spleißen des *SNCA* Gens entstehen. Dabei werden entweder das Exon 3 (SNCA126), das Exon 5 (SNCA112) oder beide Exone (SNCA98) entfernt (Beyer *et al.* 2006, Beyer *et al.* 2008). Neben Duplikationen (Chartier-Harlin *et al.* 2004) und Triplikationen (Simon-Sanchez *et al.* 2009) des *SNCA* Gens sind auch Punktmutationen eine bekannte Ursache der monogenen Parkinson-Erkrankung (Lesage und Brice 2009). Insbesondere die Punktmutationen innerhalb der genetischen Sequenz von α -Synuklein führen zu veränderten Aggregationseigenschaften. Im Vergleich zur kanonischen Variante führt die Mutation A30P zu einer verstärkten Bildung von Oligomeren, während die Mutation A53T zu einer verstärkten Bildung hochmolekularer Aggregate führt (Opazo *et al.* 2008). Eine Lysinsubstitution, wie in der Mutation E46K, führt zu einer verstärkten Oligomerisierung sowie einem veränderten Aggregationsmuster (Lazaro *et al.* 2014). Für die Mutation H50Q hingegen wurde *in vitro* eine beschleunigte Formierung von Fibrillen beschrieben (Khalaf *et al.* 2014). Funktionelle Studien an der Mutation G51D hingegen zeigten eine verlangsamte Oligomerisierung sowie eine erhöhte Zytotoxizität dieser Form von α -Synuklein im Vergleich zur Wildtyp-Variante (Lesage *et al.* 2013). Neben diesen Punktmutationen führt die Deletion des C-Termins (SNCA108) zu einer verstärkten Aggregationsneigung. Ob auch die durch alternatives Spleißen erzeugten α -Synuklein Isoformen veränderte Aggregationseigenschaften aufweisen, war Gegenstand dieser Arbeit.

Wie kürzlich für die punktmultierten α -Synuklein Spezies beschrieben wurde (Opazo *et al.* 2008), wurden für diese Arbeit die verschiedenen α -Synuklein Isoformen (SNCA140, SNCA126, SNCA112, SNCA108 und SNCA98) mit einer an das rot fluoreszierende Protein *mCherry* gekoppelte PDZ-Bindedomäne fusioniert. Transient-transfizierte HEK293T-Zellen wurden im Hinblick auf die Verteilung von α -Synuklein in Aggresomen, multiplen Aggregaten oder diffuser, zytoplasmatischer Verteilung untersucht. Dabei konnte für alle verkürzten Proteinisoformen im Vergleich zur kanonischen Variante sowie zur Positivkontrolle SNCA108 eine erhöhte diffuse

Verteilung im Zytoplasma der untersuchten Zellen beobachtet werden. Somit führt die Verkürzung der kanonischen α -Synuklein Isoform durch alternatives Spleißen (Isoformen SNCA126, SNCA112 und SNCA98) zur Reduktion der aggregatorischen Eigenschaften dieses Proteins. Auch wenn die Mehrheit aller beobachteten Zellen eine diffuse Verteilung des α -Synukleins zeigt, so zeigte die kanonische Variante im Vergleich zu den verkürzten Isoformen eine häufigere Frequenz im Auftreten von Aggresomen und multiplen Aggregaten. Das Exon 3 der kanonischen α -Synuklein Sequenz beinhaltet sowohl zwei der fünf bekannten Punktmutationen, welche eine verstärkte Aggregation bewirken, als auch eine α -Helix-Struktur, welche maßgeblich an der Ausprägung der Aggregation durch einen Prion-ähnlichen Effekt beteiligt ist (Lee *et al.* 2002, Murray *et al.* 2003, Jao *et al.* 2004, Ulmer *et al.* 2005). In der Theorie könnte somit eine reduzierte Aggregationsneigung der α -Synuklein Variante SNCA126 mit der Deletion der genetischen Information in Exon 3 einhergehen. Im Gegensatz dazu kodiert das Exon 5 unter anderem eine Phosphorylierungsstelle (Ser129), welche unter oxidativem Stress nitriert werden können. Dies ist besonders für die Proteinaggregation im Falle der Lewy-Körperchen-Demenz von Bedeutung (Duda *et al.* 2000, Fujiwara *et al.* 2002). Daneben ist die hyperaggregative α -Synuklein Variante SNCA108 um den Großteil von Exon 5 reduziert, sodass durch die Deletion von Exon 5 in SNCA112 ein Anstieg der Aggregationseigenschaften zu erwarten wäre. Im Vergleich zur Variante SNCA108 fehlen in den α -Synuklein Isoformen SNCA98 Exon 3 und Exon 5, SNCA112 lediglich die Aminosäuren 104 bis 130 (Exon 5). Diese Aminosäuren müssen somit an der Reduktion der aggregatorischen Eigenschaften beteiligt sein.

Trotz der reduzierten Aggregationseigenschaften der verschiedenen Isoformen, konnte durch eine Kotransfektion von der kanonischen Variante SNCA140 und jeweils einer Isoform (Verhältnis 4:1) keine Reduktion der Aggregation beobachtet werden. Lediglich die Bildung von Aggresomen konnte durch die Kombination vermindert werden. Für den experimentellen Ansatz wurde ein Verhältnis von 4:1 zwischen der kanonischer Variante und den verschiedenen Isoformen gewählt. Ziel war dabei die Annäherung an die in verschiedenen zerebralen Geweben beobachtete Situation (Bungeroth *et al.* 2014). Als Grundlage für diese Annahme dienten dabei ausschließlich Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene, welche eine sehr geringe Expression der verschiedenen Isoformen zeigte (unter 3 %, gemessen

an der SNCA140-Expression), sodass das reale Verhältnis vermutlich deutlich auf die Seite der SNCA140-Variante verschoben ist.

Darüber hinaus konnten durch elektronenmikroskopische Aufnahme der Fibrillen, welche aus dem kanonischen α -Synuklein und den Isoformen SNCA126 und SNCA98 hervorgingen, deutliche morphologische Unterschiede beobachtet werden (Bungeroth *et al.* 2014). Während die kanonische Variante die bekannten Fibrillen bildet, sind Fibrillen aus der Isoform SNCA112 deutlich verkürzt und parallel angeordnet. Die Isoform SNCA98 hingegen resultiert in zirkulären Agglomeraten, welche an zuvor beschriebene „Amyloidporen“ erinnern (Lashuel *et al.* 2002, Danzer *et al.* 2007, Tsigelny *et al.* 2007). Obwohl die Isoform SNCA98 im Falle der Parkinson-Erkrankung und der Lewy-Körperchen-Demenz stark überexprimiert ist, bleibt die funktionelle Bedeutung dieser zirkulären Form jedoch unbekannt. Zusätzlich werden weitere funktionelle Charakterisierungen der verschiedenen Isoformen auf Proteinebene durch fehlende, Isoform-spezifische Antikörper behindert.

6.2 Synthese von α -Synuklein Aggregaten

Die zytotoxischen (Outeiro *et al.* 2008) oder immunmodulatorischen Effekte (Sanchez-Guajardo *et al.* 2013) von aggregiertem α -Synuklein konnten bereits in verschiedenen früheren Arbeiten demonstriert werden. Um die möglichen, antiinflammatorischen Effekte der untersuchten Naturstoffe auf die Parkinson-assoziierte Neuroinflammation untersuchen zu können, mussten α -Synuklein Aggregate *in vitro* erzeugt und anschließend, als exogener Stimulus zu den zu untersuchenden Zellen gegeben werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aggregation von α -Synuklein gezielt bei 37 °C unter gleichmäßigem Rühren durchgeführt und mit Hilfe des Thioflavin-T-Tests beobachtet. In verschiedenen, früheren Publikationen wird die Aggregation über unterschiedliche Zeiträume durchgeführt. In anderen Arbeiten wurde α -Synuklein über 7 Tage (Wilms *et al.* 2009) bei 37 °C aggregiert. Wang und Kollegen stellen oligomeres α -Synuklein innerhalb 5 -7 Tagen bei 37 °C ohne Rühren und fibrilläres α -Synuklein innerhalb von 30 Tagen bei 37 °C ohne Rühren her (Wang *et al.* 2010). Daher ist in diesen Arbeiten davon auszugehen, dass es sich um fibrilläres α -Synuklein handelt und nicht die toxischen α -Synuklein Oligomere untersucht wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aggregation stets für 48 Stunden durchgeführt und beobachtet. Um diesen Effekt

dennoch kompensieren zu können, wurden für die verschiedenen Untersuchungen stets konservierte Aggregate, welche im Zeitraum der linearen Zunahme der Thioflavin-T-Fluoreszenz entnommen wurden, verwendet. Die unterschiedliche *in vitro*-Aggregation von monomerem α -Synuklein einer Charge erfordert somit die stetige Überwachung der Synthese von α -Synuklein vor der Verwendung als exogener Stimulus. Mit dem Oligomer-angereichertem α -Synuklein wurden primäre Mikrogliazellen und mikrogliale N11-Zellen stimuliert und anschließend die Expression von TNF- α untersucht. Hierbei konnte jedoch keine veränderte Expression beobachtet werden und somit ein antiinflammatorischer Effekt der untersuchten Naturstoffe auf eine α -Synuklein-vermittelte Neuroinflammation nicht untersucht werden.

