



Aus der Klinik für Neurologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wolfgang H. Oertel  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Die Effekte des  
 $\alpha 7$ -nikotinerger Acetylcholin-Agonisten PNU-282987 und  
des nikotinerger Acetylcholin-Antagonisten Mecamylamin  
auf Neuroinflammation und Neurodegeneration  
im akuten MPTP-Mausmodell des Morbus Parkinson

Inaugural-Dissertation zur  
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Vanessa Stuckenholtz**  
aus Lüdenscheid

Marburg, 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:  
5. März 2013

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

**Dekan:** Herr Prof. Dr. med. Matthias Rothmund

**Referent:** Herr Prof. Dr. med. Richard Dodel

**1. Korreferent:** Frau Prof. Dr. rer. nat. Adriana del Rey

Für meine Eltern

In Gedenken an meine Oma Marlies

## INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	1
1.1	Idiopathisches Parkinson-Syndrom .....	2
1.2	Basalganglien .....	3
1.2.1	Funktionelle Anatomie der Basalganglien .....	3
1.2.2	Dopaminstoffwechsel und Neurotransmission .....	4
1.2.3	Physiologie der Basalganglienschleife .....	6
1.3	Pathologie des Morbus Parkinson .....	8
1.3.1	Pathophysiologie der Basalganglienschleife .....	8
1.3.2	Neuropathologie .....	9
1.3.3	Ätiologie und Pathogenese .....	10
1.4	Neuroinflammation .....	11
1.4.1	Reaktive Mikrogliose.....	12
1.4.2	Astrozyten .....	15
1.4.3	Infiltration peripherer Immunzellen .....	15
1.5	Regulierung der Inflammation .....	16
1.5.1	Der cholinerge anti-inflammatorische Signalweg .....	16
1.5.2	$\alpha 7$ -nACh-Rezeptor.....	19
1.5.3	PNU-282987.....	20
1.5.4	Mecamylamin .....	21
1.6	MPTP-Mausmodell.....	21
1.6.1	MPTP-Metabolismus und MPTP-vermittelte Toxizität .....	21
1.6.2	Verschiedene Administrationsmodelle .....	22
1.7	Zielsetzung dieser Arbeit.....	24
2	Material und Methoden .....	25
2.1	Versuchsaufbau .....	25
2.2	Tiere, Tierhaltung und Einteilung in Behandlungsgruppen .....	25
2.3	Intoxikation nach dem akuten MPTP-Mausmodell.....	26
2.4	Applikation der zu testenden Substanzen .....	27
2.5	Rotarod-Test .....	27

2.6	Präparation .....	28
2.7	ELISA.....	29
2.7.1	Gewebehomogenisierung.....	30
2.7.2	Durchführung der ELISAs .....	30
2.8	Immunhistochemische Verfahren .....	33
2.8.1	Kryokonservierung.....	33
2.8.2	Herstellung von Gewebeschnitten .....	33
2.8.3	Immunhistochemischer Nachweis von Iba-1-positiven Mikroglia.....	34
2.8.4	Immunhistochemischer Nachweis der TH-positiven Neurone .....	36
2.9	HPLC .....	38
2.10	Material .....	40
2.10.1	Applizierte Substanzen .....	40
2.10.2	Chemikalien.....	40
2.10.3	Puffer.....	41
2.10.4	Antikörper und Kits .....	42
2.10.5	Referenzsubstanzen für HPLC-Eichlösungen.....	42
2.10.6	Verbrauchsmaterialien.....	43
2.10.7	Geräte .....	43
2.10.8	Software .....	44
2.11	Statistische Auswertung .....	45
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Tierverhalten .....	46
3.1.1	Allgemeines Tierverhalten .....	46
3.1.2	Rotarod.....	46
3.2	Neuroinflammation .....	47
3.2.1	Zytokin-Konzentrationen.....	47
3.2.2	Mikroglia-Aktivierung .....	52
3.3	Dopaminerge Neurodegeneration .....	56
3.3.1	Anzahl TH-positiver dopaminerger Neurone der SNpc .....	56
3.3.2	Dopamin und seine Metaboliten.....	60

## INHALTSVERZEICHNIS

---

4	Diskussion .....	67
4.1	Auswahl des Tiermodells .....	67
4.2	Tierverhalten .....	69
4.3	Neuroinflammation .....	70
4.4	Dopaminerge Neurodegeneration .....	76
4.5	Fazit .....	81
5	Zusammenfassung .....	83
6	Summary .....	85
7	Literaturverzeichnis.....	87
8	Anhang.....	99
8.1	Abkürzungsverzeichnis .....	99
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	102
8.3	Tabellenverzeichnis .....	103
8.4	Publikationen .....	104
8.5	Verzeichnis der akademischen Lehrer .....	105
8.6	Danksagung.....	106

## 1 EINLEITUNG

In seiner Monografie „*An Essay on the Shaking Palsy*“ aus dem Jahre 1817 beschrieb James Parkinson (1755-1824) erstmals die später nach ihm benannte Erkrankung. Anhand der Beobachtungen und Untersuchungen von nur sechs Patienten verfasste er eine ausführliche Beschreibung der Symptome der Parkinson-Erkrankung und brachte diese erstmals in einen klinischen Zusammenhang:

*„Involuntary tremulous motion, with lessened muscular power, in parts not in action and even when supported; with a propensity to bend the trunk forwards, and to pass from a walking to a running pace: the senses and intellects being uninjured.“* (111)

Der französische Neurologe Charcot fügte dieser Beschreibung weitere Symptome, u.a. den Rigor, hinzu und bezeichnete die Erkrankung als „*Maladie de Parkinson*“ (29, 51). Er erprobte erstmals eine medikamentöse Therapie und stellte 1880 fest, dass die Gabe von Hyoscyamin, einem Belladonna-Alkaloid, den Tremor mindern, aber die Ursache der Krankheit nicht heilen konnte (48). Bis zur Einführung der synthetischen Anticholinergika im Jahre 1946 blieb Belladonna die einzige medikamentöse Therapie der Erkrankung.

Erste Erkenntnisse über die Neuropathologie der Parkinson-Erkrankung lieferten Fritz Lewy, der 1912 die nach ihm benannten Lewy-Körperchen entdeckte (89, 124), sowie der Neuropathologe Trétiakoff, der 1919 herausfand, dass die Parkinson-Erkrankung mit der Depigmentation der Substantia nigra (SN) assoziiert ist (87, 145). Der biochemische Hintergrund wurde erst in den 1950er Jahren aufgedeckt, als Carlsson zeigte, dass es sich bei Dopamin um einen Neurotransmitter handelt und nicht nur um eine Vorstufe des Noradrenalins (25), und Ehringer und Hornykiewicz einen striatalen Dopaminmangel bei Parkinson-Patienten beschrieben (42). Die Kenntnis des Zusammenhangs eines neuropathologischen Korrelats, eines neurochemischen Defizits und des Auftretens der motorischen Symptomatik stellte die Basis für die Entdeckung der L-3,4-Dihydroxyphenylalanin- (L-DOPA-) Therapie dar. Sie galt als die erste rational entwickelte, wirksame Therapie einer neurologischen Erkrankung. Klinische Versuche mit L-DOPA, einer Vorstufe des fehlenden Dopamins, wurden erstmals von Birkmayer und Hornykiewicz in Wien (14), Barbeau in Montreal (6) und Cotzias in New York (32) durchgeführt. Heutzutage gilt L-DOPA in Kombination mit weiteren Medikamenten als Mittel der Wahl zur Behandlung der Parkinson-Erkrankung. Dennoch gibt es derzeit keine kausale Therapie, die das Fortschreiten der Krankheit verhindern könnte, denn trotz intensiver Forschung ist die Ätiologie der Erkrankung weitestgehend unbekannt. Ein Forschungsansatz zur Pathogenese behandelt die Neuroinflammation und die Frage, ob eine Beeinflussung auf dieser Ebene einen neuen Therapieansatz darstellen könnte.

## 1.1 IDIOPATHISCHES PARKINSON-SYNDROM

Das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS, Morbus Parkinson) ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach der Alzheimer-Erkrankung. Seine Prävalenz in Deutschland beträgt 100-200/100.000 Einwohner und steigt bei den über 65-Jährigen sogar auf 1.800/100.000 an (41). Da das IPS eine Erkrankung des älteren Menschen darstellt – das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 50 und 60 Jahren – und aufgrund der demografischen Alterung, ist mit einem Anstieg der Erkrankungshäufigkeit zu rechnen.

Das sporadisch auftretende IPS macht etwa 75% aller Parkinson-Syndrome aus (41). Daneben gibt es familiäre Formen des Parkinson-Syndroms, die eine genetische Ursache aufweisen, sowie sekundäre, symptomatische Parkinson-Syndrome. Parkinson-Syndrome, die im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen auftreten, werden als atypische Parkinson-Syndrome bezeichnet (s. Tabelle 1.1).

Das IPS ist definiert als hypokinetisch-rigides extrapyramidal-motorisches Syndrom, das pathogenetisch durch eine progrediente Depigmentation und Degeneration der nigrostriatalen dopaminergen Neurone sowie durch das Auftreten eosinophiler  $\alpha$ -Synuclein-Inklusionen in überlebenden Neuronen gekennzeichnet ist (156).

Zu den Kardinalsymptomen des IPS zählen Akinese, Tremor, Rigor und posturale Instabilität. Die einzelnen Symptome können unterschiedlich stark ausgeprägt und miteinander kombiniert sein. Für die klinische Diagnosestellung ist das Vorliegen der Akinese in Kombination mit mindestens einem weiteren Kardinalsymptom obligatorisch (41). Daneben weisen die meisten Parkinson-Patienten vegetative Symptome wie Seborrhoe und Sialorrhoe sowie sensorische Störungen auf. Zusätzliche psychische Symptome wie Demenz und Depression treten mit einer Häufigkeit von etwa 40% (44) bzw. 50% (94) auf. Die ebenso mit dem IPS in Verbindung stehenden motorischen Komplikationen wie motorische Fluktuationen und Dyskinesien gelten als Spätsymptome und Komplikationen einer langjährigen L-DOPA-Therapie. Nach einer Behandlungsdauer von 4 bis 6 Jahren beträgt das Risiko für das Auftreten dieser L-DOPA-Nebenwirkungen jeweils etwa 40% (1).

Bis heute gibt es keine kausale Therapie des IPS. Die symptomatische Therapie beinhaltet die Substitution von Dopamin mit L-DOPA in Kombination mit einem Decarboxylase-Inhibitor sowie die Gabe von Dopamin-Agonisten (41). Mit Medikamenten, die die Monoaminoxidase B (MAO-B) oder die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) hemmen, kann der Dopaminabbau zusätzlich verhindert werden und so die Konzentration von L-DOPA am synaptischen Spalt erhöht werden. Der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Antagonist Amantadin soll das glutamaterge-dopaminerge Ungleichgewicht ausgleichen und L-DOPA-assoziierte Dyskinesien reduzieren. Schließlich wird

für ausgewählte Fälle die Tiefen-Hirn-Stimulation als operatives Verfahren eingesetzt (125, 152).

**Tabelle 1.1 Klassifikation der Parkinson-Syndrome**

---

**Idiopathisches Parkinson-Syndrom (IPS)**

- Akinetisch rigider Typ
- Äquivalenz-Typ
- Tremordominanz-Typ
- Monosymptomatischer Ruhetremor (seltene Variante)
- Demenz vom Lewy-Körper-Typ (DLK)

**Familiäre Formen des Parkinson-Syndroms**

**Symptomatische (sekundäre) Parkinson-Syndrome und häufigere Differentialdiagnosen**

- Vaskulär (subkortikale vaskuläre Enzephalopathie)
- Normaldruckhydrozephalus
- Medikamenteninduziert (Klassische Neuroleptika, Antiemetika, Reserpin, Lithium, Calciumantagonisten wie Cinnarizin und Flunarizin, Valproat)
- Tumorbedingt
- Posttraumatisch
- Toxininduziert (z. B. Kohlenmonoxid, Mangan)
- Entzündlich (AIDS-Enzephalopathie oder seltene Enzephalitiden)
- Metabolisch (z. B. Morbus Wilson, Hypoparathyreoidismus)
- Depression
- Essentieller Tremor

**Atypische Parkinson-Syndrome**

- Multisystematrophie (MSA)
  - Progressive supranukleäre Blickparese (PSP)
  - Kortikobasale Degeneration (CBD)
  - Spinozerebelläre Atrophien (einige Subtypen)
  - Demenz vom Lewy-Körper-Typ (DLK)
- 

Tabelle nach Eggert *et al.* (41).

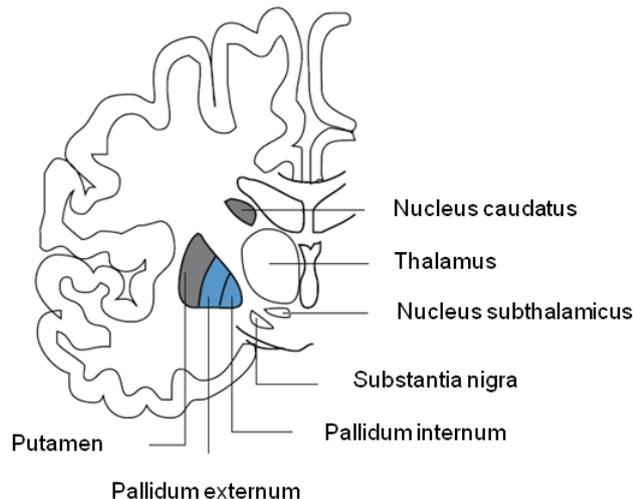
## **1.2 BASALGANGLIEN**

### **1.2.1 FUNKTIONELLE ANATOMIE DER BASALGANGLIEN**

Der Morbus Parkinson geht mit einer Funktionsstörung der Basalganglien einher (156). Die Basalganglien sind subkortikal gelegene Kerngebiete, die als funktionelle Einheit in die Verarbeitung komplexer motorischer Informationen eingebunden sind. In den Basalganglien werden Störimpulse herausgefiltert, indem Bewegungsimpulse gebahnt oder unterdrückt werden. Auf diese Weise kann u.a. der Bewegungsablauf modifiziert werden.

Die Basalganglien setzen sich zusammen aus dem Nucleus caudatus und dem Putamen, die gemeinsam als Striatum bezeichnet werden, sowie aus dem Globus pallidus (GP), welcher sich in das Pallidum internum (GPi) und das Pallidum externum (GPe) aufgliedert. Im weiteren Sinne werden auch der Nucleus subthalamicus (STN) und die SN zu den Basalganglien gezählt (s. Abbildung 1.1).

Die SN ist ein Kerngebiet im Mesencephalon. Ihre Bezeichnung als „schwarze Substanz“ ist zurückzuführen auf den hohen Gehalt an Neuromelanin in den Perikaryen der dopaminergen Neurone und die daraus resultierende schwarze Färbung dieser Hirnregion. Die SN lässt sich in die Pars compacta (SNpc) und die Pars reticularis (SNpr) unterteilen. Die SNpc besteht zu 80% aus dopaminergen Neuronen, die ins Striatum ziehen. Die SNpr stellt gemeinsam mit dem GPi die Ausgangsstation der Basalganglien dar. Sie enthält inhibitorische Neurone, deren Neurotransmitter  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) ist.



**Abb. 1.1 Anatomie der Basalganglien im Koronarschnitt**

Putamen und Nucleus caudatus bilden gemeinsam das Striatum. Der Globus pallidus gliedert sich in das Pallidum internum und Pallidum externum auf. Im weiteren Sinne werden auch die Substantia nigra und der Nucleus subthalamicus zu den Basalganglien gezählt. Dargestellt ist außerdem der Thalamus. Abbildung modifiziert nach Poeck und Hacke (115).

**1.2.2 DOPAMINSTOFFWECHSEL UND NEUROTRANSMISSION**

Dopamin spielt als Neurotransmitter der SNpc-Neurone eine wichtige Rolle für die Physiologie der Basalganglien und das nigrostriatale System. Dopamin gehört zur Gruppe der Katecholamine und wird aus der aromatischen Aminosäure L-Tyrosin synthetisiert. L-Tyrosin wird vom Körper aus der essentiellen Aminosäure Phenylalanin synthetisiert und  $\text{Na}^+$ -abhängig aktiv ins Zytoplasma aufgenommen, wo es mittels der Tyrosin-Hydroxylase (TH) zunächst zu L-DOPA hydriert und anschließend mit Hilfe der DOPA-Decarboxylase zu Dopamin decarboxyliert wird. Die TH ist das geschwindig-

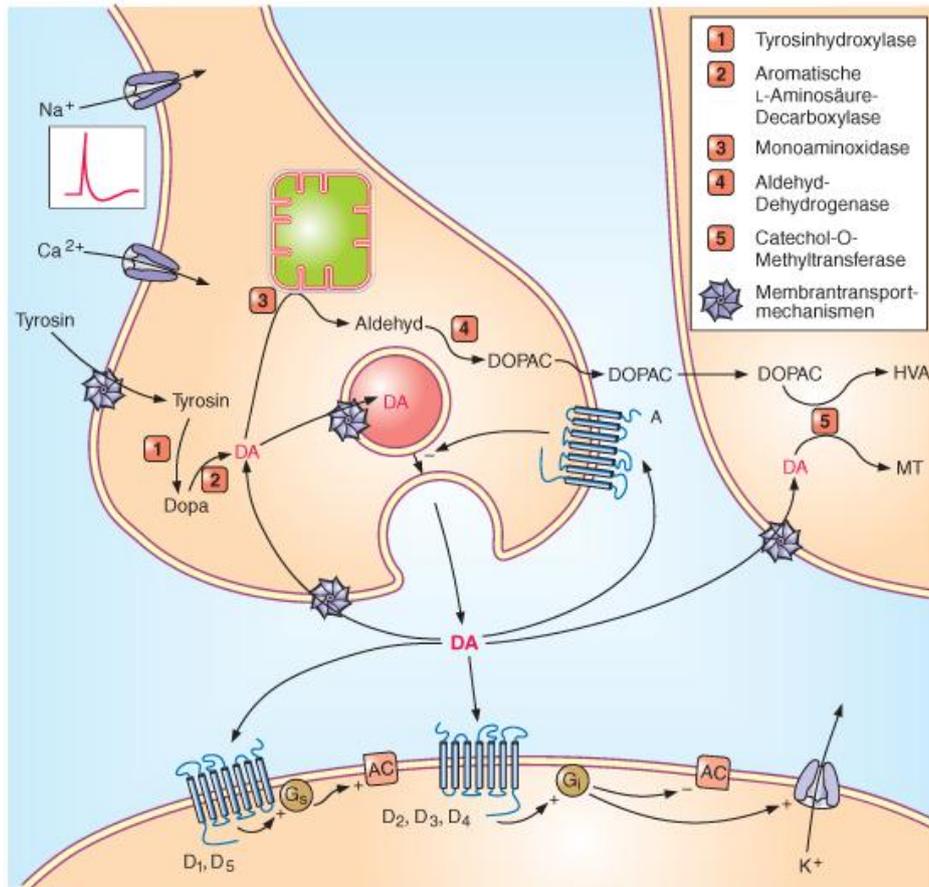
keitsbestimmende Enzym der Reaktion. Außer im Nebennierenmark kommt sie sonst nur in Katecholamin-Neuronen vor. Im Gehirn ist sie das spezifische Enzym der dopaminergen Neurone.

