

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

# **Die Rolle von Neuromelanin in der Pathogenese des idiopathischen Parkinson Syndroms**

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

vorgelegt von  
**Sebastian Geick**  
aus Parchim

Kiel 2011

1. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Lucius

2. Berichterstatter: Prof. Dr. T. Herdegen

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2011

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 18.05.2011

gez. Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi

Meiner Familie gewidmet

# Abkürzungsverzeichnis

Ag	Silber
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovine serum albumin
Ca <sup>2+</sup>	ionisiertes zweiwertiges Calcium
CD4+	Cluster of Differentiation 4
COMT	Catechol-O-methyltransferase
DA	Dopamin
DAT	dopamine active transportere
DOPAC	3,4-dihydroxyphenylacetic acid
DNA	desoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fe <sup>3+</sup>	ionisiertes dreiwertiges Eisen
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPCL	high performance liquid chromatography
HVA	homovanillin acid
Iba-1	ionized calcium binding adaptor molecule 1
Ig	Immunglobuline
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IPS	idiopathisches Parkinson-Syndrom
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
LPS	Lipopolysaccharide
MAO-B	Monoaminoxidase B
MAP	Mitogen aktiviertes Protein
MAPK	MAP-Kinase
MHC	Major Histocompatibility Complex
mRNA	messenger RNA
MPP <sup>+</sup>	1-Methyl-4-phenyl-Pyridin
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
NaCl	Natrium-Chlorid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADH	reduziertes NAD
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NADPH	reduziertes NADP
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NM	Neuromelanin
NO	Stickstoffmonoxid
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
NTF	neurothrophe Faktoren
OH <sup>-</sup>	Hydroxidion
8-OHdG	8-Hydroxy-2-Deoxyguanosin
PBS	phosphate buffered saline

PFA	Paraformaldehyd
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PS	Parkinson-Syndrom
ROS	reactive oxygen species
REDOX	Reduktions-Oxidations-Reaktion
SN	Substantia nigra
SNpc	Substantia nigra pars compacta
TH	Tyrosinhydroxylase
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
1.1	Neurodegenerative Erkrankungen .....	1
1.2	Das Parkinson-Syndrom .....	2
1.2.1	Prävalenz .....	2
1.2.2	Neuropathologie .....	3
1.2.3	Ätiologie .....	4
1.3	Neuroinflammation / Neurodegeneration .....	13
1.3.1	Mikroglia – Schlüsselzellen der Inflammation im ZNS .....	14
1.3.2	Neuromelanin – endogenes Neurotoxin ? .....	15
1.4	Fragestellungen .....	18
<b>2</b>	<b>Material</b> .....	19
2.1	Reagenzien und Materialien .....	19
2.2	Antikörper .....	20
2.3	Lösungen und Puffer .....	20
2.4	Materialien für die Histologie .....	20
2.5	Gebrauchsfertige Kits .....	20
<b>3</b>	<b>Methoden</b> .....	21
3.1	Intrazerebrale Injektionen .....	21
3.1.1	Technisches Verfahren .....	21
3.1.2	Isolierung und Reinigung von Neuromelanin .....	21
3.1.3	Zubereitung der Goldsuspension .....	22
3.1.4	Operationsverlauf und Versuchsgruppen .....	22
3.1.5	Immunhistochemie und Histologie .....	24
3.1.6	Bestimmung von Dopamin und Metaboliten im Corpus striatum .....	27
3.1.7	Statistische Analysen .....	28
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	29
4.1	Studien am Tiermodell .....	29
4.1.1	Stereotaktische kortikale Injektion von Neuromelanin/Goldsuspension .....	29
4.1.2	Neuromelanin aktiviert ruhende Mikrogliazellen in der Substantia nigra .....	30
4.1.3	Neuromelanin führt zu neuronalem, dopaminergen Zellverlust .....	31
4.1.4	Einfluss des nigralen Zellverlusts auf das Corpus striatum .....	35
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	36
5.1	Neuromelanin aktiviert Mikrogliazellen durch dualen Mechanismus .....	36
5.2	Bedeutung von Neuromelanin im <i>in – vivo</i> Modell .....	37
5.3	Einfluss der Neurodegeneration in der Substantia nigra auf nigrostriatale Bahnen ?	38

5.4	Neuromelanin – Aktivator von Mikrogliazellen und Induktor mikroglialer proinflammatorischer Zytokine .....	39
5.5	Neuroprotektion durch Neuromelanin .....	40
5.6	Interaktion von Neuromelanin mit Eisen und anderen Metallen führt zur Neurotoxizität? .....	41
5.7	Ausblick.....	43
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>49</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>60</b>
<b>9</b>	<b>Danksagungen</b> .....	<b>62</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen, die vorwiegend im höheren Lebensalter auftreten, sind durch einen langsamen progredienten Verlauf, eine charakteristische Klinik und durch typische morphologische und biochemische Veränderungen gekennzeichnet. Gemeinsam liegt ihnen ein langsam fortschreitender Funktionsverlust und Ausfall bestimmter Neuronenpopulationen in spezifischen Arealen des Zentralnervensystems (ZNS) zugrunde. Die häufigsten Vertreter dieser Krankheitsgruppe sind der Morbus Parkinson, als die häufigste Bewegungsstörung im höheren Alter, der Morbus Huntington, der Morbus Alzheimer, die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) sowie Multisystemerkrankungen, die mit Parkinson-Symptomatik und zusätzlichen Symptomen oben genannter Erkrankungen einhergehen (Jellinger, 1998). Die Prävalenz der neurodegenerativen Erkrankungen liegt zwischen 0,5-1%, mit zunehmendem Lebensalter steigt sie jedoch stark an. Die Ursachen und molekularbiologischen Prozesse der meisten neurodegenerativen Erkrankungen sind trotz großer Fortschritte der modernen Neurowissenschaften bisher größtenteils ungeklärt, so dass eine kausale Behandlung bisher nicht bekannt ist. Außer den genetisch bedingten Faktoren spielen auch umweltbedingte, exogene Faktoren eine wichtige Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankungen. Ein Ungleichgewicht zwischen neuroprotektiven und degenerativen Einflüssen kann so zum Untergang von Nervenzellen führen (Bossy-Wetzel et al., 2004; Hunter, 2005). Aufgrund der demografischen Entwicklung mit immer höherer Lebenserwartung kommt es zu einer erheblichen Zunahme der neurodegenerativen Erkrankungen und dadurch zu steigenden Gesundheitskosten, wodurch ein sozialmedizinisches und gesundheitspolitisches Problem entsteht (Siderowf et al., 2002). Außer den volkswirtschaftlichen Faktoren kommt es darüber hinaus durch die langsame Progredienz und die über die Jahre zunehmende Schwere der Erkrankung nicht nur zu einer starken Beeinträchtigung der eigenen Persönlichkeit, sondern auch der Familie, die erheblich in ihrem Alltag mit beansprucht wird, da viele der Patienten letztendlich pflegebedürftig werden. Daher liegt der Schwerpunkt der Bemühungen in der Klinik und in der Forschung vor allem in einer Verbesserung der Früherkennung und Prävention der neurodegenerativen Erkrankungen.

## **1.2 Das Parkinson-Syndrom**

Die Parkinson-Krankheit ist eine der häufigsten Formen neurodegenerativer Erkrankungen des höheren Lebensalters. James Parkinson beschrieb erstmals 1817 das Krankheitsbild in seiner Studie „An essay on the shaking palsy“. Parkinson-Syndrome sind definiert durch das Vorliegen einer Brady-/Akinese und eines der folgenden, unterschiedlich stark ausgeprägten Kardinalsymptome: Rigor, Ruhetremor, posturale Instabilität. Die Erkrankung beginnt oft einseitig (Hemisymptomatik) (Jankovic, 2008). Frühe und häufig uncharakteristische Symptome können sich in einer Verlangsamung einzelner Handlungsabläufe (Bradyphrenie), depressiver Verstimmungen oder Störungen des Schriftbildes (Mikrographie) äußern. Mißempfindungen (Dysästhesien) und Schmerzsymptome in der Schulter-Nacken-Region oder in den Extremitäten zählen wie auch die Minderung des Geruchssinnes (Hyposmie) ebenfalls zu den Prodromalsymptomen. Zusätzliche fakultative Symptome treten in Form von Störungen der Sprache (Dysarthrophonie) und vegetativen Dysfunktionen wie Sialorrhoe, Seborrhoe mit typischem Salbengesicht, nächtliche Hyperhidrose, Blasenfunktionsstörungen, Obstipation sowie orthostatische Dysregulation auf (Harris et al., 2009; Jankovic, 2008; Poewe et al., 1996). Im Verlauf erkranken ca. 40-60 % der Patienten an einer Depression (Storch et al., 2008). Auch die Demenz ist bei ca. 30% der Patienten ein Spätsymptom der Erkrankung (Caixeta et al., 2008; Robottom et al., 2009).

### **1.2.1 Prävalenz**

In Mitteleuropa sowie in Nordamerika beträgt die Erkrankungshäufigkeit 160 pro 100.000 Einwohner. In Deutschland wird die Zahl der Erkrankten auf ca. 250.000 geschätzt und weltweit auf über 5 Millionen, womit der Morbus Parkinson die zweithäufigste neurologisch degenerative Erkrankung neben der Alzheimer Erkrankung darstellt (Alves et al., 2008). Die Inzidenzrate wird auf 20/100.000 geschätzt, wobei die Erkrankungsraten bei Männern einen leicht erhöhten Anteil gegenüber Frauen aufweisen (Wooten et al., 2004). Grundsätzlich nimmt die Erkrankungshäufigkeit mit steigendem Alter deutlich zu. Die Prävalenzrate bei den über 50-Jährigen liegt bei über 1%, steigt auf 3% bei den über 60-Jährigen und auf bis zu 10% der über 80-Jährigen. Vor dem 50. Lebensjahr erkranken ca. 30% und zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr 40% der Patienten. Die häufigste Manifestation der Erkrankung liegt zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr. Bei einem kleinen Anteil (5%) der Parkinsonpatienten zeigen sich die ersten Symptome vor einem Alter von 40 Jahren. Zahlreiche Risikofaktoren wurden mit der Entstehung der Parkinsonschen Erkrankung in Zusammenhang gebracht. Einer der bedeutendsten Zusammenhänge besteht dabei zwischen dem Alter des Patienten und dem

Auftreten der Erkrankung (von Campenhausen et al., 2005; Zhang et al., 1993). Auch eine positive Familienanamnese spielt eine Rolle, denn ca. 1/5 aller Parkinson-Patienten haben Verwandte mit dem gleichen Erkrankungsbild (Sellbach et al., 2006).

### **1.2.2 Neuropathologie**

Neuropathologisch ist die Parkinson Erkrankung durch eine fortschreitende Degeneration dopaminergener Neurone in der Substantia nigra pars compacta charakterisiert. Dopaminerge Neurone enthalten Neuromelanin als Pigment, welches der Substantia nigra ihren Namen verleiht. Durch den Verlust der dopaminergen Neurone kommt es zu einer Depigmentation im Mesencephalon. Dieses Phänomen wurde erstmals durch Untersuchungen an Gehirnen von Parkinson Patienten von Tretiakoff im Jahr 1919 beschrieben. Ein paar Jahre zuvor hatte der Neurologe Friedrich Lewy bereits zytoplasmatische Einschlusskörperchen als erstes neuropathologisches Merkmal des Parkinson-Syndroms beschrieben und als Lewy-Körperchen (engl. Lewy-bodys) bezeichnet. Diese Proteinaggregate, die sich histologisch durch ihre eosinophile Färbeeigenschaft darstellen lassen, fand Lewy hauptsächlich im Nucleus basalis Meynert, dem Locus coeruleus und im dorsalen motorischen Vaguskern. Aber auch in degenerierten Neuronen der Substantia nigra konnten sie nachgewiesen werden. Ab einem neuronalen Zellverlust von etwa 50% in der Substantia nigra mit einer Verringerung des Dopaminspiegels im Corpus striatum von mindestens 60% ist dann eine klinische Manifestation zu erwarten. Die Verminderung des Dopaminspiegels korreliert mit dem Grad der Akinese. Auch in der Durchschnittsbevölkerung tritt mit zunehmendem Lebensalter eine Abnahme der Neurone in der Substantia nigra und dadurch eine Verminderung des Dopamingehalts in den Basalganglien auf, jedoch ist bei Patienten mit einem Parkinson-Syndrom die Verlustrate dopaminergener Neurone in der Substantia nigra um ein vielfaches erhöht. Außer den dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra, sind auch die noradrenergen Neurone des Locus coeruleus und serotonergen Neurone der Raphe-Kerne im Hirnstamm betroffen. Der dadurch bedingte Hormonmangel kann wiederum mit einer demenziellen Entwicklung sowie depressiven Verstimmungen beim Parkinson-Syndrom in Bezug gebracht werden (Jellinger, 1991).

### 1.2.3 Ätiologie

Unter der Bezeichnung Parkinson-Syndrom wird eine Reihe von unterschiedlichen Krankheitsbildern zusammengefasst, deren Ursachen bis heute nur unzureichend geklärt sind. Der Großteil (75-80%) wird unter dem Begriff Morbus Parkinson zusammengefasst und tritt idiopathisch auf. 20-30% der Parkinson Syndrome sind durch einen familiären Vererbungsmodus, symptomatischer Genese oder anhand Manifestationen einer anderen neurodegenerativen Erkrankung erklärbar.

- **Primäres idiopathisches Parkinson-Syndrom (IPS / Morbus Parkinson)**
  - sporadisch = auftretend mit letztlich bisher ungeklärter Genese, multifaktorielle Ursachen
  
- **Hereditäres Parkinson Syndrom (familiär = genetisch bedingt)**
  
- **Sekundäre Parkinson-Syndrome (schädigende Ursache eindeutig bekannt)**
  - Medikamenten-induziert = parkinsonoid
    - Neuroleptika (Phenothiazine, Valproinsäure),
    - Antiemetika (z.B. Metoclopramid, nicht Domperidon),
    - zentral wirksame Antihypertensiva (z.B. Reserpin),
    - Ca<sup>2+</sup>-Antagonisten (Flunarizin, Cinnarizin)
  - Normaldruckhydrozephalus
  - Hirninfarkt
  - Hypoxie
  - Subcortikale arteriosklerotische Enzephalopathie (SAE)
  - Posttraumatisch (u.a. Boxerenzephalopathie)
  - Hirntumoren
  - Toxin-induziert (Kohlenmonoxid, Mangan, Methylphenyltetrahydropyridin (MPTP), Methylendioxy-N-methylamphetamin (MDMA, Ecstasy))
  - Stoffwechselerkrankungen (M. Wilson, Hypoparathyreoidismus)
  - viral (AIDS-Enzephalopathie oder seltene Enzephalitiden)
  - postenzephalitisch (von Economo Enzephalitis, vorwiegend historisch)



Entstehung des Parkinson Syndroms mittlerweile als gesichert (Biskup et al., 2008; Hofer et al., 2004). Im Folgenden wird näher auf einige der identifizierten Gene eingegangen.

### PARK1 ( $\alpha$ -Synuclein, 4q21)

Das PARK1-Gen ist das erste Gen, das bei einer italienischen Großfamilie für eine autosomal-dominante vererbte Form des PS identifiziert werden konnte. Es ist auf dem langen Arm des Chromosoms 4 lokalisiert (Polymeropoulos et al., 1996). In dieser Region konnte dann kurze Zeit später das  $\alpha$ -Synuclein-Gen identifiziert werden, das für das gleichnamige Protein kodiert und einen wesentlichen Bestandteil der Lewy-Körperchen darstellt. Die Funktion ist größtenteils unbekannt, aber es gibt Hinweise, dass es an Tubulin bindet und als Chaperon (stabilisierendes Faltungsprotein) für sog. SNARE-Komplexe (engl. soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor) fungiert. SNARE-Proteine sind in Neuronen u.a. bei der Fusion von Vesikeln mit der Zellmembran und der anschließenden Porenbildung beteiligt und somit auch an der Regulation der dopaminergen Neurotransmission (Uversky, 2008). Durch Punktmutationen (Einzelbasenaustausch der Aminosäure Alanin durch Threonin an der Position 53 des Proteins (Ala53Thr)) im  $\alpha$ -Synuclein-Gen entsteht ein fehlgefaltetes Protein, welches durch den dadurch bedingten Funktionsverlust leicht aggregiert und sich in Form von Fibrillen, histopathologisch als Lewy-Körperchen sichtbar, ablagert (Spira et al., 2001). Fehlgefaltete Proteine werden normalerweise über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) degradiert. Dabei werden Ubiquitin-Monomere über mehrere Enzymschritte aktiviert, um dann durch Interaktion mit Protein-Ligasen (z.B. E3-Ligase/Parkin) fehlgefaltete Zielproteine zu erkennen. So markierte Proteine werden wiederum von Proteasen (26S-Proteasom) erkannt und in Peptidfragmente zerlegt. Eine Störung in diesem System durch Genmutationen oder mitochondriale Dysfunktionen mit resultierendem oxidativen Stress führen zu Schädigungen der Ubiquitinligasen oder des 26S-Proteasoms und so zu Proteinanhäufungen, welche in der Zelle starken Zellstress mit anschließender neuronalen Degeneration auslösen (Chu et al., 2009). Funktionsunfähige Chaperone spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Aggregation von Proteinen, da sie so die korrekte Faltung und Assoziation neu synthetisierter Proteine nicht mehr übernehmen können. Durch Veränderungen im  $\alpha$ -Synuclein-Gen könnte die Eigenschaft als Chaperoneprotein verloren gehen, was zur Aggregation von Proteinen führt (Uversky, 2008). Eine Aktivierung von Mikrogliazellen, welche durch Phagozytose von  $\alpha$ -Synuclein hervorgerufen wird, führt zur Freisetzung von Superoxiden (Zhang et al., 2005) sowie NO und TNF- $\alpha$  und dadurch zu weiterer neuronaler Zellschädigung. So kann gezeigt werden, dass

$\alpha$ -Synuclein und Mutationen in diesem Genabschnitt zur Pathogenese der Lewy-Körperchen assoziierten Parkinsonschen Erkrankung beitragen (Lee et al., 2006). Der Erkrankungsbeginn liegt allerdings bei einem Alter von etwas weniger als fünfzig Jahren mit einem schnellen progressiven Verlauf und häufig sich gleichzeitig entwickelnder Demenz (Golbe et al., 1990).

#### PARK2 (Parkin, 6q25)

Das familiäre, juvenile Parkinson-Syndrom, eine autosomal-rezessiv vererbte Form, das oft bereits im 2. oder 3. Lebensjahrzehnt beginnt, unterscheidet sich neuropathologisch vom idiopathischen Parkinson-Syndrom durch das Fehlen der charakteristischen Lewy-Körperchen (Kitada et al., 1998). Das PARK2-Gen, auch „Parkin“ genannt, liegt auf dem langen Arm von Chromosom 6. Das Protein-Produkt ist eine E3-Ubiquitin-Ligase, die einen Bestandteil des Ubiquitin-Proteasomen-Systems (UPS) darstellt und am Abbau fehlgestalteter Proteine beteiligt ist (Shimura et al., 2000). Die Mutationen im Parkin-Gen führen zum Verlust der E3-Ligase-Aktivität (loss of function-Mutationen), so dass die Proteindegradation beeinträchtigt bzw. eine abnorme Proteinaggregation gefördert wird, welche wiederum als ursächlich für die Neurodegeneration angenommen wird (Schlehe et al., 2008; Tanaka et al., 2001). Parkin-Mutationen werden für die Hälfte aller familiären Parkinson-Fälle verantwortlich gemacht und sind daher von großer klinischer Bedeutung (Sun et al., 2006). Es konnte auch gezeigt werden, dass eine besondere Form des  $\alpha$ -Synuclein (PARK 1) das Substrat für „Parkin“ ist (Shimura et al., 2001). Somit wurde eine Verbindung dieser beiden Parkinson-Gene über das Ubiquitin-System hergestellt.

#### PARK5 (UCH-L1, 4p)

Auf dem kurzen Arm von Chromosom 4 liegt das Gen für die C-terminale Ubiquitinhydrolase L1 (UCH-L1). UCH-L1 kann als Bestandteil der Lewy-Körperchen nachgewiesen werden und ist an der Ubiquitin-vermittelten Proteindegradation beteiligt (Ardley et al., 2004). Unklar ist jedoch, ob eine Störung der Ubiquitin-vermittelten Proteindegradation zu einer Zelldegeneration in der Substantia nigra führt. Eine Bedeutung dieses Gens für das sporadische IPS liegt aber nahe, da ein Polymorphismus des UCH-L1-Gens als protektiver Faktor identifiziert wurde (Wintermeyer et al., 2000).

#### PARK6 (PINK1, 1p35-3)

Das PINK1-Gen (engl. PTEN-induced putative kinase 1) wird wie das Parkin-Gen autosomal rezessiv vererbt und ähnelt phenotypisch dem juvenilen Parkinson-Syndrom (Funayama et al.,

2007). Das PINK1-Protein ist eine Kinase, welche in den Mitochondrien lokalisiert ist und schützend gegen die durch oxidativen Stress hervorgerufenen Dysfunktionen in den Mitochondrien wirkt (Valente et al., 2004). Nach neueren Untersuchungen zeigt sich zwischen dem Parkin-Gen und dem PINK1-Gen ein gemeinsamer Signalweg, welcher die Funktion der Mitochondrien beeinflusst (Funayama et al., 2007).