6.3 Naturstoffe reduzieren die Expression proinflammatorischer Moleküle

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung möglicher antiinflammatorischer Effekte der drei Naturstoffe Sulforaphan, Coumestrol und Curcumin. Dabei wurden mikrogliale N11-Zellen mit verschiedenen, proinflammatorischen Stoffen stimuliert und anschließend mit den Naturstoffen versetzt. Die Wirkung dieser Naturstoffe als antiinflammatorische Agentien wurde dann über die Expression verschiedener Gene, darunter TNF- α , verschiedene *Toll-like* Rezeptorgene und iNOS beobachtet. Dabei konnte für alle drei Naturstoff eine antiinflammatorische Wirkung beobachtet werden, wobei Sulforaphan deutlich stärkere Effekte zeigte, als Curcumin und Coumestrol.

6.3.1 TNF- α

Um eine mögliche antiinflammatorische Wirkung der zu untersuchenden Naturstoffe auf mikrogliale N11-Zellen zu untersuchen, wurden Zellen mit proinflammatorischen Substanzen und Naturstoffen inkubiert und anschließend die Expression des proinflammatorischen Zytokins TNF- α mittels Real-Time PCR analysiert. Ziel dieser Untersuchung war die Identifizierung potentieller immunmodulatorischer Effekte der zu untersuchenden Naturstoffe. Im Rahmen dieser Untersuchung konnte eine Hemmung der TNF- α -Expression in mikroglialen N11-Zellen mittels der drei Naturstoffe nach einer vorherigen Stimulation mit LPS, PGN und Poly(I:C) festgestellt werden.

Kürzlich konnte die inhibierende Wirkung von Sulforaphan auf TNF- α -stimulierte HSE-Zellen nachgewiesen werden (Fragoulis *et al.* 2012). Für Curcumin konnte ein suppressiver Effekt auf die TNF- α -Expression *in vitro*, *in vivo* und in Humanstudien gezeigt werden. Die Hemmung der TNF- α -Expression, welche durch verschiedene Stimuli in verschiedenen Zelltypen (BV2-Mikroglia, Makrophagen, Monozyten) induziert wurde, konnte durch Curcumin erreicht werden (Gupta *et al.* 2014). In RAW264.7-Monozyten wurde außerdem eine Hemmung der TNF- α -Expression durch das Phytoöstrogen Coumestrol nachgewiesen werden (Karieb und Fox 2011).

6.3.2 Effekt der Naturstoffe auf die Expression verschiedener TLR

Als lebensnotwendige Bestandteile des angeborenen Immunsystems detektieren die *Toll-like*-Rezeptoren molekulare Muster verschiedener Pathogene und führen so zur Induktion verschiedener früher Abwehrmechanismen (Medzhitov *et al.* 1997). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Effekte der drei Naturstoffe auf die Expression der *Toll-like*-Rezeptoren TLR2, TLR3 und TLR4 nach Stimulation der Expression mit verschiedenen Mimikry Substanzen für bakterielle (LPS, PGN) und virale (Poly(I:C)) Infektionen, beobachtet.

Ein Vermittler bakteriellen Entzündungsfaktoren ist der *Toll-like* Rezeptor 2, dessen Expression durch die Stimulation mit PGN induziert wird (Philpott und Girardin 2004). In dieser Arbeit konnte ein durch PGN-vermittelter Anstieg der TLR2-Expression in N11-Zellen Konzentrations-abhängig mit den untersuchten Naturstoffen gehemmt werden. Eine ebensolche inhibierende Wirkung von Curcumin auf den TLR2 wurde kürzlich in Leberzellen von Ratten nachgewiesen (Tu *et al.* 2012).

Ein Vermittler der viralen Infektionen ist der *Toll-like* Rezeptor 3, dessen Expression durch die Stimulation mit Poly(I:C) induziert wird (Sarkar *et al.* 2003). Im Zusammenhang dieser Arbeit konnte ein durch Poly(I:C)-vermittelter Anstieg der TLR3-Expression in N11-Zellen durch alle drei untersuchten Naturstoffe abgeschwächt werden. Jianzhong Zhu und Kollegen zeigten kürzlich, dass Sulforaphan einen inhibierenden Effekt auf die TLR3-Expression in HEK293-Zellen hat (Zhu *et al.* 2013).

Ebenfalls ein Vermittler bakterieller Infektionen ist der *Toll-like*-Rezeptor 4, dessen Expression durch die Stimulation mit LPS induziert werden kann (Guha und Mackman 2001). Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch kein LPS-vermittelter

Anstieg der TLR4-Expression in mikroglialen Zellen beobachtet werden. Somit ließ sich auch im Falle einer Kostimulation der Zellen mit LPS und den verschiedenen Naturstoffen kein antiinflammatorischer Effekt zeigen. Eine mögliche Ursache könnte in dem verwendeten LPS liegen, da unterschiedliche, kommerziell erhältliche LPS-Proben offenbar unterschiedlich auf die Expression von TLR4 wirken. Ähnliche Beobachtungen wie in dieser Arbeit wurden kürzlich ebenfalls für Sulforaphan in Knochenmarkszellen gezeigt (Koo *et al.* 2013) und durch Ergebnisse von Xian-kun Tu und Kollegen für Curcumin in primären Rattenzellen nachgewiesen (Tu *et al.* 2014). Im Gegensatz dazu konnten Rehli und Kollegen in verschiedenen Zellen eine LPS-vermittelte Reduktion der TLR4-Expression beobachten, welche vermutlich in unterschiedlich gespleißten mRNA-Varianten begründet ist (Rehli 2002).

6.3.3 iNOS

In dieser Arbeit wurde ebenfalls die iNOS-Expression als ein Entzündungsfaktor in Mikrogliazellen nachgewiesen. Alle Naturstoffe wirkten in Konzentrations-abhängiger Weise hemmend auf die iNOS-Expression nach der Behandlung mit den Stimulantien LPS, PGN und Poly(I:C).

Kürzlich wurde in RAW264.7-Zellen eine Hemmung der iNOS-Expression nach LPS-Stimulation und Sulforaphan Behandlung gezeigt (Choi *et al.* 2014). Curcumin zeigte auch eine hemmende Wirkung. Hierbei wurde die iNOS-Expression auf mRNA Ebene aus Ratten Kortex Gewebe analysiert (Zaky *et al.* 2014). Für die Phytoöstrogene, vor allem Coumestrol, wurde kürzlich ein hemmender Effekt an Mikrogliazellen auf die iNOS mRNA und Protein Expression, nachdem diese mit LPS stimuliert wurden, nachgewiesen (Jantaratnotai *et al.* 2013).

6.4 NF-κB

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen befassen sich mit der antiinflammatorischen Wirkung der Naturstoffe Coumestrol, Curcumin und Sulforaphan. Das Interesse galt dabei insbesondere dem Transkriptionsfaktor NF-κB, der neben anderen entzündlichen Erkrankungen auch in der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung eine bedeutende Rolle spielt. So konnte durch eine Immunfluoreszenzmarkierung der p65-Untereinheit von NF-κB gezeigt werden, dass sich durch die Vorbehandlung der N11-Zellen mit den Naturstoffen *in vitro* eine Hemmung der LPS-, PGN- oder Poly(I:C)-induzierten NF-κB-Translokation erreichen lässt. Da NF-κB bei der Wirtsabwehr gegen Krankheiten eine sehr wichtige Rolle

spielt, ist dieser Transkriptionsfaktor ein wichtiges Ziel für therapeutische Intervention. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Coumestrol, Curcumin und Sulforaphan entzündungshemmende Naturstoffe und potente Inhibitoren der NF- κ B-Aktivierung sind.

Für Curcumin wurde bereits gezeigt, dass aktiviertes NF- κ B in menschlichen myeloiden ML-1a-Zellen gehemmt wird (Singh und Aggarwal 1995). Bei Singh und Kollegen wurde gezeigt, dass 40 – 60 μ M Curcumin die mit TNF- α -induzierte NF- κ B-Aktivierung inhibiert. In dieser Arbeit wurden mit den Konzentrationen 10 μ M und 100 μ M Curcumin gearbeitet, welches die mit LPS, PGN und Poly(I:C) induzierte NF- κ B-Aktivierung inhibiert.

6.5 Therapeutische Verwendung der untersuchten Naturstoffe

Wie beschrieben, führen die untersuchten Naturstoffe Sulforaphan, Curcumin und Coumestrol zu einer Reduktion der Expression verschiedener Modulatoren der Immunabwehr und erfüllen somit eine antiinflammatorische Wirkung und stellen potentielle Therapeutika zur Behandlung von Inflammationen dar. Fraglich ist jedoch die Bioverfügbarkeit dieser natürlich vorkommenden Substanzen sowie die wirkungsvolle Aufnahme und Verwertung dieser Stoffe durch den tierischen Metabolismus.

6.5.1 Sulforaphan

Sulforaphan bewirkt experimentell in verschiedenen Zelllinien und Geweben eine Chemoprotektion gegen Karzinogene, oxidativen Stress und Entzündungsreaktionen (Ahn *et al.* 2010). Außerdem wird Sulforaphan bereits in der Krebsprophylaxe und in der Krebstherapie eingesetzt. Es wurde nachgewiesen, dass Sulforaphan das Wachstum von Brustkrebsstammzellen (Li *et al.* 2010) und von Prostatakrebs (Traka *et al.* 2014) hemmt. In Tierexperimenten zeigt Sulforaphan eine schützende Wirkung vor einer Schädigung der Muskulatur durch übermäßige Anstrengung. Hierbei wurde den Ratten 25 mg Sulforaphan pro kg Körpergewicht intraperitoneal verabreicht (Malaguti *et al.* 2009). Die genaue Dosierung von Sulforaphan beim Patienten ist unbekannt. Rechnet man die wirksame Sulforaphan-Einmaldosis bei Mäusen basierend auf der Körperoberfläche auf eine äquivalente Dosis beim Menschen um,

so kommt man auf 0,36 mg Sulforaphan pro kg Körpergewicht, dies entspricht 25,2 mg Sulforaphan für einen 70 kg schweren Menschen.