Nach der Biosynthese wird Dopamin über den vesikulären Monoamintransporter 2 (VMAT2) im Austausch gegen Protonen in Vesikel der terminalen Nervenendigungen aufgenommen und gespeichert. Infolge eines Aktionspotentials und der Öffnung spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle wird Dopamin in den synaptischen Spalt gegeben (Exozytose) und diffundiert zur postsynaptischen Membran, wo es an spezifische Dopamin-Rezeptoren bindet (s. Abbildung 1.2).

Dopamin-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Es gibt fünf molekularbiologisch unterschiedliche Subtypen, die man anhand ihrer Funktion in zwei Familien gliedern kann. Zur D1-Familie der Dopamin-Rezeptoren gehören die Subtypen  $\text{D}_1$  und  $\text{D}_5$ . Es handelt sich um  $\text{G}_s$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren, bei denen die Bindung von Dopamin zur Aktivierung der Adenylatcyclase und Bildung von cyclischem Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) führt. Die D2-Familie fasst die Subtypen  $\text{D}_2$ ,  $\text{D}_3$  und  $\text{D}_4$  zusammen. Über die  $\text{G}_i$ -Protein-vermittelte Hemmung der Adenylatcyclase inhibieren sie die cAMP-Bildung. Rezeptoren der D2-Familie sind u.a. an der Vermittlung motorischer Effekte beteiligt. Über Rezeptoren der D1-Familie wird diese Wirkung synergistisch beeinflusst.

$\text{D}_1$ -Rezeptoren kommen im Gehirn in hoher Dichte in den Basalganglien sowie im Nucleus accumbens, im Tuberculum olfactorium sowie in geringer Dichte auch im frontalen Kortex vor.  $\text{D}_5$ -Rezeptoren kommen im Hippocampus und Hypothalamus vor. Die Verteilung der  $\text{D}_2$ -Rezeptoren ähnelt der Verteilung der  $\text{D}_1$ -Rezeptoren, mit der höchsten Dichte im Striatum. Das Vorkommen von  $\text{D}_3$ - und  $\text{D}_4$ -Rezeptoren ist seltener und beschränkt sich auf limbische Regionen.

Um eine dauerhafte Stimulation der Dopamin-Rezeptoren zu verhindern, muss Dopamin inaktiviert werden. Dies geschieht entweder durch enzymatischen Abbau oder durch Wiederaufnahme in präsynaptische dopaminerge Neurone oder in Gliazellen. Die Wiederaufnahme in dopaminerge Neurone geschieht  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -abhängig über den transmembranösen Dopamin-Transporter (DAT). Dopamin wird anschließend entweder in Vesikeln gespeichert oder metabolisiert. Nach Aufnahme in Gliazellen wird Dopamin ausschließlich metabolisiert. Die Metabolisierung von Dopamin geschieht entweder über die COMT oder über die Monoaminoxidase (MAO). Die MAO liegt in zwei Isoformen A und B vor. Während in den Nervenzellendigungen katecholaminerger Neurone lediglich die MAO-A vorkommt, enthalten Gliazellen beide Isotypen. Über Zwischenstufen entstehen durch den enzymatischen Abbau von Dopamin 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure (DOPAC) und Homovanillinsäure (HVA).



**Abb. 1.2 Stoffwechsel und synaptische Übertragung von Dopamin**

Dargestellt sind die Biosynthese des Dopamins (DA) aus Tyrosin, die vesikuläre Speicherung, die Exozytose, die Bindung an postsynaptische Rezeptoren sowie die Wiederaufnahme und der enzymatische Abbau zu 3,4-Dihydroxyphenylethylsäure (DOPAC), Homovanillinsäure (HVA) und 3-Methoxytyramin (MT). Abbildung aus Aktories *et al.* (2).

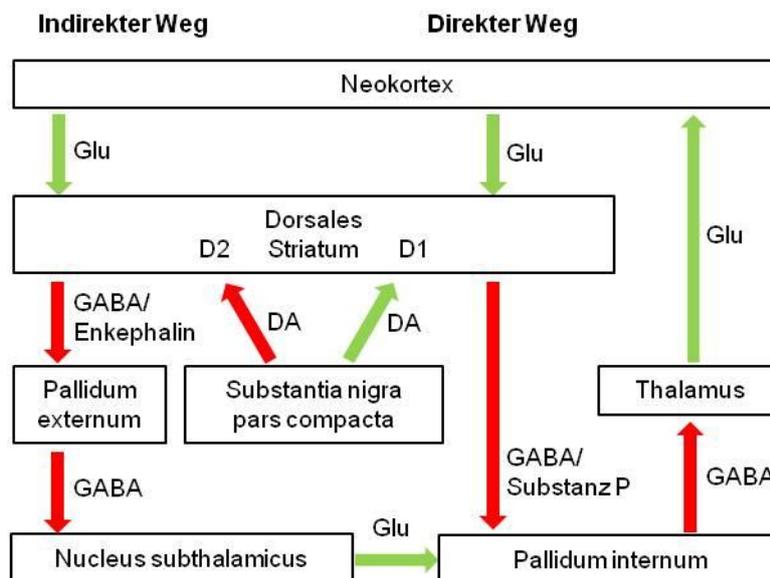
### 1.2.3 PHYSIOLOGIE DER BASALGANGLIENSCHLEIFE

Die Verschaltung der Basalganglien (s. Abbildung 1.3) beeinflusst modulierend die Motorik und wird auch als kortiko-striato-thalamo-kortikaler Regelkreis bezeichnet (21). Das Striatum gilt als Eingangsstation der Basalganglien. Man unterscheidet zwei Wege, über welche die Erregbarkeit der thalamokortikalen Neurone gesteuert werden kann. Über den direkten Weg kommt es durch Hintereinanderschaltung zweier inhibitorischer Neurone (GABA/Substanz P-Neurone des Striatums und GABAerge Neurone des GPi) zu einer Enthemmung des Thalamus. Der indirekte Weg führt über das GPe und den STN. Durch Hintereinanderschaltung insgesamt dreier hemmender Neurone (GABA/Enkephalin-Neurone des Striatums, GABAerge Neurone des GPe und des GPi) kommt es zu einer ausgeprägten Hemmung des Thalamus. Sollen Impulse des Kortex die Basalganglienschleife passieren, muss der Einfluss der Zentren des direkten Weges überwiegen. Bei Ruhe der Körpermuskulatur hingegen überwiegt der Einfluss der Zentren des indirekten Weges.

Die dopaminergen Neurone der SNpc kontrollieren das Striatum und üben einen erheblichen Einfluss auf das rasche Wechselspiel dieser beiden Wege aus. Über D1-Rezeptoren wirkt Dopamin erregend auf die GABA/Substanz P-Neurone des Striatums und aktiviert den direkten Weg. Über D2-Rezeptoren hemmt es dagegen die GABA/Enkephalin-Neurone und den indirekten Weg. Die SNpc hat demnach einen fördernden Einfluss auf motorische Impulse und spielt eine große Rolle bei der Initiation von Bewegungen. Dieser Teil der Basalganglienschleife wird auch als nigro-striatales System bezeichnet und stellt eines von drei dopaminergen Neuronensystemen dar. Es ist beim IPS am stärksten betroffen.

Daneben gibt es das tubero-infunduläre sowie das mesolimbische und mesokortikale System. Letzteres umfasst die Projektionen der dopaminergen Neurone des ventralen tegmentalaren Areals (VTA), einer im Mesencephalon medial der SN gelegenen Kerngruppe, in mesolimbische und mesokortikale Hirnregionen. Die dopaminergen Neurone des VTA sind beim IPS, obwohl sie in enger Nachbarschaft zur SN liegen, weniger stark vom dopaminergen Zelluntergang betroffen (63).

Die SN übt außerdem indirekt über Efferenzen zum Thalamus Einfluss auf die pyramidale Motorik und über Efferenzen zur Formatio reticularis auf die extrapyramidale Motorik sowie den generellen Muskeltonus aus. Über Projektionen ins limbische System kann die SN zudem psychische Vorgänge beeinflussen.



**Abb. 1.3 Physiologie der Basalganglienschleife**

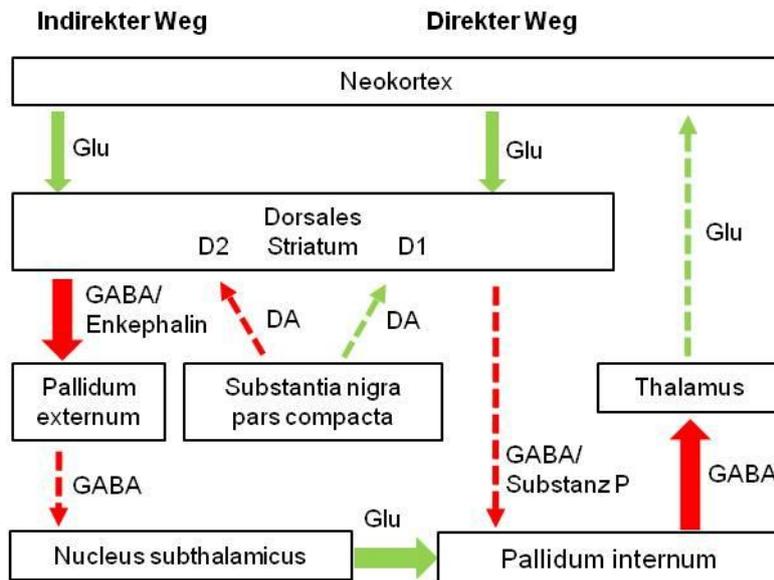
Dargestellt sind der direkte und indirekte Weg der Basalganglienschleife. Mit ihren dopaminergen Neuronen greift die Substantia nigra pars compacta modulierend in den Regelkreis ein. Über D1-Rezeptoren aktiviert sie die GABA/Substanz P-Neurone, über D2-Rezeptoren hemmt sie die GABA/Enkephalin-Neurone. DA: Dopamin; Glu: Glutamat; GABA:  $\gamma$ -Aminobuttersäure; D1: D1-Rezeptoren; D2: D2-Rezeptoren; Grüne Pfeile: Aktivierung; Rote Pfeile: Hemmung.

Abbildung modifiziert nach Braak und Del Tredici (21).

### 1.3 PATHOLOGIE DES MORBUS PARKINSON

#### 1.3.1 PATHOPHYSIOLOGIE DER BASALGANGLIENSCHLEIFE

Durch die Degeneration dopaminergener Neurone der SNpc beim IPS kommt es zu einem Dopaminmangel im Striatum, der im Putamen stärker ausgeprägt ist als im Nucleus caudatus und der mit dem morphologisch nachgewiesenen Zellverlust in der SNpc korreliert (48). In der Folge kommt es zu einem Übergewicht des indirekten Weges der Basalganglienschleife. Durch den Wegfall nigrostriataler Projektionen wird der direkte Weg weniger aktiviert und der indirekte Weg weniger gehemmt. Insgesamt kommt es so zu einer verstärkten Hemmung des Thalamus und zu einer Blockade motorischer Strukturen des Kortex. Klinisch äußert sich dies in der für das IPS typischen Akinese. Der Rigor ist wahrscheinlich Folge der fehlenden Hemmung retikulospinaler Efferenzneurone durch dopaminerge Neurone in der Formatio reticularis. Durch den Wegfall der Hemmung sogenannter „Rhythmusgeneratoren“ in der Formatio reticularis, die pulsatil und spontan aktivierende Signale über den Thalamus zum motorischen Kortex senden, kommt es zum Tremor. Die Pathophysiologie der Basalganglienschleife beim Morbus Parkinson wird in Abbildung 1.4 vereinfacht dargestellt.



**Abb. 1.4 Pathophysiologie der Basalganglienschleife beim Morbus Parkinson**

Aufgrund der Degeneration dopaminergener Neurone der Substantia nigra pars compacta beim Morbus Parkinson kommt es zu einem Übergewicht des indirekten Weges und zu einer vertieften Hemmung des Thalamus. Klinisch äußert sich dies in der für das Parkinson-Syndrom typischen Akinese. DA: Dopamin; Glu: Glutamat, GABA:  $\gamma$ -Aminobuttersäure; D1: D1-Rezeptoren; D2: D2-Rezeptoren; Grüne Pfeile: Aktivierung; Rote Pfeile: Hemmung.

Abbildung modifiziert nach Braak und Del Tredici (21).

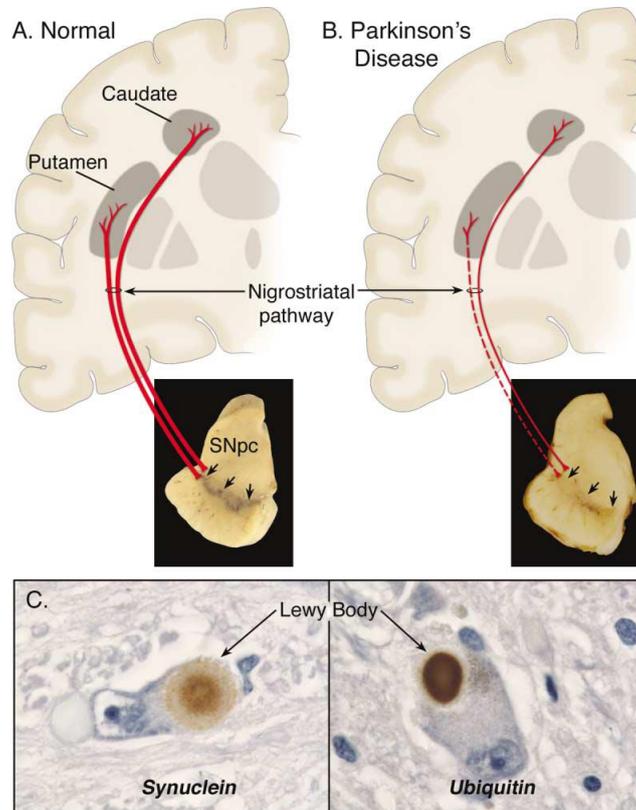
### 1.3.2 NEUROPATHOLOGIE

Das IPS ist neuropathologisch gekennzeichnet durch eine Depigmentation des Mittelhirns, das Auftreten von Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten sowie eine starke Gliareaktion in der SN. Die Depigmentation des Mittelhirns ist Folge des progredienten Verlustes neuromelaninhaltiger dopaminergener Neurone insbesondere im ventrolateralen Teil der SNpc (45). Bemerkenswert ist, dass vor allem die neuromelaninhaltigen dopaminergen Neurone in der SN zugrunde gehen, während nicht pigmentierte dopaminerge Neurone weniger stark und weniger häufig betroffen sind (63). Folge der Degeneration dopaminergener Neurone in der SNpc ist der Untergang der nigrostriatalen Projektionen (s. Abbildung 1.5) und ein Dopamin-Defizit im Striatum. Da besonders die ventrolateralen Kerngruppen der SNpc degenerieren, sind die Bahnen zum Putamen stärker betroffen als zum Nucleus caudatus (11). Sind etwa 60% der dopaminergen Neurone in der SNpc untergegangen und hat sich die Dopamin-Konzentration im Striatum um etwa 80% reduziert, kommt es zum Auftreten von Krankheitssymptomen (36). Ebenfalls von der Degeneration dopaminergener Neurone betroffen, jedoch in geringerem Ausmaß als die SN, sind der Locus coeruleus und der dorsale Vagus Kern.

Charakteristisch für das IPS ist auch das Vorkommen von intrazytoplasmatischen eosinophilen Einschlusskörperchen, den Lewy-Körperchen, in noch intakten dopaminergen Neuronen (36, 156). Immunhistochemisch lassen sich  $\alpha$ -Synuclein und Ubiquitin nachweisen (137).  $\alpha$ -Synuclein kommt ubiquitär in präsynaptischen Nervenendigungen vor. Seine Funktion ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Es gibt Anzeichen dafür, dass es an der Regulation der synaptischen Neurotransmission beteiligt ist (105). In Lewy-Körperchen liegt es in Form intermediärer Filamente vor. Lewy-Körperchen kommen in der SN und dem Locus coeruleus verstorbener Parkinson-Patienten in einer charakteristischen Halo-Form vor. Der blasse Halo umgibt einen dichten runden Kern (36). Darüber hinaus kommen ähnliche Inklusionen auch in anderen Hirnregionen wie dem limbischen System, der Formatio reticularis und den Vagus-Kerngebieten vor. Ob das Auftreten der Lewy-Körperchen für die Neurone schädlich oder sogar protektiv ist, wird derzeit kontrovers diskutiert. Es gibt Hinweise dafür, dass ihre Bildung ein Versuch der Nervenzelle ist, sich vor toxischen Aggregaten zu schützen (85, 120).

Ein weiteres neuropathologisches Merkmal des IPS ist die Neuroinflammation bzw. das Vorkommen aktivierter Mikroglia und reaktiver Astrozyten in der SN (56, 86, 97). Diese ausgeprägte Gliareaktion wird generell als eine unspezifische Antwort auf die neuronale Degeneration angesehen (56). Die Neuroinflammation ist nicht spezifisch für das IPS, sondern findet sich auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie

dem Morbus Alzheimer und bei neuroinflammatorischen Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose (64, 96). Eine ausführliche Darstellung der Neuroinflammation beim IPS erfolgt in Kapitel 1.4.



**Abb. 1.5 Neuropathologie des Parkinson-Syndroms**

Schematische Darstellung der nigrostriatalen Projektionen (rot) im gesunden Hirn (A) und beim Morbus Parkinson (B). Dopaminerge Neurone der Substantia nigra pars compacta (SNpc; Pfeile) projizieren ins Striatum (Putamen und Nucleus caudatus). Beim Morbus Parkinson kommt es zum Zelluntergang in der SNpc und zur Degeneration des nigrostriatalen Signalwegs. Die Fasern, die zum Putamen ziehen, sind stärker von der Degeneration betroffen (gestrichelte Linie). (C) Immunhistochemische Darstellung von Lewy-Körperchen in einem SNpc-Neuron mit einem  $\alpha$ -Synuclein-Antikörper (links) und einem Ubiquitin-Antikörper (rechts).

Abbildung aus Dauer und Przedborski (36).

### 1.3.3 ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE

Trotz intensiver Forschung ist die Ätiologie des IPS weitgehend unbekannt. Epidemiologischen Untersuchungen zufolge gibt es eine Reihe von Risikofaktoren, die das Auftreten des IPS begünstigen. So haben Männer (154), Nichtraucher und Nicht-Kaffeetrinker (61) sowie Menschen, die auf dem Land leben (116), ein höheres Risiko zu erkranken. Den wohl höchsten Risikofaktor stellt allerdings das Alter dar (62, 128).

Die Identifikation diverser Gene als Ursache für die hereditären Formen des Parkinson-Syndroms hat die Aufmerksamkeit der Wissenschaftler auf verschiedene Proteine und Signalwege gelenkt, die sowohl zu dopaminergem Neurodegeneration

führen als auch die Symptome des Parkinson-Syndroms auslösen können. Die phänotypischen Ähnlichkeiten zwischen diesen familiären Formen und dem IPS führen zu der Annahme, dass ihnen ein gemeinsamer molekularer Mechanismus zugrunde liegen könnte. Auch Studien über Wirkmechanismen dopaminergischer Neurotoxine wie etwa 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) geben Hinweise auf mögliche zelluläre und molekulare Mechanismen der Neurodegeneration. Mögliche an der Pathogenese beteiligte Faktoren stellen u.a. Proteinaggregation, mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress dar. Zunehmend gibt es Evidenz dafür, dass auch die durch aktivierte Mikroglia ausgelöste Neuroinflammation in der SNpc nicht nur Folge der dopaminergen Degeneration ist, sondern diese selbst auslöst bzw. unterhält (56).