#### PARK7 (DJ-1, 1p36)

Bei dieser autosomal rezessiv vererbten Form des PS konnten eine homozygote Deletion sowie eine Punktmutation im DJ-1 Gen identifiziert werden. Sie führt ebenfalls zu einer relativ früh beginnenden Symptomatik, tritt aber weniger häufig auf als andere juvenile PS (Hedrich et al., 2004). Die Funktion des DJ-1 Proteins ist noch z.T. ungeklärt, aber es konnte außer der Funktion als Biomarker bei einigen Krebserkrankungen auch eine neuroprotektive Funktion gegenüber oxidativem Stress nachgewiesen werden (Gu et al., 2009; Kahle et al., 2009).

#### PARK8 (LRRK2, 12p11.2-q13.1)

Das LRRK2 (engl. Leucine-rich repeat kinase 2)-Gen kodiert für ein großes und sehr komplexes Protein, das u.a. als Proteinkinase agiert und in neuronale Apoptosevorgänge eingreift (Webber et al., 2009). Auch wenn die einzelnen Vorgänge zwischen der LRRK2 Funktion und der zellulären Antwort noch nicht vollständig verstanden sind, konnte doch nachgewiesen werden, dass Mutationen in diesem Gen für eine autosomal-dominante Form des PS mit Spätsymptomatik verantwortlich sind (Anand et al., 2009).

#### PARK9 (Kufor-Rakeb Syndrom, 1p36)

Das Kufor-Rakeb Syndrom (KRS) ist eine seltene, neurodegenerative Erkrankung mit charakteristischen Kennzeichen des Parkinson Syndroms und zusätzlichen Symptomen wie Störungen der Augenbewegungen und Demenz. Es wird autosomal rezessiv vererbt und kann bereits im Jugendalter auftreten. Die genetische Ursache des KRS sind Mutationen im Gen auf Chromosom 1p36. Das Gen kodiert für ein Protein, das in der Membran von Lysosomen vorkommt. Das mutierte Protein wird nicht in die Membran eingebaut, sondern vom endoplasmatischen Retikulum als fehlerhaft erkannt und von der Zelle abgebaut. Durch den so bedingten verringerten Abbau anderer Proteine kommt es zu einer toxischen Anhäufung, was zur Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen führen könnte. Da das ATP13A2-

Protein am stärksten im Gehirn im Bereich der Substantia nigra gebildet wird, kann es bei der Entstehung der Parkinson-Erkrankung eine wichtige Rolle spielen (Ramirez et al., 2006).

### **1.2.3.3 Mitochondriale Defekte**

In den Mitochondrien wird Energie in Form ATP im Rahmen der Atmungskette produziert. Die Atmungskette besteht aus fünf Komplexen in der inneren Mitochondrienmembran. Bei Parkinson Patienten ist die Aktivität des Komplexes I signifikant vermindert (Cooper et al., 1995; Schapira, 1993). Somatische Mutationen im mitochondrialen Genom bedingt durch erhöhten oxidativen Stress könnten für eine verminderte Komplex I Aktivität verantwortlich sein (siehe 2.2.3.1. u. 2.2.3.4.). Auch die durch das PINK1-Gen kodierte und in den Mitochondrien lokalisierte Proteinkinase kann durch Mutationen so verändert werden, dass die protektive Eigenschaft gegenüber oxidativem Stress verloren geht. Daher wird angenommen, dass mitochondriale Mutationen die Suszeptibilität erhöhen, an einem IPS zu erkranken (Valente et al., 2004).

### **1.2.3.4 Oxidativer Stress**

Als oxidativen Stress bezeichnet man ein Ungleichgewicht zwischen der vermehrten Produktion von Prooxidantien (reaktive Sauerstoffspezies) und dem Verlust an Konzentration oder Aktivität von Antioxidantien (Vitamine C, E, Glutathion, Glutathion-Peroxidase). Die Ursachen des oxidativen Stresses sieht man v.a. in einer erhöhten zellulären Belastung durch eine vermehrte Radikal-Bildung. Dadurch kommt es zu Schädigungen der mitochondrialen Elektronentransportkette, insbesondere der Komplex I-Aktivität, wie sie bei Patienten, die an einem IPS erkrankt sind, vorliegt. Es kommt hierbei zu einer vermehrten Bildung von zellschädigenden Hydroxylradikalen ( $\text{OH}^\cdot$ ) (Marella et al., 2007). Die freien Radikale können Lipide der Zellmembran oxidieren (Lipidperoxidation), so dass es zum Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit Aktivierung von Nukleasen und Proteasen kommt, wodurch der Zelltod ausgelöst wird (Agil et al., 2006). Auch beim Dopaminstoffwechsel kommt es durch den Abbau durch die Monaminoxidase B (MAO-B) zur Bildung von Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und freien Radikalen (Yamato et al., 2010). Durch eine verminderte Aktivität der Glutathion-Peroxidase, die bei Parkinson-Patienten gezeigt werden konnte, kann Wasserstoffperoxid nicht zu Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) abgebaut werden (Power et al., 2009). Wasserstoffperoxid ist nicht sehr reaktiv, aber durch die Reaktion mit Metallen wie Kupfer und Eisen werden wiederum Hydroxylradikale gebildet, die zelltoxisch sind. Beim Parkinson-Syndrom spielt außer einer erhöhten

Eisenkonzentration in der Substantia nigra auch das beim Dopaminabbau entstehende Neuromelanin, das eine hohe Bindungsfähigkeit zum Eisen aufweist, bei der Bildung freier Radikale eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass besonders die dopaminergen Neurone der Substantia nigra eine erhöhte Disposition und Vulnerabilität für oxidativen Stress aufweisen. Um die Ausbreitung der durch die Oxidation hervorgerufenen irreversiblen DNA-Schäden zu untersuchen, konnte immunhistochemisch ein gemeinsames Produkt der DNA-Oxidation in der Bildung von 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosin (8-OHdG) charakterisiert werden. In Parkinson-Gehirnen konnte vor allem in den Neuronen der Substantia nigra eine stark erhöhte 8-OHdG-Konzentration nachgewiesen werden, welche als Biomarker in der Diagnostik oder in der Verlaufsdokumentation in Zukunft hilfreich sein kann (Yasuhara et al., 2007; Zhang et al., 1999).

### **1.2.3.5 Umweltfaktoren**

Diskutiert werden außer altersbedingten degenerativen Veränderungen und genetischen Faktoren auch Umwelt- und Ernährungseinflüsse. Dafür wurden epidemiologische Studien durchgeführt und die Häufigkeit des Auftretens der Krankheit in einer gegenüber Pestiziden exponierten Bevölkerungsgruppe (Beruf, ländliche Wasserversorgung) und einer unbelasteten Vergleichsgruppe verglichen (Gorell et al., 1998). Außerdem wurden die für das Parkinson-Syndrom in Frage kommenden Pestizide wie Paraquat, Maneb und Rotenon hinsichtlich ihrer Pathogenität analysiert. Diese Pestizide besitzen eine ähnliche chemische Struktur wie MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin), ein Nebenprodukt aus einem Heroinersatzstoff, welches bei jugendlichen Drogenabhängigen schwere Parkinson-ähnliche Symptome hervorrief (Langston et al., 1999). MPTP zeigt exemplarisch, dass eine Chemikalie ein Parkinsonsyndrom auslösen kann und das IPS damit auch durch andere Umweltfaktoren verursacht werden kann (Allam et al., 2005; Baldereschi et al., 2003).

#### MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin)

Bei der Herstellung der in den 80er Jahren neu entwickelten synthetischen Droge 1-Methyl-4-Phenyl-4-Propionpiperidin (MPPP), ein Analog des Meperidins, entstand MPTP als Nebenprodukt, welches bei den v.a. jugendlichen Konsumenten schwere Parkinson-ähnliche Symptome verursachte (Langston et al., 1983). In MPTP-Tiermodellen konnte eine selektive Degeneration dopaminergener Neurone und die Bildung von Proteinaggregaten in Form von eosinophilen Einschlusskörperchen in der Substantia nigra nachgewiesen werden (Langston,

1987). Noch Jahre nach einer MPTP-Exposition wird eine chronische Entzündungsreaktion bei Menschen und subhumanen Primaten aufrecht erhalten (Langston et al., 1999). MPTP kann die Blut-Hirn-Schranke passieren und wird in Gliazellen durch die Monoaminoxidase B (MAO-B) zu MPDP<sup>+</sup> oxidiert, welches durch spontane Oxidation zu MPP<sup>+</sup> umgewandelt wird (Markey et al., 1984). MPP<sup>+</sup> wird anschließend selektiv über den Dopamin-Transporter (DAT) in dopaminerge Neurone aufgenommen und vesikulär gespeichert. Das bedeutet, dass MPP<sup>+</sup> nur für dopaminerge Neurone selektiv toxisch ist, denn ähnliche Konzentrationen im Nebennierenmark zeigen kaum zelltoxische Wirkungen. Im Neuron wird MPP<sup>+</sup> nach Freisetzung aus den Speichern in Mitochondrien angereichert und inhibiert den Komplex-I der Elektronentransportkette, was zu einer Verminderung der ATP-Produktion und einer gesteigerten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies führt. Da Glutathion ebenfalls ATP-abhängig hergestellt wird, führt dies zu einem relativen Ungleichgewicht in Richtung zellschädigender Prooxidantien mit folgerichtiger neurotoxischer Wirkung (Beal, 2003; Jenner, 2008). Durch die Freisetzung von freien Radikalen und proinflammatorischen Zytokinen (u.a. TNF $\alpha$ , IL1) aus den geschädigten dopaminergen Neuronen werden Mikrogliazellen aktiviert, die wiederum neurotoxische Zytokine, Eicosanoide und freie Radikale wie NO und OH<sup>-</sup> freisetzen und somit die Entzündungsreaktion im Sinne eines *Circulus vitiosus* aufrecht erhalten (Nagatsu et al., 2000).

### Paraquat

Paraquat wurde in Deutschland im Bereich des Pflanzenschutzes als Herbizid eingesetzt, führt aber bei unsachgemäßem Gebrauch zu schweren Vergiftungserscheinungen. Wegen einer möglichen kanzerogenen Wirkung ist es seit 2007 in Deutschland nicht mehr zugelassen. Paraquat besitzt eine ähnliche chemische Struktur wie das MPP<sup>+</sup> und steht daher auch im Verdacht neurotoxisch zu wirken. Daher wird Paraquat auch in experimentellen Parkinson-Modellsystemen eingesetzt, in denen es wie beim MPTP-Modell zu einer nigrostriatalen Degeneration mit selektivem Verlust dopaminergener Neurone führt (McCormack et al., 2002). Umliegende Neurone wiesen z.T. Zeichen einer durch oxidativen Stress bedingten neuronalen Schädigung auf. So konnte gezeigt werden, dass Paraquat das beim Abbau von Dopamin anfallende Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oder redoxaktives Eisen zur zusätzlichen Bildung von Hydroxylradikalen nutzt und somit den zytotoxischen Effekt auf die dopaminergen Neurone verstärkt. Die Inhibition der Dopaminaufnahme oder die Anwesenheit von Superoxid-Dismutasen oder Ubichinon (Coenzym Q) zeigte eine protektive Wirkung gegenüber dem von Paraquat ausgelösten oxidativen Stress (McCarthy et al., 2004; Peng et al., 2005).

Des Weiteren gibt es Befunde, die einen Zusammenhang zwischen Paraquat und dem Parkinson-Syndrom über eine durch Paraquat induzierte Strukturänderung von  $\alpha$ -Synuclein und verstärkte Fibrillenbildung darstellen (Manning-Bog et al., 2002).

### Maneb

Maneb findet vor allem in der Landwirtschaft als Fungizid zur Abtötung von Pilzen und Sporen seine Verwendung. In einer epidemiologischen Studie konnten Costello et al. im Jahr 2009 erstmals den Beweis erbringen, dass Pestizide wie Maneb und Paraquat nicht nur in Tiermodellen und Zellkulturen neurodegenerative Prozesse auslösen, sondern auch beim Menschen zu einer Parkinson-Symptomatik führen können. Die Neurotoxizität für die nigrostriatalen Neurone wird durch die Inhibition mehrerer Komplexe der Atmungskette und des Ubiquitin-Proteasom-System erklärt. Jahrelange Exposition gegenüber den Pestiziden Maneb und Paraquat erhöht das Risiko, am Parkinson-Syndrom zu erkranken, um ein vielfaches, besonders wenn man beiden Substanzen in Kombination ausgesetzt war (Costello et al., 2009). Tiermodell-Studien belegen eine synergistische Wirkung von Maneb mit anderen Toxinen wie Paraquat und MPTP (Thrash et al., 2007). Diese Befunde zeigen, dass durch eine Vielzahl von Toxinen deren Kinetik zugunsten einer erhöhten Neurotoxizität verändert wird. Das in Maneb (chemisches Synonym: Manganethylen-1,2-bis-dithiocarbamat) enthaltene Mangan könnte ebenfalls ein Parkinson-Syndrom bewirken (Zhang et al., 2003). Gebundenes Mangan ist für den Menschen ein essentielles Spurenelement und wird normalerweise mit der Nahrung und dem Trinkwasser aufgenommen. Durch den Abbau in Bergwerken als Schwermetall und Verwendung im Bereich der Metallindustrie kann nach jahrelanger Exposition und einer chronisch inhalativen Manganintoxikation ein sog. Manganismus auftreten, der mit neuronalen Zellschäden in den Basalganglien und in der Substantia nigra assoziiert ist und Parkinson ähnliche Symptome hervorrufen kann, welche gegenüber der symptomatischen Parkinson-Therapie resistent sind (Benedetto et al., 2009; Lucchini et al., 2009).

### Rotenon

Der aus der Tubawurzel gewonnene Pflanzenstoff Rotenon wurde bis Ende der 80er Jahre als Insektizid und als Akarizid zur Bekämpfung von Milben in Deutschland verwendet und ist seitdem nicht mehr zugelassen. In der tierexperimentellen Forschung wird Rotenon verwendet, um vor allem weitere Zusammenhänge zwischen Pestizid-Exposition und Parkinson-Syndrom darzustellen. Es ließ sich zeigen, dass durch Rotenon sowohl

parkinsontypische Symptome als auch die histopathologischen Merkmale reproduzierbar sind. Die Hemmung des mitochondrialen Komplex-I der Atmungskette durch Rotenon führt zu einer gesteigerten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies mit Aktivierung von Mikrogliazellen und einer Minderung der ATP-Produktion (Li et al., 2003). Durch die besonders hohe Vulnerabilität dopaminerger Neurone kommt es v.a. im Bereich der Substantia nigra und des Striatums zu einer selektiven Degeneration dieser Neurone (Sakka et al., 2003). Diese äußert sich wiederum in typischen motorischen Auffälligkeiten (Hypokinese, Haltungstörungen, ungleichmäßiger Gang etc.) bei den Versuchstieren. Histopathologisch lassen sich fibrilläre zytoplasmatische Einschlüsse in den Neuronen der Substantia nigra darstellen, welche denen beim Parkinson-Syndrom sehr ähneln. Die Bildung von  $\alpha$ -Synucleinfibrillen scheint durch Rotenon, welches wie das Herbizid Paraquat die Proteinstruktur von  $\alpha$ -Synuclein direkt ändern kann, induziert und beschleunigt (Sherer et al., 2003). In einer aktuellen Studie der Technischen Universität Dresden von 2010 konnte durch Applikation von Rotenon über eine Magensonde erstmals gezeigt werden, dass  $\alpha$ -Synuclein-Aggregate transsynaptisch von den Neuronen des vegetativen, enteralen Nervensystems des Darmtrakts über das Rückenmark und den Hirnstamm bis zur Substantia nigra gelangen. So könnten eventuell Frühsymptome wie Obstipation, Riechstörungen und Depressionen, die vor den eigentlichen Kardinalsymptomen auftreten, erklärt werden. Da nicht jeder Parkinson-Kranke Kontakt mit Pestiziden hatte, könnten Substanzen aus der Nahrung oder von Darmpathogenen durch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies zu oxidativen Stress und nachfolgenden neuronalen Zelltod führen (Pan-Montojo et al., 2010).

### **1.3 Neuroinflammation / Neurodegeneration**

Der Begriff Neuroinflammation ist ein eingeführter Terminus für den früher beschriebenen Ausdruck der reaktiven Gliose, d.h. eine unspezifische immunologische Reaktion mit einer erhöhten Anzahl von Gliazellen in einem geschädigten Bereich des Zentralnervensystems. Die Zellen, die hierbei eine entscheidende Rolle spielen sind Mikrogliazellen und Astrozyten, welche durch bestimmte Entzündungs-Mediatoren (engl. releasing factors) aus dem geschädigten Areal aktiviert werden und die intrinsische Immunabwehr des ZNS darstellen. Die in der Peripherie vorhandenen antigenpräsentierenden dendritischen Zellen und deren Zielzellen - Makrophagen und T-Zellen – gelangen nur bei einer pathologischen Funktionsstörung der Blut-Hirn-Schranke in das ZNS. Die Mikrogliazellen besitzen ähnliche Fähigkeiten wie periphere Abwehrzellen, indem sie pathologische Veränderungen

wahrnehmen und zur Phagozytose von Zellbestandteilen befähigt sind. Entzündliche Reaktionen im ZNS, welche durch einen chronischen Stimulus aufrechterhalten werden, führen wie bei der Akutsituation zunächst zu einer Aktivierung von Mikrogliazellen. Von den Mikrogliazellen werden dann weitere Entzündungsmediatoren freigesetzt, die direkt oder durch ihre proinflammatorische Wirkungsweise neurotoxisch wirken. Bei der Parkinson-Erkrankung scheint es durch einen multifaktoriell bedingten, initial toxischen Stimulus und das Zusammenspiel von aktivierten Mikrogliazellen und Freisetzung weiterer neuroinflammatorischer Faktoren zu einer Aufrechterhaltung des neurodegenerativen Prozesses zu kommen. Der Begriff der Neurodegeneration beschreibt eine progressiv fortschreitende Dysfunktion von Neuronen und eine selektive Degeneration von spezifischen Neuronenpopulationen oder Arealen im zentralen Nervensystem (Whitton, 2007).

### **1.3.1 Mikroglia – Schlüsselzellen der Inflammation im ZNS**

Mikrogliazellen stellen die Immunzellen des Zentralnervensystems dar und besitzen vielfältige Funktionen. Auf der einen Seite dienen sie der Abwehr von pathologischen Prozessen im ZNS, andererseits scheinen sie aber auch zur Entstehung oder Verschlechterung von neurodegenerativen Veränderungen (M. Alzheimer, M. Parkinson) oder entzündlich-infektiösen Erkrankungen (Multiple Sklerose, AIDS-Demenz) beizutragen. Ein gemeinsames Kennzeichen dieser neuropathologischen Veränderungen ist dabei die Aktivierung von Mikrogliazellen mit nachfolgender neuronaler Schädigung bis hin zum neuronalen Zelltod. Mikrogliazellen stellen mit ca. 5- 20 % der zentralen Gliazellen die bedeutendsten Immunzellen des zentralen Nervensystems (ZNS) dar (Dobrenis, 1998). Sie entspringen denselben Vorläuferzellen wie die Blutmonozyten und wandern in der Fetalzeit über zentralnervöse Blutgefäße in das ZNS ein (Perry et al., 1991). Durch ihre charakteristische Morphologie, welche durch spezielle Färbetechniken darstellbar ist, unterscheiden sich Mikrogliazellen von anderen Zellen des ZNS wie Neuronen, Oligodendrozyten oder Astrozyten. Nach ihrem Erstbeschreiber werden sie auch als Hortega-Zellen bezeichnet (del Rio-Hortega, 1932). Sie fungieren als zentralnervöse Makrophagen, die außer der Phagozytose untergegangener Nervenzellen (Neurophagie) auch als Antigen-präsentierende Zelle agieren (Aloisi, 2001). Im Unterschied zu den Gewebsmakrophagen lässt ihre morphologische Form auf den Funktionszustand der Zelle schließen. Ruhende, inaktive Mikrogliazellen sind ortsständig und besitzen einem schmalen Zellkörper mit dünnen und verzweigten Zellausläufern (ramifizierte Form) (Rosenstiel et al., 2001). Durch akute pathologische Prozesse in Form einer Ischämie mit Veränderungen des Ionenmilieus oder

durch traumatische ZNS-Schädigungen mit entstehenden Zelltrümmern, aber auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Parkinson nimmt die ruhende Mikrogliazelle eine amöboide (aktive) Form an (Kreutzberg, 1996). Dies äußert sich u.a. in einer Vergrößerung des Zelleibs, der rundlich bis stäbchenförmig wirkt (hypertrophe Mikroglia) und in einer Verkürzung der Zellfortsätze. Durch amöboide Fortbewegungsweise können sie an den Ort der Gewebeläsion rekrutiert werden und dort durch mitotische Zellteilungen proliferieren. Eine starke Zunahme von MHC II- Molekülen auf der Zelloberfläche als Kennzeichen der Antigenpräsentation macht Mikrogliazellen zu residenten, intrinsischen Immuneffektorzellen des ZNS (McGeer et al., 2008). Außer der Antigenpräsentation führt die verstärkte Sekretion von Zytokinen (TNF- $\alpha$ , IL-1) und proteolytischen Enzymen zur Lymphozytenmigration in das Schadensgebiet und zur Zerstörung von gewebeeigenem und gewebefremdem Material. Durch Sekretion bestimmter Zytokine (IL-1) interagieren Mikrogliazellen funktionell auch mit Astrozyten, welche zu reaktiven Zellen proliferieren, eine weitere Mikrogliainfiltration verhindern und reparative Vorgänge einleiten. Mikrogliazellen sind jedoch durch ihre Sekretion nicht nur effizient in der Abwehreinleitung. Durch Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 oder reaktiver Sauerstoffspezies können sie neben den primären Schäden durch die zugrunde liegende Erkrankung sekundäre Nervenzellschädigungen verursachen (Block et al., 2005; Rosenstiel et al., 2001). Auch bei der Parkinson-Erkrankung scheinen aktivierte Mikrogliazellen durch erhöhte Freisetzung neurotoxischer Stoffe wie TNF- $\alpha$ , NO oder reaktiven Sauerstoffspezies eine entscheidende Rolle zu spielen. Ob die Mikrogliazellen ursächlich für das Entstehen der Erkrankung sind oder das Krankheitsbild nur zusätzlich verschlechtern, ist noch ungeklärt.