Sulforaphan kann nicht nur zur Behandlung eingenommen werden, sondern wird auch als präventive Maßnahme, um den genannten Krankheiten vorzubeugen, angewandt. Hierbei wird ein häufiger Verzehr von Brokkoli oder anderen Kohlsorten (3 - 5 Portionen pro Woche) empfohlen. Die Aufnahme von Sulforaphan stellt ein weiteres Problem dar. Am besten erhalten bleiben die wertvollen Inhaltsstoffe wenn man Brokkoli und andere Kohlsorten entweder roh verspeist und gut kaut, kurz dämpft oder kurz in Fett anbrät. Wenn man Brokkoli kocht, sollte das Kochwasser nicht weggeschüttet, sondern zur Zubereitung einer Soße oder Suppe verwendet werden, da darin das aus den Pflanzenzellen gelöste Sulforaphan enthalten ist. Die Wirkung von Brokkoli wird durch Kombination mit Brokkoli-Sprossen verstärkt. Hierbei führen die Brokkoli-Sprossen zu einer Erhöhung des Myrosinase-Enzyms, welches für die Aufnahme von Sulforaphan beim Menschen essenziell ist. Nebenwirkungen sind nicht bekannt (Cramer *et al.* 2012).

6.5.2 Curcumin

Curcumins entzündungshemmende Eigenschaften sind bereits bekannt und es liegt eine über Jahrhunderte zurückreichende Anwendungstradition vor. Curcuma wurde traditionell bei Gelbsucht, bei Darmbeschwerden und bei entzündlichen Prozessen der Haut angewandt. Heutzutage wird Curcumin bei vielen chronisch entzündlichen Erkrankungen wie z.B. der rheumatoiden Arthritis angewandt und außerdem bei Krebserkrankungen eingesetzt. Auch für die Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen wird Curcumin ein therapeutisches Potenzial zugeschrieben (Darvesh *et al.* 2012, Mythri und Bharath 2012). Hierbei gilt eine frühzeitige Behandlung mit Curcumin, die dann sowohl das Fortschreiten des Morbus Parkinson als auch der Alzheimer-Krankheit positiv beeinflusst. Es konnte nachgewiesen werden, dass Curcumin vor Abeta-Ablagerungen im Gehirn schützt, die mit als Ursache von Alzheimer angesehen werden. Des Weiteren konnte auch gezeigt werden, dass Curcumin die Aggregation von α -Synuklein verhindert und so das Fortschreiten der Parkinson-Krankheit erschwert (Ahmad und Lapidus 2012).

Damit sich in Zukunft vielversprechende klinische *in vitro*-Untersuchungen von Curcumin beim Menschen bestätigen lassen, muss die Bioverfügbarkeit von Curcumin noch verbessert werden. Beim Menschen konnten selbst nach der

Einnahme von 12 g Curcumin in Kapselform nur geringe Mengen des Wirkstoffs im Blut nachgewiesen werden. Eine japanische Forschergruppe hat eine Curcumin-Formulierung mit hoher Bioverfügbarkeit entwickelt. Erste pharmakokinetische Untersuchungen am Menschen konnten nach Einnahme der auf einer Nanopartikel-Technologie basierenden Formulierung 27-fach höhere Plasmaspiegel nachweisen als nach Einnahme von konventionellem Curcumin Pulver (Sasaki *et al.* 2011). Eine weitere Untersuchung bestätigt die Dosisabhängigkeit im Blutspiegel, bei einer Anwendung von 150 bzw. 210 mg Curcumin. Hierbei wurde über einen leichtgradigen Durchfall als mögliche Nebenwirkung berichtet (Kanai *et al.* 2012).

6.5.3 Coumestrol

Coumestrol ist eine chemische Verbindung die zu den Isoflavonen gehört. Es ist ein Dihydroxy-Derivat des Coumestans, das wiederum zu den Phytoöstrogenen gehört. Phytoöstrogenen wird eine hemmende Wirkung bei Krebstumoren zugeschrieben. Coumestrol selber gibt es noch nicht in Tablettenform. Eine genaue Dosierung von Coumestrol beim Menschen oder in einem Mausmodell ist noch nicht bekannt. Eine mögliche Phytoöstrogenkonzentration der gängigen Nahrungssupplemente könnte zwischen 40 mg und 80 mg Isoflavon liegen. Dies wurde aus der täglichen Aufnahme in Asien für sojareiche Ernährung errechnet. In dieser Konzentration sind bisher keine unerwünschten Nebenwirkungen beim Menschen beschrieben worden, Gelinas und Martinoli beschreiben jedoch ein gewisses neuroprotektives Potential mit einem gleichzeitig geringen hormonalen Effekt (Gelinas und Martinoli 2002). Notwendige Langzeitstudien liegen nicht vor. Es existiert eine Arbeit über die protektive Wirkung von Coumestrol gegen Amyloid- β -Peptiden und LPS-induzierter Toxizität in Astrocyten (Liu *et al.* 2011).

6.6 Reflektion und Ausblick

Im Kontext der unterschiedlichen Expression der verschiedenen α -Synuklein Isoformen in verschiedenen Synukleinopathien (Beyer 2006) bestand ein Ziel dieser Arbeit in der Charakterisierung der Aggregationseigenschaften der verschiedenen α -Synuklein Isoformen im Vergleich zur kanonischen Variante in verschiedenen *in vitro*-Experimenten. Dabei konnte für die kanonische Variante SNCA140 eine vermehrte Bildung von Aggresomen und multiplen Aggregaten in transfizierten HEK293T-Zellen beobachtet werden, während die verkürzten Isoformen SNCA126, SNCA112 und SNCA98 vermehrt in einer diffusen, zellulären Verteilung vorliegen.

Darüber hinaus konnte für die verkürzten Isoformen auch die Bildung kürzerer Fibrillen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen beobachtet werden. Somit können für die verschiedenen α -Synuklein Isoformen veränderte Aggregationseigenschaften im Vergleich zur kanonischen Variante postuliert werden. Offen bleibt jedoch, ob diese veränderten Aggregationseigenschaften auch *in vivo*, zum Beispiel im Falle von Parkinson-Patienten oder im murinen System beobachtet werden können und somit eine pathologische Bedeutung für unterschiedliche Verlaufsformen der Parkinson-Erkrankung haben.

Neben der Charakterisierung der unterschiedlichen Aggregationseigenschaften der verschiedenen α -Synuklein Isoformen lag der Hauptfokus dieser Arbeit auf der Untersuchung der drei Naturstoffe Coumestrol, Curcumin und Sulforaphan im Hinblick auf ihre antiinflammatorischen und antiaggregatorischen Eigenschaften. Hier konnte *in vitro* ein hemmender Effekt der Naturstoffe auf die Expression von TLR2 und TLR3, welche im Kontext der Mikroglia-vermittelten Neuroinflammation steht (Roodveldt *et al.* 2013, Beraud *et al.* 2011) sowie auf TNF- α und den globalen Inflammationsmarker NF- κ B in mikroglialen N11-Zellen beobachtet werden. Ein möglicher, neuroprotektiver Effekt der α -Synuklein-vermittelten Neuroinflammation konnte hingegen leider nicht untersucht werden, da die im Rahmen dieser Arbeit synthetisch hergestellten α -Synuklein Oligomere *in vitro* keinen proinflammatorischen Effekt zeigten. Dieses Problem könnte zum Beispiel mit Hilfe eines stabil transfizierten Flp-In Zellkulturmodells umgangen werden. Hierzu wurden in meiner Arbeitsgruppe bereits einige Vorarbeiten durchgeführt. So könnte nicht nur der neuroinflammatorische Effekt der kanonischen α -Synuklein-Variante, sondern auch die der verschiedenen Isoformen untersucht werden. Nach erfolgreichen Zellkulturversuchen könnte schließlich das MPTP-Mausmodell für mögliche *in vivo* Untersuchungen verwendet werden, um die antiinflammatorische und antiaggregatorische Wirkung der verschiedenen Naturstoffe zu untersuchen.

Bis dahin bleibt ein mögliches, duales Wirkungspotential der drei beschriebenen Naturstoffe im Hinblick auf die Verwendung als antiinflammatorisches und antiaggregatorisches Therapeutikum im Kontext der Parkinson-Erkrankung weiter offen.