#### **1.4 NEUROINFLAMMATION**

Das Zentralnervensystem (ZNS) gilt als immunprivilegiertes Organ und wird als solches vor dem ungehinderten Zugriff des Immunsystems bewahrt. Verschiedene Mechanismen wie die Blut-Hirn-Schranke dienen dazu, Immunreaktionen zu kontrollieren und ggf. zu unterdrücken, denn diese können für Neurone im ZNS schädlich sein.

Inflammation ist die erste Antwort des Immunsystems auf einen potentiell schädigenden exogenen oder endogenen Reiz. Im akuten Zustand schützt sie so das Gewebe vor eindringenden Pathogenen und unterstützt die Heilung. Eine chronische Inflammation kann jedoch das Gewebe selbst schädigen. Aufgrund der begrenzten Regenerationsfähigkeit der Neurone ist solch eine chronische Entzündung des ZNS, die chronische Neuroinflammation, besonders nachteilig.

Charakteristisch für die Neuroinflammation sind das Vorkommen aktivierter Mikrogliazellen und reaktiver Astrozyten im Parenchym des ZNS sowie eine erhöhte Produktion von Zytokinen und Chemokinen, Prostaglandinen und Komplement-Kaskade-Proteinen sowie reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen (ROS und RNS), welche zu einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke führen und so das Einwandern von peripheren Immunzellen begünstigen (86). Erste Hinweise zur Neuroinflammation beim IPS lieferten McGeer *et al.* 1988. Anhand von *Post-mortem*-Untersuchungen wiesen sie eine erhöhte Anzahl aktivierter Mikroglia in der SN von Parkinson-Patienten nach (95). Wie oben bereits erwähnt, geht man heutzutage davon aus, dass die Neuroinflammation nicht nur die Folge der Neurodegeneration ist, sondern zur Pathogenese des IPS selbst beiträgt (28, 56, 123).

### 1.4.1 REAKTIVE MIKROGLIOSE

Mikroglia sind mesodermalen Ursprungs und stellen ca. 10 % aller Gliazellen dar (97). Sie gelten als Makrophagen und die einzigen immunkompetenten ortsansässigen Zellen des ZNS. Entsprechend sind sie die ersten Zellen, die auf pathologische Ereignisse reagieren und die Immunantwort des Gehirns einleiten (107). In gesundem Gewebe weisen Mikroglia kleine Zellkörper und eine verzweigte Morphologie auf. In diesem ruhenden Stadium dienen sie der Überwachung, Verteidigung und Aufrechterhaltung der Homöostase im ZNS, indem sie geringe Mengen an Wachstumsfaktoren freisetzen und das Überleben der Neurone fördern (107). Bei der Aktivierung von Mikroglia kommt es zu einer stufenweisen morphologischen Veränderung der Zelle von einer ruhenden, ramifizierten zu einer hypertrophen Form mit Abnahme der distalen Ramifizierung und Zunahme proximaler Verästelungen (78).

Die Mikroglia-Aktivierung ist initial eine vorübergehende physiologische Reaktion auf einen immunologischen Stimulus, z. B. das Lipopolysaccharid (LPS) der äußeren Membran gram-negativer Bakterien, oder auf eine Gewebsschädigung wie den Untergang dopaminergener Neurone in der SNpc. Wenn dopaminerge Neurone untergehen, setzen sie verschiedene Substanzen frei, welche die Mikroglia direkt durch Bindung an Oberflächenmoleküle aktivieren können. Zu diesen Substanzen zählt  $\alpha$ -Synuclein (157), das möglicherweise als falsch aggregiertes Protein selbst den neuronalen Zelltod auslöst und die Hauptkomponente der Lewy-Körperchen darstellt (138). Weitere Substanzen, die bei der Degeneration dopaminergener Neurone freigesetzt werden und die zu einer Mikroglia-Aktivierung führen können, sind Neuromelanin (16, 153), das v.a. in dopaminergen Neuronen der SN vorkommt, sowie Laminin, ein Molekül der extrazellulären Matrix, und die Matrixmetalloprotease-3 (MMP3), die für den Abbau von Molekülen der extrazellulären Matrix zuständig ist (16). Auch Adenosintriphosphat (ATP), das von geschädigten Neuronen freigesetzt wird, kann Mikroglia durch Bindung an purinerge Rezeptoren auf der Zelloberfläche aktivieren (22, 37). Möglicherweise kommt es auch durch den Wegfall eines inhibitorischen Effekts, den gesunde Neurone auf ruhende Mikroglia ausüben, zu deren Aktivierung. Neurone exprimieren auf ihrer Zelloberfläche den *Cluster of differentiation* (CD) 200, ein transmembranöses Glykoprotein, das an den CD200-Rezeptor auf Mikroglia bindet und diesen hilft, ihren Ruhezustand beizubehalten (7, 65).

Bei ihrer Aktivierung verändern Mikroglia nicht nur ihre morphologische Erscheinung. Sie proliferieren, migrieren und phagozytieren geschädigte Zellen, beseitigen so potentiell schädigendes Material und schützen benachbarte Zellen (107). Gleichzeitig fungieren Mikroglia auch als Antigen-präsentierende Zellen. Sie präsentieren einwandernden T-Lymphozyten phagozytisiertes pathogenes Material und leiten so die adaptive

Immunantwort ein. Außerdem exprimieren aktivierte Mikroglia vermehrt Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche. Hierzu zählen u.a. Zelladhäsionsmoleküle wie der *Major Histocompatibility Complex II* (MHC II), der auch auf ruhenden Mikroglia vorkommt (103), Komplementrezeptoren und Integrine sowie Toll-like-Rezeptoren (TLR), Zytokin- und Chemokin-Rezeptoren (123). Schließlich sezernieren aktivierte Mikroglia Faktoren, die initial der Verteidigung dienen, jedoch potentiell neurotoxisch sein können (123). Hierzu zählen u.a. Zytokine, Chemokine, ROS und RNS.

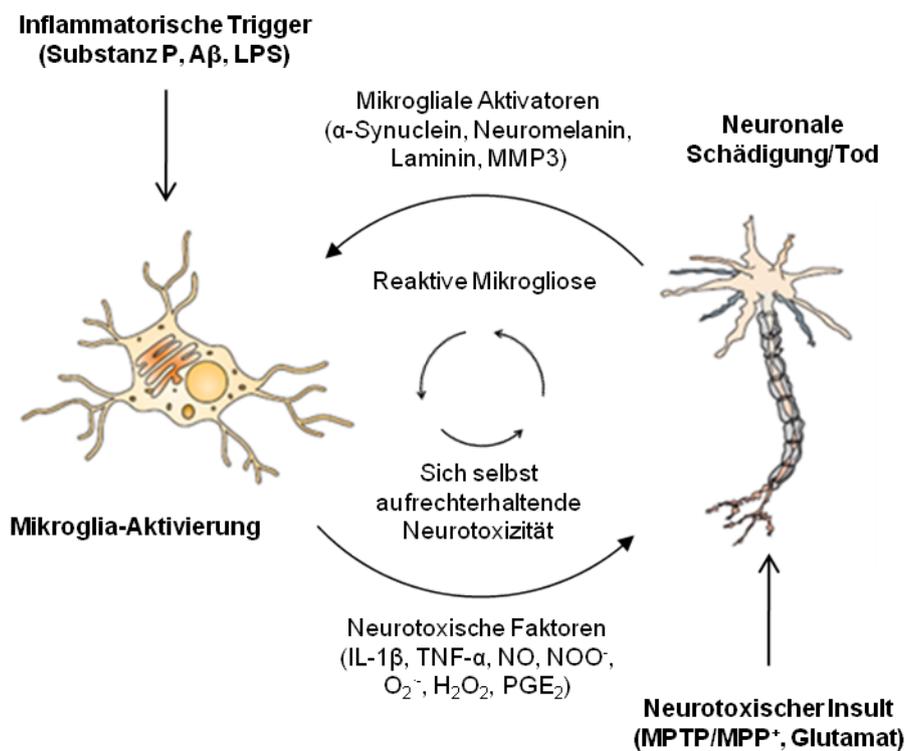
Zytokine sind Peptide, die die Immunantwort steuern und sowohl parakrin als auch autokrin wirken können. Aktivierte Mikroglia sezernieren pro- und anti-inflammatorische Zytokine, besitzen gleichzeitig aber auch entsprechende Rezeptoren für diese Zytokine (123). Pro-inflammatorische Zytokine wie die Interleukine (IL) IL-1 $\beta$  und IL-6 sowie der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) können eine anhaltende Immunantwort hervorrufen, während anti-inflammatorische Zytokine, zu denen IL-10 und der *Transforming Growth Factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) zählen, diese herunter regulieren können. Pro-inflammatorische Zytokine können durch Bindung an Zytokin-Rezeptoren auf dopaminergen Neuronen und Aktivierung von Signalwegen direkt toxisch wirken oder auch indirekt toxische Effekte in Form von oxidativem Stress ausüben.

Unter oxidativem Stress versteht man die Schädigung biologischer Systeme durch Sauerstoff, ROS und RNS. Oxidativer Stress führt zu Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Schäden, Proteinveränderungen, Membranschäden durch Lipid-Peroxidation und in der Folge zur Schädigung und zum Absterben von Zellen. Dadurch soll das ZNS gegen intrazelluläre Mikroorganismen verteidigt werden. ROS und RNS können potentiell aber auch Neurone schädigen. Die Neurone der SN sind besonders anfällig für oxidativen Stress (48). Mikroglia können direkt durch Sekretion von ROS und RNS sowie indirekt über Zytokine oxidativen Stress induzieren und so neuronenschädigend wirken. Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und Interferon- $\gamma$  können die Expression von Enzymen induzieren, die solche toxischen reaktiven Verbindungen produzieren. Zu diesen Enzymen gehören die induzierbare NO-Synthase (iNOS) und die Cyclooxygenase-2 (COX-2), die in der SN von Parkinson-Patienten in erhöhter Konzentration vorkommen (67).

Die Aktivierung der Mikroglia ist eigentlich gedacht als eine vorteilhafte, vorübergehende, selbst-limitierende Reaktion auf neuronale Schädigung oder andere diverse Stimuli. Beim IPS jedoch entwickelt sich die Mikroglia-Aktivierung – einmal ausgelöst – zu einem schwelenden, unkontrollierten, sich selbst aufrecht erhaltenden Prozess, der nicht nur geschädigte, sondern auch gesunde Neurone zerstören und so großen Schaden anrichten kann. Die übermäßige Produktion von Zytokinen und ROS bei chronischer Mikroglia-Aktivierung führt selbst zur Neurodegeneration. Im Rahmen ihres

zellulären Todes setzen die dopaminergen Neurone wiederum mikrogliale Aktivatoren frei. Dieser *Circulus vitiosus* (s. Abbildung 1.6) wird auch als reaktive Mikrogliose bezeichnet und beschreibt eine sich selbst aufrechterhaltende Neurotoxizität, die zu einer chronischen, fortschreitenden Neurodegeneration führt (16).

Da Mikroglia eine uneinheitliche Verteilung im Gehirn aufweisen (84), zeigen verschiedene Hirnregionen eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber dieser mikrogliavermittelten Neurotoxizität. So stellt die SNpc die Hirnregion mit der höchsten Mikroglia-Dichte dar und mesencephale Neurone sind im Vergleich zu hippokampalen und kortikalen Neuronen wesentlich anfälliger gegenüber inflammatorisch bedingter Neurodegeneration (76).



**Abb. 1.6 Reaktive Mikrogliose**

Die Mikroglia-Aktivierung kann über zwei Wege stattfinden und zur Neurodegeneration führen. Erstens können inflammatorische Trigger Mikroglia aktivieren, die daraufhin neurotoxische Faktoren sezernieren. Zweitens kann die Mikroglia-Aktivierung eine Antwort auf neuronalen Zelltod darstellen (reaktive Mikrogliose) und im Sinne eines *Circulus vitiosus* zu weiterer Neurodegeneration führen. Aβ: β-Amyloid; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Wasserstoffperoxid; IL-1β: Interleukin-1β; LPS: Lipopolysaccharid; MMP3: Matrix-metalloprotease-3; MPP<sup>+</sup>: 1-Methyl-4-phenyl-pyridinium; MPTP: 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin; NO: Stickstoffmonoxid; NOO<sup>-</sup>: Peroxynitrit; O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Superoxid; PGE<sub>2</sub>: Prostaglandin E<sub>2</sub>; TNF-α: Tumornekrosefaktor-α.

Abbildung modifiziert nach Block *et al.* (16).

### 1.4.2 ASTROZYTEN

Auch Astrozyten spielen eine, wenn auch untergeordnete Rolle bei der Neuroinflammation. Astrozyten stellen den Hauptanteil aller Gliazellen und bis zu 50 % des Hirnvolumens dar (30). Sie sind für die Sicherstellung einer optimalen Homöostase für neuronale Funktionen verantwortlich. Astrozyten kontrollieren die extrazellulären Konzentrationen von Neurotransmittern und sezernieren verschiedene neurotrophische Faktoren. Hierzu zählen der *Glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF), der *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) und der *Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor* (MANF) (134). Außerdem besitzen Astrozyten antioxidative Eigenschaften. Sie beseitigen mit Hilfe der Glutathion-Peroxidase freie Radikale und verhindern so oxidativen Stress. Kommt es zur Gewebsschädigung, reagieren Astrozyten mit einer Größenzunahme und Proliferation im Sinne einer sogenannten reaktiven Astroglie, welche die neuronalen Zellen schützt.

Es gibt jedoch zunehmend Hinweise, dass auch Astrozyten an der Neurodegeneration beim IPS beteiligt sind. So konnten Mirza *et al.* in *Post-mortem*-Untersuchungen keine solche protektive reaktive Astroglie in der SN von Parkinson-Patienten nachweisen (102). Vielmehr akkumulieren Astrozyten  $\alpha$ -Synuclein im Zytoplasma (20, 135). Diese  $\alpha$ -Synuclein-Ablagerungen wiederum führen zur Aktivierung von Mikroglia und konsekutiv zur Schädigung dopaminerger Neurone (53, 55).

### 1.4.3 INFILTRATION PERIPHERER IMMUNZELLEN

Eine erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke begünstigt die Einwanderung peripherer Immunzellen, insbesondere T-Lymphozyten, ins ZNS. So wird auch das adaptive Immunsystem an der Immunantwort beteiligt.

CD4-positive T-Helfer-Zellen und CD8-positive zytotoxische T-Zellen wurden in hoher Dichte in der Nähe von dopaminerger Neuronen und in engem Kontakt zu Blutgefäßen bei Parkinson-Patienten gefunden. Im Nucleus ruber, einer Region, die beim IPS nicht betroffen ist, konnten hingegen keine Lymphozyten nachgewiesen werden. Dies zeigt, wie hoch selektiv die Infiltration der Lymphozyten in geschädigte Hirnregionen zu sein scheint. Zunehmend gibt es Hinweise darauf, dass T-Lymphozyten nicht nur an der Immunantwort beteiligt sind, sondern selbst auch zytotoxisch wirken und zur Neurodegeneration beitragen können. (23)

## 1.5 REGULIERUNG DER INFLAMMATION

Bei inflammatorischen Prozessen hat der Körper die Möglichkeit, die Inflammation zu regulieren und sich vor einer übermäßigen Zytokinproduktion zu schützen, bevor diese Schaden anrichten kann. Sind ausreichende Zytokin-Konzentrationen erreicht, wird ihre Sekretion gehemmt, die Immunzellen gehen in einen refraktären Zustand über und die Inflammation wird gedämpft. Auch über die Adrenocorticotropes Hormon (ACTH)-Glucocorticoid-Achse, die bei Verletzung, Entzündung und Stress aktiviert wird, kann das Ausmaß der Inflammation eingegrenzt werden. Glucocorticoide regulieren die Produktion von TNF- $\alpha$  und anderen Zytokinen herunter. Ein anderer Weg, einer exzessiven Zytokinproduktion entgegenzuwirken, ist die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$ . Noch schneller und präziser als anti-inflammatorische Zytokine und Glucocorticoide kann das autonome Nervensystem über den cholinergen anti-inflammatorischen Signalweg die Immunantwort regulieren (33, 35).

### 1.5.1 DER CHOLINERGE ANTI-INFLAMMATORISCHE SIGNALWEG

Der cholinerge anti-inflammatorische Signalweg stellt den efferenten Arm des inflammatorischen Reflexes dar (69, 144), über welchen das autonome Nervensystem die Möglichkeit besitzt, unmittelbar auf Informationen über immunologische Geschehnisse zu reagieren. Den afferenten Schenkel dieses inflammatorischen Reflexes bilden afferente Fasern des Nervus vagus. Über diese werden Informationen über inflammatorische Prozesse in der Peripherie zum ZNS geleitet. Auf welche Weise der Nervus vagus das Vorhandensein inflammatorischer Mediatoren erkennt, ist unklar. Möglicherweise binden Zytokine direkt an Rezeptoren der Vagusneurone, da einige von diesen Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) für den IL-1-Rezeptor exprimieren (43). Eine andere Möglichkeit wäre, dass die afferenten Fasern des Nervus vagus über chemorezeptive Zellen in den Paraganglien, auf denen Bindungsstellen für IL-1 nachgewiesen wurden, stimuliert werden (50). Die afferenten glutamatergen Fasern des Nervus vagus erreichen die Medulla oblongata und enden im Nucleus tractus solitarii. Von hier aus ziehen Fasern zum dorsalen motorischen Vagus Kern, dem Ursprung präganglionärer Neurone, deren Axone die efferenten Fasern des Nervus vagus bilden (126).

Zusätzlich erhält das ZNS bei besonders hohen Zytokin-Konzentrationen im Blut über humorale Mechanismen Informationen über periphere immunologische Geschehnisse. Dann wird IL-1 $\beta$  beispielsweise aktiv über die Blut-Hirn-Schranke transportiert und kann an IL-1 $\beta$ -Rezeptoren auf Mikroglia und Endothelzellen binden (35).

Die efferenten Fasern des Nervus vagus, ihr Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) und die  $\alpha 7$ -Untereinheit des nikotineren Acetylcholin-Rezeptors bilden den efferenten Arm des inflammatorischen Reflexes, den sogenannten cholinergen anti-inflammatori-

schen Signalweg (s. Abbildung 1.7). Immunzellen wie Makrophagen exprimieren den  $\alpha 7$ -nikotineren Acetylcholin-Rezeptor ( $\alpha 7$ -nACh-Rezeptor) auf ihrer Zelloberfläche (133). Hieran bindet ACh, das vom Nervus vagus nach Aktivierung des inflammatorischen Reflexes ausgeschüttet wird. In den Immunzellen führt die Aktivierung der  $\alpha 7$ -Untereinheit durch ACh über eine Reihe von Signalkaskaden zu einer reduzierten Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine.