### **1.3.2 Neuromelanin – endogenes Neurotoxin?**

Neuromelanin ist ein amorphes, kaum lösliches Pigment, das beim Menschen vor allem in den dopaminhaltigen Neuronen der Substantia nigra (Mesencephalon) und den Noradrenalin-synthetisierenden Neuronen des Locus coeruleus (Rhombencephalon) vorkommt. Andere Dopamin-produzierenden Zellen wie die der Nebennierenrinde weisen keine Pigmentierung auf. Weder die chemische Struktur noch die physiologische Funktion von Neuromelanin sind bisher vollständig verstanden. Die Bildung von Neuromelanin im menschlichen Gehirn beginnt ab dem dritten bis fünften Lebensjahr (Fenichel et al., 1968). Außer beim Menschen kann Neuromelanin noch bei Primaten, Pferden oder einigen Amphibienarten nachgewiesen werden. Bei der Parkinson-Krankheit zeigen neuere Untersuchungen, dass ein Missverhältnis

zwischen zellprotektiver und zellschädigender Wirkungsweise von Neuromelanin eine Rolle im Prozess der Neurodegeneration spielen kann (Marsden, 1983; Youdim et al., 1994).

### **1.3.2.1 Struktur und Funktion von Neuromelanin**

Die Bestimmung der Struktur von Neuromelanin gestaltet sich als schwierig, da es im Gegensatz zu den Melaninen der Haut (Eu- und Phäomelanine) oder synthetisch hergestellten Modell-Melaninen wesentlich komplexer aufgebaut ist und mit konventionellen Analyseverfahren nicht ausreichend charakterisierbar ist. Anhand der ESR-Spektroskopie (ESR, Elektronen-Spin-Resonanz) kann durch die Erfassung nicht gepaarter Elektronen aber die Eigenschaft von Neuromelanin als stabiles Radikal gezeigt werden (Enochs et al., 1993; Zecca et al., 2002). Bisherige Erkenntnisse zeigen ein Grundgerüst aus Indolringen, an denen 5-S-Cysteinyl-Dopamin-Reste gebunden sind. Die Identifikation der Cystein-Dopamin-Einheiten als ein Baustein von Neuromelanin weist auf eine detoxifizierende Rolle der Neuromelanin-Synthese hin, da so einer zytotoxischen Akkumulation in den Neuronen vorgebeugt wird (Sulzer et al., 2000). Der Schwefelgehalt im Neuromelaningerüst deutet auf die Anwesenheit von aliphatischen Gruppen und Benzothiazinringen hin (Zecca et al., 1992), welche mit den Indolringen in Form von langkettigen Polymeren aneinandergelagert sein (Polymer-Modell) oder eine überlappende, graphitähnliche Struktur bilden könnten (Schicht-Modell) (Fedorow et al., 2005). Über die einzelnen Modellsysteme herrscht noch Uneinigkeit. Die aliphatische Komponente besteht zum einen aus langkettigen Fettsäuren sowie aus Isoprenoiden wie z.B. Dolichol und wird nicht in anderen Melaninen gefunden (Fedorow et al., 2005). Außer den freien Elektronen lassen sich im Bereich hoher Elektronendichte auch ionisiertes Eisen ( $\text{Fe}^{3+}$ ) nachweisen (Zecca et al., 1996). In den dopaminergen Neuronen gibt es kein Speichersystem in Form von intrazellulärem Ferritin, so dass Neuromelanin Eisen in einem netzartigem Gerüst organisiert und so zunächst in unschädlicher Form speichert (Zecca et al., 2003). Beim IPS kann Neuromelanin seine primär protektive Wirkung für die dopaminergen Neurone aber verlieren (Zecca et al., 2003). Man vermutet, dass es bei hohen Konzentrationen von  $\text{Fe}^{3+}$ , welche beim Parkinson Syndrom nachgewiesen werden konnten, zu Veränderungen des Neuromelanin-Gerüsts kommt. Eine dadurch bedingte Anreicherung von freiem redoxaktiven Eisen kann wiederum eine schädigende Wirkung durch entstehende freie Radikale ausüben (Enochs et al., 1993; Riederer et al., 1992; Youdim et al., 1994).

### 1.3.2.2 Biosynthese von Neuromelanin

Wie die Analyse der strukturellen Grundform von Neuromelanin gestaltet sich auch die Frage nach der Entstehung von Neuromelanin als derzeit noch nicht einheitlich geklärt. Es wird ausgiebig darüber debattiert, ob die Biosynthese durch autoxidative Polymerisierung von überschüssigem Dopamin oder enzymatisch erfolgt (Zecca et al., 2001). Ein Anstieg der zytosolischen Konzentration von Dopamin in den Neuronen kann durch Veränderungen verschiedener Dopamin-Transportsysteme zustande kommen. So konnte gezeigt werden, dass u.a. der Monoamintransporter 2 (VMAT2) in den dopaminergen Neuronen vermindert ist. VMAT2 ist ein Membranprotein in zytoplasmatischen Vesikeln von Neuronen und erleichtert als Membrantransporter die Aufnahme von Dopamin in die Vesikel. Mittels Exozytose werden diese dann in den synaptischen Spalt entleert (Sulzer et al., 2000). Ist VMAT2 in geringer Menge exprimiert, kann er indirekt zu einer erhöhten zytosolischen Dopamin-Konzentration führen (Liang et al., 2004). Überschüssiges zytosolisches Dopamin wird durch die Bindung von Schwermetallen wie Eisen ( $\text{Fe}^{3+}$ )- oder Kupferionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ) oxidiert und bildet neurotoxische Dopamin-Chinone (Sulzer et al., 2000). Durch Autoxidation wird es aber zu unlöslichem Neuromelanin umgewandelt, welches die Metallionen in einem stabilen Komplex bindet und so einen Mechanismus der Neurone zum Selbstschutz darstellen kann. Die Anhäufung von Neuromelanin kann histologisch wiederum in Form einer verstärkten Pigmentierung dopaminergener Neurone wahrgenommen werden. Als Problem dieser Theorie wird die Unvereinbarkeit mit dem biochemischen Konzept des Fließgleichgewichts nach Bertalanffy gesehen, das besagt, dass Stoffkonzentrationen in einer Zelle über Transportvorgänge oder durch enzymatische Regulation konstant gehalten werden. Dieser Zustand der Homöostase wird bei der nicht-enzymatischen Synthese von Neuromelanin umgangen und spricht gegen eine ausschließlich autoxidative Bildung von Neuromelanin aus Dopamin zu einem Polymerisationsprodukt. Auch strukturelle Untersuchungen am nativen Pigment zeigen keine Übereinstimmung mit synthetisch hergestelltem Dopamin-Melanin (Double et al., 2000; Dzierzega-Leczna et al., 2004). Die Hypothese der enzymatischen Biosynthese von Neuromelanin basiert ausschließlich auf in-vitro-Untersuchungen, da Neuromelanin bei Labortieren wie Ratten und Mäusen nicht vorkommt und somit keine funktionelle Überprüfung möglich macht. So wird u.a. die Beteiligung der Tyrosinase an der Biosynthese von Neuromelanin postuliert, seit man die mRNA dieses Enzyms in der humanen Substantia nigra (Xu et al., 1997) und deren Promotoraktivität in der Substantia nigra von adulten Mäusen nachweisen konnte (Tief et al., 1998). Tyrosinase katalysiert die Oxidationsreaktionen von L-Tyrosin zu DOPA-Chinonen und trägt eigenständig oder über

einen zweiten Weg mit Hilfe von 5,6-Dihydroxyindol-2-carbonsäure-Oxidase (engl. Tyrosinase related Protein 1-Trp1) zur Melanin-Synthese bei. Im Gegensatz dazu besitzen Menschen mit einem okulokutanen Albinismus, denen dieses Enzym fehlt, normal pigmentierte Neurone in der Substantia nigra (Foley et al., 1958). Ein anderer enzymatischer Signalweg wurde durch die Tyrosin-Hydroxylase (TH) beschrieben. Die Tyrosinhydroxylase spielt in der Biosynthese der Katecholamine eine wesentliche Rolle, da es als einziges Enzym zur Herstellung von L-DOPA befähigt ist. In Anwesenheit von Cystein vermag die Tyrosinhydroxylase auch Thioether-Derivate von L-DOPA zu generieren, welche die Vorläufer zur Neuromelanin-Synthese darstellen können (Haavik, 1997). Andere Forschungsgruppen sehen in der Peroxidase oder auch in der Prostaglandin-H-Synthetase ein Schlüsselenzym in der Neuromelanin-Biosynthese, da sie die Oxidation von Dopamin zu reaktiven Dopamin-Chinonen katalysieren und mit Proteinen reagierend zur Bildung von Cystein-Dopamin-Einheiten beitragen können (Hastings, 1995; Okun, 1997).

#### **1.4 Fragestellungen**

In dieser Arbeit soll die Hypothese geprüft werden, ob die in einem *in vitro*-Modell untersuchte Wirkung von Neuromelanin auf Mikrogliazellen (Wilms et al., 2003) auch in einem *in vivo*-Modell reproduzierbar ist. Die Vermutung liegt nahe, dass extraneuronales Neuromelanin eine Mikrogliose, Chemotaxis und Aktivierung von Mikrogliazellen auslösen und durch Freisetzung von neurotoxischen Mediatoren aus diesen Zellen zu einem chronischen Inflammationsprozess mit nachfolgender Neurodegeneration führen kann. Dazu wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Wird durch die Injektion von humanem Neuromelanin in den zerebralen Cortex einer Wistar-Ratte eine Aktivierung von Mikrogliazellen induziert?
2. Werden Mikrogliazellen auch bei einer entsprechenden Injektion in die Substantia nigra aktiviert?
3. Kann eine Aktivierung von Mikrogliazellen in der Substantia nigra zu einer Degeneration der dopaminergen Neurone führen?

## 2 Material

### 2.1 Reagenzien und Materialien

Kaliumchlorid p.A.	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat wasserfrei p.A	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid p.A.	Carl Roth Gmbh + Co. KG
di-Natriumhydrogenphosphat wasserfrei p.A	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd reinst	Merck
Chloralhydrat	Merck
Albumin bovine Fraction (Standard Grade, lyophil.)	Serva 11930
Ethanol	Carl Roth Gmbh + Co. KG
Xylol (Isomere) reinst für die Histologie	Merck
Benzoesäure-methylester (Methylbenzoat) für die Mikroskopie	Carl Roth Gmbh + Co. KG
Perhydrol 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> p.A	Merck
Methanol p.A.	Carl Roth Gmbh + Co. KG
Histo-Comp (Schmelzpunkt 56-58 Grad Celsius)	Vogel
Neuromelanin	Kooperation mit Prof. L. Zecca, Institut für biomedizinische Technologie in Mailand, Italien

### 2.2 Antikörper

#### (1) Primäre Antikörper

Anti - GFAP (Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein)	Dako polyclonal Rabbit
Anti-Iba 1	Wako Chemicals, Neuss
Anti-Th (Thyrosinhydroxylase)	Chemicon, Hampshire, UK

#### (2) Sekundäre Antikörper

Biotinylierter Ziege anti-Kaninchen IgG	Vector Laboratories Inc.
Ziegenserum	Sigma

sekundäre Antikörper gekoppelt an alkalische Phosphatase	Dako, Hamburg und Dianova, Hamburg
--	------------------------------------

## 2.3 Lösungen und Puffer

### 0,1m PBS-Puffer (Phosphate buffered saline) pH 7,4

K Cl (Kaliumchlorid)	0,2 g
K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Kaliumdihydrogenphosphat)	0,2 g
Na <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub> (di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat)	2,16 g
Na CL (Natriumchlorid)	8 g
H <sub>2</sub> O ad 1000 ml	

### 4% Paraformaldehyd (pH 7,4)

4 g Paraformaldehyd auf 100 ml 0,1 M PBS

### 4% Chloralhydrat dest.

4g Chloralhydrat auf 100 ml Aqua dest.

### BSA (Bovines Serum Albumin)

0,75-1 g BSA auf 100 ml PBS

## 2.4 Materialien für die Histologie

Objektträger beschichtet mit Histobond	Marienfeld Laboratory Glassware
--	---------------------------------

## 2.5 Gebrauchsfertige Kits

Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories, Inc.
Peroxidase Substrate Kit DAB	Vector Laboratories Inc.

## **3 Methoden**

### **3.1 Intrazerebrale Injektionen**

#### **3.1.1 Technisches Verfahren**

Die intrazerebrale Injektion mit Hilfe eines stereotaktischen Apparates stellt ein gängiges in vivo Modell dar. Anhand eines dreidimensionalen Koordinatensystems (3D-Neuronavigation) können so einzelne Punkte im zentralen Nervensystem von Versuchstieren gezielt aufgesucht werden, um verschiedenste Wirkstoffe zu injizieren. Die hierfür notwendigen Zielpunkte werden einem Hirnatlanten entnommen, welcher die aus zahlreichen Gehirnen von Versuchstieren einer bestimmten Gewichtsklasse gemittelten Daten in Form von histologischen Schnitten unter Angabe der jeweiligen Ebene darstellt. In dieser Studie findet der Atlas von Paxinos und Watson -„The Rat Brain in Stereotactic Coordinates“-Verwendung (Paxinos et al., 1980). Als Ausgangspunkt für die Anwendung der Koordinaten dient die Interaurallinie (0/0/0 = anterior/lateral/vertikal in mm), in der das Versuchstier mittels zweier Ohrpins im Gestell fixiert ist.

#### **3.1.2 Isolierung und Reinigung von Neuromelanin**

Die Gewinnung von Neuromelanin aus der humanen Substantia nigra erfolgt in Kooperation mit dem Institut für biomedizinische Technologie in Mailand, Italien (Arbeitsgruppe Prof. Zecca). Die Proben stammen von Autopsien verstorbener Personen, deren Alter zwischen 50 – 80 Jahren lag und die weder neurologisch noch psychiatrisch erkrankt waren. Die Autopsien werden innerhalb von 24 Stunden nach dem Tod durchgeführt und die entnommenen Proben dann bei – 80 °C aufbewahrt. Nachdem die einzelnen Proben zusammengetragen und gewogen sind, werden Teilproben von 0,5 g des Gewebes in ein 30 ml großes Zentrifugenglas eingebracht und nachdem das Gewebe homogenisiert ist, nochmals 15 ml Wasser zugegeben und dann geschüttelt. Die einzelnen Röhrchen werden bei 10.000/min für 15 Minuten zentrifugiert und das entstandene Pellet zweimal mit 15 ml Phosphatpuffer (0,050 mol/l, pH 7,4) gewaschen. Anschließend werden die Proben für 3 Stunden bei 37 °C in einem Puffer auf Tris-Basis (0,050 mol/l, pH 7,4), welcher Natriumdodecylsulfat enthält (5mg/ml), inkubiert. Diese Suspension wird dann bei 10.000/min für 20 Minuten zentrifugiert und nach Abtragen des Überstandes wird das Pellet noch einmal unter denselben Bedingungen wie bereits beschrieben inkubiert. Nach nochmaliger Zentrifugierung bei 10.000/min für 20 Minuten und Abtragen des Überstandes wird das Pellet nochmals für 3 Stunden bei 37°C in demselben

Puffer, der zusätzlich noch Proteinase K (0,2mg/ml) enthält, inkubiert. Das Neuromelaninpigment wird durch die wie oben angegebene Zentrifugierung abgetrennt, dann zweimal mit 5 ml einer NaCl-Lösung (9mg/ml) und dreimal mit 5 ml Wasser gewaschen. Die Proben werden anschließend in 2 ml Methanol überführt, zentrifugiert und der Überstand abgetragen. Daraufhin werden die Proben in 1 ml Hexan gewaschen, zentrifugiert und nach Abtragen des Überstandes wird Neuromelanin unter einem Stickstoff haltigem Durchfluss getrocknet und unter Vakuum aufbewahrt. Die Identität und Reinheit von diesem Neuromelanin wird durch Elementaranalysen, Aminosäuren-Analysen und durch die Elektronen-Spin-Resonanz bestätigt (Zecca et al, 2002). Kurz vor Beginn der Versuche wird Neuromelanin als eine Suspension von 0,5mg/ml in sterilem PBS vorbereitet und in kleinen Probenbehältern bei 4°C aufbewahrt.

### **3.1.3 Zubereitung der Goldsuspension**

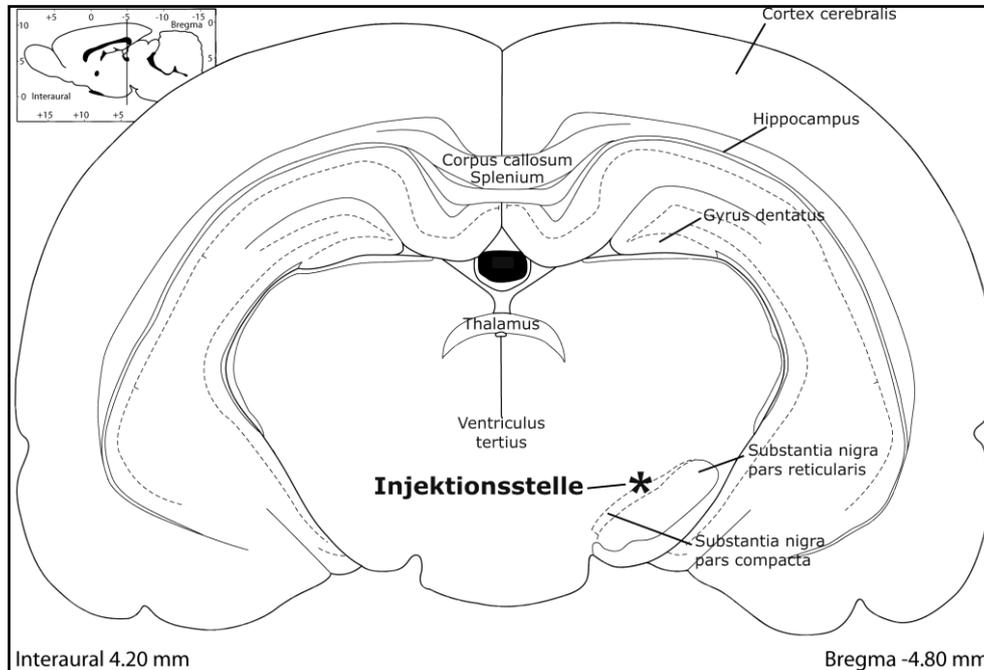
Als negative Teilchenkontrolle zum humanen Neuromelanin werden inerte, 0,6 µm große Goldpartikel verwendet. Die Goldpartikel werden ebenfalls kurz vor Beginn der Versuche als eine Suspension von 0,5 mg/ml in sterilem PBS vorbereitet und in kleinen Probenbehältern bei 4 °C aufbewahrt.