7 Zusammenfassung

Die Parkinson-Erkrankung ist eine schwerwiegende, kognitive und neuromotorische Dysfunktion, welche sowohl durch genetische Ursachen, als auch durch Umwelteinflüsse hervorgerufen werden kann. Eine besondere Bedeutung kommt dabei dem Protein α -Synuklein zu, welches zu Oligomeren aggregieren kann. Die Bildung dieser Oligomere kann dabei unter anderem durch Punktmutationen innerhalb der α -Synuklein Sequenz beeinflusst werden. Das aggregierte α -Synuklein lagert sich dann im neuronalen Gewebe ab und entfaltet dort eine neurodegenerative Wirkung, unter anderem durch zytotoxische Effekte auf die umgebenden neuronalen Zellen. Neben der kanonischen Variante von α -Synuklein (SNCA140) können durch alternatives Spleißen auch weitere, verkürzte Isoformen vorliegen (SNCA126, SNCA112 und SNCA98), ob diese jedoch ein anderes Aggregationsverhalten als die kanonische Variante zeigen, war bisher nicht bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dabei gezeigt werden, dass diese Isoformen nicht nur ein unterschiedliches, wenn auch im Vergleich zur kanonischen Form stets deutlich niedrigeres Expressionsniveau in verschiedenen neuronalen Geweben zeigen, sondern auch unterschiedlich aggregieren. So führen alle untersuchten Isoformen zu einer deutlich verminderten Bildung von Aggresomen und Aggregaten, was zum einen in den entsprechend fehlenden Proteindomänen, aber insbesondere auch in einer kurzen, aus vier Aminosäuren bestehenden Sequenz begründet ist. Daneben konnte gezeigt werden, dass die Bildung von Aggresomen in HEK293T-Zellen *in vitro* aus kanonischem α -Synuklein in Gegenwart einzelner Isoformen negativ beeinflusst wird. Eine Verminderung der Bildung multipler Aggregate konnte dabei jedoch nicht beobachtet werden. Neben den zytotoxischen Effekten von α -Synuklein auf das umliegende neuronale Gewebe, vermitteln diese Aggregate auch Expression und Freisetzung proinflammatorischer Moleküle, wodurch die Parkinson-Erkrankung stetig weiter voranschreitet. Im Zusammenhang mit verschiedenen Therapien zur Behandlung der Parkinson-Erkrankung werden, wie auch im Falle anderer Erkrankungen, z.B. Krebs, die Verwendung verschiedener Naturstoffe, welchen eine antiinflammatorische Wirkung zugeschrieben wird, diskutiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die putative, antiinflammatorische und somit neuroprotektive Wirkung der drei Naturstoffe Curcumin, Coumestrol und Sulforaphan auf mikrogliale

Zellen untersucht. Dabei konnte besonders für Sulforaphan eine starke Verminderung der Expression von Entzündungsmarkern wie TNF- α , den *Toll-like*-Rezeptoren TLR2, TLR3 und TLR4 sowie der an der Pathogenabwehr beteiligten Stickstoffsynthase iNOS beobachtet werden. Auch Coumestrol und Curcumin führten im Rahmen der durchgeführten Analysen zu Verminderung der Expression der untersuchten Gene, obgleich diese etwas geringer als im Falle von Sulforaphan ausfällt. Somit könnten die untersuchten Naturstoffe, allen voran Sulforaphan, als potentielle Therapeutika zur Behandlung der Parkinson-Erkrankung verwendet werden. In diesem Zusammenhang ist daher besonders die Untersuchung der Bioverfügbarkeit und der Aufnahme und Wirkung dieser Naturstoffe durch den tierischen Organismus von besonderer Bedeutung.

8 Summary

Parkinson's disease is a severe cognitive and neuromotoric disorder that is caused by diverse genetic and environmental factors. Especially, α -Synuclein, which can form large oligomeric structures has been placed in the centre of PD research. Among others, the formation of these oligomeric structures is influenced by point mutations within the α -Synuclein sequence. Aggregated α -Synuclein deposits within neuronal tissues where they act in a neurodegenerative manner through mediation of cytotoxic effects on neighbouring neuronal cells. Besides the canonical variant of α -Synuclein (SNCA140), alternative splicing can lead to the formation of truncated isoforms. So far, the effect of this truncation on the formation of oligomeric structures has not been investigated, yet. In this thesis it was shown that these isoforms not only showed differences in tissue-specific expression patterns, but also a different aggregation behaviour compared to the canonical form. Thus, all investigated isoforms showed a clearly reduced formation of aggregates and multiple aggregates that is not only caused by missing of complete protein domains, but also by a short four amino acid sequence. In addition, both, the formation of SNCA140 aggregates is impeded in HEK293T cells and *in vitro* by the other isoforms. Unfortunately, a reduced formation of multiple aggregates was not observed due to this interference. Besides the cytotoxic effects of α -Synuclein to the neighbouring cellular environment, aggregates also promote the expression and release of proinflammatory molecules, thereby accelerating the Parkinson's disease. In combination with diverse therapeutic strategies regarding the treatment of the Parkinson's disease, the use of various natural substances that show antiinflammatory properties is discussed. Here the putative antiinflammatory effects and thus neuroprotective actions of the three natural substances Curcumin, Coumestrol and Sulforaphane towards microglia cells were investigated. Thereby, Sulforaphane caused a strong reduction of the expression of markers of inflammation such as TNF- α , the Toll-like receptors TLR2, TLR3 and TLR4 and the nitrogen synthase iNOS, which also is a mediator of pathogen defence. Although slightly reduced compared to the effects of Sulforaphane, Coumestrol and Curcumin resulted in a reduced expression of the investigated genes, too. Thus, the investigated natural substances might be potent therapeutics for the treatment of Parkinson's disease. Nevertheless, further

investigations regarding the bioavailability and uptake and actions of these substances by the animal organism is required.

9 Danksagung

Besonderer Dank gebührt meinem Betreuer Prof. Dr. Dr. Gregor Kuhlenbäumer für die Bereitstellung des interessanten Themas. Seine Unterstützung bei meiner wissenschaftlichen Arbeit und das entgegengebrachte Vertrauen förderten das Gelingen dieser Arbeit und trugen zum Voranschreiten des Projektes bei.

Für die Übernahme der Betreuung und des Referates meiner Arbeit vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Roeder herzlich bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ralph Lucius für die fachliche Unterstützung und die methodische Unterweisung im Bereich der primären Mikrogliazellkultur bedanken.

Für die schöne Zeit, die gemeinsamen Unternehmungen und die entstandenen Freundschaften möchte ich mich bei meinen lieben früheren Kollegen bedanken. Auch für den regen fachlichen Austausch geht ein großer Dank an Dr. Silke Appenzeller, Dr. Franziska Hopfner, Manuela Pendziwiat, Stefanie Müller und Kerstin Wulbrandt.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie für ihre Unterstützung.

10 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name	May Bungereoth
Geburtstag	30.08.1986
Geburtsort	Münster
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch

SCHUL- UND AUSBILDUNG

seit 03/2011	Promotionsarbeit zur Erlangung des Doktors der Naturwissenschaften am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Abteilung Molekulare Neurobiologie, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Kuhlenbäumer mit dem Thema: „Morbus Parkinson: Untersuchungen zum Aggregationsverhalten von α -Synuklein und zur Inhibition Mikroglia-vermittelter Neuroinflammation“
10/2005 bis 12/2010	Diplomstudium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Hauptfächer: Zellbiologie, Nebenfächer: Zoologie und Toxikologie Diplomarbeit mit dem Thema „Identifikation HNA-verursachender Mutationen im <i>Septin9</i> Gen“ am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Abteilung Molekulare Neurobiologie, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Kuhlenbäumer
08/1998 bis 06/2005	Besuch der Bischöflichen Gesamtschule Friedensschule in Münster, Abschluss: Abitur

11 Publikationsliste

Kleffner I, **Bungeroth M**, Schiffbauer H, Schäbitz WR, Ringelstein EB, Kuhlenbäumer G. The role of aquaporin-4 polymorphisms in the development of brain edema after middle cerebral artery occlusion. *Stroke*. 2008 Apr;39(4):1333-5.

Appenzeller S, Helbig I, Stephani U, Häusler M, Kluger G, **Bungeroth M**, Müller S, Kuhlenbäumer G, van Baalen A. Febrile infection-related epilepsy syndrome (FIRES) is not caused by SCN1A, POLG, PCDH19 mutations or rare copy number variations. *Dev Med Child Neurol*. 2012 Dec;54(12):1144-8.

Hopfner F, **Bungeroth M**, Pendziwiat M, Tittmann L, Deuschl G, Schneider SA, Kuhlenbäumer G. Rare variants in ANO3 are not a susceptibility factor in essential tremor. *Parkinsonism Relat Disord*. 2014 Jan;20(1):134-5.

Bungeroth M, Appenzeller S, Regulin A, Völker W, Lorenzen I, Grötzinger J, Pendziwiat M, Kuhlenbäumer G. Differential aggregation properties of alpha-synuclein isoforms. *Neurobiol Aging*. 2014 Aug;35(8):1913-9.

Hopfner F, Stevanin G, Müller SH, Mundwiler E, **Bungeroth M**, Durr A, Pendziwiat M, Anheim M, Schneider SA, Tittmann L, Klebe S, Lorenz D, Deuschl G, Brice A, Kuhlenbäumer G. *Mov Disord*. 2015 Apr;30(5):721-4.

12 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, May Bungeroth, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Morbus Parkinson: Untersuchungen zum Aggregationsverhalten von α -Synuklein und zur Inhibition Mikroglia-vermittelter Neuroinflammation“ selbstständig und nur unter zu Hilfenahme der angegebenen Hilfsmittel und Quellen unter Anleitung meiner akademischen Mentoren angefertigt habe. Die Arbeit erfolgte unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG). Ich versichere ferner, dass diese Dissertation bisher an keiner anderen Universität oder Fakultät vorgelegt wurde. Des Weiteren erkläre ich, kein anderes Promotionsverfahren ohne Erfolg beendet zu haben und dass keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Kiel, den 07. Januar 2016

May Bungeroth

13 Literaturverzeichnis

Aggarwal, B. B. and K. B. Harikumar (2009). "Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases." Int J Biochem Cell Biol **41**(1): 40-59.

Ahmad, B. and L. J. Lapidus (2012). "Curcumin prevents aggregation in alpha-synuclein by increasing reconfiguration rate." J Biol Chem **287**(12): 9193-9199.

Akira, S. and H. Hemmi (2003). "Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family." Immunol Lett **85**(2): 85-95.

Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov and R. A. Flavell (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." Nature **413**(6857): 732-738.

Amin, A. and M. Buratovich (2007). "The anti-cancer charm of flavonoids: a cup-of-tea will do!" Recent Pat Anticancer Drug Discov **2**(2): 109-117.