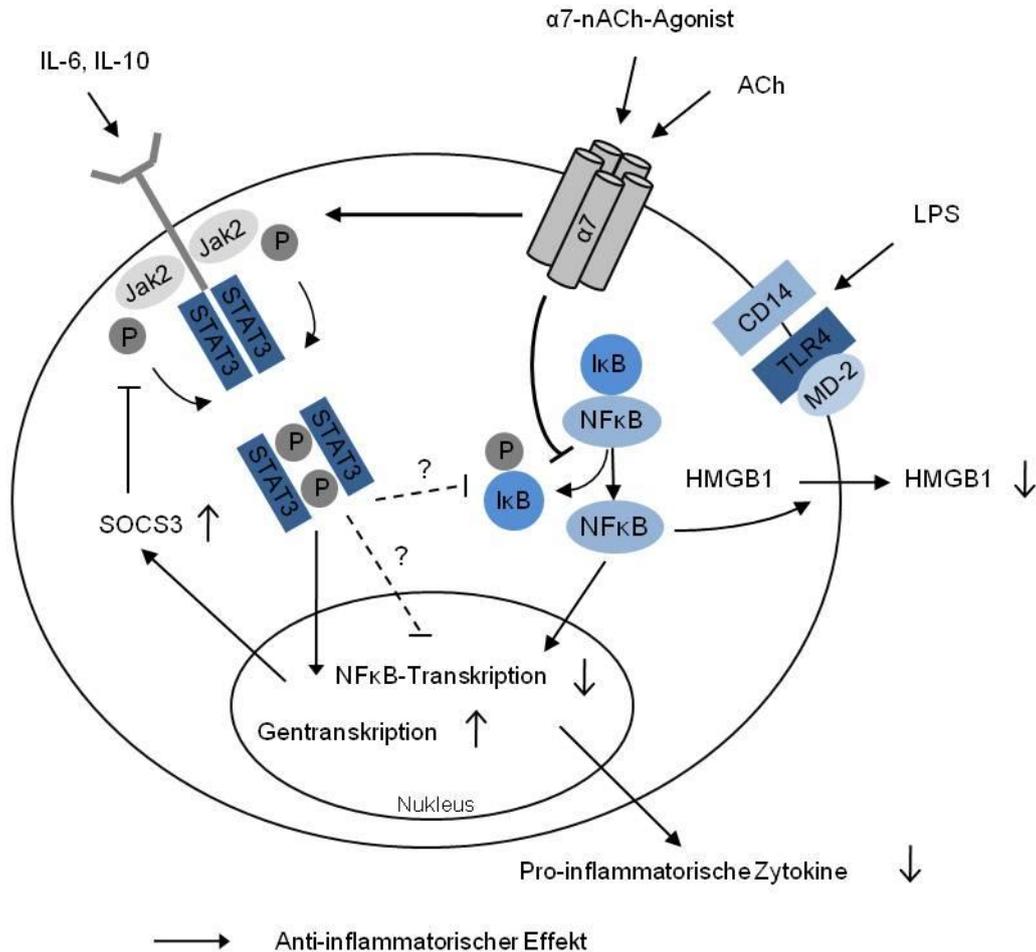
Der Nukleäre Faktor  $\kappa B$  (NF $\kappa B$ ) kann nicht in den Zellkern translozieren, da die Phosphorylierung des NF $\kappa B$ -Inhibitors (I $\kappa B$ ) gehemmt wird. Im Zellkern ist NF $\kappa B$  für die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine zuständig. Außerdem führt die Hemmung der I $\kappa B$ -Phosphorylierung dazu, dass das *High-Mobility-Group-Protein B1* (HMGB1), ein Protein, das die Expression von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 induziert, nicht freigesetzt werden kann. So kann die Bindung von ACh an die  $\alpha 7$ -Untereinheit des nACh-Rezeptors über NF $\kappa B$  die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-18 durch Makrophagen vermindern. Die Freisetzung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 wird hingegen nicht beeinflusst. (19, 33, 35)

Zusätzlich kommt es zur Aktivierung des Jak2/STAT3-Signalwegs (75). Der  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptor interagiert direkt mit der Januskinase 2 (Jak2), einer Tyrosinkinase, und führt zu deren Phosphorylierung. An die so entstandenen Phosphotyrosine bindet der *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3), welcher daraufhin phosphoryliert wird. Phosphorylierte STAT3 bilden Dimere, die nach Translokation in den Zellkern die Gentranskription beeinflussen. STAT3 ist ein Transkriptionsfaktor, der u.a. für die anti-inflammatorischen Effekte von IL-10 verantwortlich ist (122). Die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-6 beeinflusst STAT3 allerdings nicht direkt. Vielmehr scheint STAT3 seine anti-inflammatorischen Effekte über eine Zusammenarbeit mit dem NF $\kappa B$ -Signalweg auszuüben (33, 74).

Die Aktivierung des  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptors induziert außerdem die Expression des *Suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3), einem STAT-induzierten STAT-Inhibitor, der den Jak2/STAT3-Signalweg hemmt. Der anti-inflammatorische Signalweg scheint jedoch nicht von der Expression dieses Proteins abzuhängen. (75)

In experimentellen Modellen verschiedener entzündlicher Erkrankungen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung dieses cholinergen anti-inflammatorischen Signalwegs die Inflammation eindämmt und das Überleben verbessert. So führt beispielsweise die transkutane elektrische Stimulation des Nervus vagus (68) sowie die Gabe der  $\alpha 7$ -nACh-Agonisten Nikotin (149) oder GTS-21 (112) bei Sepsis zu reduzierten HMGB1-Konzentrationen und verbessertem Überleben der Versuchstiere. Vagotomie oder die Gabe des nACh-Antagonisten Mecamylamin hingegen führen zu einer verstärkten Inflammation. Im experimentellen Modell der Pankreatitis führt eine

Vagotomie bzw. die Gabe des nACh-Antagonisten Mecamylamin zu erhöhten Amylase- und Lipase-Konzentrationen im Plasma und zu einem erhöhten Schweregrad der Pankreatitis (151).



**Abb. 1.7 Cholinerg anti-inflammatorischer Signalweg**

Die Aktivierung des α7-nicotinergen Acetylcholin-Rezeptors in LPS-stimulierten Makrophagen führt zu einer reduzierten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine. Zum einen wird über die Inhibierung der IκB-Phosphorylierung die Freisetzung des pro-inflammatorischen Zytokins HMGB1 gehemmt und die Translokation von NFκB in den Nucleus sowie die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine verhindert. Zum anderen wird der Jak2/STAT3-Signalweg aktiviert. Phosphorylierte STAT3-Dimere translozieren in den Nucleus und induzieren anti-inflammatorische Effekte, wie die Expression des anti-inflammatorischen Proteins SOCS3. Der Jak2/STAT3-Signalweg beeinflusst die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine nur indirekt, möglicherweise indem er den NFκB-Signalweg inhibiert (gestrichelte Linien). α7-nACh-Agonist: α7-nicotinerges Acetylcholin-Agonist; ACh: Acetylcholin; CD14: Cluster of differentiation 14; HMGB1: High-Mobility-Group-Protein B1; IκB: NF-κB-Inhibitor; Jak2: Januskinase 2; MD-2: Lymphozyten-Antigen 96; NFκB: Nukleärer Faktor κB; P: Phosphatrest; SOCS3: Suppressor of cytokine signaling 3; STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3; TLR4: Toll-like-Rezeptor 4.

Abbildung modifiziert nach Metz und Tracey (101) sowie Cui und Li (33).

Der cholinerge anti-inflammatorische Signalweg wurde zunächst als ein Mechanismus des peripheren Nervensystems beschrieben. Erste Hinweise, dass solch ein cholinerges Signalweg auch im ZNS existiert und die Aktivierung von Mikroglia beeinflussen kann, lieferten Shytle *et al.* Sie konnten zeigen, dass auch Mikroglia im ZNS den  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptor exprimieren und die Gabe von Nikotin und ACh die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Freisetzung in Mikroglia hemmen kann (133). Zusätzlich werden in aktivierten Mikroglia die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK) durch Nikotin supprimiert, die für die post-transkriptionalen Schritte der TNF- $\alpha$ -Synthese zuständig sind (142).

Es konnte gezeigt werden, dass  $\alpha 7$ -nACh-Agonisten neuroprotektiv gegenüber der  $\beta$ -Amyloid (A $\beta$ )-Toxizität in experimentellen Modellen des Morbus Alzheimer sind. Der Morbus Alzheimer ist eine neurodegenerative Erkrankung, die ebenso wie das IPS mit einer Neuroinflammation einhergeht und bei der es zu einer Reduktion von nACh-Rezeptoren in krankheitsrelevanten Hirnregionen wie dem cerebralen Kortex und dem Hippocampus kommt. *In-vivo*-Studien zeigen, dass der  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptor eine bedeutende Rolle beim Schutz gegenüber cholinergen Läsionen und der Verbesserung kognitiver Funktionen spielt (60).

In einem kürzlich erschienenen Artikel beschreiben Liu *et al.*, dass Nikotin als unselektiver Agonist an nACh-Rezeptoren im akuten MPTP-Mausmodell neuroprotektiv gegenüber Toxin-induziertem dopaminergen Zellverlust wirkt und die Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia in der SN abschwächen kann, während die Behandlung mit dem selektiven  $\alpha 7$  nACh-Antagonisten Methyllycaconitin diese Effekte aufhebt (92).

### 1.5.2 $\alpha 7$ -nACh-REZEPTOR

Nikotinerge ACh-Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, die sich als sogenannte Pentamere aus fünf Untereinheiten zusammensetzen. Abhängig von Struktur und Lokalisation kann ein neuronaler von einem muskulären Typ unterschieden werden (3). Letzterer ist an der neuromuskulären Endplatte lokalisiert und besteht aus den Untereinheiten  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\delta$  und  $\gamma$  bzw.  $\epsilon$  im Verhältnis 2:1:1:1. Neuronale nACh-Rezeptoren kommen im ZNS und im peripheren Nervensystem vor, werden jedoch auch von nicht-neuronalen Zellen exprimiert (46). Neuronale nACh-Rezeptoren setzen sich im Gegensatz zum muskulären Typ lediglich aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten zusammen. Die hohe Anzahl an unterschiedlichen Untereinheiten (neun  $\alpha$ - und vier  $\beta$ -Untereinheiten) und ihre vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten – als Homo- oder Heteromere – sorgen für eine große Auswahl an Rezeptor-Varianten mit jeweils unterschiedlichen Funktionen (3, 39). Während heteromere nACh-Rezeptoren zwei Ligandenbindungsstellen aufweisen, die an der Kontaktfläche zwischen einer  $\alpha$ - und

einer  $\beta$ -Untereinheit lokalisiert sind, besitzen homomere nACh-Rezeptoren fünf identische Ligandenbindungsstellen (52).

Der  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptor ist einer der am besten charakterisierten neuronalen nikotinergen ACh-Rezeptoren. Er ist ein homomerer Rezeptor bestehend aus fünf  $\alpha 7$ -Untereinheiten, die eine zentrale Pore formen. Jede  $\alpha 7$ -Untereinheit hat eine atomare Masse von etwa 56 kDa und besteht aus 502 Aminosäuren. 22 Aminosäuren bilden das N-terminale Signalpeptid, gefolgt von der extrazellulären Ligandenbindungsstelle bestehend aus 200 Aminosäuren (9, 74). Die Untereinheiten bestehen jeweils aus vier Transmembrandomänen (TM1-4), die wiederum je vier  $\alpha$ -Helices aufweisen, welche den Ionenkanal bilden. Der  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptor ist besonders permeabel für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (3, 10) und hat so Einfluss auf  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalwege, zu denen die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), die Proteinkinase C (PKC) und die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) zählen (33). Auf diese Weise können  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptoren die Neurotransmitter-Freisetzung aus präsynaptischen Nervenendigungen modulieren und exzitatorische Impulse in postsynaptischen Neuronen induzieren.

Im ZNS ist die  $\alpha 7$ -Untereinheit mit neuronaler Plastizität und Zellüberleben assoziiert (10, 39). Nagetiere weisen die  $\alpha 7$ -Untereinheit v.a. im Hippocampus, Hypothalamus, Kortex und im dorsalen motorischen Vaguskern auf (52). Im menschlichen Hirn kann sie im Kortex, im Hippocampus, im Kleinhirn und in den Basalganglien nachgewiesen werden (52). Die  $\alpha 7$ -Untereinheit kann auf striatalen dopaminergen Nervenendigungen nicht gefunden werden, kommt allerdings auf glutamatergen Nervenendigungen vor, welche den nigrostriatalen Signalweg wiederum beeinflussen können (27).

Wie oben bereits erwähnt, weisen auch nicht-neuronale Zellen neuronale nikotinerge ACh-Rezeptoren auf. So wird der  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptor auch von Immunzellen wie Makrophagen und Mikroglia exprimiert und spielt eine essentielle Rolle beim anti-inflammatorischen Signalweg.

### 1.5.3 PNU-282987

Das Benzamid PNU-282987 (N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]-4-chlorobenzamidhydrochlorid) ist ein potenter, selektiver Agonist an  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptoren ( $K_i = 27 \text{ nM}$ ) (17, 54). In verschiedenen experimentellen Arbeiten hat PNU-282987 über die Aktivierung des cholinergen anti-inflammatorischen Signalwegs eine anti-inflammatorische Wirkung gezeigt. Su *et al.* zeigten, dass PNU-282987 im Mausmodell ein akutes Lungenversagen abschwächen kann (140). Waldburger *et al.* wiesen *in vitro* nach, dass PNU-282987 die IL-6-Produktion von Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten bei der rheumatoiden Arthritis dosisabhängig hemmt (148).

#### **1.5.4 MECAMYLAMIN**

Mecamylamin (*N*,2,3,3-Tetramethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-amin) ist ein unspezifischer nicht-kompetitiver Antagonist an nACh-Rezeptoren. In den 1950er Jahren wurde Mecamylamin als erstes oral verfügbares Antihypertensivum auf den Markt gebracht, verlor jedoch in dieser Funktion aufgrund diverser Nebenwirkungen zunehmend an Bedeutung (5). Es gilt jedoch in der experimentellen Forschung als der am häufigsten verwendete Inhibitor neuronaler nACh-Rezeptoren, welcher die physiologischen Effekte von Nikotin hemmt (109).

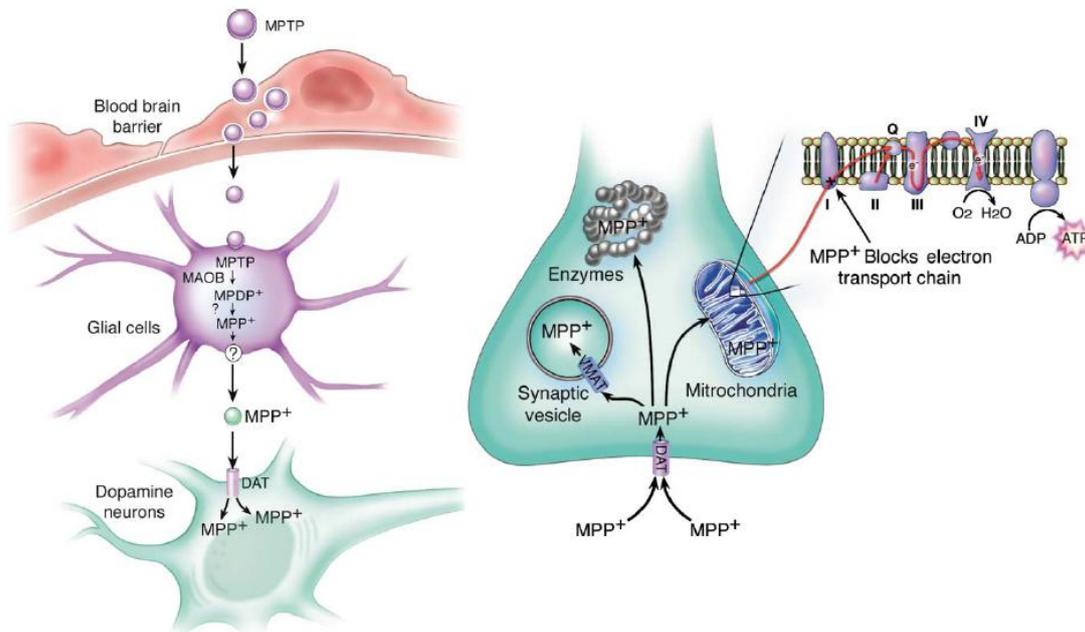
### **1.6 MPTP-MAUSMODELL**

Das MPTP-Modell ist das am häufigsten verwendete Tiermodell des IPS (8). MPTP ist ein Neurotoxin und wurde zufällig 1982 entdeckt. Junge Drogenabhängige aus Kalifornien entwickelten innerhalb kürzester Zeit Parkinson-ähnliche Symptome, nachdem sie sich selbst synthetisiertes 1-Methyl-4-phenyl-4-propionoxy-piperidin (MPPP) gespritzt hatten, welches mit neurotoxischem MPTP kontaminiert war (81). Die neurotoxischen Effekte scheinen über Jahre anzudauern. So konnte bei der neuropathologischen Untersuchung dreier Patienten Jahre nach MPTP-Exposition eine Ansammlung von Mikroglia um Neurone und ein anhaltender aktiver Zellverlust nachgewiesen werden (82). In Tierexperimenten wurde gezeigt, dass MPTP sowohl bei Primaten als auch bei Mäusen ein Parkinson-Syndrom auslösen kann. Der Vorteil gegenüber anderen Toxin-induzierten Parkinson-Tiermodellen ist, dass MPTP selektiv dopaminerge Neurone der SNpc zerstört und bei Menschen Symptome induziert, die identisch mit denen des IPS sind (118).

#### **1.6.1 MPTP-METABOLISMUS UND MPTP-VERMITTELTE TOXIZITÄT**

MPTP selbst ist nicht toxisch. Es ist sehr lipophil und kann die Blut-Hirn-Schranke schnell überwinden. In Gliazellen und serotonergen Neuronen wird es mittels der MAO-B zu 1-Methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium (MPDP<sup>+</sup>) und anschließend zu 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>), dem eigentlichen Neurotoxin, oxidiert und in den Extrazellularraum gegeben (s. Abbildung 1.8). MPP<sup>+</sup> ist polar und kann die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden. Es hat eine hohe Affinität für den DAT und gelangt über diesen selektiv in dopaminerge Neurone. Dort kann es über den VMAT2 in synaptische Vesikel aufgenommen werden oder verbleibt im Zytoplasma und interagiert mit verschiedenen Enzymen. Außerdem kann es in der mitochondrialen Matrix akkumulieren und zu einer irreversiblen Hemmung des Komplex I der Atmungskette führen. In der Folge kommt es zur Verarmung der Zelle an ATP, zum vermehrten Anfall von ROS

und schließlich zum Absterben der dopaminergen Zelle. Die dopaminergen Neurone der SNpc sind dabei besonders vulnerabel, während die Neurone des VTA weniger anfällig erscheinen. Darüber hinaus verursacht MPTP auch im Locus coeruleus einen Zelluntergang (146). Gleichzeitig löst MPTP eine Neuroinflammation aus, wie sie auch beim IPS zu beobachten ist. Es führt zur Aktivierung von Mikroglia und zur Einwanderung von Lymphozyten (80).