### **3.1.4 Operationsverlauf und Versuchsgruppen**

Für die Versuche wurden männliche Ratten des Stammes Wistar mit einem Gewicht zwischen 300-330g verwendet. Alle verwendeten Tiere wurden unter einem 12 Stunden hell/dunkel Zyklus mit freiem Zugang zu Futter und Wasser im Tierhaus der CAU Kiel gehalten. Die Experimente erfolgten gemäß der Richtlinien der Direktive der Europäischen Union 86/609/EEC. Die Wistar-Ratten werden mit Chloralhydrat (50mg/kg Körpergewicht) intraperitoneal anästhesiert und in einen stereotaktischen Apparat (Kopf<sup>®</sup>) eingespannt. Die künftige Inzisionsstelle wird rasiert und mit Kodan<sup>TM</sup> desinfiziert. Durch einen ca. zwei Zentimeter langen mediosagittalen Hautschnitt, beginnend von der Sutura frontalis, wird die Kopfhaut durchtrennt und die Schädelkalotte durch Mobilisation beider Hautlappen freigelegt. Eventuelle Blutungen werden elektrokoaguliert und der Knochen mit Wasserstoffperoxid gereinigt. Ausgehend für die Berechnung der Injektionsstelle ist der Punkt Bregma, die Kreuzungsstelle der Sutura frontalis und der Sutura sagittalis. Für die Injektion der Substanzen Neuromelanin, Gold, LPS und PBS in den zerebralen Cortex (um unsere Hypothese der Aktivierung von Mikrogliazellen durch Neuromelanin-Moleküle zu verifizieren, Gruppe A) benutzen wir die Region des Frontalcortex mit folgenden

Koordinaten: 3mm anterior von Bregma, 3,5 mm lateral der Mittellinie und 2 mm ventral zur Hemisphärenoberfläche (Paxinos et al., 1980). Die Injektionsstelle wird markiert und die Kalotte mit einem Elektrobohrer eröffnet, wobei darauf zu achten ist, dass der Sinus sagittalis superior nicht verletzt wird. Das Bohrloch wird vom Knochenstaub gereinigt und die Injektionsnadel (Hamilton-Kanüle) langsam in das Parenchym eingebracht. Für das Cortex-Modell werden insgesamt sechzig Wistar-Ratten verwendet, wobei die einzelnen Gruppen jeweils aus fünfzehn Versuchstieren bestehen. Jedes Versuchstier erhält zwei Substanzen, die jeweils durch eine ipsilaterale Injektion und eine kontralaterale PBS-Kontrollinjektion eingebracht werden. Die genannten Substanzen Neuromelanin und Gold werden daher zunächst wie oben beschrieben als eine Suspension von 0,5 mg/ml in sterilem PBS vorbereitet und bei 4°C in kleinen Probenbehälter aufbewahrt. Die Injektionen (jeweils 2 µl der o.g. Lösungen) erfolgen über einen Zeitraum von je zwei Minuten. Um eine gleichmäßige Verteilung der Substanzen im Parenchym zu gewährleisten, wird die Kanüle erst nach weiteren zwei Minuten aus dem Gehirn gezogen. Beide Bohrlöcher werden mit Lysostypt<sup>TM</sup> (Kollagenschwamm) verschlossen und die Wundränder mit Wundklammern wieder adaptiert. Fünfzehn Versuchstieren wird durch die genannte Operationstechnik Neuromelanin injiziert und fünfzehn weiteren als negative Teilchenkontrolle eine Goldsuspension. Als Kontrollgruppe verwenden wir dieselbe Gruppengröße, wobei die ersten fünfzehn Versuchstiere reines PBS in der gleichen Dosis von 2 µl als zerebrale Injektion (negative Kontrolle) und weitere fünfzehn eine 2 µl -Injektion bakterieller Lipopolysaccharide (LPS von E.coli, 100ng/ml) erhalten (positive Kontrolle). LPS ist ein bakterielles Endotoxin, welches durch seine proinflammatorischen Eigenschaften zur Gliazellaktivierung führt und somit in dieser Untersuchung als positive Kontrolle verwendet wird. Für die Injektion der Substanzen in die Substantia nigra pars compacta (Gruppe B) benutzen wir folgende Koordinaten: 4,8 mm posterior von Bregma, 1,7 mm lateral der Mittellinie und 2 mm ventral zur Hemisphärenoberfläche (siehe Abb.1) (Paxinos et al., 1980). Die Injektion erfolgt supranigral, d.h. der Stichkanal endet kranial der Substantia nigra, um eine Immunreaktion allein bedingt durch die Stichinzision zu verhindern. Dabei erhält jedes Versuchstier der ersten Gruppe, die insgesamt aus acht Versuchstieren besteht, Neuromelanin (0,5mg/ml) in 2µl sterilem PBS knapp oberhalb der linken Substantia nigra und durch ein kontralaterales Bohrloch eine Goldsuspension in 2µl sterilen PBS als Kontrolle knapp oberhalb der rechten Substantia nigra. In der Kontrollgruppe, die ebenfalls aus acht Versuchstieren besteht, werden neben der ipsilateralen LPS-Injektion (100ng/ml LPS in 2µl PBS gelöst) kontralateral 2 µl PBS injiziert. Zur Auswertung werden nur die Versuchstiere genommen, bei denen die

Injektionsstelle eindeutig sichtbar die Substantia nigra erreicht hat. So werden sieben von acht Versuchstieren in der mit Neuromelanin behandelten Gruppe und sechs von acht Versuchstieren in der mit LPS behandelten Gruppe ausgewertet.



**Abb. 1: Schematische Darstellung der intrazerebralen Injektionsstelle (koronar).**

Koronarer Schnitt durch das Gehirn einer Ratte. Die Injektionsstelle für Neuromelanin oder LPS (\*) befindet sich linksseitig kranial der Substantia nigra. Kontralateral wurde die Kontrollsubstanz Gold oder PBS injiziert (Paxinos et al., 1980).

### 3.1.5 Immunhistochemie und Histologie

Nach verschiedenen Überlebenszeiten von drei, acht und zwölf Wochen (Cortex-Modell) und einer Woche in der SN-Gruppe werden die Versuchstiere erneut anästhesiert, der Thorax eröffnet und die Aorta thoracica abgeklemmt, um eine Perfusion der unteren Körperhälfte zu verhindern. Nach Eröffnung des linken Ventrikels, wird die Perfusionsnadel bis in die Aorta ascendens geschoben und dort fixiert. Zum Abfluss der Perfusionslösung wird das rechte Herzohr eröffnet. Nach transkardialer Perfusion von 300 ml 0.9% NaCl Lösung erfolgt die Perfusion mit 300 ml gekühltem 4%igem Paraformaldehyd (PFA) in Phosphatpuffer innerhalb von 10min. Nach Ende der Perfusion wird das Gehirn freipräpariert, in der Perfusionslösung bei 4°C für 24 h gelagert und danach die Perfusionslösung gegen 1%PFA

ausgetauscht. Zur histologischen Aufarbeitung werden die Gehirne zunächst in PBS (mehrmals erneuert) für 24 Stunden gespült und anschließend durch eine aufsteigende Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 90%, 100%) geführt. Anschließend werden sie über ein Zwischenmedium (Methylbenzoat) geführt und in Paraplast eingebettet. Am Rotationsmikrotom (Leica RM 2155) werden dann 7µm dicke serielle Horizontalschnitte durch den Cortex (Gruppe A) oder Koronarschnitte des gesamten nigralen Komplex von –4,8 bis –6,3 mm kaudal von Bregma (Gruppe B) angefertigt. Danach werden diese auf den mit HistoBond beschichteten Objektträgern (Marienfeld Lab. Glassware) aufgefangen, bei 37° Celsius gestreckt und für weitere 24 Stunden bei 37° im Wärmeschrank getrocknet. Zur Darstellung der Neuroinflammation und -degeneration werden folgende Antikörper verwendet:

Astrozyten	saures Gliafilamentprotein (GFAP)	(Dakopatts, Hamburg, FRG)
Mikroglia	ionisiertes Calcium bindendes Adaptermolekül 1 (Iba1)	(Wako Chemicals, Japan)
dopaminerge Neurone	Tyrosinhydroxylase (TH)	(Chemicon, Hampshire, England).

Vor der immunhistochemischen Reaktion werden die Schnitte zunächst in Xylol (3 x 5 min) und in einer absteigenden Alkoholreihe (jeweils 5 min) entparaffiniert. Die gewebseigene Peroxidase-Aktivität wird in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol für 30 Minuten unterdrückt und unspezifische Bindungsstellen werden mit BSA (1%ig) für 30 Minuten blockiert. Bei der GFAP-Färbung werden die Schnitte mit Trypsin 0,05% für ca. 3 Minuten enzymatisch angedaut. Die Schnitte werden dann mit PBS unter Zugabe von 0,3 % - igem Triton X-100 und 10 % - igem Ziegen Serum vorbehandelt und mit den jeweiligen Primäntikörpern gegen GFAP (polyclonal 1:200 verdünnt mit 1 % BSA), Iba1 (polyclonal 1:500 verdünnt mit 1% BSA) und TH (1:500) über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4° C inkubiert. Die parallel mitgeführte Negativkontrolle wurde nur mit BSA inkubiert. Nach wiederholtem Waschen in PBS werden die Schnitte mit einem Sekundäntikörper (biotinyliert anti-Kaninchen IgG 1:300, 1% Ziegen Serum zugesetzt, Vector Laboratories, Burlingame, USA) für 45 Minuten inkubiert. Der nicht gebundene Antikörperüberschuß wird in PBS ausgewaschen. Die immunhistochemischen Färbungen werden mittels der ABC-Technik (Avidin-Biotin-Komplex-Technik), einem hochspezifischen Bindungstest zur Sichtbarmachung der Bindung von Antikörpern an Antigene, ausgeführt. Zur Sichtbarmachung wird der jeweilige

Antikörper an eine avidingekoppelte Peroxidase oder avidingekoppelte alkalische Phosphatase gekoppelt. Avidin wiederum ist ein tetrameres Glycoprotein aus Hühnereiweiß, dessen Untereinheiten mit extrem hoher Affinität an das Biotin des 2. Antikörpers binden. Der ABC-Kit (Vectastain Vector Laboratories) wird dann für 30 Minuten inkubiert. Die an Avidin-gebundene Peroxidase liegt als Meerrettich-Peroxidase vor. Die Darstellung der Immunreaktion erfolgt mit DAB Substrat Kit (Vector Lab. SK-4100). Die Präparate werden in einer Lösung aus Aqua dest., Puffer (pH 7,5), DAB, und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 10 Minuten inkubiert, die Objektträger anschließend in Aqua dest. gewaschen und mit DePeX als Einbettmittel eingedeckt. In den negativen Kontrollen werden die primären Antikörper weggelassen. Da es bedingt durch den mit der Injektion verbundenen Einstich in der TH-Immunhistochemie zu einer Herunterregulation der Enzyme in lebenden Zellen und damit zu einer falschen Reduzierung der Zellzahl und zu einem negativem Ergebnis kommen kann, werden zusätzlich Schnitte nahe der Einstichstelle mit Kresylviolett gefärbt, da diese Art von Färbung alle Zellen ungeachtet der phänotypischen Expression markiert. Zur Herstellung der Färbelösung werden 0,1 g Kresylviolett in 100ml Pufferlösung (5,44 g Na-acetat; 1000 ml Aqua dest.; 9,6 ml Eisessig) gelöst und zum Differenzieren, d.h. Auswaschen des Farbüberschusses, wird 70% Alkohol verwendet. Das Entwässern erfolgt in Äthanol über Xylol. Nach dem Entparaffinieren mit Xylol und Alkohol wird mit Kresylviolett (1% wässrige Lsg.) bei 50° C für 30 min gefärbt. Letztlich wird der Schnitt mit DePeX eingeschlossen. Um den Umfang der Neurodegeneration von dopaminergen Neuronen zu erfassen, werden Schnitte der gesamten Substantia nigra hergestellt. Jeder zehnte Schnitt wird visuell auf die Anzahl der nigralen TH-positiven Neurone unter einem Lichtmikroskop (Zeiss Axiophot mit digitalem Kamerasystem Axiocam) gezählt, um so einen ersten Eindruck einer möglichen Neurodegeneration zu erhalten. Das Lichtmikroskop ist wiederum mit einem digitalen Kamerasystem ausgestattet, so dass durch das Erstellen von Fotomontagen die Grenzenlinien der Substantia nigra unter Zuhilfenahme umgebender anatomischer Strukturen definiert werden können (Hagg et al., 1993). Alle TH-positiven Neurone innerhalb dieser Grenzlinien, deren Kern sich vollständig angeschnitten in der Ebene darstellt, werden bei 200-/400-facher Vergrößerung ipsi- und kontralateral gezählt. Im Bereich der Injektionsstelle erwarten wir aufgrund der höheren lokalen Neuromelanin-Konzentration einen Anstieg des neuronalen Zellverlusts. Dazu wird zusätzlich jeder dritte Objektträger vor und nach der Einstichläsion gefärbt und von zwei Untersuchern unabhängig voneinander und ohne Kenntnisse über die Gruppenzugehörigkeit des Präparates ausgezählt.

### **3.1.6 Bestimmung von Dopamin und seinen Metaboliten im Corpus**

#### **striatum mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

Um Auswirkungen durch das in die Substantia nigra injizierte Neuromelanin auf das Corpus striatum festzustellen, werden für die letzte Untersuchung zwei Versuchsgruppen mit einer Gruppenstärke von jeweils zehn Versuchstieren zusammengestellt. Der ersten Versuchsgruppe werden hierbei nur Neuromelaninpartikel in Form einer Suspension injiziert und der zweiten als Kontrollgruppe eine Goldsuspension. Die Überlebenszeit wird auf eine Woche festgelegt, um die Ergebnisse mit denen der Immunhistochemie vergleichen zu können. Nach diesem Zeitraum werden die Versuchstiere durch CO<sub>2</sub>-Gabe getötet und das Gehirn freipräpariert. Dann wird das Corpus striatum herausgeschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Im Corpus striatum werden dann der Dopamingehalt (DA), die Konzentration seiner Metaboliten Homovanillinmandelsäure (HVA) und 3,4 Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC) und der Serotiningehalt (5-HT) sowie sein Metabolit 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) durch eine High Performance Liquid Chromatography (HPLC) mittels eines elektrochemischen Detektors bestimmt. Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie ist ein chromatographisches Trennverfahren, mit dessen Hilfe chemische Substanzgemische in ihre einzelnen Bestandteile aufgetrennt und identifiziert werden können. Das Substanzgemisch strömt dabei zusammen mit dem Laufmittel (mobile Phase) in einer Trennsäule an der stationären Phase vorbei. Die chromatographische Trennung erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Affinität der in der mobilen Phase gelösten Substanzen zur stationären Phase, was sich in unterschiedlichen Durchlaufzeiten der Substanzen durch die Trennsäule (Retentionszeiten) äußert. Anhand dieser Retentionszeiten lassen sich dann die einzelnen Substanzen mit Hilfe eines Detektors identifizieren (Lough et al., 1995). Nach der Gewichtsbestimmung der einzelnen Proben werden diese in 30 ml/g befeuchtetem Gewebe von 0,1 M Perchlorsäure (HClO<sub>4</sub>), welche 0,4 µg/ml Isoproterenol enthält, und in 10 µg/ml Ascorbinsäure homogenisiert. Das Homogenisat wird dann mit 9000 x g für zehn Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand bei -20°C aufbewahrt. Direkt im Anschluss an die Homogenisation und das Zentrifugieren werden die Indolamine und Katecholamine durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie bestimmt. Hierzu werden 50 µl des durch Zentrifugieren aus dem Homogenisat gewonnenen Überstands über ein Probenaufgabeventil eingespritzt und mit einer C18-Trennsäule (C.P.S. Analytica; Korngröße 5 µm, Länge 250 mm, Durchmesser 4,6 mm) bei Raumtemperatur chromatographisch aufgetrennt. Die mobile Phase besteht aus 10 % Methylalkohol und zu 90 % aus 50 mM Natriumazetat (enthält 0,005 mM EDTA-Natrium), 0,7 mM Natrium-Heptansulfonsäure und 2 M Phosphorsäure, welche

dem pH-Wert von 4,40 angepasst wird. Das Laufmittel wird dann durch eine Serie 200-Pumpe (Parkin Elmer) mit einer Flussgeschwindigkeit von 1,7ml/min gefördert. Das gegen die Ag/AgCl-Referenzelektrode angelegte Potential der Karbonelektrode betrug 0,75V. Die einzelnen Substanzen werden durch eine amperometrische, elektrochemische LC-4C Messzelle detektiert (Bio Analytical System). Die Berechnung der Peak-Flächen der aufgezeichneten Chromatogramme erfolgte mittels eines C-R4A Integrators (Shimadzu). Die HPCL-Bestimmungen erfolgten in Kooperation mit Prof. Zecca (Instituts für Biomedizinische Technologie in Mailand, Italien).

### **3.1.7 Statistische Analysen**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels eines Tabellenkalkulationsprogramms (Excel, Microsoft). Die Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$  SEM (Standardabweichung des Mittelwertes) dargestellt und in Form von Säulendiagrammen dargestellt. Die Auswertung der Daten erfolgte bezogen auf die Werte der mit inerter Kontrollsubstanz behandelte Tiere. Zur statistischen Auswertung wurde ein multipler, paarweiser Vergleich mit Hilfe des Student's t-Testes durchgeführt. Abweichungen werden mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  als signifikant angesehen.

## **4 Ergebnisse**

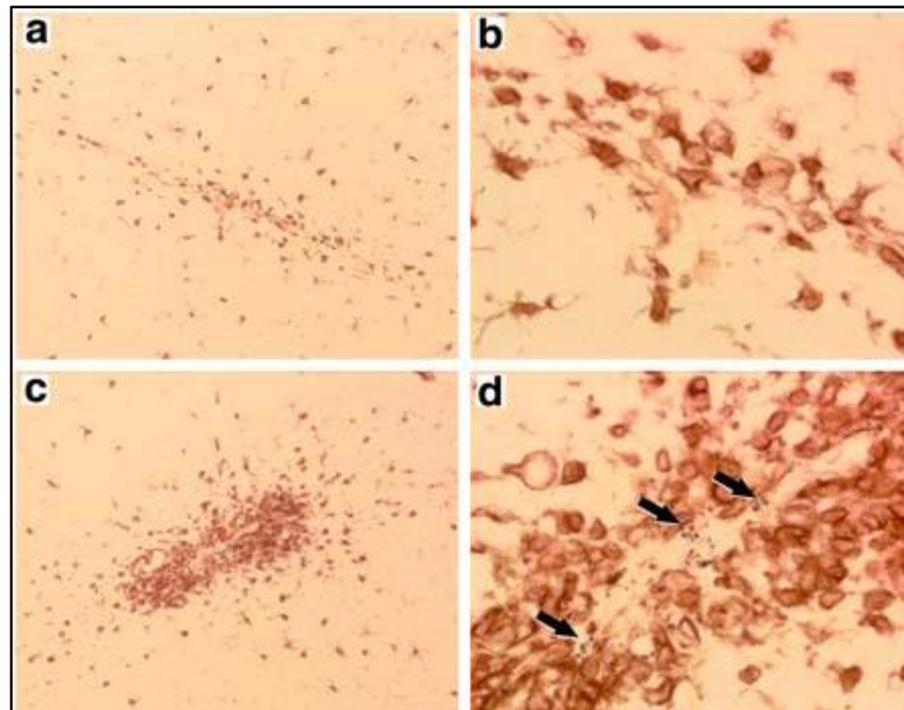
### **4.1 Studien am Tiermodell**

#### **4.1.1 Stereotaktische kortikale Injektion von Neuromelanin / Goldsuspension**

Nach der intrazerebralen Injektion von Neuromelanin (0,5mg/ml in 2µl sterilem PBS) bei fünfzehn adulten Wistar-Ratten können die aktivierten Mikrogliazellen im ganzen frontalen Cortex nahe der Injektionsstelle durch die dichte Ansammlung und die rundlichen Zellkörper anhand einer Spezialfärbung mit einem Iba-1-Antikörper (siehe Abb. 1c,d) identifiziert werden. Iba-1 ist ein sogenanntes EF-Hand Protein, welches durch seine Helixstruktur der Ausbreitung von Daumen und Zeigefinger der menschlichen Hand ähnelt. Die Helix besteht aus geladenen Aminosäuren und bindet  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Es kommt ausschließlich in Makrophagen und Mikrogliazellen vor und wird während der Aktivierung dieser Zellen hochreguliert. Die Versuchstiere, denen die Goldpartikel (0,5mg/ml in 2µl sterilem PBS) injiziert werden (Abb. 1a,b), zeigen im Gegensatz dazu eine eher moderate Aktivierung von Mikrogliazellen und eine geringe Entzündungsreaktion. Die kortikale Entzündungsreaktion der mit Neuromelanin behandelten Gruppe nimmt jedoch mit der Dauer der Überlebenszeit von der 3. bis zur 12. Woche hin stetig ab. Somit bestätigen die Ergebnisse unsere initiale Hypothese einer Mikrogliazell-Aktivierung durch Injektion von Neuromelanin in das Hirnparenchym.