Amor, S., L. A. Peferoen, D. Y. Vogel, M. Breur, P. van der Valk, D. Baker and J. M. van Noort (2014). "Inflammation in neurodegenerative diseases--an update." Immunology **142**(2): 151-166.

Anderson, K. V., G. Jurgens and C. Nusslein-Volhard (1985). "Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product." Cell **42**(3): 779-789.

Arizono, K., S. Kagawa, H. Hamada and T. Ariyoshi (1995). "Nitric oxide mediated metallothionein induction by lipopolysaccharide." Res Commun Mol Pathol Pharmacol **90**(1): 49-58.

Baeuerle, P. A. and D. Baltimore (1988). "Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor." Cell **53**(2): 211-217.

Baeuerle, P. A. and D. Baltimore (1988). "I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor." Science **242**(4878): 540-546.

Banerjee, R., M. F. Beal and B. Thomas (2010). "Autophagy in neurodegenerative disorders: pathogenic roles and therapeutic implications." Trends Neurosci **33**(12): 541-549.

Barkett, M. and T. D. Gilmore (1999). "Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors." Oncogene **18**(49): 6910-6924.

Barnes, P. J. (1997). "Nuclear factor-kappa B." Int J Biochem Cell Biol **29**(6): 867-870.

Becker, G., A. Muller, S. Braune, T. Buttner, R. Benecke, W. Greulich, W. Klein, G. Mark, J. Rieke and R. Thumler (2002). "Early diagnosis of Parkinson's disease." J Neurol **249** Suppl 3: III/40-48.

Bekris, L. M., I. F. Mata and C. P. Zabetian "The genetics of Parkinson disease." J Geriatr Psychiatry Neurol **23**(4): 228-242.

Benveniste, E. N. (1997). "Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis." J Mol Med (Berl) **75**(3): 165-173.

- Beraud, D. and K. A. Maguire-Zeiss (2012). "Misfolded alpha-synuclein and Toll-like receptors: therapeutic targets for Parkinson's disease." Parkinsonism Relat Disord **18 Suppl 1**: S17-20.
- Beraud, D., M. Twomey, B. Bloom, A. Mittereder, V. Ton, K. Neitzke, S. Chasovskikh, T. R. Mhyre and K. A. Maguire-Zeiss (2011). "alpha-Synuclein Alters Toll-Like Receptor Expression." Front Neurosci **5**: 80.
- Beyer, K. (2006). "Alpha-synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers." Acta Neuropathol **112**(3): 237-251.
- Beyer, K., M. Domingo-Sabat, J. Humbert, C. Carrato, I. Ferrer and A. Ariza (2008). "Differential expression of alpha-synuclein, parkin, and synphilin-1 isoforms in Lewy body disease." Neurogenetics **9**(3): 163-172.
- Beyer, K., M. Domingo-Sabat, J. I. Lao, C. Carrato, I. Ferrer and A. Ariza (2008). "Identification and characterization of a new alpha-synuclein isoform and its role in Lewy body diseases." Neurogenetics **9**(1): 15-23.
- Beyer, K., J. Humbert, A. Ferrer, J. I. Lao, C. Carrato, D. Lopez, I. Ferrer and A. Ariza (2006). "Low alpha-synuclein 126 mRNA levels in dementia with Lewy bodies and Alzheimer disease." Neuroreport **17**(12): 1327-1330.
- Bisaglia, M., S. Mammi and L. Bubacco (2009). "Structural insights on physiological functions and pathological effects of alpha-synuclein." FASEB J **23**(2): 329-340.
- Bisaglia, M., A. Trolino, M. Bellanda, E. Bergantino, L. Bubacco and S. Mammi (2006). "Structure and topology of the non-amyloid-beta component fragment of human alpha-synuclein bound to micelles: implications for the aggregation process." Protein Sci **15**(6): 1408-1416.
- Block, M. L., L. Zecca and J. S. Hong (2007). "Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms." Nat Rev Neurosci **8**(1): 57-69.
- Blomquist, C. H., P. H. Lima and J. R. Hotchkiss (2005). "Inhibition of 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (3alpha-HSD) activity of human lung microsomes by genistein, daidzein, coumestrol and C(18)-, C(19)- and C(21)-hydroxysteroids and ketosteroids." Steroids **70**(8): 507-514.
- Brandenburg, L. O., M. Kipp, R. Lucius, T. Pufe and C. J. Wruck (2010). "Sulforaphane suppresses LPS-induced inflammation in primary rat microglia." Inflamm Res **59**(6): 443-450.
- Breydo, L., J. W. Wu and V. N. Uversky (2012). "Alpha-synuclein misfolding and Parkinson's disease." Biochim Biophys Acta **1822**(2): 261-285.
- Bungeroth, M., S. Appenzeller, A. Regulin, W. Volker, I. Lorenzen, J. Grotzinger, M. Pendziwiat and G. Kuhlenbaumer (2014). "Differential aggregation properties of alpha-synuclein isoforms." Neurobiol Aging **35**(8): 1913-1919.
- Chartier-Harlin, M. C., J. Kachergus, C. Roumier, V. Mouroux, X. Douay, S. Lincoln, C. Levecque, L. Larvor, J. Andrieux, M. Hulihan, N. Waucquier, L. Defebvre, P. Amouyel, M. Farrer and A. Destee (2004). "Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease." Lancet **364**(9440): 1167-1169.
- Chavarria, A. and J. Alcocer-Varela (2004). "Is damage in central nervous system due to inflammation?" Autoimmun Rev **3**(4): 251-260.

Choi, W. J., S. K. Kim, H. K. Park, U. D. Sohn and W. Kim (2014). "Anti-Inflammatory and Anti-Superbacterial Properties of Sulforaphane from Shepherd's Purse." Korean J Physiol Pharmacol **18**(1): 33-39.

Clayton, D. F. and J. M. George (1998). "The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease." Trends Neurosci **21**(6): 249-254.

Conway, K. A., J. C. Rochet, R. M. Bieganski and P. T. Lansbury, Jr. (2001). "Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct." Science **294**(5545): 1346-1349.

Cooper, J. H. (1969). "A n evaluation of current methods for the diagnostic histochemistry of amyloid." J Clin Pathol **22**(4): 410-413.

Couch, Y., L. Alvarez-Erviti, N. R. Sibson, M. J. Wood and D. C. Anthony (2011). "The acute inflammatory response to intranigral alpha-synuclein differs significantly from intranigral lipopolysaccharide and is exacerbated by peripheral inflammation." J Neuroinflammation **8**: 166.

Cramer, J. M., M. Teran-Garcia and E. H. Jeffery (2012). "Enhancing sulforaphane absorption and excretion in healthy men through the combined consumption of fresh broccoli sprouts and a glucoraphanin-rich powder." Br J Nutr **107**(9): 1333-1338.

Crisp, A. H., K. Norton, S. Gowers, C. Halek, C. Bowyer, D. Yeldham, G. Levett and A. Bhat (1991). "A controlled study of the effect of therapies aimed at adolescent and family psychopathology in anorexia nervosa." Br J Psychiatry **159**: 325-333.

Danzer, K. M., D. Haasen, A. R. Karow, S. Moussaud, M. Habeck, A. Giese, H. Kretschmar, B. Hengerer and M. Kostka (2007). "Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding." J Neurosci **27**(34): 9220-9232.

Darvesh, A. S., R. T. Carroll, A. Bishayee, N. A. Novotny, W. J. Geldenhuys and C. J. Van der Schyf (2012). "Curcumin and neurodegenerative diseases: a perspective." Expert Opin Investig Drugs **21**(8): 1123-1140.

Davidson, W. S., A. Jonas, D. F. Clayton and J. M. George (1998). "Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes." J Biol Chem **273**(16): 9443-9449.

De Duve, C. (1963). "The lysosome." Sci Am **208**: 64-72.

de Rijk, M. C., C. Tzourio, M. M. Breteler, J. F. Dartigues, L. Amaducci, S. Lopez-Pousa, J. M. Manubens-Bertran, A. Alperovitch and W. A. Rocca (1997). "Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease." J Neurol Neurosurg Psychiatry **62**(1): 10-15.

DiMauro, S. and E. A. Schon (2003). "Mitochondrial respiratory-chain diseases." N Engl J Med **348**(26): 2656-2668.

Dringen, R. (2000). "Metabolism and functions of glutathione in brain." Prog Neurobiol **62**(6): 649-671.

Du, H. N., L. Tang, X. Y. Luo, H. T. Li, J. Hu, J. W. Zhou and H. Y. Hu (2003). "A peptide motif consisting of glycine, alanine, and valine is required for the fibrillization and cytotoxicity of human alpha-synuclein." Biochemistry **42**(29): 8870-8878.