**Abb. 1.8 MPTP-Metabolismus und MPP<sup>+</sup>-Wirkung**

Nach systemischer Applikation überwindet MPTP die Blut-Hirn-Schranke und wird in Gliazellen und serotonergen Neuronen (nicht gezeigt) durch die MAO-B zu MPDP<sup>+</sup> und anschließend zu MPP<sup>+</sup> oxidiert. MPP<sup>+</sup> wird in den Extrazellularraum gegeben und über den DAT selektiv in dopaminerge Neurone aufgenommen. Innerhalb der dopaminergen Zelle kann MPP<sup>+</sup> in der Mitochondrien-Matrix akkumulieren und über eine Hemmung von Komplex I zur Verarmung der Zelle an ATP sowie zur Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen (letzteres nicht gezeigt) führen. MPTP kann außerdem im Zytoplasma mit Proteinen interagieren oder über den VMAT2 in synaptische Vesikel aufgenommen werden. ATP: Adenosintriphosphat; DAT: Dopamin-Transporter; MAO-B: Monoaminoxidase B; MPDP<sup>+</sup>: 1-Methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium; MPP<sup>+</sup>: 1-Methyl-4-phenylpyridinium; MPTP: 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin; VMAT2: vesikulärer Monoamintransporter 2. Abbildung aus Dauer und Przedborski (36).

### 1.6.2 VERSCHIEDENE ADMINISTRATIONSMODELLE

Mäuse reagieren besonders empfindlich auf MPTP und werden daher als etabliertes Nagermodell häufig verwendet (59). Es gibt drei gängige Administrationsmodelle des MPTP-Mausmodells mit unterschiedlicher Dosierung von MPTP (hier dargestellt für die weitverbreitete C57Bl/6-Mauslinie; die einzelnen Dosen können bei unterschiedlichen Mauslinien variieren).

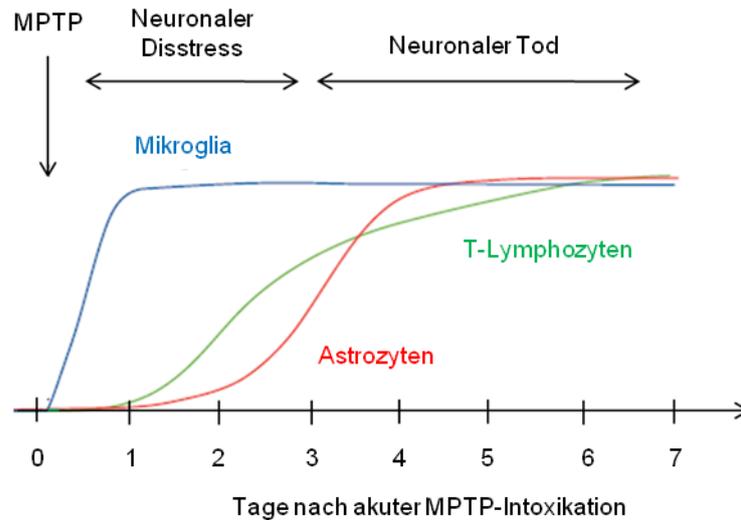
Beim akuten MPTP-Mausmodell werden innerhalb kürzester Zeit hohe Dosen an MPTP intraperitoneal (i.p.) verabreicht: 4x 20 mg/kg Körpergewicht MPTP im Abstand

von zwei Stunden (71, 136). MPTP induziert in dieser hohen Dosierung einen ausgeprägten, anhaltenden Zellverlust in der SN und eine starke Reduktion der dopaminergen Innervation des Striatums (70, 79). Außerdem ist die Neuroinflammation in diesem Modell besonders ausgeprägt. Neben Mikroglia-, Astrozyten-, und Lymphozytenaktivierung (s. Abbildung 1.9) kommt es auch zu einer signifikanten Hochregulation von iNOS und anderen mikroglial vermittelten Neurotoxinen. Die Mikroglia-Aktivierung findet dabei noch vor dem Untergang dopaminergener Neurone statt und ist bereits an Tag 2 nach MPTP-Intoxikation maximal ausgeprägt (90).

Beim subakuten MPTP-Mausmodell (1x/Tag 30 mg/kg Körpergewicht MPTP i.p. für fünf bis zehn Tage (58)) kommt es zwar anfänglich zu dopaminergem Zellverlust und striatalem Dopaminmangel, nach Ende der Intoxikation sind diese jedoch reversibel (83, 114). Neuroinflammation bzw. erhöhte striatale IL-1 $\beta$ -Spiegel konnten auch bei diesem Modell beobachtet werden (13).

Das chronische MPTP-Mausmodell (2x/Woche 25 mg/kg Körpergewicht MPTP subkutan +250 mg/kg Körpergewicht Probenecid i.p. für 5 Wochen (83)) ist dem natürlichen Verlauf des IPS am ähnlichsten. MPTP wird in Kombination mit Probenecid als Adjuvanz gegeben. Probenecid inhibiert die renale tubuläre Sekretion bestimmter Stoffe, darunter MPTP, und führt zu einem Anstieg der Plasma-Spiegel, indem es die renale Reabsorption fördert. Zusätzlich hemmt es im ZNS den Transport neurochemischer Stoffe aus dem Plexus choroideus und aus Parenchymzellen ins Plasma und erhöht so deren Konzentration im ZNS (83). Auch beim chronischen MPTP-Mausmodell kommt es zum Untergang dopaminergener Neurone und zum Dopaminmangel im Striatum. Ob MPTP bei chronischer Applikation ebenfalls eine Neuroinflammation auslösen kann, ist in der Literatur widersprüchlich: in einigen Studien konnte eine Mikroglia-Aktivierung nachgewiesen werden (100, 130), in anderen hingegen nicht (4). Im Gegensatz zum akuten und subakuten Modell führt das chronische Modell zum Auftreten neuronaler Inklusionen, in denen  $\alpha$ -Synuclein und Ubiquitin nachgewiesen werden konnten, und reproduziert eher den progressiven Verlauf des Morbus Parkinson (83, 100).

Das akute und subakute MPTP-Mausmodell hingegen haben den Vorteil, dass eine kürzere Behandlungsdauer ausreicht, die neuropathologischen Veränderungen des Parkinson-Syndroms auszulösen. Zudem sind sie erprobter und verlässlicher in Bezug auf die Auslösung einer begleitenden Neuroinflammation als das chronische Modell. Das akute MPTP-Mausmodell hat im Vergleich zum subakuten Modell den Vorteil, dass es zu einem anhaltenden, nicht reversiblen Zellverlust in der SNpc und zu einem striatalen Dopamin-Defizit führt.



**Abb. 1.9 Reaktionen in der SN nach akuter MPTP-Intoxikation**

Nach akuter Applikation von MPTP (4x 20 mg/kg Körpergewicht MPTP i.p. im Abstand von 2 Stunden) kommt es zunächst zu neuronalem Disstress der dopaminergen Neurone für 3 bis 4 Tage und anschließend zum Zelltod. Dieser ist 7 Tage nach MPTP-Applikation weitgehend abgeschlossen. Mikroglia werden bereits 12 bis 24 Stunden nach MPTP-Exposition aktiviert, noch bevor es zum dopaminergen Zelluntergang kommt. Die Aktivierung der Astrozyten erfolgt erst 3 bis 4 Tage nach MPTP-Intoxikation gleichzeitig mit dem Beginn des dopaminergen Zellverlusts. Die Infiltration der T-Lymphozyten ins ZNS beginnt an Tag 2 nach MPTP-Intoxikation und steigt bis Tag 7 stetig an. MPTP: 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin.

Abbildung modifiziert nach Hirsch und Hunot (64).

## 1.7 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT

In dieser Arbeit soll die Rolle des cholinergen anti-inflammatorischen Signalwegs in einem experimentellen Modell des Morbus Parkinson untersucht werden. Hierzu sollen die Effekte des selektiven  $\alpha 7$ -nACh-Agonisten PNU-282987, einem direkten Aktivator des cholinergen anti-inflammatorischen Signalwegs, auf Neuroinflammation und Neurodegeneration im akuten MPTP-Mausmodell bestimmt werden. Außerdem sollen die Effekte des unselektiven nACh-Antagonisten Mecamylamin betrachtet werden. Die wesentlichen Fragestellungen hierbei sind:

- Kann der selektive  $\alpha 7$ -nACh-Agonist PNU-282987 über die Aktivierung des cholinergen anti-inflammatorischen Signalwegs die MPTP-induzierte Neuroinflammation, insbesondere die Aktivierung von Mikroglia und die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, beeinflussen?
- Wirkt PNU-282987 darüber hinaus neuroprotektiv und hat die erwartete Abschwächung der Neuroinflammation einen Effekt auf den dopaminergen Zelluntergang in der SNpc? Könnte PNU-282987 somit einen möglichen Ansatz in der Behandlung des IPS darstellen?
- Welche Auswirkungen hat im Gegensatz dazu die Gabe des nACh-Antagonisten Mecamylamin auf Neuroinflammation und Neurodegeneration?

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 VERSUCHSAUFBAU

Die Untersuchungen fanden am akuten MPTP-Mausmodell unter der Verwendung von C57BL/6-Mäusen statt. PNU-282987 als selektiver Agonist an  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptoren sowie Mecamylamin als unspezifischer nACh-Antagonist dienten der Aktivierung bzw. Inhibierung des cholinergen anti-inflammatorischen Signalwegs. Die MPTP-intoxikierten und mit der entsprechenden Substanz behandelten Tiere wurden mit NaCl 0,9 %-behandelten Kontrolltieren verglichen.

Als Marker der Neuroinflammation an Tag 2 nach MPTP-Intoxikation fungierten die striatalen Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  und des anti-inflammatorischen IL-10 sowie die Anzahl aktivierter Mikroglia in der SNpc. Zu diesem Zeitpunkt erwartete man die maximale Ausprägung der Mikroglia-Aktivierung bzw. Neuroinflammation (s. Abbildung 1.9). Die Neurodegeneration an Tag 7 nach MPTP-Intoxikation wurde anhand der Anzahl dopaminerger Neurone in der SNpc, der Konzentrationen von Dopamin und seinen Metaboliten HVA und DOPAC im Striatum sowie anhand des Dopamin-Umsatzes beurteilt. An Tag 7 nach MPTP-Intoxikation galt der dopaminerge Zelluntergang als abgeschlossen (64, 71). Darüber hinaus wurden Rotarod-Verhaltenstests mit den Tieren vor und nach Behandlung durchgeführt.

### 2.2 TIERE, TIERHALTUNG UND EINTEILUNG IN BEHANDLUNGSGRUPPEN

Als Versuchstiere dienten 66 männliche C57BL/6-Mäuse (Centre d'Élevage René Janvier, Le Genest St. Isles, F). Dieser Mäusestamm ist im MPTP-Mausmodell besonders empfindlich auf die Schädigung nigrostriataler dopaminerger Neurone (71, 117, 141). Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Lieferung sieben Wochen alt und hatten einen Tag vor MPTP-Intoxikation ein durchschnittliches Körpergewicht von 24,1 g. Sie wurden in Kunststoffkäfigen in Gruppen von je sechs bzw. acht Tieren in pathogenfreier Umgebung gehalten und hatten freien Zugang zu Futter und Trinkwasser. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug zwölf Stunden. Bevor mit den Experimenten begonnen wurde, wurde den Tieren eine Eingewöhnungszeit im Tierstall von etwa einer Woche gewährt.

Die Tiere wurden in verschiedene Behandlungsgruppen eingeteilt (s. Tabelle 2.1). Die drei Tiergruppen mit jeweils acht Tieren pro Käfig wurden den MPTP-7d-Gruppen zugeteilt, da hier eine erhöhte Gefahr für die Tiere bestand, unter der Behandlung zu versterben. Die restlichen Tiere wurden den Behandlungsgruppen randomisiert zugewiesen. Der Saline/Saline-Gruppe wurden zusätzliche sechs Tiere für die Zytokinmessungen zugeteilt. Die Behandlungsgruppen wurden anhand römischer Zahlen, die

Tiere innerhalb der Gruppe anhand arabischer Zahlen unterschieden. Die Tiere wurden entsprechend mit einem schwarzen Strichcode am Schwanz markiert. Die Markierung wurde täglich nachgezeichnet. Die Tiere der MPTP-2d- und der MPTP-7d-Gruppe erhielten Injektionen von MPTP und stellten somit die Gruppe der erkrankten Tiere dar. Die MPTP-2d-Tiere wurden an Tag 2, die MPTP-7d-Tiere an Tag 7 nach MPTP-Intoxikation getötet. Die Saline-Gruppen I, II und III dienten als Kontrollen. Entsprechend der Gruppenzuteilung erhielten die Tiere die zu testenden Substanzen (PNU-282987 bzw. Mecamylamin) appliziert.

Die Tierversuche wurden mit Genehmigung des Regierungspräsidiums Giessen vom 25.03.2011 (V 54 – 19 c 20 15 (1) MR 20/15 Nr. 15/2011) und unter Beachtung des Tierschutzgesetzes der Bundesrepublik Deutschland durchgeführt.

**Tabelle 2.1 Einteilung in Behandlungsgruppen**

	<b>Saline</b>	<b>MPTP-2d</b>	<b>MPTP-7d</b>
<b>Saline</b>	I (1-12)	IV (1-6)	VII (1-8)
<b>Mecamylamin</b>	II (1-6)	V (1-6)	VIII (1-8)
<b>PNU-282987</b>	III (1-6)	VI (1-6)	IX (1-8)

### **2.3 INTOXIKATION NACH DEM AKUTEN MPTP-MAUSMODELL**

Die MPTP-Intoxikation erfolgte nach dem akuten MPTP-Mausmodell (71). Die MPTP-2d- und MPTP7d-Tiere erhielten innerhalb eines Tages vier Injektionen MPTP-Hydrochlorid (20 mg/kg Körpergewicht je Injektion) im Abstand von jeweils zwei Stunden i.p. in den linken Unterbauch. Den Kontrolltieren wurde ein entsprechendes Volumen NaCl-Lösung 0,9 % appliziert (240 µl je Injektion).

Da bereits die Inhalation und der Hautkontakt mit MPTP beim Menschen Symptome des IPS auslösen können, mussten entsprechende Sicherheitsmaßnahmen beim Umgang mit MPTP getroffen werden, die sich an den Empfehlungen von Przedborski *et al.* orientierten (117). Alle Arbeiten mit MPTP wurden in einem eigens dafür eingerichteten Raum unter dem Abzug und mit geeigneter Schutzkleidung (Schutzanzug, Atemschutzgerät, Schutzbrille, Handschuhe) durchgeführt. Die Tiere wurden bis zum fünften Tag nach MPTP-Intoxikation ebenfalls in diesem Raum in einem Wärmeschrank gelagert, da ihre Ausscheidungen in den ersten Tagen nach Intoxikation MPTP enthalten konnten. Anschließend wurden die Tiere in neue Käfige mit frischem Streu, Futter und Wasser umgesetzt. Die mit MPTP kontaminierten Käfige sowie die Arbeitsflächen wurden mit einem Bleichmittel auf Chlorbasis (Eau de Javel) gereinigt und desinfiziert. Kontaminierte Verbrauchsmaterialien wurden durch Hochtemperaturverbrennung entsorgt.

## 2.4 APPLIKATION DER ZU TESTENDEN SUBSTANZEN

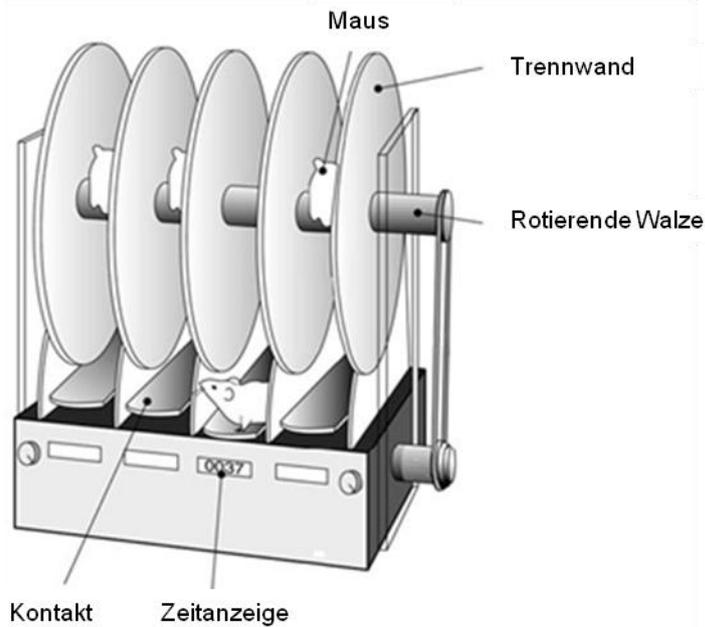
Je nach Gruppenzuteilung erhielten die Tiere täglich i. p. Injektionen des  $\alpha 7$ -nACh-Agonisten PNU-282987 (3 mg/kg Körpergewicht) bzw. des nACh-Antagonisten Mecamylamin-Hydrochlorid (1 mg/kg Körpergewicht) in den linken Unterbauch. Die Kontrolltiere erhielten analog dazu ein entsprechendes Volumen NaCl-Lösung 0,9 % (100  $\mu$ l je Injektion). Die erste Gabe der Substanzen erfolgte einen Tag vor MPTP-Intoxikation, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, trotz der hohen Toxizität der gewählten MPTP-Dosis einen möglichen Effekt der zu testenden Substanzen erzielen zu können. Die letzte Injektion erfolgte einen Tag vor Versuchsende.

## 2.5 ROTAROD-TEST

Beim Rotarod-Test handelt es sich um einen Verhaltensversuch, bei dem die motorische Koordination, insbesondere der Vorder- und Hinterläufe, und das Gleichgewicht der Versuchstiere gezielt untersucht werden können. Der Test ist besonders sensitiv für extrapyramidal-motorische Läsionen.

Das Rotarod (Rotarod 3375-4R) war mit einer profilierten Walze (Durchmesser 3 cm) ausgestattet, die um ihre Längsachse rotierte (s. Abbildung 2.1). Trennwände unterteilten die Walze, sodass gleichzeitig vier Tiere getestet werden konnten, ohne dass diese Sichtkontakt zu den Nachbartieren hatten. Die Zeitmessung wurde individuell für jedes Tier per Knopfdruck gestartet. Im Boden unterhalb der Walze befanden sich Kontaktplättchen, die das Hinabfallen der Maus von der Walze registrierten und die Zeit stoppten. Die Fallhöhe betrug 15,8 cm. Das Rotarod war über eine Prozesskontrolleinheit mit einem PC verbunden, der die Daten mit Hilfe der TSE-Rota-Rod V 2.6 Software speicherte.

Getestet wurden die MPTP-7d-Tiere und die Kontrolltiere. Eine Woche vor Basiswertbestimmung fand ein Testlauf zur Habituation der Tiere statt. Die Basiswertbestimmung selbst erfolgte vor MPTP-Intoxikation bzw. Beginn der Behandlungen. Nach MPTP-Intoxikation und erfolgter Behandlung fand einen Tag vor Abtötung der Tiere eine weitere Testung statt. Die Testläufe fanden jeweils am Vormittag statt. Die Walze rotierte mit einer konstanten Geschwindigkeit (sogenanntes *Fixed-speed Rotarod*) von 10 Rotationen pro Minute (rpm). Die Tiere wurden nahe der Schwanzwurzel gefasst, aus dem Käfig gehoben und auf die rotierende Walze gesetzt. Gemessen wurde die Zeit, die sich das Tier auf der rotierenden Walze halten konnte. Nach Hinunterfallen von der Walze wurden dem Tier vier weitere Aufsetzversuche gewährt. Der Versuch wurde nach insgesamt fünf Aufsetzversuchen oder nach Erreichen der Zielzeit von 120 Sekunden beendet.