### Gold-Injektion

### NM-Injektion



**Abb.1 Kortikale Injektion von humanem Neuromelanin führt zur Aktivierung von Mikrogliazellen im frontalen Cortex.**

Eine starke Entzündungsreaktion mit einer erhöhten Mikrogliazellzahl und -aktivierung, dargestellt durch Iba1-Immunhistochemie, kann nach drei Wochen Überlebenszeit für die mit Neuromelanin behandelten Tiere (c,d), jedoch nur moderat für die Kontrollgruppe (Injektion einer Goldsuspension, (a,b)) nachgewiesen werden. Die Pfeile in (d) zeigen die Neuromelanin-Granula in unmittelbarer Nähe zu den aktivierten, amöboiden Mikrogliazellen. (Vergrößerung a,c = 100x, b,d = 400x)

#### **4.1.2 Neuromelanin aktiviert ruhende Mikrogliazellen in der Substantia nigra**

Nach Bestätigung der Aktivierungshypothese von Mikrogliazellen durch Neuromelanin-Injektion im Kortex-Modell erfolgte als nächster Schritt die Überprüfung der Befunde in der Substantia nigra. Dazu erhalten insgesamt acht adulte Ratten eine Suspension von Neuromelanin (0,5mg/ml in 2µl sterilem PBS) knapp oberhalb der linken Substantia nigra und kontralateral als Kontrolle eine Goldsuspension (50mg/ml in 2µl sterilen PBS) knapp oberhalb der rechten Substantia nigra. Um eine Entzündungsreaktion in der Substantia nigra von Neuromelanin injizierten Tieren festzustellen, werden die einzelnen Gehirnschnitte

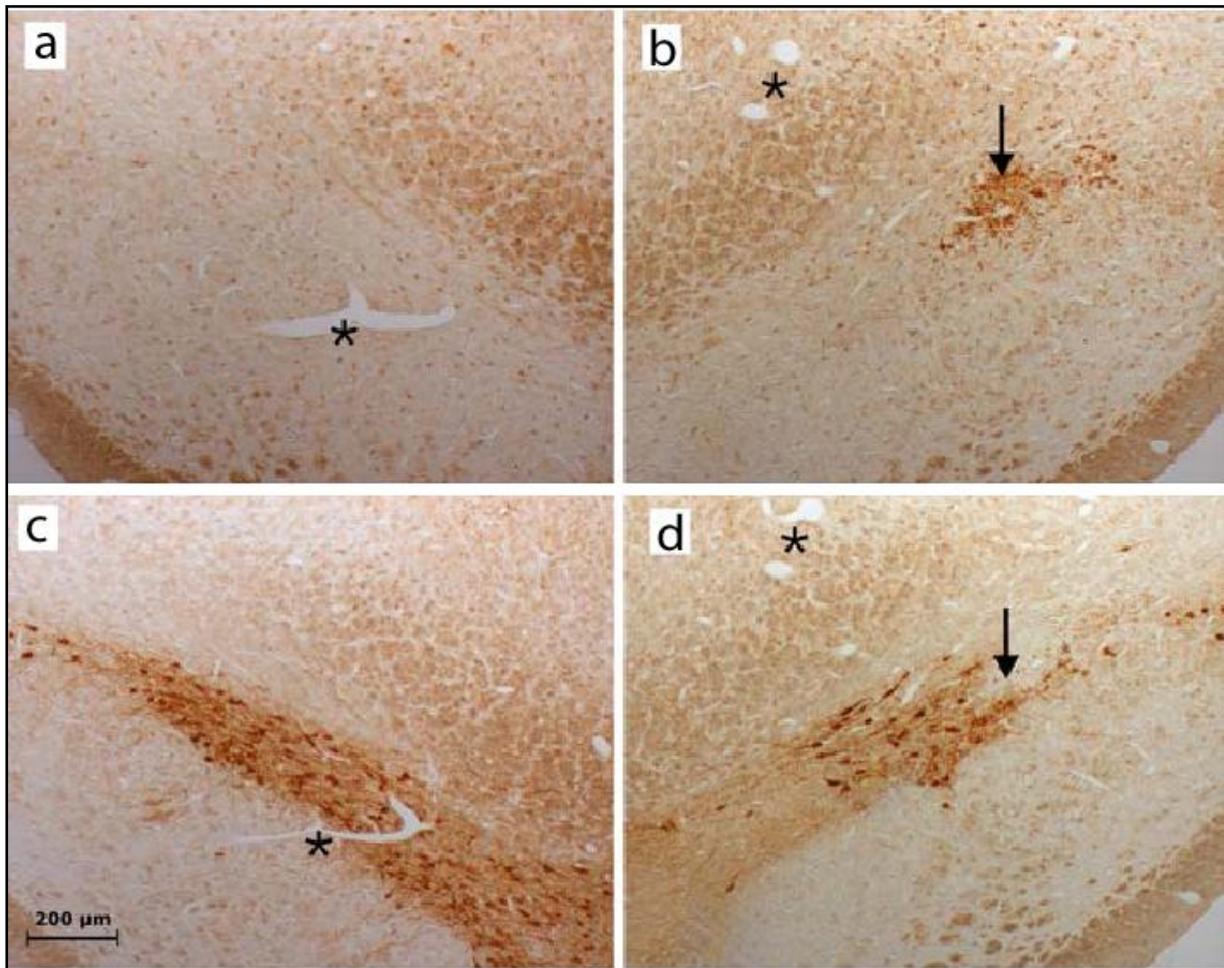
immunhistologisch mit Iba-1 Antikörper gefärbt. Die Ergebnisse zeigen, dass im Vergleich zur Kontrollgruppe (Injektion der Goldsuspension), in der nach einer Woche Überlebenszeit nur eine moderate immunhistologische Anfärbung von ruhenden Mikrogliazellen gezeigt werden kann (Abb.2a), bei den mit Neuromelanin behandelten Tieren eine deutliche Zunahme Iba-1 immunreaktiver, aktivierter Mikrogliazellen sichtbar (Abb. 2b) wird.

### **4.1.3 Mikrogliazell-Aktivierung führt zu dopaminergem Zellverlust in der Substantia nigra**

Bei den mit Neuromelanin behandelten Tieren zeigt sich nach einer Woche Überlebenszeit in den koronaren Schnitten durch die Substantia nigra nahe des Injektionsortes (sichtbar durch den von der Kanüle verursachten Stichkanal) eine deutliche Abnahme der Immunreaktivität der Tyrosinhydroxylase (Abb. 2d). Tyrosinhydroxylase (TH) ist ein Enzym, das die Umwandlung von L-Tyrosin in Levodopa katalysiert und so für die Biosynthese von Dopamin eine wichtige Rolle spielt. Bei den mit Goldpartikeln injizierten Tieren sind hingegen noch reichlich TH-positive Neurone (= 100 %) zu erkennen (Abb.2c). Das Areal mit dem maximalen neuronalen Zellverlust (sichtbar an der Abnahme der TH-positiven Neurone) stimmt genau mit dem Areal überein, in dem die meisten Mikrogliazellen aktiviert werden (Abb.2b,d). Dieser klar sichtbare neuronale Zellverlust in den mit Neuromelanin behandelten Tieren kann anhand der durchschnittlichen Anzahl der TH-positiven neuronalen Zellmenge in der näheren Umgebung der Neuromelanin-Granula (Abb. 4, Reduktion um fast 50 %) erhärtet werden. In dem Bereich der Substantia nigra, der nicht durch die Neuromelanin-Injektion erreicht wird, zeigt sich auch kein neuronaler Zellverlust. Der neuronale Zellverlust kann nicht nur durch die Reduktion von Tyrosinhydroxylase (TH) in der immunhistologischen Färbung, sondern auch direkt in der Nissl-Färbung bestätigt werden (Abb. 3). Sie zeigt eine beträchtliche Abnahme der neuronalen Zellpopulation in der Substantia nigra nach der Neuromelanin-Injektion. In der Positivkontrolle führt die intranigrale Injektion von Lipopolysacchariden (LPS) durch die inflammatorische Wirkungsweise zu einer starken Degeneration dopaminergener Neurone. In den beiden anderen Kontrollgruppen (PBS/Gold-Injektion = negative Kontrolle) kann nur ein geringer Verlust an TH-positiven Zellen beobachtet werden (Abb. 4).

## Gold-Injektion

## Neuromelanin-Injektion

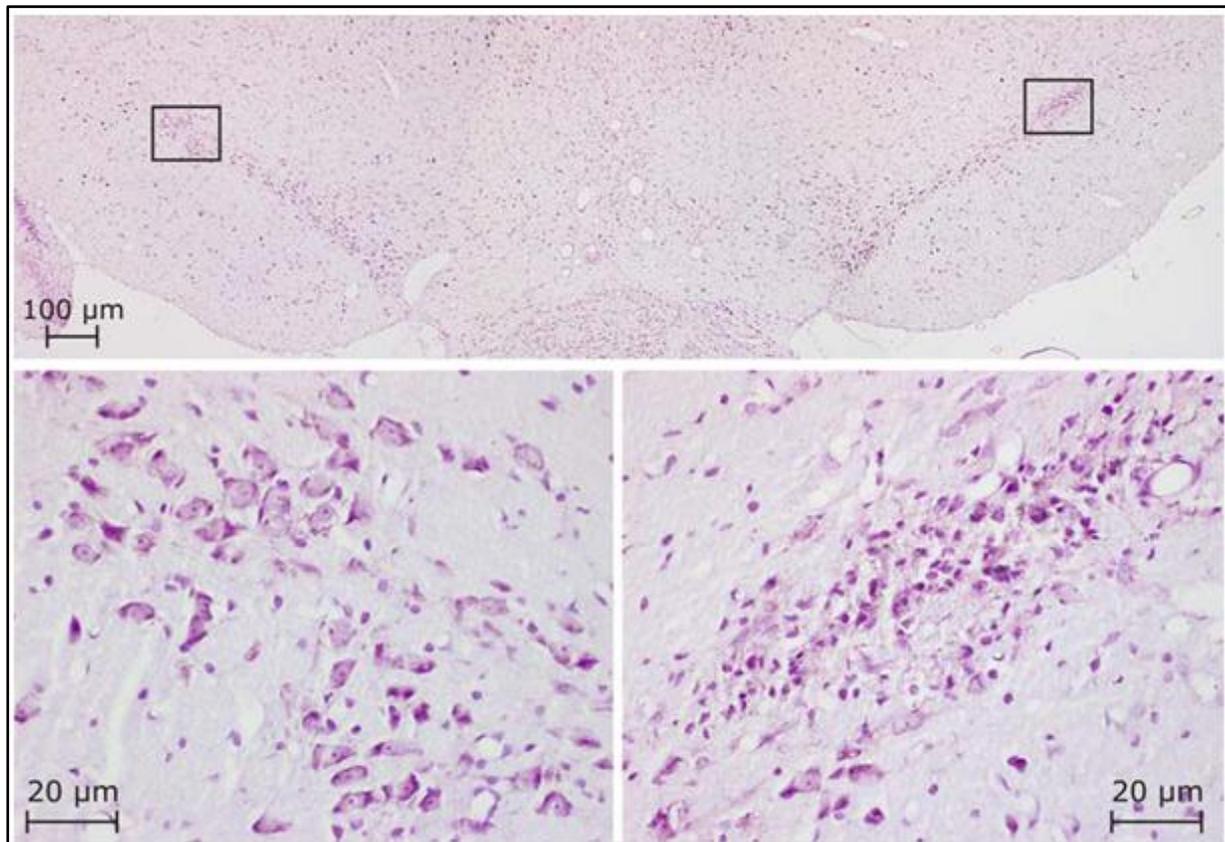


**Abb.2** Repräsentative Darstellung der Aktivierung von Mikrogliazellen (Iba-1 Färbung in Abb. a,b) und der neuronalen dopaminergen Zelldegeneration (TH-Färbung in Abb.c,d)

Nach supranigraler Injektion von Neuromelanin (b,d) lässt sich eine starke Aktivierung von Mikrogliazellen (b) und eine deutliche Reduktion dopaminergener Neurone (d) in der Substantia nigra nachweisen, wobei das Areal mit dem maximalen neuronalen Zellverlust genau mit dem Areal, in dem die meisten Mikrogliazellen aktiviert werden, übereinstimmt. Auf der kontralateralen Seite (Injektion einer Goldsuspension, (a,c)) zeigen sich weder deutliche neuronale Zellverluste noch Zeichen einer Mikrogliazell-Aktivierung. (Balken = 200 µm)

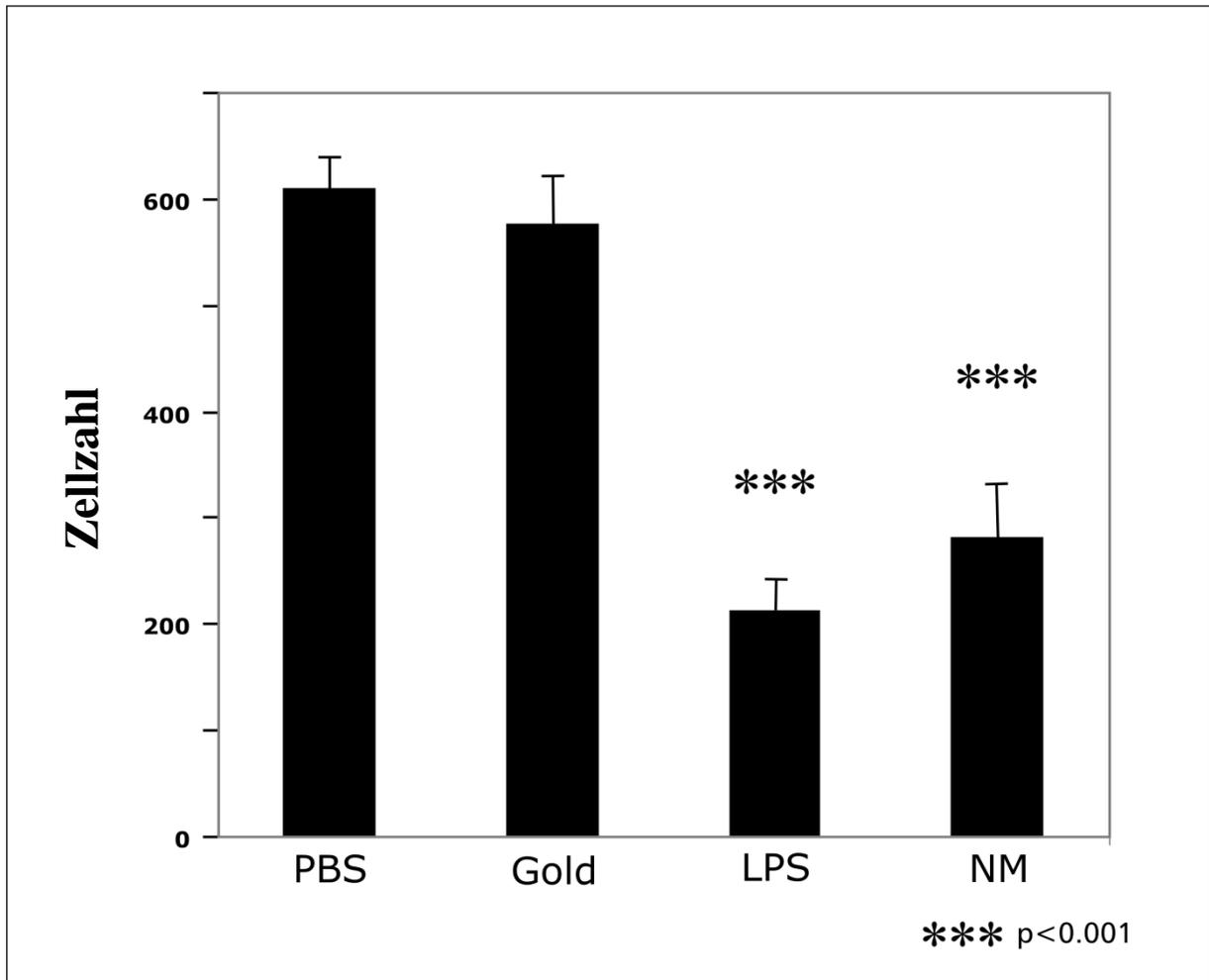
### Gold-Injektion

### Neuromelanin-Injektion



**Abb.3** Darstellung des neuronalen Zellverlust durch Nissl-Färbung.

Die obere Abbildung zeigt eine rekonstruierte Übersichtsaufnahme durch das Mittelhirn eine Woche nach supranigraler Injektion von Neuromelanin und Goldpartikeln. Repräsentative Mikrofotos (untere Abb.) zeigen in stärkerer Mikroskopvergrößerung eine signifikante Reduktion nigraler Neurone nach Injektion von Neuromelanin (rechte Abb.). Im Gegensatz dazu weist die Injektion von Goldpartikeln (linke Abb.) nur moderate oder keine Zeichen eines neuronalen Zelltodes auf.



**Abb.4 Quantitätsbestimmung des dopaminergen neuronalen Zellverlusts in der Substantia nigra nach Injektion von humanen Neuromelanin.**

Die Injektionen von Neuromelanin (NM) oder LPS induzieren eine signifikante Abnahme TH-positiver Neurone (Neuromelanin 50 % / LPS 65 %). Die Injektion der Kontrollsubstanzen Gold und PBS zeigen nur einen sehr geringen Verlust dopaminergener Neurone. Die Ergebnisse sind gemittelt anhand fünf unabhängiger Versuche und durch die Anzahl von TH-positiven Zellen angegeben. Eine Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,001$  wird als signifikant angenommen und mittels eines multiplen, paarweisen Vergleichs (Student's t-Test) bestätigt.

#### 4.1.4 Einfluss des nigralen Zellverlusts auf das Corpus striatum

Um mögliche funktionelle Beeinträchtigungen durch den neuronalen Zellverlust in der Substantia nigra festzustellen, wird das Corpus striatum der mit Neuromelanin behandelten Ratten (oder Goldpartikel als Kontrolle) mittels der HPLC und einer elektrochemischen Detektion analysiert. Es zeigen sich jedoch eine Woche nach der Injektion keine signifikanten Veränderungen der Konzentrationen von Dopamin (DA) und den Metaboliten Homovanillinmandelsäure (HVA) und 3,4 Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC) gegenüber den Kontrolltieren (s. Tabelle 1).

**Tabelle 1. Bestimmung von Dopamin (DA) und den Metaboliten (HVA und DOPAC) (in  $\mu\text{g/g}$  Feuchtgewebe) im Corpus striatum eine Woche nach der Injektion von humanem Neuromelanin in die Substantia nigra.**

	<b>n</b>	<b>DA</b>	<b>DOPAC</b>	<b>HVA</b>
<b>Kontrollinjektion</b>	10	13.35 +/- 0.75	1.51 +/- 0.15	0.89 +/- 0.07
<b>Neuromelanin - Injektion</b>	10	13.51 +/- 0.81	1.38 +/- 0.14	0.93 +/- 0.07

## 5 Diskussion

Trotz intensiver Forschung ist die Ätiologie des idiopathischen Parkinsonsyndroms (IPS) und die damit verbundene fortschreitende Degeneration dopaminerger Neurone in der Substantia nigra noch weitgehend ungeklärt. Um den Ablauf des IPS wirklich zu verstehen, müssen außer den Faktoren, die den degenerativen Prozess aufrechterhalten, auch die initialen Triggerfaktoren identifiziert werden. Durch mehrere Studien (Block et al., 2005; Rosenstiel et al., 2001; Wilms et al., 2009) konnte zunächst eine neuroinflammatorische Reaktion gezeigt werden, die den neuronalen Zelltod beim idiopathischen Parkinson-Syndrom (IPS) begleitet und morphologisch durch aktivierte Mikrogliazellen gekennzeichnet ist. Die Erkenntnisse daraus und aus den vorliegenden Untersuchungen sollen nun neue Informationen über einen möglichen endogenen Auslöser des chronisch neuroinflammatorischen Prozesses beim IPS aufzeigen.

### 5.1 Neuromelanin aktiviert Mikrogliazellen durch einen dualen

#### Mechanismus

Einer der möglichen endogenen Induktoren kann sich in dem komplexen polymeren Pigment Neuromelanin offenbaren, welches sich in den dopaminergen Neuronen der Substantia nigra befindet. In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, in wie weit extrazelluläres, humanes Neuromelanin einen neuroinflammatorischen Prozess auslösen kann. Unter der Annahme, dass eine Neuroinflammation tatsächlich mitverantwortlich für den progressiven Verlust von dopaminergen Neuronen bei Parkinson Erkrankten ist, muss es einen Mechanismus geben, der eine Entzündungsreaktion auf die Neurodegeneration folgen lässt und umgekehrt diese Entzündungsreaktion aufrecht erhält. In bereits durchgeführten *in-vitro* Studien in unserem Labor konnte zunächst gezeigt werden, dass humanes Neuromelanin als endogener Faktor eine Proliferation sowie die Chemotaxis von Mikrogliazellen induziert (Wilms et al., 2003). Parallel dazu aktiviert extrazelluläres Neuromelanin über einen dualen Mechanismus kultivierte Mikrogliazellen. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B spielt hierbei die entscheidende Rolle. Er wird durch Neuromelanin mittels Phosphorylierung und Degradation des inhibierenden Proteins  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) aktiviert. Außerdem aktiviert Neuromelanin die p38-Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK), die wiederum eine Untereinheit von NF- $\kappa$ B phosphoryliert und zur Transaktivierung des Transkriptionsfaktors führt (Rosenstiel et al., 2001).

NF- $\kappa$ B reguliert die Expression von Genen verschiedener proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder IL-6, aber auch die Stickoxid-Synthase (iNOS) und wird als wesentlicher Transkriptionsfaktor für die Mikrogliazell-Aktivität betrachtet. Diese Befunde demonstrieren eine wichtige Rolle von Neuromelanin in der Pathogenese des PS. In einem *Circulus vitiosus* kann Neuromelanin zur Aktivierung von Mikrogliazellen beitragen, welche durch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen zum entzündungsbedingten neuronalen Zelltod führen, wodurch erneut zusätzliches Neuromelanin freigesetzt wird und den Entzündungsprozess chronifizieren läßt (Wilms et al., 2003; Zecca et al., 2003).