- DuBridge, R. B., P. Tang, H. C. Hsia, P. M. Leong, J. H. Miller and M. P. Calos (1987). "Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system." Mol Cell Biol **7**(1): 379-387.
- Duda, J. E., B. I. Giasson, Q. Chen, T. L. Gur, H. I. Hurtig, M. B. Stern, S. M. Gollomp, H. Ischiropoulos, V. M. Lee and J. Q. Trojanowski (2000). "Widespread nitration of pathological inclusions in neurodegenerative synucleinopathies." Am J Pathol **157**(5): 1439-1445.
- Dudley, D. J. (1992). "The immune system in health and disease." Baillieres Clin Obstet Gynaecol **6**(3): 393-416.
- el-Agnaf, O. M. and G. B. Irvine (2002). "Aggregation and neurotoxicity of alpha-synuclein and related peptides." Biochem Soc Trans **30**(4): 559-565.
- Fahn, S. (2003). "Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome." Ann N Y Acad Sci **991**: 1-14.
- Farrer, M., J. Kachergus, L. Forno, S. Lincoln, D. S. Wang, M. Hulihan, D. Maraganore, K. Gwinn-Hardy, Z. Wszolek, D. Dickson and J. W. Langston (2004). "Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications." Ann Neurol **55**(2): 174-179.
- Forno, L. S. (1996). "Neuropathology of Parkinson's disease." J Neuropathol Exp Neurol **55**(3): 259-272.
- Fragoulis, A., J. Laufs, S. Muller, U. Soppa, S. Siegl, L. K. Reiss, M. Tohidnezhad, C. Rosen, K. Tenbrock, D. Varoga, S. Lippross, T. Pufe and C. J. Wruck (2012). "Sulforaphane has opposing effects on TNF-alpha stimulated and unstimulated synoviocytes." Arthritis Res Ther **14**(5): R220.
- Fujiwara, H., M. Hasegawa, N. Dohmae, A. Kawashima, E. Masliah, M. S. Goldberg, J. Shen, K. Takio and T. Iwatsubo (2002). "alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions." Nat Cell Biol **4**(2): 160-164.
- Gasser, T. (2009). "Molecular pathogenesis of Parkinson disease: insights from genetic studies." Expert Rev Mol Med **11**: e22.
- Gelinas, S. and M. G. Martinoli (2002). "Neuroprotective effect of estradiol and phytoestrogens on MPP+-induced cytotoxicity in neuronal PC12 cells." J Neurosci Res **70**(1): 90-96.
- George, J. M. (2002). "The synucleins." Genome Biol **3**(1): REVIEWS3002.
- Gille, G. and K. Sigler (1995). "Oxidative stress and living cells." Folia Microbiol (Praha) **40**(2): 131-152.
- Goedert, M., M. G. Spillantini and S. W. Davies (1998). "Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases." Curr Opin Neurobiol **8**(5): 619-632.
- Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell and R. Nairn (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-74.
- Grove, D. S. (1999). "Quantitative real-time polymerase chain reaction for the core facility using TaqMan and the Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division 7700 Sequence Detector." J Biomol Tech **10**(1): 11-16.
- Guerrero-Beltran, C. E., M. Calderon-Oliver, J. Pedraza-Chaverri and Y. I. Chirino (2012). "Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: recent advances." Exp Toxicol Pathol **64**(5): 503-508.

- Guha, M. and N. Mackman (2001). "LPS induction of gene expression in human monocytes." Cell Signal **13**(2): 85-94.
- Gupta, S. C., A. K. Tyagi, P. Deshmukh-Taskar, M. Hinojosa, S. Prasad and B. B. Aggarwal (2014). "Downregulation of tumor necrosis factor and other proinflammatory biomarkers by polyphenols." Arch Biochem Biophys **559**: 91-99.
- Halliwell, B. (2007). "Biochemistry of oxidative stress." Biochem Soc Trans **35**(Pt 5): 1147-1150.
- Hanisch, U. K. (2002). "Microglia as a source and target of cytokines." Glia **40**(2): 140-155.
- Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak and P. M. Williams (1996). "Real time quantitative PCR." Genome Res **6**(10): 986-994.
- Houlden, H. and A. B. Singleton (2012). "The genetics and neuropathology of Parkinson's disease." Acta Neuropathol **124**(3): 325-338.
- Hughes, A. J., S. E. Daniel, L. Kilford and A. J. Lees (1992). "Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases." J Neurol Neurosurg Psychiatry **55**(3): 181-184.
- Ikebe, S., M. Tanaka and T. Ozawa (1995). "Point mutations of mitochondrial genome in Parkinson's disease." Brain Res Mol Brain Res **28**(2): 281-295.
- Jahn, T. R. and S. E. Radford (2008). "Folding versus aggregation: polypeptide conformations on competing pathways." Arch Biochem Biophys **469**(1): 100-117.
- Jakes, R., M. G. Spillantini and M. Goedert (1994). "Identification of two distinct synucleins from human brain." FEBS Lett **345**(1): 27-32.
- Jantaratnotai, N., P. Utaisincharoen, P. Sanvarinda, A. Thampithak and Y. Sanvarinda (2013). "Phytoestrogens mediated anti-inflammatory effect through suppression of IRF-1 and pSTAT1 expressions in lipopolysaccharide-activated microglia." Int Immunopharmacol **17**(2): 483-488.
- Jao, C. C., A. Der-Sarkissian, J. Chen and R. Langen (2004). "Structure of membrane-bound alpha-synuclein studied by site-directed spin labeling." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(22): 8331-8336.
- Kaisho, T. and S. Akira (2002). "Toll-like receptors as adjuvant receptors." Biochim Biophys Acta **1589**(1): 1-13.
- Kanai, M., A. Imaizumi, Y. Otsuka, H. Sasaki, M. Hashiguchi, K. Tsujiko, S. Matsumoto, H. Ishiguro and T. Chiba (2012). "Dose-escalation and pharmacokinetic study of nanoparticle curcumin, a potential anticancer agent with improved bioavailability, in healthy human volunteers." Cancer Chemother Pharmacol **69**(1): 65-70.
- Karieb, S. and S. W. Fox (2011). "Phytoestrogens directly inhibit TNF-alpha-induced bone resorption in RAW264.7 cells by suppressing c-fos-induced NFATc1 expression." J Cell Biochem **112**(2): 476-487.
- Kato, H., S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, S. Uematsu, K. Matsui, T. Tsujimura, K. Takeda, T. Fujita, O. Takeuchi and S. Akira (2005). "Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response." Immunity **23**(1): 19-28.
- Khalaf, O., B. Fauvet, A. Oueslati, I. Dikiy, A. L. Mahul-Mellier, F. S. Ruggeri, M. K. Mbefo, F. Vercruyse, G. Dietler, S. J. Lee, D. Eliezer and H. A. Lashuel (2014). "The H50Q mutation

enhances alpha-synuclein aggregation, secretion, and toxicity." J Biol Chem **289**(32): 21856-21876.

Kobayashi, H., R. Espinosa, 3rd, A. A. Fernald, C. Begy, M. O. Diaz, M. M. Le Beau and J. D. Rowley (1993). "Analysis of deletions of the long arm of chromosome 11 in hematologic malignancies with fluorescence in situ hybridization." Genes Chromosomes Cancer **8**(4): 246-252.

Kobe, B. and A. V. Kajava (2001). "The leucine-rich repeat as a protein recognition motif." Curr Opin Struct Biol **11**(6): 725-732.

Koo, J. E., Z. Y. Park, N. D. Kim and J. Y. Lee (2013). "Sulforaphane inhibits the engagement of LPS with TLR4/MD2 complex by preferential binding to Cys133 in MD2." Biochem Biophys Res Commun **434**(3): 600-605.

Kopito, R. R. (2000). "Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation." Trends Cell Biol **10**(12): 524-530.

Kreutzberg, G. W. (1996). "Microglia: a sensor for pathological events in the CNS." Trends Neurosci **19**(8): 312-318.

Kruger, R., W. Kuhn, T. Muller, D. Woitalla, M. Graeber, S. Kosel, H. Przuntek, J. T. Epplen, L. Schols and O. Riess (1998). "Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease." Nat Genet **18**(2): 106-108.

Kuiper, G. G., J. G. Lemmen, B. Carlsson, J. C. Corton, S. H. Safe, P. T. van der Saag, B. van der Burg and J. A. Gustafsson (1998). "Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta." Endocrinology **139**(10): 4252-4263.

Kumar, A., J. Zhang and F. S. Yu (2006). "Toll-like receptor 3 agonist poly(I:C)-induced antiviral response in human corneal epithelial cells." Immunology **117**(1): 11-21.

Lashuel, H. A., C. R. Overk, A. Oueslati and E. Masliah (2013). "The many faces of alpha-synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target." Nat Rev Neurosci **14**(1): 38-48.

Lashuel, H. A., B. M. Petre, J. Wall, M. Simon, R. J. Nowak, T. Walz and P. T. Lansbury, Jr. (2002). "Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils." J Mol Biol **322**(5): 1089-1102.

Lazaro, D. F., E. F. Rodrigues, R. Langohr, H. Shahpasandzadeh, T. Ribeiro, P. Guerreiro, E. Gerhardt, K. Krohnert, J. Klucken, M. D. Pereira, B. Popova, N. Kruse, B. Mollenhauer, S. O. Rizzoli, G. H. Braus, K. M. Danzer and T. F. Outeiro (2014). "Systematic comparison of the effects of alpha-synuclein mutations on its oligomerization and aggregation." PLoS Genet **10**(11): e1004741.

Lee, H. J., C. Choi and S. J. Lee (2002). "Membrane-bound alpha-synuclein has a high aggregation propensity and the ability to seed the aggregation of the cytosolic form." J Biol Chem **277**(1): 671-678.

Lee, S. B., S. M. Park, K. J. Ahn, K. C. Chung, S. R. Paik and J. Kim (2009). "Identification of the amino acid sequence motif of alpha-synuclein responsible for macrophage activation." Biochem Biophys Res Commun **381**(1): 39-43.

Lesage, S., M. Anheim, F. Letournel, L. Bousset, A. Honore, N. Rozas, L. Pieri, K. Madiona, A. Durr, R. Melki, C. Verny, A. Brice and G. French Parkinson's Disease Genetics Study (2013). "G51D alpha-synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome." Ann Neurol **73**(4): 459-471.