**Abb. 2.1 Schematische Darstellung des Rotarod**  
Abbildung modifiziert nach Carter (26).

## 2.6 PRÄPARATION

Die Tiere wurden an Tag 2 bzw. an Tag 7 nach MPTP-Intoxikation durch rasche zervikale Dislokation und Dekapitation getötet. Die Schädelkalotte wurde von okzipital in sagittaler Richtung mit einer Schere eröffnet und zu beiden Seiten aufgeklappt. Die Dura mater wurde vorsichtig abpräpariert und das Hirn entnommen. Das Hirn wurde anschließend auf Eis und Filterpapier präpariert. Das linke Frontalhirn wurde abgetrennt, das linke Striatum vorsichtig separiert und – je nach Gruppenzugehörigkeit der Tiere – bei -80 °C bis zur Zytokin-Bestimmung gelagert oder für die spätere Durchführung der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) vorbereitet. Dazu wurden die Striata in Tubes gegeben und ihr Gewicht bestimmt. Anschließend wurden in jedes Tube 250 µl gekühlte Perchlorsäure gegeben, um eine Oxidation der Katecholamine zu verhindern, und die Tubes bei -80 °C eingefroren. Der restliche Teil der Hirne wurde mit 4-prozentigem Paraformaldehyd (PFA) für 2 Tage bei +4 °C auf einer Schüttelplatte postfixiert und zum Entwässern in 30 % Sucrose in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) umgebettet.

Verwendete Lösungen und deren Herstellung:

### PFA 4%:

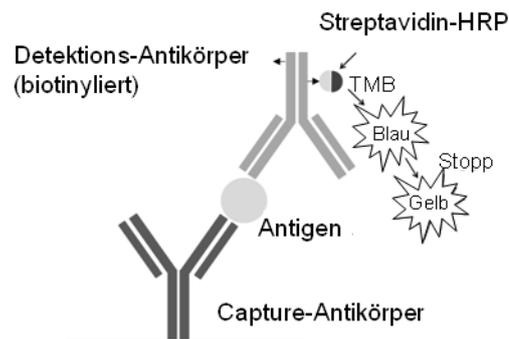
PFA	40 g
Milli-Q ddH <sub>2</sub> O	1000 ml
NaOH	<i>q.s. ad</i> pH 7

### 30% Sucrose in PBS:

Sucrose	300 g
PBS	1000 ml

## 2.7 ELISA

Bei einem *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) handelt es sich um ein proteinchemisches Verfahren, bei dem mit Hilfe einer enzymatischen Farbreaktion ein Antigen-Antikörper-Komplex nachgewiesen werden kann. Bei den verwendeten ELISAs handelt es sich um Sandwich-ELISAs, bei denen zwei Antikörper dazu dienen, das gesuchte Antigen zu detektieren (s. Abbildung 2.2). Der erste Antikörper stellt den *Capture*-Antikörper dar, der an eine Mikrotiterplatte gebunden ist. Nach Zugabe der Probe bindet dieser Antikörper an die in der Probe befindlichen Antigene. Der zweite Antikörper, der biotinylierte Detektions-Antikörper, bindet ebenfalls an das Antigen. So entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex („Sandwich“). Die Meerrettich-Peroxidase (HRP) bindet an den Detektions-Antikörper, indem das an die HRP gekoppelte Streptavidin mit dem Biotin des Detektions-Antikörpers eine kovalente Bindung eingeht. Die HRP katalysiert die Umsetzung eines Farbsubstrats. Die Absorption des entstandenen Farbstoffes kann mit Hilfe eines Photometers bestimmt werden und ist proportional zur Konzentration des gesuchten Antigens.



**Abb. 2.2 Prinzip des Sandwich-ELISAs**

Das Antigen wird vom *Capture*- und vom Detektions-Antikörper gebunden („Sandwich“). Die über eine Avidin-Biotin-Bindung an den Detektions-Antikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase (HRP) katalysiert die Umsetzung des Farbsubstrats Tetramethylbenzidin (TMB) von blau nach gelb. Die gemessene Absorption ist proportional zur Konzentration des gesuchten Antigens.

Abbildung modifiziert nach R&D Systems (121).

Auf diese Weise wurden die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 und TNF- $\alpha$  im Hirnlysat nachgewiesen. Verwendet wurden die linken Striata der MPTP-2d-Tiere. Als Kontrollen dienten die Striata der zusätzlichen sechs Tiere der Saline/Saline-Gruppe, da die linken Striata der übrigen Kontrolltiere im weiteren Verlauf für die HPLC verwendet wurden.

### 2.7.1 GEWEBEHOMOGENISIERUNG

Das zu untersuchende Hirngewebe musste zur Durchführung der ELISAs zunächst homogenisiert werden. Die Striata der zu untersuchenden Tiere wurden jeweils in 1,5 ml Eppendorf Protein LoBind Tubes gegeben und je Tube 440 µl einer Lösung aus Lysispuffer T-Per und Proteaseinhibitor hinzugefügt. Mit Mörser und Pistill wurde das Gewebe anschließend mechanisch homogenisiert. Nach 10 Minuten Inkubation und 5 Minuten Zentrifugieren bei +4 °C und 10.000 g (Biofuge Stratos) wurde der Überstand mit Hilfe einer Pipette abgenommen und in neue 0,5 ml Eppendorf Protein LoBind Tubes gegeben. Mit dem NanoDrop wurde die Proteinkonzentration der einzelnen Hirnlysate ermittelt. Als Leerwert wurde die Proteinkonzentration in der Lösung aus T-Per und Proteaseinhibitor bestimmt. Das Hirnlysat des Tieres IV.2 wies mit 2,76 µg/µl die geringste Proteinkonzentration auf. Alle anderen Proben wurden auf diese Konzentration verdünnt. Jeweils 100 µl der auf 2,76 µg/µl verdünnten Hirnlysate (entsprechend 276 µg) wurden pro ELISA und pro Tier eingesetzt.

#### Verwendeter Lysispuffer + Proteaseinhibitor:

Eine Tablette Complete Protease Inhibitor Cocktail wurde in 500 µl Milli-Q ddH<sub>2</sub>O gelöst. 150 µl dieser Lösung wurden mit 15 ml T-Per gemischt.

### 2.7.2 DURCHFÜHRUNG DER ELISAS

In jedes Well einer 96 Well-Mikrotiterplatte wurden 100 µl *Capture*-Antikörper (gelöst in PBS) gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Um ungebundene Antigene zu entfernen, wurde die Mikrotiterplatte dann mit 400 µl Waschpuffer pro Well gewaschen. Der Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Zum Schluss wurde der Waschpuffer vollständig entfernt und die Mikrotiterplatte gut abgeklopft. Durch anschließende Zugabe von 300 µl Blockpuffer in jedes Well und nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden freie Bindungsstellen gesättigt und unspezifische Bindungen verhindert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte erneut gewaschen.

Zur späteren Quantifizierung der Ergebnisse wurden für jeden ELISA zwei serielle Verdünnungsreihen des entsprechenden Standards angelegt. Der Standard wurde in Reagent Diluent für mindestens 15 Minuten gelöst und anschließend auf eine Konzentration von 2000 pg/ml verdünnt. Durch weiteres Verdünnen mit Reagent Diluent entstand eine Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von 1000 pg/ml, 500 pg/mg, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml bis 31,25 pg/ml.

Die Mikrotiterplatten wurden mit jeweils 100 µl der auf 2,76 µg/µl verdünnten Hirnlysate bzw. mit 100 µl des in Reagent Diluent gelösten Standards der Verdünnungs-

reihe über 2 Stunden bei Raumtemperatur und dicht verschlossen inkubiert. 2 Wells wurden zur Bestimmung des Leerwerts nicht befüllt. Die Verdünnungsreihe des Standards wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. Nach dem Waschen wurden in jedes Well 100 µl des Detektions-Antikörpers (gelöst in Reagent Diluent) gegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte erneut gewaschen, in jedes Well 100 µl Streptavidin-HRP 0,5 % gegeben, mit Alufolie lichtgeschützt abgedeckt und bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Danach wurde die Mikrotiterplatte gewaschen und mit 100 µl Substratlösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur und lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden in jedes Well 50 µl Stopplösung gegeben. Direkt im Anschluss wurde die Absorption jedes Wells im Microplate Reader bei 450 nm gegen einen Referenzwert von 570 nm bestimmt. Es erfolgte eine Wellenlängenkorrektur, indem die Differenz der bei diesen beiden Wellenlängen gemessenen Werte gebildet wurde. Die Messwerte der Doppelbestimmungen von Leerwert und Verdünnungsreihe des Standards wurden gemittelt. Die gemittelten Leerwerte wurden von jedem Messwert subtrahiert. Mit Hilfe der Standardmesswerte wurde eine Standardkurve erstellt. Anhand der Absorptionen der Standardkurve wurden die Zytokin-Konzentrationen der einzelnen Hirnlysate mit Hilfe der i-control Microplate Reader Software errechnet.

Folgende Puffer, Antikörper und Lösungen wurden verwendet:

#### IL-1β-ELISA

Blockpuffer: SuperBlock Blocking Buffer in Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS)  
*Capture*-Antikörper: Rat Anti-Mouse IL-1β (0,4 µg/ml)  
Detektions-Antikörper: Biotinylated Goat Anti-Mouse IL-1β (600 ng/ml)  
Standard: Recombinant Mouse IL-1β (720 ng/ml; davon 1,39 µl + 500 µl Reagent Diluent ergeben 2000 pg/ml)

#### IL-6-ELISA

Blockpuffer: Reagent Diluent  
*Capture*-Antikörper: Rat Anti-Mouse IL-6 (2 µg/ml)  
Detektions-Antikörper: Biotinylated Goat Anti-Mouse IL-6 (200 ng/ml)  
Standard: Recombinant Mouse IL-6 (140 ng/ml; davon 5,56 µl + 500 µl Reagent Diluent ergeben 2000 pg/ml)

TNF- $\alpha$ -ELISA

Blockpuffer: Reagent Diluent  
*Capture*-Antikörper: Goat Anti-Mouse TNF- $\alpha$  (0,8  $\mu$ g/ml)  
Detektions-Antikörper: Biotinylated Goat Anti-Mouse TNF- $\alpha$  (200 ng/ml)  
Standard: Recombinant Mouse TNF- $\alpha$  (100 ng/ml; davon 1,79  $\mu$ l  
+ 500  $\mu$ l Reagent Diluent ergeben 2000 pg/ml)

IL-10-ELISA

Blockpuffer: Reagent Diluent  
*Capture*-Antikörper: Rat Anti-Mouse IL-10 (4  $\mu$ g/ml)  
Detektions-Antikörper: Biotinylated Goat Anti-Mouse IL-10 (400 ng/ml)  
Standard: Recombinant Mouse IL-10 (100 ng/ml; davon 10  $\mu$ l  
+ 500  $\mu$ l Reagent Diluent ergeben 2000 pg/ml)

Waschpuffer: 0,05 % Tween 20 in PBS, pH 7,2 - 7,4

PBS 10x	200 ml
Ampuwa	1800 ml
Sterile Filtration	
Tween 20	1000 $\mu$ l

Reagent Diluent: 0,1 % Bovines Serumalbumin (BSA) + 0,05 % Tween 20 in TBS,  
pH 7,2-7,4

BSA	25 $\mu$ l
Tween 20	12,5 $\mu$ l
TBS	24,96 ml

Streptavidin-HRP 0,5 %:

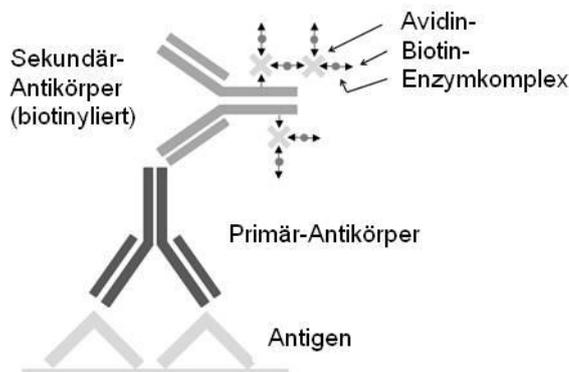
Streptavidin-HRP	50 $\mu$ l
Reagent Diluent	9950 $\mu$ l

Substratlösung: Tetramethylbenzidin (TMB)

Stopp-Lösung: Schwefelsäure (2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

## 2.8 IMMUNHISTOCHEMISCHE VERFAHREN

Mittels Immunhistochemie (IHC) lassen sich antigene Komponenten in Gewebeschnitten mit Hilfe spezifischer Antikörper mikroskopisch darstellen. Die Gewebeschnitte wurden als sogenannte „*free floating sections*“ gefärbt, das heißt, sie waren noch nicht auf Objektträger aufgezogen, sondern schwammen frei in den jeweiligen Lösungen. Erst nach der IHC wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen. Die immunhistochemische Färbung erfolgte nach der Avidin-Biotin-Methode (s. Abbildung 2.3). Bei dieser Methode bindet der Primär-Antikörper das Antigen und wird zudem selbst von einem biotinylierten Sekundär-Antikörper gebunden. Biotin bindet mit hoher Affinität an einen Avidin-Biotin-Enzymkomplex, dessen Enzym, eine Peroxidase, bei Zugabe des farblosen Substrats 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) dieses zu einem braunen Polymer polymerisiert.



**Abb. 2.3 Avidin-Biotin-Methode**

Das Antigen wird zunächst vom Primär-Antikörper und dieser anschließend vom Sekundär-Antikörper gebunden. An den Sekundär-Antikörper bindet über eine Avidin-Biotin-Bindung ein Enzymkomplex, dessen Peroxidase eine Farbreaktion katalysiert (umgesetztes Substrat nicht gezeigt).

### 2.8.1 KRYOKONSERVIERUNG

Die PFA-fixierten Hirne wurden in  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  kaltem Isopropanol für eine Minute kryokonserviert. Anschließend wurden sie bis zur Herstellung der Gewebsschnitte bei einer Temperatur von  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.8.2 HERSTELLUNG VON GEWEBESCHNITTEN

Die Schnitte von Striatum und SN der kryokonservierten Hirne wurden an einem Kryostat angefertigt. Die Kühlkammertemperatur des Kryostats betrug  $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Die Hirne wurden mit Kryoeinbettmedium (Tissue Tek O.C.T. Compound) auf der Objektplatte fixiert. Diese wurde dann in den Objektkopf eingesetzt und die linke Seite des Hirns, bei der Frontalhirn und Striatum fehlten, mit einer Nadel markiert. Mit dem Rotationsmikrotom wurden  $20\text{ }\mu\text{m}$  dicke koronare Schnitte gefertigt. Pro Tier und pro

Region standen jeweils 10 Röhrchen mit 0,02 % Natriumazid in PBS bereit, in die nacheinander jeweils ein Schnitt gegeben wurde. Der 11. Schnitt gelangte wieder ins erste Röhrchen usw. Es entstanden jeweils 10 Schnittserien der SN mit je 16 bis 19 Schnitten bzw. des Striatums mit je 9 bis 14 Schnitten und mit einem Abstand von 200 µm zueinander.

Verwendete Lösung und ihre Herstellung:

0,02 % Natriumazid in PBS:

Natriumazid	1,2 ml
PBS	6000 ml

### **2.8.3 IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON IBA-1-POSITIVEN MIKROGLIA**

Mit dem immunhistochemischen Nachweis des *Ionized calcium binding adaptor molecule 1* (Iba-1) lassen sich Mikroglia im mikroskopischen Bild darstellen. Iba-1 ist im ZNS ein spezifisches Enzym der Mikroglia und wird bei Mikroglia-Aktivierung vermehrt exprimiert. Die Iba-1-IHC wurde mit den SN-Schnitte der Saline- und MPTP-2d-Tiere durchgeführt.

Von jedem Tier wurden die Schnitte einer Schnittserie in eine Vertiefung einer 6 Well Mikrotiterplatte gegeben und in 0,1 M PBS gewaschen. Nach Inkubation mit Peroxidase-Blocklösung für 7 Minuten und zweimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden unspezifische Reaktionen durch einstündige Inkubation mit Blocklösung blockiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper Rabbit Anti-Iba-1 erfolgte über 2 Tage bei +4 °C. Nach zweimaligem Waschen in 0,1 M PBS wurde der biotinylierte Sekundär-Antikörper Goat Anti-Rabbit IgG für 60 Minuten bei Raumtemperatur zu den Schnitten gegeben. Im Anschluss wurde zweimal in 0,1 M PBS gewaschen. Die Amplifikation der Reaktion erfolgte durch Inkubation mit Avidin und Biotin für 60 Minuten. Nach einmaligem Waschen mit Waschpuffer diente DAB als Chromogen (Inkubation über 5 Minuten). Bis zum Aufziehen auf Objektträger wurden die gefärbten Schnitte in NaCl-Lösung 0,9% auf dem Schüttler gelagert. Die Schnitte wurden in anatomischer Reihenfolge auf beschichtete Objektträger aufgezogen, in aufsteigender Alkoholreihe (30 %, 70 %, 2 x 96 %, 2 x 100 %) und Xylol entwässert und mit Entellan eingedeckelt.

Verwendete Lösungen und Antikörper:

Waschpuffer: PBS 0,1 M

Peroxidase-Blocklösung:

PBS 0,1 M	77 ml
Methanol	20 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3 ml

Inkubationszeit: 7 min

Blocklösung:

PBS 0,1 M	50 ml
Normal Goat Serum	2000 µl
BSA	0,5 g
Triton	0,2 g

Inkubationszeit: 60 min

1. Antikörper:

Rabbit Anti-Iba-1	8 µl
Blocklösung	7992 µl

Inkubationszeit: 48 h (+4 °C)

2. Antikörper:

Biotinylated Goat Anti-Rabbit	40 µl
Blocklösung	9960 µl

Inkubationszeit: 60 min

Avidin-Biotin-Lösung:

Avidin	160 µl
Biotin	160 µl
PBS 0,1 M	20 ml

Inkubationszeit: 60 min

Substrat-Lösung:

Gelöstes DAB (1 Flasche/50 ml Ampuwa)	25 ml
PBS 0,2 M	25 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 %	8 µl

Inkubationszeit: 5 min

Die histologische Auswertung und Auszählung der Iba-1-positiven Mikroglia erfolgte am Nikon Eclipse 80i-Mikroskop mit Hilfe der Software NIS Elements BR. Pro Tier wurden fünf durch die SNpc ziehende Schnitte ausgezählt. Dazu wurden die Schnitte zunächst in der 1,25- und 4-fachen Vergrößerung betrachtet und die SNpc-Region bestimmt. Von den fünf ausgewählten Schnitten pro Tier wurden in 10-facher Vergröße-

nung digitale Bildaufnahmen der SN-Region mit der DS-2M-Digitalkamera erstellt. Die Nikon Imaging Software erlaubte das Zählen der Mikroglia und die Übertragung der Daten in eine Excel-Tabelle zur weiteren Auswertung.

#### **2.8.4 IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS DER TH-POSITIVEN NEURONE**

Eine Möglichkeit, dopaminerge Neurone mikroskopisch darzustellen, ist der immunhistochemische Nachweis der TH. Im Gehirn ist dieses Enzym spezifisch für dopaminerge Neurone. Für die TH-IHC wurden Hirnschnitte der SN von den Saline- und MPTP-7d-Tieren verwendet.