## **5.2 Bedeutung von Neuromelanin im *in-vivo* Modell**

In den Untersuchungen anhand des Tiermodells kann zum einen gezeigt werden, dass humanes Neuromelanin in Form von mikroskopisch kleinen Granula direkt und in der Nähe der Injektionsstelle (frontaler Cortex/Substantia nigra) Mikrogliazellen aktiviert und zum anderen zu einem signifikanten Verlust von neuronalen Zellen in der Substantia nigra adulter Ratten führt. Unser Tiermodell repräsentiert jedoch im Gegensatz zum IPS keinen chronischen Degenerationsprozess, sondern eher eine akute Neuroinflammation und – degeneration. Dennoch wird extraneuronales Neuromelanin als eine der ursächlichen Substanzen einer chronischen Entzündungsreaktion und neuronalen Zelldegeneration in der Substantia nigra von Parkinson Erkrankten erachtet, da man neben der intensiven Aktivierung von Mikrogliazellen in der Nähe von Neuromelanin-beladenen Neuronen in der Substantia nigra pars compacta und im Locus coeruleus auch eine systemische Entzündungsreaktion im Liquor cerebrospinalis von Parkinson Erkrankten nachweisen konnte (Imamura et al., 2003; Kastner et al., 1992). Durch die höchste Dichte an ruhenden Mikrogliazellen im gesamten ZNS (Lawson et al., 1990) wird die Hypothese, dass Neuromelanin bei Parkinson Erkrankten in der Substantia nigra über eine Mikrogliazell-Aktivierung zur Neurodegeneration führt, weiter bestärkt. Außer der Substantia nigra zeigen aber auch direkt mit dieser in Verbindung stehende Regionen wie das Putamen eine Mikrogliazell-Aktivierung, welche sekundär zur neuronalen Degeneration beitragen kann (Imamura et al., 2003).

### **5.3 Einfluss der Neurodegeneration in der Substantia nigra auf nigrostriatale Bahnen?**

Trotz des neuronalen Zellverlusts in der Substantia nigra nahe dem Injektionsort können wir jedoch keine signifikante Abnahme der Dopaminkonzentration oder der Zwischenprodukte (HVA und DOPAC) im Corpus striatum feststellen. Eine Erklärung dafür kann sein, dass wir Neuromelanin in einer Suspension als kleinste Granula injiziert haben, die lokal nahe der Injektionsstelle eine starke Entzündungsreaktion und Neurodegeneration auslösen (siehe Abb. 2 und 3), jedoch durch die weitestgehende Unlösbarkeit der Neuromelanin-Granula eine Diffusion verhindert wird und Neurone, die sich abgelegen der Injektionsstelle befinden, nicht oder nur moderat geschädigt werden. Dieses zeigt auch, dass in unserem Tiermodell nur eine geringe Anzahl von nigrostriatalen Projektionen geschädigt werden und die daraus resultierende Abnahme von Dopamin im Corpus striatum nur auf einen kleinen Abschnitt begrenzt ist und es sich schwierig gestaltet, diesen Abschnitt genau zu lokalisieren und zu präparieren. Außerdem könnte bei dieser Untersuchungsgruppe die Überlebenszeit von einer Woche nach Injektion zu kurz gewählt sein, um messbare Veränderungen in der Konzentration von Dopamin und dessen Metaboliten im Corpus striatum zu erzielen. Viele Studien zeigen indes unter Anwendung einer LPS-Injektion in die Substantia nigra als pro-inflammatorischen Stimulus eine Abnahme der Konzentration genannter Neurotransmitter im Corpus striatum sowie einen neuronalen Zellverlust (Castano et al., 1998; Croisier et al., 2006; De Pablos et al., 2005). Neuromelanin kann wie durch die Untersuchungen bestätigt ebenso wie LPS eine Entzündungsreaktion auslösen, jedoch ist Neuromelanin dabei nicht so potent wie LPS. Und zum anderen wurden bei anderen Studien oftmals längere Überlebenszeiträume (3 Wochen) der Versuchstiere (Zhang et al., 2006) oder höhere Dosierungen von LPS verwendet, um einen nachweisbaren Effekt im Corpus striatum zu erzielen. So zeigt es sich als schwierig, unsere Ergebnisse mit denen anderer Studien zu vergleichen. Was wir jedoch ebenfalls nachweisen konnten, ist eine Aktivierung von Mikrogliazellen und einen signifikanten neuronalen Zellverlust in der Substantia nigra mittels eigens durchgeführten LPS-Injektionen (siehe Abb. 4). Bei der Parkinson Erkrankung kommt es durch die über mehrere Jahre oder Jahrzehnte anhaltende neuronale Degeneration in der Substantia nigra zu einem extrazellulären Verbleib von Neuromelanin. Da sich dieser Prozess über die gesamte Substantia nigra verteilt, lässt sich so auch eine stärkere Degeneration nigrostriataler Verbindungen und eine generalisierte Abnahme der Dopamine im Corpus striatum über einen längeren Zeitraum erklären.

## **5.4 Neuromelanin – Aktivator von Mikrogliazellen und Induktor mikroglialer proinflammatorischer Zytokine**

In dieser Arbeit gehen wir unserer Hypothese nach, dass extrazelluläres Neuromelanin auch ein Aktivator von Mikrogliazellen im *in vivo*-Modell sein kann. Wir beobachten, dass Neuromelanin nach der initialen intrazerebralen Injektion in den frontalen Cortex (zur Überprüfung der Hypothese) oder in die Substantia nigra eine akute und starke Entzündungsreaktion mit Aktivierung von Mikrogliazellen induziert, die sich nachfolgend durch Änderung des Phentyps von ruhenden, ramifizierten zu aktivierten, amöboiden Zellen präsentieren. Darüber hinaus scheint es mit zunehmendem Zeitintervall zu einer Abnahme dieses Effektes zu kommen, so dass wir keine sichtbare Aktivierung von Mikrogliazellen in den Untersuchungsgruppen mit acht bzw. zwölf Wochen Überlebenszeit mehr feststellen können (Cortex-Modell). Dieses spiegelt jedoch das fehlende Angebot von zusätzlichem Neuromelanin wider, welches aufgrund des degenerativen Verlaufes von Neuromelanin-beladenen Neuronen beim Morbus Parkinson stets vorhanden ist. In unserem Modell, in der den Versuchstieren Neuromelanin in die Substantia nigra injiziert wird und die eine Woche überleben, induziert Neuromelanin eine schnelle und suffiziente Aktivierung von Mikrogliazellen, um einen signifikanten neuronalen Zelltod erzielen zu können. Beim Menschen hingegen verläuft dieser Prozess wesentlich langsamer. Die Ursache für diese schnelle Degeneration von neuronalen Zellen könnte sich einerseits durch die Injektion von gereinigtem Neuromelanin erklären lassen, andererseits könnten die Mikrogliazellen von den Versuchstieren (Wistar-Ratten) stärker auf menschliches Neuromelanin reagieren. Im Gegensatz dazu zeigt die Injektion der Goldsuspension als positive Teilchenkontrolle keinen oder nur einen moderaten Effekt auf die Mikrogliazellen. Die Goldpartikel werden benutzt, um die Möglichkeit auszuschließen, dass durch einen unspezifischen mechanischen Reiz, welcher durch Granula hervorgerufen wird (wie Neuromelanin-Partikel), eine Aktivierung von Mikrogliazellen verursacht werden kann. Demzufolge sprechen die beobachteten Effekte auf die Mikrogliazellen und die umliegenden Neurone für die spezifische und selektive Wirkung des Neuromelanin-Moleküls. Dieses wird zusätzlich durch die vorangegangenen *in vitro* Experimente bestärkt, in denen die Inkubation reiner Mikrogliazellkulturen mit Neuromelanin zur Aktivierung von Mikrogliazellen führte, welche anhand der NO und TNF- $\alpha$ -Produktion gemessen wurde. Die Inkubation mit einer Goldsuspension zeigte keine messbaren Anstiege der Zytokinkonzentration in dem Medium (Wilms et al., 2003). Obwohl verschiedene Mechanismen wie Umwelttoxine oder genetische Faktoren eine primäre neuronale Schädigung in der Substantia nigra oder im Corpus striatum initiieren können, kann

extrazelluläres Neuromelanin, welches aus den abgestorbenen Neuronen freigesetzt wird, die Freisetzung mikroglialer, neurotoxischer Faktoren induzieren und nachfolgend zur Aufrechterhaltung der Neurodegeneration und damit zur Verschlechterung des Krankheitsbildes führen. Die Bildung und Speicherung von Neuromelanin in den dopaminergen Neuronen beginnt mit den ersten Jahren nach der Geburt, wobei die Konzentrationen auf 2,3 – 3,7 µg /mg bei einem Alter von 50 – 90 Jahren ansteigen (Zecca et al., 2002). Bei Parkinson – Patienten liegt der Neuromelanin – Gehalt in der Substantia nigra zwischen 1,2 – 1,5 µg /mg, was weniger als 50 % der Normalkonzentration an Neuromelanin darstellt. Beim PS sind die pigmentierten Neurone vulnerabler als die unpigmentierten Neurone, was wiederum Neuromelanin in Beziehung zur Vulnerabilität dopaminergener Neurone in der Substantia nigra bringt. Die Vulnerabilität scheint jedoch nicht direkt mit der Menge an Neuromelanin zu korrelieren, denn histologische Studien zeigen, dass leicht pigmentierte Neurone beim PS vulnerabler reagieren als stark pigmentierte Neurone (Gibb, 1992; Kastner et al., 1992; Mann et al., 1983). Andere Studien postulieren, dass Neuromelanin die Vulnerabilität der dopaminergen Neurone der Substantia nigra erhöhen kann, da auch synthetisch hergestelltes Neuromelanin Apoptose in Zellkulturen induziert (Offen et al., 1997). Bedenkt man, dass sich der mit der Altersentwicklung zunehmende Neuromelanin-Gehalt in den dopaminergen Neuronen völlig abweichend von der Anzahl der pigmentierten Neurone darstellt, scheint es, dass Neuromelanin nur in einer Subpopulation nigraler Neurone akkumuliert, während andere dopaminerge Neurone völlig unpigmentiert bleiben (Zecca et al., 2002). Das bestätigt auch die Abnahme von Neuromelanin in der Substantia nigra von Parkinson-Patienten, die, wie in neuropathologischen Studien bestätigt, nur einen Verlust der pigmentierten Neurone aufweisen (Gibb, 1992; Pakkenberg et al., 1991).

## **5.5 Neuroprotektion durch Neuromelanin?**

In einigen Studien wird angenommen, dass intraneuronales Neuromelanin protektiv gegenüber MPTP, Pestiziden und toxischen Metallen wirken kann (Lindquist et al., 1988; Sokolowski et al., 1990; Zecca et al., 1996). So konnte gezeigt werden, dass Neuromelanin den toxischen Metaboliten MPP<sup>+</sup> in vivo akkumulieren kann und so die Toxizität von MPTP reduziert (D'Amato et al., 1986). Das Herbizid Paraquat, welches strukturell dem toxischen Metaboliten MPP<sup>+</sup> sehr ähnlich ist und daher als PS-induzierendes Agens in Verdacht steht, kann ebenfalls in Neuronen durch Neuromelanin gebunden werden, so dass diese dadurch

gegen eine Toxizität durch Paraquat geschützt sein können (Lindquist et al., 1988). In einer Studie der Arbeitsgruppe Sulzer et al. aus dem Jahr 2000 wurde demonstriert, dass die Neuromelanin-Synthese durch eine Überexpression des synaptischen vesikulären Katecholamin-Transporters (VMAT2) unterdrückt werden kann, da dieser freies zytosolisches Dopamin durch vesikuläre Akkumulation reduziert. Da Neuromelanin einen stabilen, eisenhaltigen Komplex darstellt und die Neuromelaninsynthese durch die chelatbildenden Eigenschaften von Deferoxamin inhibiert werden kann, deutet vieles darauf hin, dass zytosolisches Dopamin und Dihydroxyphenylalanin (L-Dopa), ein Zwischenprodukt der Dopaminsynthese, durch Eisen-vermittelte Katalyse zu Membran-undurchlässigen Chinonen und Semichinonen oxidiert werden. Die Neuromelanin-Synthese resultiert folglich aus überschüssigen zytosolischen Katecholaminen, die nicht in synaptischen Vesikeln akkumulieren. Die Akkumulation der Katechole und Chinone durch Einschluss zu Neuromelanin-Organellen kann somit einen antioxidativen Mechanismus für catecholaminhaltige Neurone darstellen (Sulzer et al., 2000).

## **5.6 Interaktion von Neuromelanin mit Eisen und anderen Metallen führt zur Neurotoxizität?**

Neuromelanin scheint das einzige Puffersystem gegenüber Eisen und anderen toxischen Metallen in dopaminergen Neuronen der Substantia nigra darzustellen. In den Oligodendrozyten und Astrozyten der Substantia nigra liegt Eisen in Form von H – oder L – Ferritin vor (Zecca et al., 2004a). Neuromelanin verfügt über Bindungsstellen mit hoher und niedriger Affinität zu Eisen, wobei es scheint, dass Neuromelanin das Redox-aktive Eisen an den Bindungsstellen mit hoher Affinität besser sequestrieren kann und so die Ausbildung von Hydroxylradikalen unterdrückt. Neuromelanin spielt dabei eine protektive Rolle, indem es eine Induktion von oxidativem Stress durch freie Eisenionen verhindert. Durch die Fähigkeit von Neuromelanin als Chelatbildner andere Redox-aktive Metalle wie Kupfer, Mangan oder Chrom und toxische Metalle wie Cadmium, Quecksilber oder Blei zu binden, kann Neuromelanin als Speichersystem mit hoher Kapazität für metallische Ionen neuronalem Schaden vorbeugen (Swartz et al., 1992; Zecca et al., 1996; Zecca et al., 1993). In der Anwesenheit eines hohen Eisenspiegels akkumuliert Neuromelanin Eisen dann auch an den Bindungsstellen mit niedriger Affinität in einer Ferritin ähnlichen Eisenoxidhydroxyl-Clusterform, durch die Eisen eine Reduktions-Oxidations-Reaktion ausführen und freie Radikale produzieren kann, welche wiederum neurotoxisch wirken. An Patienten, die an der

Parkinson-Erkrankung verstorben sind, konnte eine Zunahme des an Neuromelanin gebundenen Gesamteisens und des Redox-aktiven Eisens sowie eine Assoziation mit Neuromelanin-Granula beobachtet werden (Faucheux et al., 2003; Jellinger et al., 1992). Die Redox-Aktivität ist bei den Parkinson-Erkrankten, die den massivsten neuronalen Verlust zeigten, am höchsten. Außerdem konnte man bei Parkinson-Patienten nach einem Anstieg des Gesamteisens einen Mangel in der Hochregulation der Ferritinexpression zur Speicherung des Eisens feststellen, was wiederum die Frage nach den in der Eisenhomöostase involvierten Molekülen aufwirft. So scheint es letztendlich die Menge an zytosolischem Eisen zu sein, die ausschlaggebend ist für die protektive oder neurotoxische Wirkung von Neuromelanin (Double et al., 2002; Zecca et al., 2008a). Damit wird Neuromelanin während des Verlaufes des PS zum zweiseitigen Schwert. Während des Verlaufes bei Parkinson-Erkrankten wird vermutet, dass Neuromelanin durch Eisenfreisetzung zu vermehrtem oxidativen Stress in den Mitochondrien führt. Durch die mitochondriale Dysfunktion und die herabgesetzte Funktion der 26S-Proteasomen kann die neuronale Degeneration gefördert werden (Shamoto-Nagai et al., 2006). Neuromelanin akkumuliert so einerseits in zytosolischen Organellen und führt zu einem direktem Effekt an den Neuronen der Substantia nigra, andererseits wird es durch neuronale Degeneration in den Extrazellulärraum freigesetzt und erhält dadurch Zugang zu den in der Umgebung liegenden Mikrogliazellen. Derartiges extrazelluläres Neuromelanin enthält große Mengen an Eisen und der Anteil an aktivem, an Redox-Reaktionen teilnehmendem Eisen nimmt bei Parkinson-Patienten zu. Da Redox-aktives freies zweiwertiges Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) und andere Übergangsmetalle die Fähigkeit besitzen, äußerst reaktive Hydroxylradikale ( $\text{OH}^\cdot$ ) durch einen katalytischen Prozess zu erzeugen, wurde die Redox-Aktivität von Neuromelanin-Aggregaten bei Parkinson Patienten untersucht. Diese zeigten eine deutliche Zunahme der Redox-Aktivität (+69 %) bei einer statistisch signifikanten Reduktion (-70 %) in der Anzahl der Neuromelanin enthaltenen Neurone und einen Anstieg des freien, ionisierten Eisengehalts. Eine mögliche Konsequenz des extrazellulären Neuromelanins mit derartigen Redox-aktiven Elementen zeigt sich in einer Zunahme des oxidativen Stresses bei Parkinson-Patienten (Faucheux et al., 2003; Zecca et al., 2004b). In Parkinson-Tiermodellstudien wurde beobachtet, dass extrazelluläres Eisen zum Anstieg von aktivierten Mikrogliazellen führt und eine globale zentrale Ischämie auslöst (Shoham et al., 2000). Es stellt sich jedoch die Frage, warum die dopaminergen Neurone verglichen mit anderen Neuronen eine höhere Vulnerabilität zeigen. In der Tat haben die dopaminergen Neurone der Substantia nigra einen hohen Gehalt an Dopamin, das oxidiert reaktive Chinone bilden kann. Darüber hinaus besitzen dopaminerge Neurone nur einen

geringen Gehalt an Glutathion und damit eine geringe antioxidative Kapazität. Der Gehalt an Toxinen und reaktiven Metallen ist deutlich höher und gebunden an Neuromelanin (Zecca et al., 2004b). Daher kann Neuromelanin ein Kandidat sein, zunächst durch Freisetzung aus untergegangenen Neuronen, eine akute Neurodegeneration bei Parkinson Erkrankten auszulösen, welche dann über die Jahre in eine chronische Form übergeht. Zunächst ist grundsätzlich ein Vorkommen sehr hoher Konzentrationen von Neuromelanin in der Substantia nigra mit zunehmenden Alter anzunehmen (2-4 mg/g Gewebe nach 50 Jahren), welches dann aber noch durch seine Unlösbarkeit, seine lange Verweildauer im Extrazellulärraum (Langston et al., 1999) und seine hohen Mengen an gebundenen Toxinen wie Metalle oder Pestizide zur Chronifizierung und Aufrechterhaltung des neurodegenerativen Prozess beitragen kann (Zucca et al., 2004).