- Lesage, S. and A. Brice (2009). "Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors." Hum Mol Genet **18**(R1): R48-59.
- LeVine, H., 3rd (1993). "Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution." Protein Sci **2**(3): 404-410.
- Lin, H. Y., C. H. Tang, Y. H. Chen, I. H. Wei, J. H. Chen, C. H. Lai and D. Y. Lu (2010). "Peptidoglycan enhances proinflammatory cytokine expression through the TLR2 receptor, MyD88, phosphatidylinositol 3-kinase/AKT and NF-kappaB pathways in BV-2 microglia." Int Immunopharmacol **10**(8): 883-891.
- Liu, M. H., F. Y. Tsuang, S. Y. Sheu, J. S. Sun and C. M. Shih (2011). "The protective effects of coumestrol against amyloid-beta peptide- and lipopolysaccharide-induced toxicity on mice astrocytes." Neurol Res **33**(6): 663-672.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Lu, Y. C., W. C. Yeh and P. S. Ohashi (2008). "LPS/TLR4 signal transduction pathway." Cytokine **42**(2): 145-151.
- Manning-Bog, A. B., A. L. McCormack, M. G. Purisai, L. M. Bolin and D. A. Di Monte (2003). "Alpha-synuclein overexpression protects against paraquat-induced neurodegeneration." J Neurosci **23**(8): 3095-3099.
- Marletta, M. A., A. R. Hurshman and K. M. Rusche (1998). "Catalysis by nitric oxide synthase." Curr Opin Chem Biol **2**(5): 656-663.
- Maroteaux, L., J. T. Campanelli and R. H. Scheller (1988). "Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal." J Neurosci **8**(8): 2804-2815.
- Masuda, M., N. Suzuki, S. Taniguchi, T. Oikawa, T. Nonaka, T. Iwatsubo, S. Hisanaga, M. Goedert and M. Hasegawa (2006). "Small molecule inhibitors of alpha-synuclein filament assembly." Biochemistry **45**(19): 6085-6094.
- Matsubara, M., D. Harada, H. Manabe and K. Hasegawa (2004). "Staphylococcus aureus peptidoglycan stimulates granulocyte macrophage colony-stimulating factor production from human epidermal keratinocytes via mitogen-activated protein kinases." FEBS Lett **566**(1-3): 195-200.
- McGeer, P. L., S. Itagaki, B. E. Boyes and E. G. McGeer (1988). "Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains." Neurology **38**(8): 1285-1291.
- McGeer, P. L. and E. G. McGeer (2001). "Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease." Neurobiol Aging **22**(6): 799-809.
- McGeer, P. L. and E. G. McGeer (2008). "Glial reactions in Parkinson's disease." Mov Disord **23**(4): 474-483.
- McNaught, K. S., R. Belizaire, O. Isacson, P. Jenner and C. W. Olanow (2003). "Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease." Exp Neurol **179**(1): 38-46.
- McNaught, K. S. and C. W. Olanow (2006). "Protein aggregation in the pathogenesis of familial and sporadic Parkinson's disease." Neurobiol Aging **27**(4): 530-545.
- Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. (2000). "Innate immunity." N Engl J Med **343**(5): 338-344.

- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (1997). "Innate immunity: impact on the adaptive immune response." Curr Opin Immunol **9**(1): 4-9.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt and C. A. Janeway, Jr. (1997). "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity." Nature **388**(6640): 394-397.
- Menon, V. P. and A. R. Sudheer (2007). "Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin." Adv Exp Med Biol **595**: 105-125.
- Minagar, A., P. Shapshak, R. Fujimura, R. Ownby, M. Heyes and C. Eisdorfer (2002). "The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis." J Neurol Sci **202**(1-2): 13-23.
- Mizuno, Y., N. Hattori, T. Kitada, H. Matsumine, H. Mori, H. Shimura, S. Kubo, H. Kobayashi, S. Asakawa, S. Minoshima and N. Shimizu (2001). "Familial Parkinson's disease. Alpha-synuclein and parkin." Adv Neurol **86**: 13-21.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-273.
- Murray, I. V., B. I. Giasson, S. M. Quinn, V. Koppaka, P. H. Axelsen, H. Ischiropoulos, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (2003). "Role of alpha-synuclein carboxy-terminus on fibril formation in vitro." Biochemistry **42**(28): 8530-8540.
- Mythri, R. B. and M. M. Bharath (2012). "Curcumin: a potential neuroprotective agent in Parkinson's disease." Curr Pharm Des **18**(1): 91-99.
- Naiki, H., K. Higuchi, M. Hosokawa and T. Takeda (1989). "Fluorometric-Determination of Amyloid Fibrils In vitro Using the Fluorescent Dye, Thioflavine-T." Analytical Biochemistry **177**(2): 244-249.
- Neumann, H. (2001). "Control of glial immune function by neurons." Glia **36**(2): 191-199.
- Omagari, D., Y. Mikami, H. Suguro, K. Sunagawa, M. Asano, E. Sanuki, I. Moro and K. Komiyama (2009). "Poly I:C-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 in intestinal epithelial cells." Clin Exp Immunol **156**(2): 294-302.
- Opazo, F., A. Krenz, S. Heermann, J. B. Schulz and B. H. Falkenburger (2008). "Accumulation and clearance of alpha-synuclein aggregates demonstrated by time-lapse imaging." J Neurochem **106**(2): 529-540.
- Outeiro, T. F., P. Putcha, J. E. Tetzlaff, R. Spoelgen, M. Koker, F. Carvalho, B. T. Hyman and P. J. McLean (2008). "Formation of toxic oligomeric alpha-synuclein species in living cells." PLoS One **3**(4): e1867.
- Pandey, N., J. Strider, W. C. Nolan, S. X. Yan and J. E. Galvin (2008). "Curcumin inhibits aggregation of alpha-synuclein." Acta Neuropathol **115**(4): 479-489.
- Parks, B. A., L. Jiang, P. M. Thomas, C. D. Wenger, M. J. Roth, M. T. Boyne, 2nd, P. V. Burke, K. E. Kwast and N. L. Kelleher (2007). "Top-down proteomics on a chromatographic time scale using linear ion trap fourier transform hybrid mass spectrometers." Anal Chem **79**(21): 7984-7991.

Pearce, R. K., A. Owen, S. Daniel, P. Jenner and C. D. Marsden (1997). "Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease." J Neural Transm **104**(6-7): 661-677.

Philpott, D. J. and S. E. Girardin (2004). "The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection." Mol Immunol **41**(11): 1099-1108.

Pickart, C. M. and M. J. Eddins (2004). "Ubiquitin: structures, functions, mechanisms." Biochim Biophys Acta **1695**(1-3): 55-72.

Polymeropoulos, M. H., C. Lavedan, E. Leroy, S. E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E. S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanassiadou, T. Papapetropoulos, W. G. Johnson, A. M. Lazzarini, R. C. Duvoisin, G. Di Iorio, L. I. Golbe and R. L. Nussbaum (1997). "Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease." Science **276**(5321): 2045-2047.

Recchia, A., P. Debetto, A. Negro, D. Guidolin, S. D. Skaper and P. Giusti (2004). "Alpha-synuclein and Parkinson's disease." FASEB J **18**(6): 617-626.

Rehli, M. (2002). "Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression." Trends Immunol **23**(8): 375-378.

Rideout, H. J., P. Dietrich, Q. Wang, W. T. Dauer and L. Stefanis (2004). "alpha-synuclein is required for the fibrillar nature of ubiquitinated inclusions induced by proteasomal inhibition in primary neurons." J Biol Chem **279**(45): 46915-46920.

Rietschel, E. T., U. Seydel, U. Zahringer, U. F. Schade, L. Brade, H. Loppnow, W. Feist, M. H. Wang, A. J. Ulmer, H. D. Flad and et al. (1991). "Bacterial endotoxin: molecular relationships between structure and activity." Infect Dis Clin North Am **5**(4): 753-779.

Righi, M., L. Mori, G. De Libero, M. Sironi, A. Biondi, A. Mantovani, S. D. Donini and P. Ricciardi-Castagnoli (1989). "Monokine production by microglial cell clones." Eur J Immunol **19**(8): 1443-1448.

Rochet, J. C. and P. T. Lansbury, Jr. (2000). "Amyloid fibrillogenesis: themes and variations." Curr Opin Struct Biol **10**(1): 60-68.

Roodveldt, C., A. Labrador-Garrido, E. Gonzalez-Rey, C. C. Lachaud, T. Williams, R. Fernandez-Montesinos, A. Benitez-Rondan, G. Robledo, A. Hmadcha, M. Delgado, C. M. Dobson and D. Pozo (2013). "Preconditioning of microglia by alpha-synuclein strongly affects the response induced by toll-like receptor (TLR) stimulation." PLoS One **8**(11): e79160.

Rosenstiel, P., R. Lucius, G. Deuschl, J. Sievers and H. Wilms (2001). "From theory to therapy: implications from an in vitro model of ramified microglia." Microsc Res Tech **54**(1): 18-25.

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-491.

Sanchez-Guajardo, V., C. J. Barnum, M. G. Tansey and M. Romero-Ramos (2013). "Neuroimmunological processes in Parkinson's disease and their relation to alpha-synuclein: microglia as the referee between neuronal processes and peripheral immunity." ASN Neuro **5**(2): 113-139.

Sanchez-Lopez, J. A., I. Caballero, M. Montazeri, N. Maslehat, S. Elliott, R. Fernandez-Gonzalez, A. Calle, A. Gutierrez-Adan and A. Fazeli (2014). "Local Activation of Uterine Toll-

Like Receptor 2 and 2/6 Decreases Embryo Implantation and Affects Uterine Receptivity in Mice." Biol Reprod.

Sarkar, S. N., H. L. Smith, T. M. Rowe and G. C. Sen (2003). "Double-stranded RNA signaling by Toll-like receptor 3 requires specific tyrosine residues in its cytoplasmic domain." J Biol Chem **278**(7): 4393-4396.