Von jedem Tier wurden die Schnitte einer Schnittserie in eine Vertiefung einer 6-Well Mikrotiterplatte gegeben und in 0,1 M PBS gewaschen. Nach Inkubation mit Peroxidase-Blocklösung für 5 Minuten und Waschen mit Waschpuffer wurden unspezifische Reaktionen durch Inkubation mit Blocklösung für 30 Minuten unterbunden. Nach Waschen in 0,1 M PBS wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper Rabbit Anti-TH über Nacht bei +4 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen in 0,1 M PBS wurde der biotinylierte Sekundär-Antikörper Goat Anti-Rabbit IgG für 40 Minuten zu den Schnitten gegeben. Im Anschluss wurden die Schnitte in 0,1 M PBS gewaschen. Die Amplifikation der Reaktion erfolgte durch Inkubation mit Avidin und Biotin für 60 Minuten. Nach Waschen mit Waschpuffer erfolgte die Inkubation mit dem Chromogen DAB für 5 Minuten. Bis zum Aufziehen auf Objektträger wurden die gefärbten Schnitte in NaCl-Lösung 0,9% auf dem Schüttler gelagert. Die Schnitte wurden in anatomischer Reihenfolge auf beschichtete Objektträger aufgezogen, in aufsteigender Alkoholreihe (30 %, 70 %, 2x 96 %, 2x 100 %) und Xylol entwässert und mit Entellan eingedeckelt.

Verwendete Lösungen und Antikörper:

Waschpuffer: PBS 0,1 M

Peroxidase-Blocklösung:

PBS 0,1 M

Methanol

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Inkubationszeit: 5 min

77 ml

20 ml

3 ml

Blocklösung:

PBS 0,1 M

BSA

Inkubationszeit: 30 min

100 ml

4 g

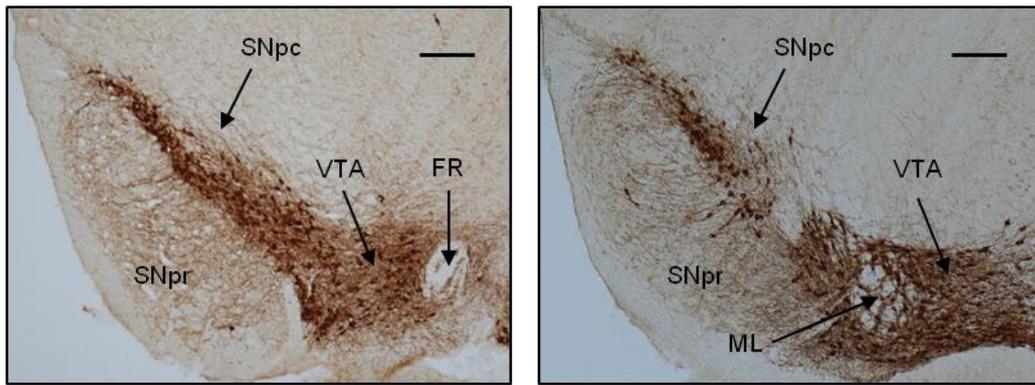
<u>1. Antikörper:</u>	Inkubation über Nacht (+4 °C)
Rabbit Anti-TH	100 µl
Thimerosal 0,02 % gelöst in PBS 0,1 M	100 ml
Triton	10 µl

<u>2. Antikörper:</u>	Inkubationszeit: 40 min
Biotinylated Goat Anti-Rabbit	80 µl
PBS 0,1 M	20 ml

<u>Avidin-Biotin-Lösung:</u>	Inkubationszeit: 60 min
Avidin	160 µl
Biotin	160 µl
PBS 0,1 M	20 ml

<u>Substrat-Lösung:</u>	Inkubationszeit: 5 min
Gelöstes DAB (1 Flasche/50 ml Ampuwa)	25 ml
PBS 0,2 M	25 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 %	8 µl

Die histologische Auswertung der TH-IHC erfolgte mit dem System Computer Assisted Stereological Toolbox (CAST; Visiopharm Integrator System). Das optische Bild des Olympus BX51-Mikroskops wurde in 1,25-facher Vergrößerung von der Olympus DP72-Kamera digitalisiert. Mit Hilfe der Software wurde das Hirnareal zur Auszählung, die SNpc, in jedem Schnitt mit einer Markierungslinie umrandet. In jedem markierten Areal wurden in 40-facher Vergrößerung alle TH-positiven Zellen der SNpc gezählt. Dazu wurde das Areal vom System in kleine Rechtecke (*Samples*) unterteilt, welche dann einzeln auf dem Bildschirm zur Auszählung erschienen. Das Zählen erfolgte per Mausklick und Markierung jeder einzelnen Zelle. Es wurden lediglich die TH-positiven Zellen der SNpc gezählt und nicht des VTA, welches medial der SNpc liegt (s. Abbildung 2.4). Zur Orientierung dienten der Hirnatlas von Paxinos und Franklin („*The Mouse Brain in Stereotaxis Coordinates*“) (113) sowie anatomische Orientierungspunkte wie der Fasciculus retroflexus (Meynert-Bündel) und der mediale Lemniscus. Pro Tier wurden so im Durchschnitt 9,5 Schnitte ausgezählt.



**Abb. 2.4 Histologische Auswertung TH-positiver Zellen der SNpc**

Mikrofotografien der Substantia nigra pars compacta (SNpc) mit TH-positiven Neuronen im Koronarschnitt. Das linke Bild zeigt einen Schnitt durch die SNpc auf Höhe des Fasciculus retroflexus (FR; Meynert-Bündel). Das rechte Bild zeigt einen weiter okzipital gelegenen Schnitt, der den medialen Lemniscus (ML), eine aufgelockerte Struktur, die die SNpc vom ventralen tegmentalen Areal (VTA) trennt, darstellt. Lateral zur SNpc befindet sich die Substantia nigra pars reticularis (SNpr). Vergrößerung: 4x; Maßstabsleiste: 200  $\mu\text{m}$ .

## 2.9 HPLC

Der Neurotransmitter Dopamin sowie seine Metaboliten HVA und DOPAC lassen sich mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und elektrochemischer Detektion nachweisen. Hierbei handelt es sich um eine physikalische Methode, bei der eine Stofftrennung durch Verteilung zwischen einer stationären und einer mobilen Phase erfolgt. Durchgeführt wurde die HPLC als Umkehrphase-Chromatographie sowie unter isokratischen Bedingungen. Dies bedeutet, dass die mobile Phase polarer als die stationäre Phase war und ihre Zusammensetzung – anders als bei der Gradiententrennung – während der gesamten Zeit konstant blieb.

Die bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten Striata wurden zunächst für einige Minuten auf Eis gelagert, um die Temperatur zu erhöhen. Anschließend wurden sie für jeweils 10 Sekunden mit dem Sonifier homogenisiert. Nach 15 Minuten Ruhenlassen auf Eis wurden die Tubes 20 Minuten lang bei  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert (13000 g). Anschließend wurde der Überstand abgenommen und durch eine Polyester-Membran mit  $74\text{ }\mu\text{m}$  Maschenweite filtriert. Jeweils  $20\text{ }\mu\text{l}$  Überstand wurden durch den Autosampler GINA 50 bei  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  injiziert und mittels der mobilen Phase bei einer Flussgeschwindigkeit von  $0,5\text{ ml/min}$  und einem Druck von 125 bar mit Hilfe der M 300 Pumpe über die stationäre Phase transportiert. Das Signal wurde elektrochemisch mit dem Detektor BAS LC 4B ermittelt. Die Gehaltsbestimmung der jeweiligen Substanz erfolgte über eine externe 7-Punkt-Kalibrierung aus der Fläche unter dem *Peak* mit Hilfe der Software Chromeleon 6.20. Vor jeder Messreihe fand eine Kalibrierung mit je  $20\text{ }\mu\text{l}$  Eichlösung (Dopamin, DOPAC bzw. HVA) der entsprechenden Konzentrationen statt. Das Detektionsminimum betrug  $5 \times 10^{-10}\text{ mol/l}$ . Die Analyse dauerte 20 Minuten.

Mobile Phase:

Oktansulfonsäure (Natriumsalz)	0,14 g
Na <sub>2</sub> -Ethyldiamintetraacetat (Na <sub>2</sub> EDTA)	0,1 g
Triethylamin	6 ml
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	<i>q.s. ad</i> pH 2,8
Acetonitril	35 ml
Milli-Q ddH <sub>2</sub> O	<i>q.s. ad</i> 1 l

Stationäre Phase:

Vertex 125 x 3 mm mit Vorsäule 5 x 3 mm, Nucleosil 120-3 C18

Eigenschaften des Detektors BAS LC 4B:

Arbeitselektrode: Glassy Carbon

Referenzelektrode: Ag/AgCl

Detektorempfindlichkeit: 1 nA/V

Oxidationspotential: 750 mV

Temperatur der Messzelle: +22 °C

## 2.10 MATERIAL

Es werden die jeweiligen Hersteller und falls verfügbar die CAS-Nummer bereitgestellt.

### 2.10.1 APPLIZIERTE SUBSTANZEN

Isotone NaCl-Lösung 0,9 %	Berlin Chemie AG, Berlin	7647-14-5
Mecamylamin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim	826-39-1
MPTP-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim	28289-54-5
PNU-282987	Sigma-Aldrich, Steinheim	123464-89-1

### 2.10.2 CHEMIKALIEN

3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich, Steinheim	868272-85-9
Acetonitril	Carl Roth, Karlsruhe	75-05-8
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H.	7732-18-5
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector, Burlingame, USA	-
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim	9048-46-8
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablet	Roche Diagnostics, Mannheim	-
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim	67-68-5
Dinatriumphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; wasserfrei)	Carl Roth, Karlsruhe	7558-79-4
Eau de Javel Bleichmittel	Floreal Haagen, Saarbrücken	-
Entellan® Neu	Merck, Darmstadt	-
Ethanol absolut	J.T. Baker, Deventer, NL	64-17-5
Isopropanol	Merck, Darmstadt	67-63-0
Isotone NaCl-Lösung 0,9 %	Berlin Chemie AG, Berlin	7647-14-5
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe	7447-40-7
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck, Darmstadt	7778-77-0
Leica Cryofect	Leica Microsystems, Nussloch	-
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim	67-56-1
Milli-Q ddH <sub>2</sub> O	Eigene Herstellung	7732-18-5
Na <sub>2</sub> -Ethylendiamintetraacetat ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )	Sigma-Aldrich, Steinheim	-
Natriumazid $\geq 99$ %, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe	26628-22-8
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim	7647-14-5
Natronlauge (NaOH; 1 M)	AppliChem, Darmstadt	1310-73-2
Normal Goat Serum	Vector, Burlingame, USA	-

Octansulfonsäure (Natriumsalz)	Sigma-Aldrich, Steinheim	5324-84-5
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth, Karlsruhe, D	30525-89-4
Perchlorsäure	Merck, Darmstadt	7601-90-3
Phosphorsäure (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl-Roth, Karlsruhe	7664-38-2
Salzsäure (HCl) rauchend 37 %	Carl Roth, Karlsruhe	7647-01-0
Schwefelsäure (2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe	7664-93-9
Sucrose	Sigma-Aldrich, Steinheim	57-50-1
SuperBlock Blocking Buffer	Pierce Biotechnology, Rockford, USA	-
Thimerosal	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim	54-64-8
Tissue Tek O.C.T. Compound	Sakura Finetek, Staufen	-
Tetramethylbenzidin (TMB)	Calbiochem, Merck, Darmstadt	54827-17-7
T-Per	Pierce Biotechnology, Rockford, USA	-
Triethylamin	Sigma-Aldrich, Steinheim	121-44-8
Triton	Carl Roth, Karlsruhe	9002-93-1
Trizma® Base	Sigma-Aldrich, Steinheim	77-86-1
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe	9005-64-5
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 30 %	Merck, Darmstadt	7722-84-1
Xylol	J.T. Baker, Deventer, NL	1330-20-7

### 2.10.3 PUFFER

#### Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS): Stammlösung 10x

NaCl	800 g
KCl	20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (wasserfrei)	144 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	24 g
Milli-Q ddH <sub>2</sub> O	q.s. ad 10 l
NaOH	q.s. ad pH 7,4

Für den Gebrauch wurde die Stammlösung 1:10 mit Milli-Q ddH<sub>2</sub>O verdünnt.

#### Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS):

Trizma® Base	2,42 g
NaCl	8,76 g
Milli-Q ddH <sub>2</sub> O	q.s. ad 1000 ml
HCl	q.s. ad pH 7,6

#### 2.10.4 ANTIKÖRPER UND KITS

Duo Set ELISA Development System                      R&D Systems, Minneapolis, USA

##### Mouse IL-1 $\beta$ /IL-1F2 (DY 402)

*Capture*-Antikörper: Rat Anti-Mouse IL-1 $\beta$  (Part 840134)

Detektions-Antikörper: Biotinylated Goat Anti-Mouse IL-1 $\beta$  (Part 840135)

Standard: Recombinant Mouse IL-1 $\beta$  (Part 840136)

Streptavidin-HRP (Part 890803)

##### Mouse IL-6 (DY 406)

*Capture*-Antikörper: Rat Anti-Mouse IL-6 (Part 840171)

Detektions-Antikörper: Biotinylated Goat Anti-Mouse IL-6 (Part 840172)

Standard: Recombinant Mouse IL-6 (Part 840173)

Streptavidin-HRP (Part 890803)

##### Mouse TNF- $\alpha$ (DY410)

*Capture*-Antikörper: Rat Anti-Mouse TNF- $\alpha$  (Part 840143)

Detektions-Antikörper: Biotinylated Goat Anti-Mouse TNF- $\alpha$  (Part 840144)

Standard: Recombinant Mouse TNF- $\alpha$  (Part 840145)

Streptavidin-HRP (Part 890803)

##### Mouse IL-10 (DY417)

*Capture*-Antikörper: Rat Anti-Mouse IL-10 (Part 840125)

Detektions-Antikörper: Biotinylated Goat Anti-Mouse IL-10 (Part 840126)

Standard: Recombinant Mouse IL-10 (Part 840127)

Streptavidin-HRP (Part 890803)

Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG                      Vector Laboratories, Peterborough, UK

Rabbit Anti-Iba-1    Wako Chemicals, Neuss

Rabbit Anti-TH    Peel Freez Biologicals, Rogers, USA

#### 2.10.5 REFERENZSUBSTANZEN FÜR HPLC-EICHLÖSUNGEN

3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC)	Sigma-Aldrich, Steinheim	102-32-9
Dopamin (DA)	Sigma-Aldrich, Steinheim	51-61-6
Homovanillinsäure (HVA)	Sigma-Aldrich, Steinheim	306-08-1

### 2.10.6 VERBRAUCHSMATERIALIEN

1,5 ml Micro-Tubes	Sarstedt, Nümbrecht
5 ml Röhren 75 x 12 mm PS mit Stopfen	Sarstedt, Nümbrecht
6 Well Microplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Deckgläser 24 x 60 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Einmalskalpell	B. Braun, Melsungen
Eppendorf Protein LoBind Tubes (0,5 + 1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Filterpapier	Whatman, Dassel
Fine-Ject Einmalkanülen 0,9 x 40 mm	Henke Sass Wolf, Tuttlingen
Glaspipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
HSW Norm-Ject® Einmalspritzen 1 ml TBC	Henke Sass Wolf, Tuttlingen
IWAKI ELISA-Microplatten 96 Well	Iwaki, Tokio, J
Netwell Inserts 24 mm Polystyren, 74 µm Maschenweite Polyester-Membran	VWR International, Darmstadt
Objekträger SuperFrost® Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm M Laboratory Film	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pasteur-Pipetten Glas 230 mm ungestopft	VWR International, Darmstadt
Pipettenspitzen 46 mm, 53 mm, 71 mm	Eppendorf, Hamburg
Präparatgläser mit Gewinde, 15 ml, 45 x 27 mm	Kobe, Marburg

### 2.10.7 GERÄTE

Accu-Jet pro	Brand, Wertheim
BAS LC 4B Detektor	Bioanalytical Systems, West Lafayette, USA
Biofuge Stratos Highspeed Table Top Zentrifuge	Heraeus Instruments, Osterode
Biotrak II Plate Washer	Amersham Biosciences, Freiburg
Branson Sonifier Cell Disruptor B15	Heinemann, Schwäbisch-Gmünd
Dell Precision T3400 PC	Dell, Round Rock, USA
Digitales pH-Meter pH525	WTW, Weilheim
DS-2M Digitalkamera	Nikon, Tokio, J
Eppendorf Research Pipetten 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Esprimo PC	Fujitsu Siemens, München
GINA 50 Autosampler	Gynkotec, Germering
Infinite 200 Microplate Reader	Tecan, Crailsheim

Leica CM1850 Kryostat	Leica Microsystems, Nussloch
M 300 Pumpe	Gynkotec, Germering
MAC 6000 Systems	Ludl, Hawthorne, USA
Milli-Q Wasseraufbereitungssystem	Millipore, Eschborn
Mörser und Pistill	Kobe, Marburg
MXX-2001 Waage	Denver Instrument, Göttingen
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
Nikon Eclipse 80i	Nikon, Tokio, J
Olympus BX51 Mikroskop	Olympus, Hamburg
Olympus DP72 Kamera	Olympus, Hamburg
Pipetus Pipettierhilfe	Hirschmann, Eberstadt
Process control unit Rotarod 3375	TSE Systems, Bad Homburg
Rotarod 3375-4R (+ Walze für 4 Mäuse)	TSE Systems, Bad Homburg
SI-403 Waage	Denver Instrument, Göttingen
ST5 Wipp-Schüttler	Cat, Staufen
Terra PC	Wortmann, Hüllhorst
Ultra-Low Temperature V.I.P. Freezer	Sanyo Electric, Gunma, J
Universal-Thermometer „Maxi-T“	Kobe, Marburg
Vertex 125 x 3 mm mit Vorsäule 5 x 3 mm, Nucleosil 120-3 C18	Knauer, Berlin
Vortex-Schüttler	VWR International, Darmstadt
XY Digipot Joystick	Ludl, Hawthorne, USA
 <b>2.10.8 SOFTWARE</b>	
CAST (Visiopharm Integrator System Version 3.0.15.0)	Visiopharm, Hørsholm, DK
Chromeleon 6.20	Dionex, Germering
IBM SPSS Statistics 19.0	IBM, Chicago, USA
i-control Microplate Reader Software	Tecan, Crailsheim
Microsoft Office Excel 2007	Microsoft Corp., Redmond, USA
NIS Elements Br (Nikon Imaging Software)	Nikon, Tokio, J
TSE-Rota-Rod V 2.6 Software	TSE Systems, Bad Homburg

## 2.11 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) aus n Tieren angegeben. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm IBM SPSS Statistics 19.0. Die Daten wurden zunächst mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung untersucht. Bei vorliegender Normalverteilung wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Mit dem Levene-Test wurde auf Varianzhomogenität geprüft. War diese gegeben, wurden die Daten mit dem Post-Hoc-Test nach Tukey ausgewertet. Bei Daten, die nicht varianzhomogen waren, wurde der Post-Hoc-Test nach Games-Howell angewandt. Nicht-normalverteilte Daten wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney-U-Test ausgewertet. Der Vorher-Nachher-Vergleich der Rotarod-Daten erfolgte mit dem  $t$ -Test für gepaarte Stichproben. Als Signifikanzniveau wurde  $p \leq 0,05$  festgelegt. Signifikante Unterschiede zwischen einer MPTP- und ihrer Kontrollgruppe wurden mit einem Stern (\*), solche innerhalb der Kontrollgruppen oder innerhalb der MPTP-Gruppen mit einem Doppelkreuz (#) gekennzeichnet.