## **5.7 Ausblick**

Bis heute ist keine kurative Therapie für das IPS verfügbar, daher muss der Entwicklung von Therapieansätzen, die den neurodegenerativen Prozess aufhalten, eine besondere Bedeutung zugemessen werden. Die momentane medikamentöse Therapie des IPS ist zwar sehr wirkungsvoll, jedoch nur symptomatisch, d.h. sie kann die Progredienz der Erkrankung nicht aufhalten. Die in unserem *in-vivo* Modell vorgestellten Ergebnisse demonstrieren, dass extrazelluläres Neuromelanin eine Entzündungsreaktion mit nachfolgender Aktivierung von Mikrogliazellen auslösen kann und so möglicherweise einen wichtigen Faktor für den chronisch neurodegenerativen Prozess des IPS darstellt. Diese Tatsache zeigt wiederum einen wichtigen Schritt im Rahmen der Therapiemöglichkeiten auf. So kann eine Inhibition des Entzündungsprozesses mit antiinflammatorischen Wirkstoffen die Symptomatik des IPS beeinflussen. Zunächst gerieten vor allem die steroidal und nichtsteroidal Antirheumatika (NSAR) in das Blickfeld, welche über die Hemmung der Phospholipase A<sub>2</sub> bzw. Cyclooxygenase die Synthese der Arachidonsäure und Prostaglandine und somit eine Entzündungsreaktion einschränken. Im MPTP-Tiermodell hemmen diese Wirkstoffe die Mikrogliazell-Aktivität und die Produktion von proinflammatorischen Molekülen und reduzieren den entzündungsbedingten Untergang dopaminerger Neurone (Aubin et al., 1998). Auch der proinflammatorische Transkriptionsfaktor NF-κB scheint in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen eine Rolle zu spielen. Außer Cortisonpräparaten und einigen NSAR's, die NF-κB inhibieren und die Produktion mikroglialer proinflammatorischer Zytokine vermindern (Aubin et al., 1998), kann unsere Forschungsgruppe anhand von

*in-vitro* Versuchen und stereotaktisch durchgeführten Injektionen in die Substantia nigra mit  $\alpha$ -Synuklein-Protofibrillen ähnliche Befunde nachweisen.  $\alpha$ -Synuklein-Protofibrillen sind ebenfalls sehr potente Aktivatoren des proinflammatorischen p38-MAPK/NF- $\kappa$ B-Signalwegs in Mikrogliazellen, so dass die Inhibition der Signalwege über MAPK/NF- $\kappa$ B durch den I $\kappa$ B-Kinaseinhibitor Sulfasalazin oder auch durch Semapimod, welcher als spezifischer p38-MAPK-Kinase Inhibitor die Phosphorylierung einer Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B vermindert, zu einer Hemmung der Mikrogliazell-Aktivierung mit verminderter Freisetzung der neurotoxischen Mediatoren TNF $\alpha$ , IL-6 und NO führt (Wilms et al., 2009; Wilms et al., 2003). Einige NSAR's wie Ibuprofen oder Indometacin besitzen außer den genannten Eigenschaften auch die Fähigkeit den Peroxisome Proliferator Activated Rezeptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) zu aktivieren. PPAR- $\gamma$  ist ein Mitglied der Nuklear Rezeptor Familie und inhibiert u.a. proinflammatorische Eigenschaften in Mikrogliazellen (Lehmann et al., 1997). Die schweren gastrointestinalen Nebenwirkungen der steroidalen und nichtsteroidalen Antirheumatika bei einer Langzeiteinnahme stellen den therapeutischen Nutzen jedoch klar in den Hintergrund, so dass die medikamentöse Entwicklung eher in eine andere Richtung verfolgt wird. Vorklinische Studien haben gezeigt, dass Pioglitazon, ein als Insulinsensitizer eingesetztes Antidiabetikum, als Agonist des PPAR- $\gamma$  dem dopaminergen Zellverlust in der Substantia nigra im MPTP-Modell vorbeugen kann, wobei der exakte Wirkmechanismus noch umstritten ist. Einige Studien weisen eine Inhibition von NF- $\kappa$ B nach (Dehmer et al., 2004), andere sehen vor allem in der Hemmung der Monaminoxidase B, die MPTP in den neurotoxischen Metaboliten MPP<sup>+</sup> umwandelt, die neuroprotektive Wirkung von Pioglitazon (Quinn et al., 2008). Außer den immunregulatorischen Eigenschaften spielt Pioglitazon auch in der Regulation der Mitochondrienfunktion und im zellulären Metabolismus eine Rolle, welche bei der Parkinson-Erkrankung beeinträchtigt sind und somit simultan wiederhergestellt werden könnten (Randy et al., 2007). Ein anderes immunregulatorisches Medikament stellt das semisynthetische Antibiotikum Minozyklin aus der Gruppe der Tetrazykline dar. Außer seiner antimikrobiellen Wirkung durch Hemmung der Proteinsynthese besitzt es unabhängig davon auch noch einen antientzündlichen Wirkungsmechanismus. Im MPTP-Tiermodell hemmt Minozyklin die Mikrogliazell-Aktivität und reduziert so die Produktion Mikroglia-assoziiierter neurotoxischer Effektormoleküle (Du et al., 2001). Aber es gibt auch widersprüchliche Studienergebnisse, die in Tiermodellen unter der Minozyklin-Behandlung eher eine Verschlechterung der Parkinson-Symptomatik aufweisen (Yang et al., 2003). Neueren Studien zufolge versucht man sich einen immunmodulatorischen Arzneistoff, der zur Behandlung der Multiplen Sklerose eingesetzt wird, auch bei der Parkinson-Erkrankung zu

Nutzen zu machen. Glatirameracetat (Copolymer1/Copaxone) ist ein synthetisches Polypeptid, welches aus den vier Aminosäuren Glutaminsäure, Lysin, Alanin und Tyrosin besteht und dem Myelin-Basischem Protein (MBP) der Myelinscheide in seiner Zusammensetzung sehr ähnelt (Tsai, 2007). Durch die Behandlung mit Glatirameracetat in einem MPTP-Mausmodell kann die normalerweise schädliche T-Zellreaktion in eine antientzündliche und protektive Immunantwort umgeändert werden, indem diese spezifischen T-Zellen die Mikrogliazell-Aktivierung unterdrücken und die Synthese neurotropher Faktoren wie GDNF durch Astrozyten stimulieren (Johnston et al., 2008). Außerdem fördert Glatirameracetat durch die Aktivierung eines Transkriptionsfaktors (FOXP3) die Umwandlung von konventionellen CD4+CD25-T-Zellen zu CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen, die wiederum große Mengen antientzündlich wirkender Zytokine wie IL10 und TGFβ produzieren (Reynolds et al., 2007). Der klinische Nutzen dieser Form der aktiven Immunisierung durch Glatirameracetat bei der Parkinson-Erkrankung muss aber erst noch nachgewiesen werden.

## 6 Zusammenfassung

Das Idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS, Morbus Parkinson) wurde erstmals 1817 als Krankheitsbild von James Parkinson in seiner Studie „An essay on the shaking palsy“ beschrieben. Es stellt die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach Morbus Alzheimer dar und betrifft 1-2% der Gesamtpopulation der über 65-jährigen. Das pathologische Korrelat der Erkrankung ist die progressive Degeneration dopaminergener Neurone in der Substantia nigra pars compacta des Mittelhirns. Dieser neuronale Zellverlust führt zur Verarmung des Striatums an Dopamin. Wenn ca. 50% der dopaminergen Neurone der Substantia nigra abgestorben und damit ca. 70-80% des striatalen Dopamins verloren ist, entwickeln die Patienten die typischen Kardinalsymptome Bradykinese, Ruhetremor, Rigor und posturale Instabilität aus. Mikroglia sind die residenten Gewebsmakrophagen des ZNS und "Schlüsselzellen" in der Initiierung und Unterhaltung von Entzündungsreaktionen im Gehirn. Aktivierte Mikrogliazellen setzen proinflammatorische und bekanntermaßen neurotoxische Moleküle frei. Die Degeneration der dopaminergen Neurone in der Substantia nigra beim IPS geht mit einer chronischen Entzündungsreaktion, d.h. einer Aktivierung von Mikrogliazellen einher. Während wahrscheinlich endogene (genetische Prädisposition) und exogene Faktoren (Umweltgifte) den dopaminergen Zelltod einleiten, verstärkt die begleitende neuroinflammatorische Reaktion den Zellverlust. Von degenerierenden dopaminergen Neuronen in den Extrazellulärraum freigesetzte Moleküle stehen in Verdacht die chronische Mikrogliazell-Aktivierung zu unterhalten. Einen der möglichen endogenen Induktoren kann das schwarz-bräunliche Pigment Neuromelanin darstellen, welches sich vor allem in den dopaminergen Neuronen der Substantia nigra befindet. Durch die Funktion als Chelatbildner stellt es in diesen Neuronen das einzige Puffersystem gegenüber freien Eisen- und andere Metallionen dar, wodurch es zunächst eine neuroprotektive Eigenschaft zu besitzen scheint, indem es eine Induktion von oxidativen Stress verhindert. Die protektive Eigenschaft von Neuromelanin kann jedoch durch Bindungsänderungen bei erhöhten Eisenionenkonzentrationen verloren gehen und durch Freisetzung freier Radikale in eine neurotoxische Wirkung umschlagen. Außer einer direkten neurotoxischen Wirkung von Neuromelanin kann extraneuronales Neuromelanin, welches aus abgestorbenen Neuronen der Substantia nigra freigesetzt wird, indirekt zur Mikrogliose und über Chemotaxis zur Aktivierung von Mikrogliazellen führen. Mikrogliazellen sind außer ihrer Eigenschaft als Makrophagen durch ihre MHC-Oberflächenmoleküle zur Antigenpräsentation befähigt und leiten durch Sekretion verschiedener Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder IL6 die Abwehrreaktion ein.



Trotz des neuronalen Zellverlusts in der Substantia nigra haben wir aber keine signifikante Abnahme der Dopaminkonzentration im Corpus striatum festgestellt, was u.a. durch das kurze Zeitfenster begründet werden kann. Aber über einen Zeitraum von Jahrzehnten kann extrazelluläres Neuromelanin über die Aktivierung von Mikrogliazellen letztendlich zu einem relevanten, neuronalen Zellverlust führen und den progressiven Dopaminmangel im Corpus striatum durch Schädigungen der nigrostriatalen Bahnen erklären. Diese Untersuchungen können Anlass geben, weitere neue therapeutische Strategien zu entwickeln, um den Kreislauf aus neuronalem Zelltod - Neuroinflammation - neuronalem Zelltod zu durchbrechen.

## 7 Literaturverzeichnis

Agil, A., Duran, R., Barrero, F., Morales, B., Arauzo, M., Alba, F., Miranda, M.T., Prieto, I., Ramirez, M., and Vives, F. (2006). Plasma lipid peroxidation in sporadic Parkinson's disease. Role of the L-dopa. *J Neurol Sci* 240, 31-36.

Allam, M.F., Del Castillo, A.S., and Navajas, R.F. (2005). Parkinson's disease risk factors: genetic, environmental, or both? *Neurol Res* 27, 206-208.

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

Alves, G., Forsaa, E.B., Pedersen, K.F., Dreetz Gjerstad, M., and Larsen, J.P. (2008). Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol* 255 *Suppl* 5, 18-32.

Anand, V.S., and Braithwaite, S.P. (2009). LRRK2 in Parkinson's disease: biochemical functions. *Febs J* 276, 6428-6435.

Ardley, H.C., Scott, G.B., Rose, S.A., Tan, N.G., and Robinson, P.A. (2004). UCH-L1 aggregates formation in response to proteasome impairment indicates a role in inclusion formation in Parkinson's disease. *J Neurochem* 90, 379-391.

Aubin, N., Curet, O., Deffois, A., and Carter, C. (1998). Aspirin and salicylate protect against MPTP-induced dopamine depletion in mice. *J Neurochem* 71, 1635-1642.

Baldereschi, M., Di Carlo, A., Vanni, P., Ghetti, A., Carbonin, P., Amaducci, L., and Inzitari, D. (2003). Lifestyle-related risk factors for Parkinson's disease: a population-based study. *Acta Neurol Scand* 108, 239-244.

Beal, M.F. (2003). Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991, 120-131.

Bender, A., Krishnan, K.J., Morris, C.M., Taylor, G.A., Reeve, A.K., Perry, R.H., Jaros, E., Hersheson, J.S., Betts, J., Klopstock, T., Taylor, R.W., and Turnbull, D.M. (2006). High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet* 38, 515-517.

Benedetto, A., Au, C., and Aschner, M. (2009). Manganese-induced dopaminergic neurodegeneration: insights into mechanisms and genetics shared with Parkinson's disease. *Chem Rev* 109, 4862-4884.

Biskup, S., Gerlach, M., Kupsch, A., Reichmann, H., Riederer, P., Vieregge, P., Wullner, U., and Gasser, T. (2008). Genes associated with Parkinson syndrome. *J Neurol* 255 *Suppl* 5, 8-17.

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

Bossy-Wetzell, E., Schwarzenbacher, R., and Lipton, S.A. (2004). Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med* 10 *Suppl*, S2-9.

Caixeta, L., and Vieira, R.T. (2008). [Dementia in Parkinson's disease]. *Rev Bras Psiquiatr* 30, 375-383.

- Castano, A., Herrera, A.J., Cano, J., and Machado, A. (1998). Lipopolysaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction and damage in nigrostriatal dopaminergic system. *J Neurochem* 70, 1584-1592.
- Chu, Y., Dodiya, H., Aebischer, P., Olanow, C.W., and Kordower, J.H. (2009). Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: relationship to alpha-synuclein inclusions. *Neurobiol Dis* 35, 385-398.
- Cooper, J.M., Daniel, S.E., Marsden, C.D., and Schapira, A.H. (1995). L-dihydroxyphenylalanine and complex I deficiency in Parkinson's disease brain. *Mov Disord* 10, 295-297.
- Costello, S., Cockburn, M., Bronstein, J., Zhang, X., and Ritz, B. (2009). Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. *Am J Epidemiol* 169, 919-926.
- Croisier, E., and Graeber, M.B. (2006). Glial degeneration and reactive gliosis in alpha-synucleinopathies: the emerging concept of primary gliodegeneration. *Acta Neuropathol* 112, 517-530.
- D'Amato, R.J., Lipman, Z.P., and Snyder, S.H. (1986). Selectivity of the parkinsonian neurotoxin MPTP: toxic metabolite MPP<sup>+</sup> binds to neuromelanin. *Science* 231, 987-989.
- De Pablos, R.M., Herrera, A.J., Villaran, R.F., Cano, J., and Machado, A. (2005). Dopamine-dependent neurotoxicity of lipopolysaccharide in substantia nigra. *Faseb J* 19, 407-409.
- Dehmer, T., Heneka, M.T., Sastre, M., Dichgans, J., and Schulz, J.B. (2004). Protection by pioglitazone in the MPTP model of Parkinson's disease correlates with I kappa B alpha induction and block of NF kappa B and iNOS activation. *J Neurochem* 88, 494-501.
- Dobrenis, K. (1998). Microglia in cell culture and in transplantation therapy for central nervous system disease. *Methods* 16, 320-344.
- Double, K.L., Ben-Shachar, D., Youdim, M.B., Zecca, L., Riederer, P., and Gerlach, M. (2002). Influence of neuromelanin on oxidative pathways within the human substantia nigra. *Neurotoxicol Teratol* 24, 621-628.
- Double, K.L., Zecca, L., Costi, P., Mauer, M., Griesinger, C., Ito, S., Ben-Shachar, D., Bringmann, G., Fariello, R.G., Riederer, P., and Gerlach, M. (2000). Structural characteristics of human substantia nigra neuromelanin and synthetic dopamine melanins. *J Neurochem* 75, 2583-2589.
- Du, Y., Ma, Z., Lin, S., Dodel, R.C., Gao, F., Bales, K.R., Triarhou, L.C., Chernet, E., Perry, K.W., Nelson, D.L., Luecke, S., Phebus, L.A., Bymaster, F.P., and Paul, S.M. (2001). Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14669-14674.
- Dzierzega-Leczna, A., Kurkiewicz, S., Stepien, K., Chodurek, E., Wilczok, T., Arzberger, T., Riederer, P., and Gerlach, M. (2004). GC/MS analysis of thermally degraded neuromelanin from the human substantia nigra. *J Am Soc Mass Spectrom* 15, 920-926.

- Enochs, W.S., Nilges, M.J., and Swartz, H.M. (1993). A standardized test for the identification and characterization of melanins using electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. *Pigment Cell Res* 6, 91-99.
- Faucheux, B.A., Martin, M.E., Beaumont, C., Hauw, J.J., Agid, Y., and Hirsch, E.C. (2003). Neuromelanin associated redox-active iron is increased in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *J Neurochem* 86, 1142-1148.
- Fedorow, H., Pickford, R., Hook, J.M., Double, K.L., Halliday, G.M., Gerlach, M., Riederer, P., and Garner, B. (2005). Dolichol is the major lipid component of human substantia nigra neuromelanin. *J Neurochem* 92, 990-995.
- Fenichel, G.M., and Bazelon, M. (1968). Studies on neuromelanin. II. Melanin in the brainstems of infants and children. *Neurology* 18, 817-820.
- Foley, J.M., and Baxter, D. (1958). On the nature of pigment granules in the cells of the locus coeruleus and substantia nigra. *J Neuropathol Exp Neurol* 17, 586-598.
- Funayama, M., and Hattori, N. (2007). [Molecular genetics of PINK1]. *Brain Nerve* 59, 831-838.
- Gibb, W.R. (1992). Melanin, tyrosine hydroxylase, calbindin and substance P in the human midbrain and substantia nigra in relation to nigrostriatal projections and differential neuronal susceptibility in Parkinson's disease. *Brain Res* 581, 283-291.
- Golbe, L.I., Di Iorio, G., Bonavita, V., Miller, D.C., and Duvoisin, R.C. (1990). A large kindred with autosomal dominant Parkinson's disease. *Ann Neurol* 27, 276-282.
- Gorell, J.M., Johnson, C.C., Rybicki, B.A., Peterson, E.L., and Richardson, R.J. (1998). The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology* 50, 1346-1350.
- Gu, L., Cui, T., Fan, C., Zhao, H., Zhao, C., Lu, L., and Yang, H. (2009). Involvement of ERK1/2 signaling pathway in DJ-1-induced neuroprotection against oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 383, 469-474.
- Haavik, J. (1997). L-DOPA is a substrate for tyrosine hydroxylase. *J Neurochem* 69, 1720-1728.
- Hagg, T., and Varon, S. (1993). Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of adult rat substantia nigra dopaminergic neurons in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6315-6319.
- Harris, M.K., Shneyder, N., Borazanci, A., Korniyuchuk, E., Kelley, R.E., and Minagar, A. (2009). Movement disorders. *Med Clin North Am* 93, 371-388.
- Hastings, T.G. (1995). Enzymatic oxidation of dopamine: the role of prostaglandin H synthase. *J Neurochem* 64, 919-924.
- Hedrich, K., Djarmati, A., Schafer, N., Hering, R., Wellenbrock, C., Weiss, P.H., Hilker, R., Vieregge, P., Ozelius, L.J., Heutink, P., Bonifati, V., Schwinger, E., Lang, A.E., Noth, J., Bressman, S.B., Pramstaller, P.P., Riess, O., and Klein, C. (2004). DJ-1 (PARK7) mutations are less frequent than Parkin (PARK2) mutations in early-onset Parkinson disease. *Neurology* 62, 389-394.

- Hofer, A., and Gasser, T. (2004). New aspects of genetic contributions to Parkinson's disease. *J Mol Neurosci* 24, 417-424.
- Hunter, D.J. (2005). Gene-environment interactions in human diseases. *Nat Rev Genet* 6, 287-298.
- Imamura, K., Hishikawa, N., Sawada, M., Nagatsu, T., Yoshida, M., and Hashizume, Y. (2003). Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol* 106, 518-526.
- Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79, 368-376.
- Jellinger, K., Kienzl, E., Rumpelmair, G., Riederer, P., Stachelberger, H., Ben-Shachar, D., and Youdim, M.B. (1992). Iron-melanin complex in substantia nigra of parkinsonian brains: an x-ray microanalysis. *J Neurochem* 59, 1168-1171.
- Jellinger, K.A. (1991). Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol Chem Neuropathol* 14, 153-197.
- Jellinger, K.A. (1998). Neuropathology of movement disorders. *Neurosurg Clin N Am* 9, 237-262.
- Jenner, P. (2008). Functional models of Parkinson's disease: a valuable tool in the development of novel therapies. *Ann Neurol* 64 Suppl 2, S16-29.
- Johnston, L.C., Su, X., Maguire-Zeiss, K., Horovitz, K., Ankoudinova, I., Guschin, D., Hadaczek, P., Federoff, H.J., Bankiewicz, K., and Forsayeth, J. (2008). Human interleukin-10 gene transfer is protective in a rat model of Parkinson's disease. *Mol Ther* 16, 1392-1399.
- Kahle, P.J., Waak, J., and Gasser, T. (2009). DJ-1 and prevention of oxidative stress in Parkinson's disease and other age-related disorders. *Free Radic Biol Med* 47, 1354-1361.
- Kastner, A., Hirsch, E.C., Lejeune, O., Javoy-Agid, F., Rascol, O., and Agid, Y. (1992). Is the vulnerability of neurons in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease related to their neuromelanin content? *J Neurochem* 59, 1080-1089.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., and Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392, 605-608.
- Kreutzberg, G.W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19, 312-318.
- Langston, J.W. (1987). MPTP: insights into the etiology of Parkinson's disease. *Eur Neurol* 26 Suppl 1, 2-10.
- Langston, J.W., and Ballard, P.A., Jr. (1983). Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N Engl J Med* 309, 310.
- Langston, J.W., Forno, L.S., Tetud, J., Reeves, A.G., Kaplan, J.A., and Karluk, D. (1999). Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol* 46, 598-605.

- Lawson, L.J., Perry, V.H., Dri, P., and Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39, 151-170.
- Lee, P.H., Lee, G., Park, H.J., Bang, O.Y., Joo, I.S., and Huh, K. (2006). The plasma alpha-synuclein levels in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J Neural Transm* 113, 1435-1439.
- Lehmann, J.M., Lenhard, J.M., Oliver, B.B., Ringold, G.M., and Kliewer, S.A. (1997). Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 272, 3406-3410.
- Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez, J.A., and Robinson, J.P. (2003). Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem* 278, 8516-8525.
- Liang, C.L., Nelson, O., Yazdani, U., Pasbakhsh, P., and German, D.C. (2004). Inverse relationship between the contents of neuromelanin pigment and the vesicular monoamine transporter-2: human midbrain dopamine neurons. *J Comp Neurol* 473, 97-106.
- Lindquist, N.G., Larsson, B.S., and Lyden-Sokolowski, A. (1988). Autoradiography of [14C]paraquat or [14C]diquat in frogs and mice: accumulation in neuromelanin. *Neurosci Lett* 93, 1-6.
- Lough, W.J., and Wainer, I.W. (1995). High performance liquid chromatography - Fundamental principles and practice. Blackie Academic & Professionell, an imprint of Chapman&Hall, Western Cleddens Road, Bishopbriggs, Glasgow G64 2NZ
- Lucchini, R.G., Martin, C.J., and Doney, B.C. (2009). From manganism to manganese-induced parkinsonism: a conceptual model based on the evolution of exposure. *Neuromolecular Med* 11, 311-321.
- Mann, D.M., and Yates, P.O. (1983). Possible role of neuromelanin in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Mech Ageing Dev* 21, 193-203.
- Manning-Bog, A.B., McCormack, A.L., Li, J., Uversky, V.N., Fink, A.L., and Di Monte, D.A. (2002). The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J Biol Chem* 277, 1641-1644.
- Marella, M., Seo, B.B., Matsuno-Yagi, A., and Yagi, T. (2007). Mechanism of cell death caused by complex I defects in a rat dopaminergic cell line. *J Biol Chem* 282, 24146-24156.
- Markey, S.P., Johannessen, J.N., Chiueh, C.C., Burns, R.S., and Herkenham, M.A. (1984). Intra-neuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature* 311, 464-467.
- Marsden, C.D. (1983). Neuromelanin and Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 19, 121-141.
- McCarthy, S., Somayajulu, M., Sikorska, M., Borowy-Borowski, H., and Pandey, S. (2004). Paraquat induces oxidative stress and neuronal cell death; neuroprotection by water-soluble Coenzyme Q10. *Toxicol Appl Pharmacol* 201, 21-31.