Sasaki, H., Y. Sunagawa, K. Takahashi, A. Imaizumi, H. Fukuda, T. Hashimoto, H. Wada, Y. Katanasaka, H. Takeya, M. Fujita, K. Hasegawa and T. Morimoto (2011). "Innovative preparation of curcumin for improved oral bioavailability." Biol Pharm Bull **34**(5): 660-665.

Schulz-Schaeffer, W. J. "The synaptic pathology of alpha-synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia." Acta Neuropathol **120**(2): 131-143.

Schulze-Luehrmann, J. and S. Ghosh (2006). "Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa B." Immunity **25**(5): 701-715.

Sen, R. and D. Baltimore (1986). "Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism." Cell **47**(6): 921-928.

Sen, R. and D. Baltimore (1986). "Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences." Cell **46**(5): 705-716.

Serpell, L. C., J. Berriman, R. Jakes, M. Goedert and R. A. Crowther (2000). "Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(9): 4897-4902.

Shaner, N. C., P. A. Steinbach and R. Y. Tsien (2005). "A guide to choosing fluorescent proteins." Nat Methods **2**(12): 905-909.

Sian, J., D. T. Dexter, A. J. Lees, S. Daniel, Y. Agid, F. Javoy-Agid, P. Jenner and C. D. Marsden (1994). "Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia." Ann Neurol **36**(3): 348-355.

Simon-Sanchez, J., C. Schulte, J. M. Bras, M. Sharma, J. R. Gibbs, D. Berg, C. Paisan-Ruiz, P. Lichtner, S. W. Scholz, D. G. Hernandez, R. Kruger, M. Federoff, C. Klein, A. Goate, J. Perlmutter, M. Bonin, M. A. Nalls, T. Illig, C. Gieger, H. Houlden, M. Steffens, M. S. Okun, B. A. Racette, M. R. Cookson, K. D. Foote, H. H. Fernandez, B. J. Traynor, S. Schreiber, S. Arepalli, R. Zonozzi, K. Gwinn, M. van der Brug, G. Lopez, S. J. Chanock, A. Schatzkin, Y. Park, A. Hollenbeck, J. Gao, X. Huang, N. W. Wood, D. Lorenz, G. Deuschl, H. Chen, O. Riess, J. A. Hardy, A. B. Singleton and T. Gasser (2009). "Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease." Nat Genet **41**(12): 1308-1312.

Singh, P. K., V. Kotia, D. Ghosh, G. M. Mohite, A. Kumar and S. K. Maji (2013). "Curcumin modulates alpha-synuclein aggregation and toxicity." ACS Chem Neurosci **4**(3): 393-407.

Singh, S. and B. B. Aggarwal (1995). "Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected]." J Biol Chem **270**(42): 24995-25000.

Spillantini, M. G., A. Divane and M. Goedert (1995). "Assignment of human alpha-synuclein (SNCA) and beta-synuclein (SNCB) genes to chromosomes 4q21 and 5q35." Genomics **27**(2): 379-381.

Spillantini, M. G., M. L. Schmidt, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes and M. Goedert (1997). "Alpha-synuclein in Lewy bodies." Nature **388**(6645): 839-840.

Stefanova, N., L. Fellner, M. Reindl, E. Masliah, W. Poewe and G. K. Wenning (2011). "Toll-like receptor 4 promotes alpha-synuclein clearance and survival of nigral dopaminergic neurons." Am J Pathol **179**(2): 954-963.

Su, X., K. A. Maguire-Zeiss, R. Giuliano, L. Prifti, K. Venkatesh and H. J. Federoff (2008). "Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease." Neurobiol Aging **29**(11): 1690-1701.

Tabeta, K., P. Georgel, E. Janssen, X. Du, K. Hoebe, K. Crozat, S. Mudd, L. Shamel, S. Sovath, J. Goode, L. Alexopoulou, R. A. Flavell and B. Beutler (2004). "Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(10): 3516-3521.

Tak, P. P. and G. S. Firestein (2001). "NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases." J Clin Invest **107**(1): 7-11.

Takeuchi, O. and S. Akira (2001). "Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system." Int Immunopharmacol **1**(4): 625-635.

Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda and S. Akira (1999). "Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components." Immunity **11**(4): 443-451.

Tapping, R. I., S. Akashi, K. Miyake, P. J. Godowski and P. S. Tobias (2000). "Toll-like receptor 4, but not toll-like receptor 2, is a signaling receptor for Escherichia and Salmonella lipopolysaccharides." J Immunol **165**(10): 5780-5787.

Thapa, A., B. C. Vernon, K. De la Pena, G. Soliz, H. A. Moreno, G. P. Lopez and E. Y. Chi (2013). "Membrane-mediated neuroprotection by curcumin from amyloid-beta-peptide-induced toxicity." Langmuir **29**(37): 11713-11723.

Thomas, M. P., K. Chartrand, A. Reynolds, V. Vitvitsky, R. Banerjee and H. E. Gendelman (2007). "Ion channel blockade attenuates aggregated alpha synuclein induction of microglial reactive oxygen species: relevance for the pathogenesis of Parkinson's disease." J Neurochem **100**(2): 503-519.

Trachootham, D., W. Lu, M. A. Ogasawara, R. D. Nilsa and P. Huang (2008). "Redox regulation of cell survival." Antioxid Redox Signal **10**(8): 1343-1374.

Tsigelny, I. F., P. Bar-On, Y. Sharikov, L. Crews, M. Hashimoto, M. A. Miller, S. H. Keller, O. Platoshyn, J. X. Yuan and E. Masliah (2007). "Dynamics of alpha-synuclein aggregation and inhibition of pore-like oligomer development by beta-synuclein." FEBS J **274**(7): 1862-1877.

Tu, C. T., Q. Y. Yao, B. L. Xu, J. Y. Wang, C. H. Zhou and S. C. Zhang (2012). "Protective effects of curcumin against hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride: modulation of high-mobility group box 1, Toll-like receptor 4 and 2 expression." Food Chem Toxicol **50**(9): 3343-3351.

Tu, X. K., W. Z. Yang, J. P. Chen, Y. Chen, L. Q. Ouyang, Y. C. Xu and S. S. Shi (2014). "Curcumin inhibits TLR2/4-NF-kappaB signaling pathway and attenuates brain damage in permanent focal cerebral ischemia in rats." Inflammation **37**(5): 1544-1551.

Ulmer, T. S., A. Bax, N. B. Cole and R. L. Nussbaum (2005). "Structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein." J Biol Chem **280**(10): 9595-9603.

Uversky, V. N. and D. Eliezer (2009). "Biophysics of Parkinson's disease: structure and aggregation of alpha-synuclein." Curr Protein Pept Sci **10**(5): 483-499.

- Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe and F. Speleman (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." Genome Biol **3**(7): RESEARCH0034.
- Vogiatzi, T., M. Xilouri, K. Vekrellis and L. Stefanis (2008). "Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells." J Biol Chem **283**(35): 23542-23556.
- Wang, C. and M. S. Kurzer (1997). "Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells." Nutr Cancer **28**(3): 236-247.
- Wang, M. S., S. Boddapati, S. Emadi and M. R. Sierks (2010). "Curcumin reduces alpha-synuclein induced cytotoxicity in Parkinson's disease cell model." BMC Neurosci **11**: 57.
- Watson, M. B., F. Richter, S. K. Lee, L. Gabby, J. Wu, E. Masliah, R. B. Effros and M. F. Chesselet (2012). "Regionally-specific microglial activation in young mice over-expressing human wildtype alpha-synuclein." Exp Neurol **237**(2): 318-334.
- Wiesinger, H. (2001). "Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system." Prog Neurobiol **64**(4): 365-391.
- Wilms, H., P. Rosenstiel, M. Romero-Ramos, A. Arlt, H. Schafer, D. Seegert, P. J. Kahle, S. Odoj, J. H. Claasen, C. Holzknecht, L. O. Brandenburg, G. Deuschl, S. Schreiber, D. Kirik and R. Lucius (2009). "Suppression of MAP kinases inhibits microglial activation and attenuates neuronal cell death induced by alpha-synuclein protofibrils." Int J Immunopathol Pharmacol **22**(4): 897-909.
- Wolfe, L. S., M. F. Calabrese, A. Nath, D. V. Blaho, A. D. Miranker and Y. Xiong (2010). "Protein-induced photophysical changes to the amyloid indicator dye thioflavin T." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(39): 16863-16868.
- Zaky, A., M. Mahmoud, D. Awad, B. M. El Sabaa, K. M. Kandeel and A. R. Bassiouny (2014). "Valproic acid potentiates curcumin-mediated neuroprotection in lipopolysaccharide induced rats." Front Cell Neurosci **8**: 337.
- Zhang, W., T. Wang, Z. Pei, D. S. Miller, X. Wu, M. L. Block, B. Wilson, W. Zhang, Y. Zhou, J. S. Hong and J. Zhang (2005). "Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease." FASEB J **19**(6): 533-542.
- Zhang, Y., T. W. Kensler, C. G. Cho, G. H. Posner and P. Talalay (1994). "Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(8): 3147-3150.
- Zhou, Y., M. Guo, X. Wang, J. Li, Y. Wang, L. Ye, M. Dai, L. Zhou, Y. Persidsky and W. Ho (2013). "TLR3 activation efficiency by high or low molecular mass poly I:C." Innate Immun **19**(2): 184-192.
- Zhu, J., A. Ghosh, E. M. Coyle, J. Lee, E. R. Hahm, S. V. Singh and S. N. Sarkar (2013). "Differential effects of phenethyl isothiocyanate and D,L-sulforaphane on TLR3 signaling." J Immunol **190**(8): 4400-4407.