McCormack, A.L., Thiruchelvam, M., Manning-Bog, A.B., Thiffault, C., Langston, J.W., Cory-Slechta, D.A., and Di Monte, D.A. (2002). Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis* 10, 119-127.

McGeer, P.L., and McGeer, E.G. (2008). Glial reactions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 23, 474-483.

Nagatsu, T., Mogi, M., Ichinose, H., and Togari, A. (2000). Cytokines in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 143-151.

Offen, D., Ziv, I., Barzilai, A., Gorodin, S., Glater, E., Hochman, A., and Melamed, E. (1997). Dopamine-melanin induces apoptosis in PC12 cells; possible implications for the etiology of Parkinson's disease. *Neurochem Int* 31, 207-216.

Okun, M.R. (1997). The role of peroxidase in neuromelanin synthesis: a review. *Physiol Chem Phys Med NMR* 29, 15-22.

Pakkenberg, B., Moller, A., Gundersen, H.J., Mouritzen Dam, A., and Pakkenberg, H. (1991). The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 54, 30-33.

Pan-Montojo, F., Anichtchik, O., Dening, Y., Knels, L., Pursche, S., Jung, R., Jackson, S., Gille, G., Spillantini, M.G., Reichmann, H., and Funk, R.H. (2010). Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice. *PLoS One* 5, e8762.

Paxinos, G., Watson, C.R., and Emson, P.C. (1980). AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. *J Neurosci Methods* 3, 129-149.

Peng, J., Stevenson, F.F., Doctrow, S.R., and Andersen, J.K. (2005). Superoxide dismutase/catalase mimetics are neuroprotective against selective paraquat-mediated dopaminergic neuron death in the substantia nigra: implications for Parkinson disease. *J Biol Chem* 280, 29194-29198.

Perry, V.H., and Gordon, S. (1991). Macrophages and the nervous system. *Int Rev Cytol* 125, 203-244.

Poewe, W.H., and Wenning, G.K. (1996). The natural history of Parkinson's disease. *Neurology* 47, S146-152.

Polymeropoulos, M.H., Higgins, J.J., Golbe, L.I., Johnson, W.G., Ide, S.E., Di Iorio, G., Sanges, G., Stenroos, E.S., Pho, L.T., Schaffer, A.A., Lazzarini, A.M., Nussbaum, R.L., and Duvoisin, R.C. (1996). Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science* 274, 1197-1199.

Power, J.H., and Blumbergs, P.C. (2009). Cellular glutathione peroxidase in human brain: cellular distribution, and its potential role in the degradation of Lewy bodies in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol* 117, 63-73.

Quinn, L.P., Crook, B., Hows, M.E., Vidgeon-Hart, M., Chapman, H., Upton, N., Medhurst, A.D., and Virley, D.J. (2008). The PPARgamma agonist pioglitazone is effective in the

MPTP mouse model of Parkinson's disease through inhibition of monoamine oxidase B. *Br J Pharmacol* 154, 226-233.

Ramirez, A., Heimbach, A., Grundemann, J., Stiller, B., Hampshire, D., Cid, L.P., Goebel, I., Mubaidin, A.F., Wriekat, A.L., Roeper, J., Al-Din, A., Hillmer, A.M., Karsak, M., Liss, B., Woods, C.G., Behrens, M.I., and Kubisch, C. (2006). Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet* 38, 1184-1191.

Randy, L.H., and Guoying, B. (2007). Agonism of Peroxisome Proliferator Receptor-Gamma may have Therapeutic Potential for Neuroinflammation and Parkinson's Disease. *Curr Neuropharmacol* 5, 35-46.

Reynolds, A.D., Banerjee, R., Liu, J., Gendelman, H.E., and Mosley, R.L. (2007). Neuroprotective activities of CD4+CD25+ regulatory T cells in an animal model of Parkinson's disease. *J Leukoc Biol* 82, 1083-1094.

Riederer, P., Dirr, A., Goetz, M., Sofic, E., Jellinger, K., and Youdim, M.B. (1992). Distribution of iron in different brain regions and subcellular compartments in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 32 *Suppl*, S101-104.

Robottom, B.J., and Weiner, W.J. (2009). Dementia in Parkinson's disease. *Int Rev Neurobiol* 84, 229-244.

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

Sakka, N., Sawada, H., Izumi, Y., Kume, T., Katsuki, H., Kaneko, S., Shimohama, S., and Akaike, A. (2003). Dopamine is involved in selectivity of dopaminergic neuronal death by rotenone. *Neuroreport* 14, 2425-2428.

Schapira, A.H. (1993). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 60, 288-291.

Schlehe, J.S., Lutz, A.K., Pilsl, A., Lammermann, K., Grgur, K., Henn, I.H., Tatzelt, J., and Winklhofer, K.F. (2008). Aberrant folding of pathogenic Parkin mutants: aggregation versus degradation. *J Biol Chem* 283, 13771-13779.

Sellbach, A.N., Boyle, R.S., Silburn, P.A., and Mellick, G.D. (2006). Parkinson's disease and family history. *Parkinsonism Relat Disord* 12, 399-409.

Shamoto-Nagai, M., Maruyama, W., Yi, H., Akao, Y., Tribl, F., Gerlach, M., Osawa, T., Riederer, P., and Naoi, M. (2006). Neuromelanin induces oxidative stress in mitochondria through release of iron: mechanism behind the inhibition of 26S proteasome. *J Neural Transm* 113, 633-644.

Sherer, T.B., Kim, J.H., Betarbet, R., and Greenamyre, J.T. (2003). Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp Neurol* 179, 9-16.

Shimura, H., Schlossmacher, M.G., Hattori, N., Frosch, M.P., Trockenbacher, A., Schneider, R., Mizuno, Y., Kosik, K.S., and Selkoe, D.J. (2001). Ubiquitination of a new form of alpha-

synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science* 293, 263-269.

Shoham, S., and Youdim, M.B. (2000). Iron involvement in neural damage and microgliosis in models of neurodegenerative diseases. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46, 743-760.

Siderowf, A., Ravina, B., and Glick, H.A. (2002). Preference-based quality-of-life in patients with Parkinson's disease. *Neurology* 59, 103-108.

Sokolowski, A.L., Larsson, B.S., and Lindquist, N.G. (1990). Distribution of 1-(3H)-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (3H-MPTP) in the frog: uptake in neuromelanin. *Pharmacol Toxicol* 66, 252-258.

Spira, P.J., Sharpe, D.M., Halliday, G., Cavanagh, J., and Nicholson, G.A. (2001). Clinical and pathological features of a Parkinsonian syndrome in a family with an Ala53Thr alpha-synuclein mutation. *Ann Neurol* 49, 313-319.

Storch, A., Ebersbach, G., Fuchs, G., Jost, W.H., Odin, P., Reifschneider, G., and Bauer, M. (2008). [Depression in Parkinson's disease. Part 1: epidemiology, signs and symptoms, pathophysiology and diagnosis]. *Fortschr Neurol Psychiatr* 76, 715-724.

Sulzer, D., Bogulavsky, J., Larsen, K.E., Behr, G., Karatekin, E., Kleinman, M.H., Turro, N., Krantz, D., Edwards, R.H., Greene, L.A., and Zecca, L. (2000). Neuromelanin biosynthesis is driven by excess cytosolic catecholamines not accumulated by synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11869-11874.

Sun, M., Latourelle, J.C., Wooten, G.F., Lew, M.F., Klein, C., Shill, H.A., Golbe, L.I., Mark, M.H., Racette, B.A., Perlmuter, J.S., Parsian, A., Guttman, M., Nicholson, G., Xu, G., Wilk, J.B., Saint-Hilaire, M.H., DeStefano, A.L., Prakash, R., Williamson, S., Suchowersky, O., Labelle, N., Growdon, J.H., Singer, C., Watts, R.L., Goldwurm, S., Pezzoli, G., Baker, K.B., Pramstaller, P.P., Burn, D.J., Chinnery, P.F., Sherman, S., Vieregge, P., Litvan, I., Gillis, T., MacDonald, M.E., Myers, R.H., and Gusella, J.F. (2006). Influence of heterozygosity for parkin mutation on onset age in familial Parkinson disease: the GenePD study. *Arch Neurol* 63, 826-832.

Swartz, H.M., Sarna, T., and Zecca, L. (1992). Modulation by neuromelanin of the availability and reactivity of metal ions. *Ann Neurol* 32 *Suppl*, S69-75.

Tanaka, K., Suzuki, T., Chiba, T., Shimura, H., Hattori, N., and Mizuno, Y. (2001). Parkin is linked to the ubiquitin pathway. *J Mol Med* 79, 482-494.

Thrash, B., Uthayathas, S., Karuppagounder, S.S., Suppiramaniam, V., and Dhanasekaran, M. (2007). Paraquat and maneb induced neurotoxicity. *Proc West Pharmacol Soc* 50, 31-42.

Tief, K., Schmidt, A., and Beermann, F. (1998). New evidence for presence of tyrosinase in substantia nigra, forebrain and midbrain. *Brain Res Mol Brain Res* 53, 307-310.

Tsai, S.J. (2007). Glatiramer acetate could be a potential therapeutic agent for Parkinson's disease through its neuroprotective and anti-inflammatory effects. *Med Hypotheses* 69, 1219-1221.

Uversky, V.N. (2008). Alpha-synuclein misfolding and neurodegenerative diseases. *Curr Protein Pept Sci* 9, 507-540.

- Valente, E.M., Abou-Sleiman, P.M., Caputo, V., Muqit, M.M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A.R., Healy, D.G., Albanese, A., Nussbaum, R., Gonzalez-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W.P., Latchman, D.S., Harvey, R.J., Dallapiccola, B., Auburger, G., and Wood, N.W. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* *304*, 1158-1160.
- von Campenhausen, S., Bornschein, B., Wick, R., Botzel, K., Sampaio, C., Poewe, W., Oertel, W., Siebert, U., Berger, K., and Dodel, R. (2005). Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol* *15*, 473-490.
- Webber, P.J., and West, A.B. (2009). LRRK2 in Parkinson's disease: function in cells and neurodegeneration. *Febs J* *276*, 6436-6444.
- Whitton, P.S. (2007). Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol* *150*, 963-976.
- Wilms, H., Rosenstiel, P., Romero-Ramos, M., Arlt, A., Schafer, H., Seegert, D., Kahle, P.J., Odoy, S., Claasen, J.H., Holzkecht, C., Brandenburg, L.O., Deuschl, G., Schreiber, S., Kirik, D., and Lucius, R. (2009). Suppression of MAP kinases inhibits microglial activation and attenuates neuronal cell death induced by alpha-synuclein protofibrils. *Int J Immunopathol Pharmacol* *22*, 897-909.
- Wilms, H., Rosenstiel, P., Sievers, J., Deuschl, G., Zecca, L., and Lucius, R. (2003). Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease. *Faseb J* *17*, 500-502.
- Wintermeyer, P., Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Voitalla, D., Berg, D., Becker, G., Leroy, E., Polymeropoulos, M., Berger, K., Przuntek, H., Schols, L., Epplen, J.T., and Riess, O. (2000). Mutation analysis and association studies of the UCHL1 gene in German Parkinson's disease patients. *Neuroreport* *11*, 2079-2082.
- Wooten, G.F., Currie, L.J., Bovbjerg, V.E., Lee, J.K., and Patrie, J. (2004). Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *75*, 637-639.
- Xu, Y., Stokes, A.H., Freeman, W.M., Kumer, S.C., Vogt, B.A., and Vrana, K.E. (1997). Tyrosinase mRNA is expressed in human substantia nigra. *Brain Res Mol Brain Res* *45*, 159-162.
- Yamato, M., Kudo, W., Shiba, T., Yamada, K.I., Watanabe, T., and Utsumi, H. (2010). Determination of reactive oxygen species associated with the degeneration of dopaminergic neurons during dopamine metabolism. *Free Radic Res* *44*, 249-257.
- Yang, L., Sugama, S., Chirichigno, J.W., Gregorio, J., Lorenzl, S., Shin, D.H., Browne, S.E., Shimizu, Y., Joh, T.H., Beal, M.F., and Albers, D.S. (2003). Minocycline enhances MPTP toxicity to dopaminergic neurons. *J Neurosci Res* *74*, 278-285.
- Yasuhara, T., Hara, K., Sethi, K.D., Morgan, J.C., and Borlongan, C.V. (2007). Increased 8-OHdG levels in the urine, serum, and substantia nigra of hemiparkinsonian rats. *Brain Res* *1133*, 49-52.
- Youdim, M.B., Ben-Shachar, D., and Riederer, P. (1994). The enigma of neuromelanin in Parkinson's disease substantia nigra. *J Neural Transm Suppl* *43*, 113-122.

- Zecca, L., Casella, L., Albertini, A., Bellei, C., Zucca, F.A., Engelen, M., Zadlo, A., Szewczyk, G., Zareba, M., and Sarna, T. (2008). Neuromelanin can protect against iron-mediated oxidative damage in system modeling iron overload of brain aging and Parkinson's disease. *J Neurochem* *106*, 1866-1875.
- Zecca, L., Fariello, R., Riederer, P., Sulzer, D., Gatti, A., and Tampellini, D. (2002). The absolute concentration of nigral neuromelanin, assayed by a new sensitive method, increases throughout the life and is dramatically decreased in Parkinson's disease. *FEBS Lett* *510*, 216-220.
- Zecca, L., Mecacci, C., Seraglia, R., and Parati, E. (1992). The chemical characterization of melanin contained in substantia nigra of human brain. *Biochim Biophys Acta* *1138*, 6-10.
- Zecca, L., Shima, T., Stroppolo, A., Goj, C., Battiston, G.A., Gerbasi, R., Sarna, T., and Swartz, H.M. (1996). Interaction of neuromelanin and iron in substantia nigra and other areas of human brain. *Neuroscience* *73*, 407-415.
- Zecca, L., Stroppolo, A., Gatti, A., Tampellini, D., Toscani, M., Gallorini, M., Giaveri, G., Arosio, P., Santambrogio, P., Fariello, R.G., Karatekin, E., Kleinman, M.H., Turro, N., Hornykiewicz, O., and Zucca, F.A. (2004a). The role of iron and copper molecules in the neuronal vulnerability of locus coeruleus and substantia nigra during aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 9843-9848.
- Zecca, L., and Swartz, H.M. (1993). Total and paramagnetic metals in human substantia nigra and its neuromelanin. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* *5*, 203-213.
- Zecca, L., Tampellini, D., Gerlach, M., Riederer, P., Fariello, R.G., and Sulzer, D. (2001). Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour. *Mol Pathol* *54*, 414-418.
- Zecca, L., Youdim, M.B., Riederer, P., Connor, J.R., and Crichton, R.R. (2004b). Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* *5*, 863-873.
- Zecca, L., Zucca, F.A., Wilms, H., and Sulzer, D. (2003). Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics. *Trends Neurosci* *26*, 578-580.
- Zhang, J., Fitsanakis, V.A., Gu, G., Jing, D., Ao, M., Amarnath, V., and Montine, T.J. (2003). Manganese ethylene-bis-dithiocarbamate and selective dopaminergic neurodegeneration in rat: a link through mitochondrial dysfunction. *J Neurochem* *84*, 336-346.
- Zhang, J., Perry, G., Smith, M.A., Robertson, D., Olson, S.J., Graham, D.G., and Montine, T.J. (1999). Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. *Am J Pathol* *154*, 1423-1429.
- Zhang, W., Shin, E.J., Wang, T., Lee, P.H., Pang, H., Wie, M.B., Kim, W.K., Kim, S.J., Huang, W.H., Wang, Y., Zhang, W., Hong, J.S., and Kim, H.C. (2006). 3-Hydroxymorphinan, a metabolite of dextromethorphan, protects nigrostriatal pathway against MPTP-elicited damage both in vivo and in vitro. *Faseb J* *20*, 2496-2511.

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

Zhang, Z.X., and Roman, G.C. (1993). Worldwide occurrence of Parkinson's disease: an updated review. *Neuroepidemiology* 12, 195-208.

Zucca, F.A., Giaveri, G., Gallorini, M., Albertini, A., Toscani, M., Pezzoli, G., Lucius, R., Wilms, H., Sulzer, D., Ito, S., Wakamatsu, K., and Zecca, L. (2004). The neuromelanin of human substantia nigra: physiological and pathogenic aspects. *Pigment Cell Res* 17, 610-617.

## 8 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Sebastian Geick
Geburtsdatum	24.02.1978
Geburtsort	Parchim
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet, zwei Kinder

### Schulbildung

1984-1990	Grund-/Oberschule Parchim
1990-1991	Wilhelm-Tanck-Realschule in Neumünster
1991-1995	Klaus-Groth-Gymnasium in Neumünster
1995-1999	Abitur an der Holstenschule in Neumünster

### Zivildienst

1999-2000	Diakonisches Werk in Neumünster
-----------	---------------------------------

### Auslandsaufenthalte

2000-2002	medizinische Hilfsprojekte in Südamerika, Indien und Namibia
-----------	--

### Hochschulbildung

2002-2009	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität (CAU) zu Kiel
2004	Erster Teil der Ärztlichen Prüfung
2008-2009	Praktisches Jahr - Klinik für Innere Medizin, Städtisches Krankenhaus Kiel - Klinik für Chirurgie und Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel
2009	Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung und Erhalt der Approbation als Arzt

## **Klinische -/ Wissenschaftliche Tätigkeiten**

2004	Aufnahme der Doktorarbeit am Institut für Anatomie der CAU Kiel, Arbeitsgruppe Prof. Dr. rer. nat. Lucius/ Prof. Dr. med. Sievers
2006	Neunmonatige klinische und soziale Tätigkeit in einem Kinderdorf in San Rafael del Mojan, Venezuela
2007- 2009	Tätigkeit als Assistent klinischer Studien im Clinical Research Services in Kiel
seit 11/2009	Wissenschaftlicher Angestellter am Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

## **Publikationen**

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

Kiel, 18.05.2011

## 9 Danksagungen

Meine ganze Familie und besonders ich möchten Herrn **Prof. Dr. nat. Ralph Lucius** von ganzem Herzen danken. Wenn einer seinem Namen als Doktorvater wirklich gerecht wird, dann er. Er stand mir immer mit seinem Rat und seiner Hilfe in Bezug auf meine Arbeit zur Seite. Aber vor allem menschlich hat er so GROSSES und Unglaubliches für uns geleistet. Er hat immer versucht, mir und meiner kleinen Familie in jeglicher Situation zu helfen. Durch sein unermüdliches Engagement in der Kontaktaufnahme zu den Kliniken hat er es ermöglicht, dass meine venezolanische Schwiegermutter an ihrer Erkrankung erfolgreich behandelt werden konnte und ihr Lebensglück wieder gefunden hat. In ihrem Namen möchte ich nochmals eine große Danksagung an Prof. Lucius machen.

Desweiteren gilt ein ganz besonderes Dankeschön den engagierten MTA's. Hier möchte ich mich vor allem bei **Gundel Jopp, Marion Kölln** und **Rosi Sprang** bedanken, die mir nicht nur im Labor mehr als nur unter die Arme gegriffen haben. Auch in meinem Vorhaben, einem Kinderdorf in Venezuela zu helfen, haben sie mich finanziell unterstützt, wofür vor allem die Kinder sehr dankbar waren.

Ich möchte auch **Prof. Dr. med. Jobst Sievers**, der mich durch seine neuroanatomischen Vorlesungen animierte und mich mit in seine Arbeitsgruppe aufnahm, sowie **PD. Dr. med. Henrik Wilms**, als ehemaligen wissenschaftlichen Mitarbeiter der Klinik für Neurologie des UK-SH, für ihre Unterstützung in diesem Projekt danken. Herrn **Dr. med. C. Holzknecht** sei ebenfalls gedankt.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie danken, vor allem meinen **Eltern, Heike und Peter Geick**, die immer versucht haben, mir alles zu ermöglichen, was ich mir vorgenommen habe, egal wie verrückt es manchmal erschien und mich stets mit sanftem Druck in meiner Arbeit vorantrieben. Neben meinen Eltern ist es meine eigene kleine Familie mit meiner Frau **Monica Andrea** und meinen Söhnen **Jose Gregorio und Joel Alejandro**, die mir das geben, was ich mir vom Leben erwünscht habe. Mein Sohn Jose kann mich immer dazu motivieren, zwischenzeitlich auch einmal wieder in die Kinderwelt einzutauchen. Mein Sohn Joel, der erst vor kurzem das Licht dieser Welt erblickt hat, kann einen stundenlang in seinen Bann ziehen. Dieses und die Momente mit meiner Frau sind es, für die es sich für mich zu leben lohnt.