Als Basiswert für die Bewertung sämtlicher Parameter dienten die nur mit NaCl-Lösung 0,9 % behandelten Kontrolltiere (Saline/Saline); ihr Wert wurde entsprechend auf 100 % gesetzt. Die Wirkungen der getesteten Substanzen PNU-282987 und Mecamylamin auf Neuroinflammation und Neurodegeneration wurden darüber hinaus im Verhältnis zur entsprechenden MPTP-Wirkung bewertet, also der Differenz der Mittelwerte der MPTP/Saline-Gruppe und der Kontrollgruppe. Hat eine Substanz beispielsweise anti-inflammatorisch gewirkt, so stieg die Zytokin-Konzentration weniger stark an; es kam zu einer Reduktion des Anstiegs. Die Reduktion des Anstiegs bzw. der Senkung (hier bezeichnet mit X) ließ sich mit folgender Formel berechnen:

$$X = \frac{(\text{MPTP/Substanz} - \text{Saline/Saline}) - (\text{MPTP/Saline} - \text{Saline/Saline})}{(\text{MPTP/Saline} - \text{Saline/Saline})}$$

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 TIERVERHALTEN

##### 3.1.1 ALLGEMEINES TIERVERHALTEN

Alle Tiere überlebten das zwei bis sieben Tage andauernde Experiment. Tiere, denen MPTP appliziert worden war, wiesen nach Intoxikation die in der Literatur beschriebenen körperlichen Symptome wie struppiges Fell, Zittern und Hypokinese auf, welche für maximal 24 Stunden anhielten.

##### 3.1.2 ROTAROD

Anhand des Rotarod-Tests wurden die motorische Koordination und das Gleichgewicht der Versuchstiere gezielt untersucht. Der Rotarod-Test fand sowohl vor als auch sechs Tage nach Behandlung mit MPTP und den zu testenden Substanzen statt. Zu diesem Zeitpunkt war mit einem voll ausgeprägten MPTP-induzierten dopaminergen Zelluntergang und folglich mit motorischen Veränderungen zu rechnen. Getestet wurden die Saline-Tiere und die MPTP-7d-Tiere. Die Ergebnisse wurden auf mögliche Unterschiede vor und nach der Behandlung untersucht. Zudem wurden die Behandlungsgruppen untereinander verglichen.

Die motorische Koordination der Tiere, gemessen als Aufenthaltszeit auf dem rotierenden Drehstab sowie als Anzahl der Aufsetzversuche, zeigte keine signifikanten Unterschiede. Alle Tiere erreichten sowohl vor als auch nach der Behandlung die Zielzeit von 120 Sekunden. Dabei wurden ihnen fünf Aufsetzversuche gewährt. Die Anzahl der Aufsetzversuche (s. Tabelle 3.1) unterschied sich weder im Vergleich der Gruppen untereinander noch beim Vergleich der verbundenen Stichproben vor und nach der Behandlung signifikant.

**Tabelle 3.1 Anzahl der Aufsetzversuche im Rotarod-Versuch**

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) der Saline-Tiere (n = 6) und der MPTP-7d-Tiere (n = 8) sowohl vor (prae) als auch 6 Tage nach (post) der Behandlung mit MPTP und der entsprechenden Substanz.

	Saline		MPTP	
	prae	post	prae	post
<b>Saline</b>	1,83 ( $\pm$ 0,6)	1,50 ( $\pm$ 0,31)	3,13 ( $\pm$ 0,78)	2,13 ( $\pm$ 0,45)
<b>Mecamylamin</b>	2,17 ( $\pm$ 0,37)	2,33 ( $\pm$ 0,45)	2,13 ( $\pm$ 0,51)	1,38 ( $\pm$ 0,35)
<b>PNU-278987</b>	1,33 ( $\pm$ 0,19)	1,50 ( $\pm$ 0,31)	2,63 ( $\pm$ 0,53)	1,38 ( $\pm$ 0,17)

### 3.2 NEUROINFLAMMATION

Um das Ausmaß der Neuroinflammation nach akuter MPTP-Intoxikation und Behandlung mit den zu testenden Substanzen zu beurteilen, wurden die Zytokin-Konzentrationen im Striatum sowie die Mikroglia-Anzahl in der SNpc bestimmt. Die zu den Zytokinen zählenden Interleukine gelten als Botenstoffe der Immunzellen und werden im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion vermehrt ausgeschüttet. IL-1 $\beta$  und IL-6 zählen zu den pro-inflammatorischen Zytokinen. IL-10 besitzt anti-inflammatorische Eigenschaften. TNF- $\alpha$  zählt ebenfalls zu den pro-inflammatorischen Zytokinen und ist an der Regulierung der Aktivität verschiedener Immunzellen beteiligt. Mikroglia gelten als die Makrophagen und die einzigen immunkompetenten Zellen des ZNS. Bei Schädigung beispielsweise dopaminerger Neurone in der SNpc – hier ist die Mikroglia-Dichte am höchsten – kommt es zur Mikroglia-Aktivierung, zur Zunahme der Mikroglia-Anzahl und zur erhöhten Zytokinausschüttung.

Zur Beurteilung des Ausmaßes der Neuroinflammation wurden neben den Kontrolltieren die MPTP-2d-Tiere untersucht. An Tag 2 nach MPTP-Intoxikation war mit einer maximalen Ausprägung der Mikroglia-Aktivierung und folglich der Neuroinflammation zu rechnen (64, 90).

#### 3.2.1 ZYTOKIN-KONZENTRATIONEN

Die Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  sowie des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 im Striatum wurden mittels Sandwich-ELISA-Methode bestimmt.

##### 3.2.1.1 INTERLEUKIN-1 $\beta$

Die durchschnittlichen Konzentrationen des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  im Striatum der einzelnen Behandlungsgruppen werden in Tabelle 3.2 aufgeführt.

**Tabelle 3.2 Striatale IL-1 $\beta$ -Konzentration**

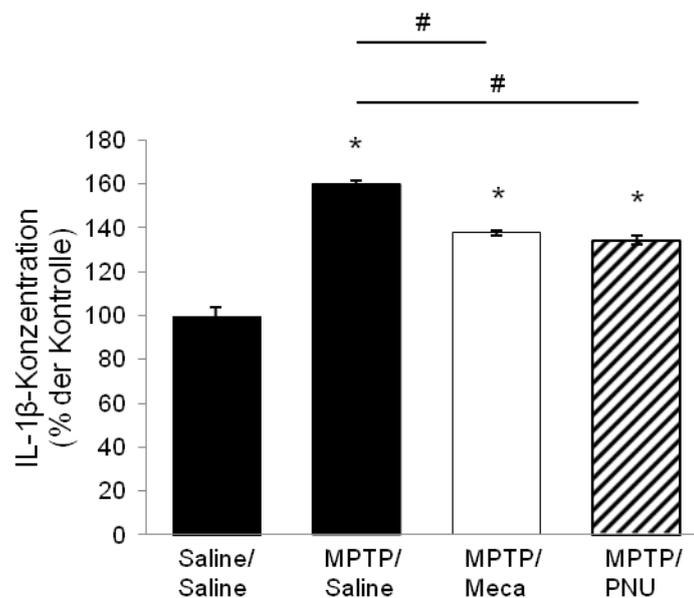
Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) in pg/ml der Saline/Saline-Tiere sowie der MPTP-2d-Tiere an Tag 2 nach MPTP-Intoxikation (n = 6).

	<b>Saline</b>	82,26 ( $\pm$ 3,28)
<b>MPTP</b>	<b>Saline</b>	131,50 ( $\pm$ 1,62)
	<b>Mecamylamin</b>	113,29 ( $\pm$ 1,07)
	<b>PNU-282987</b>	110,49 ( $\pm$ 1,60)

Die Kontrolltiere wiesen im Mittel eine IL-1 $\beta$ -Konzentration von  $82,26 \pm 3,28$  pg/ml auf ( $100 \pm 3,99$  %). MPTP führte an Tag 2 nach Intoxikation zu einem signifikanten Anstieg der striatalen IL-1 $\beta$ -Konzentration auf  $159,86 \pm 1,97$  %.

Nach zusätzlicher Gabe von PNU-282987 reduzierte sich die IL-1 $\beta$ -Konzentration auf  $134,32 \pm 1,95$  % ( $p \leq 0,001$ ); dies entspricht einer Reduktion des Konzentrationsanstiegs um 42,67 %. Die Tiere, die mit Mecamylamin behandelt wurden, wiesen eine ebenfalls erniedrigte IL-1 $\beta$ -Konzentration von  $137,72 \pm 1,3$  % auf ( $p \leq 0,001$ ). Mecamylamin führte entsprechend zu einem um 36,98 % reduzierten Anstieg der IL-1 $\beta$ -Konzentration. Im Vergleich zu den Kontrolltieren waren die IL-1 $\beta$ -Spiegel der MPTP/PNU-282987- und der MPTP/Mecamylamin-Tiere weiterhin signifikant erhöht.

Sowohl die Gabe des  $\alpha 7$ -nACh-Agonisten PNU-282987 als auch des nACh-Antagonisten Mecamylamin reduzierte den durch MPTP induzierten IL-1 $\beta$ -Anstieg signifikant. Abbildung 3.1 fasst die Ergebnisse zusammen.



**Abb. 3.1 Striatale IL-1 $\beta$ -Konzentration**

Striatale IL-1 $\beta$ -Konzentration an Tag 2 nach akuter MPTP-Intoxikation und Behandlung mit PNU-282987 (PNU) bzw. Mecamylamin (Meca). Die Striata wurden an Tag 2 nach MPTP-Intoxikation entnommen. Die IL-1 $\beta$ -Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA und Post-Hoc-Test nach Games-Howell (\* $p \leq 0,05$ : MPTP-behandelte Gruppen verglichen mit Kontrolle; # $p \leq 0,05$ : MPTP-behandelte Gruppen untereinander verglichen; n = 6).

**3.2.1.2 INTERLEUKIN-6**

Die durchschnittlichen striatalen IL-6-Konzentrationen sind in Tabelle 3.3 angegeben.

**Tabelle 3.3 Striatale IL-6-Konzentration**

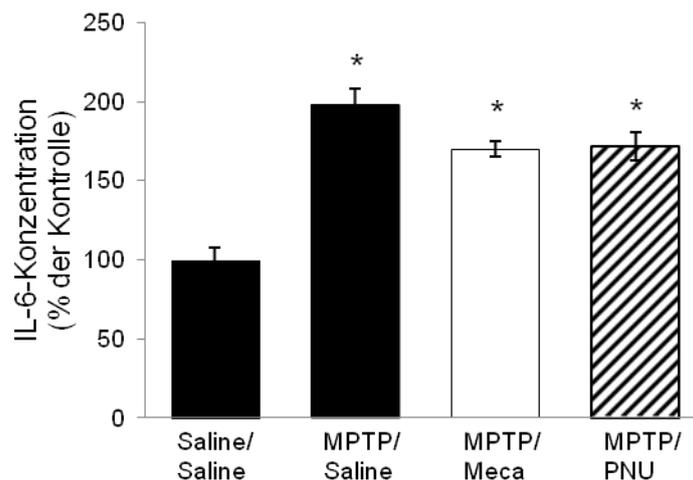
Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) in pg/ml der Saline/Saline-Tiere sowie der MPTP-2d-Tiere an Tag 2 nach MPTP-Intoxikation (n = 6).

	<b>Saline</b>	29,45 ( $\pm$ 2,23)
<b>MPTP</b>	<b>Saline</b>	58,29 ( $\pm$ 2,91)
	<b>Mecamylamin</b>	50,10 ( $\pm$ 1,47)
	<b>PNU-282987</b>	50,55 ( $\pm$ 2,55)

Die Kontrolltiere wiesen eine mittlere striatale IL-6-Konzentration von  $29,45 \pm 2,23$  pg/ml ( $100 \pm 7,57$  %) auf. Zwei Tage nach MPTP-Intoxikation kam es zu einer signifikanten Zunahme der IL-6-Konzentration um  $97,93 \pm 9,88$  %.

PNU-282987 reduzierte die IL-6-Konzentration auf  $171,65 \pm 8,66$  % nicht signifikant (n.s.,  $p = 0,178$ ). Die Reduktion des Konzentrationsanstiegs durch PNU-282987 betrug  $26,84$  %. Mecamylamin reduzierte die IL-6-Konzentration auf  $170,12 \pm 4,99$  % (n.s.,  $p = 0,143$ ), entsprechend einem um  $28,4$  % reduzierten Konzentrationsanstieg. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren die IL-6-Spiegel der MPTP/PNU-282987- und der MPTP/Mecamylamin-Tiere weiterhin signifikant erhöht.

Die Reduktion des MPTP-induzierten IL-6-Anstiegs durch PNU-282987 bzw. Mecamylamin war nicht signifikant und nur als Trend beobachtbar (s. Abbildung 3.2).



**Abb. 3.2 Striatale IL-6-Konzentration**

Striatale IL-6-Konzentration an Tag 2 nach akuter MPTP-Intoxikation und Behandlung mit PNU-282987 (PNU) bzw. Mecamylamin (Meca). Die Striata wurden an Tag 2 nach MPTP-Intoxikation entnommen. Die IL-6-Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA und Post-Hoc-Test nach Tukey (\* $p \leq 0,05$ ; MPTP-behandelte Gruppen verglichen mit Kontrolle; n = 6).

**3.2.1.3 TUMORNEKROSEFAKTOR- $\alpha$**

Die mittleren striatalen TNF- $\alpha$ -Konzentrationen sind in Tabelle 3.4 dargestellt.

**Tabelle 3.4 Striatale TNF- $\alpha$ -Konzentration**

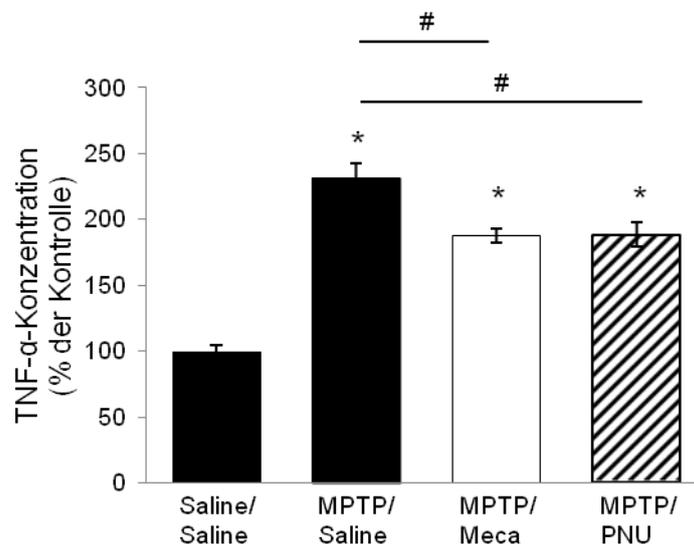
Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) in pg/ml der Saline/Saline-Tiere sowie der MPTP-2d-Tiere an Tag 2 nach MPTP-Intoxikation (n = 6).

		Saline	74,93 ( $\pm$ 3,12)
MPTP	Saline	173,41 ( $\pm$ 8,28)	
	Mecamylamin	140,82 ( $\pm$ 4,01)	
	PNU-282987	141,26 ( $\pm$ 6,66)	

Die Kontrolltiere wiesen im Durchschnitt eine striatale TNF- $\alpha$ -Konzentration von 74,93  $\pm$  3,12 pg/ml (100  $\pm$  4,16 %) auf. MPTP führte an Tag 2 nach Intoxikation zu einer Zunahme der TNF- $\alpha$ -Konzentration auf 231,43  $\pm$  11,05 % ( $p \leq 0,001$ ).

Die zusätzliche Gabe von PNU-282987 führte zu einem um 32,65 % reduzierten Zytokinanstieg auf 188,52  $\pm$  8,89 % ( $p = 0,011$ ). Mecamylamin senkte den IL-6-Spiegel ebenfalls signifikant auf 187,94  $\pm$  5,35 % (Reduktion des Anstiegs um 33,09 %). Im Vergleich zu den Kontrollen waren beide Werte weiterhin signifikant erhöht.

Sowohl der  $\alpha 7$ -nACh-Agonist als auch der nACh-Antagonist reduzierten den durch MPTP induzierten TNF- $\alpha$ -Anstieg signifikant (s. Abbildung 3.3).



**Abb. 3.3 Striatale TNF- $\alpha$ -Konzentration**

Striatale TNF- $\alpha$ -Konzentration an Tag 2 nach akuter MPTP-Intoxikation und Behandlung mit PNU-282987 (PNU) bzw. Mecamylamin (Meca). Die Striata wurden an Tag 2 nach MPTP-Intoxikation entnommen. Die TNF- $\alpha$ -Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA und Post-Hoc-Test nach Tukey (\* $p \leq 0,05$ : MPTP-behandelte Gruppen verglichen mit Kontrolle; # $p \leq 0,05$ : MPTP-behandelte Gruppen untereinander verglichen; n = 6).

**3.2.1.4 INTERLEUKIN-10**

Tabelle 3.5 stellt die durchschnittlichen Konzentrationen des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 im Striatum der einzelnen Behandlungsgruppen dar.

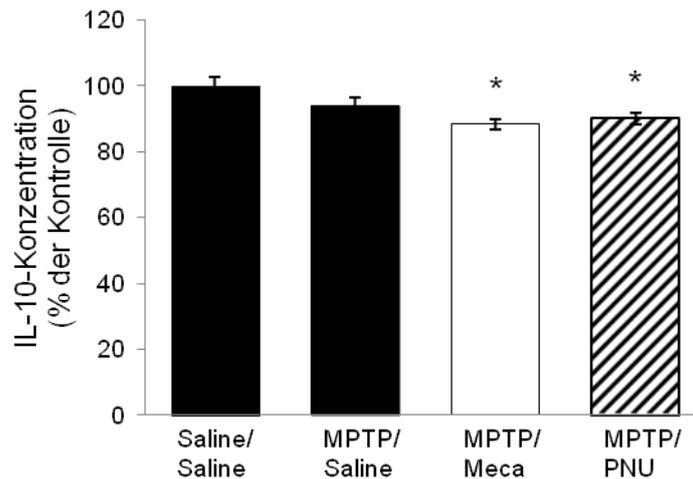
**Tabelle 3.5 Striatale IL-10-Konzentration**

Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) in pg/ml der Saline/Saline-Tiere sowie der MPTP-2d-Tiere an Tag 2 nach MPTP-Intoxikation (n = 6).

	<b>Saline</b>	327,58 ( $\pm$ 9,08)
<b>MPTP</b>	<b>Saline</b>	308,12 ( $\pm$ 7,97)
	<b>Mecamylamin</b>	289,23 ( $\pm$ 4,59)
	<b>PNU-282987</b>	295,18 ( $\pm$ 5,43)

Die IL-10-Konzentration der Kontrolltiere betrug  $327,58 \pm 9,08$  pg/ml ( $100 \pm 2,77$  %). MPTP führte zu keiner signifikanten Änderung der striatalen IL-10-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle ( $94,06 \pm 2,43$  %).

PNU-282987 und auch Mecamylamin führten bei MPTP-intoxikierten Tieren ebenfalls zu keiner signifikanten Änderung des IL-10-Spiegels. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen jedoch waren die Werte der MPTP/PNU-282987-Tiere ( $90,11 \pm 1,66$  %;  $p = 0,034$ ) sowie der MPTP/Mecamylamin-Tiere ( $88,29 \pm 1,4$  %;  $p = 0,01$ ) reduziert. Abbildung 3.4 fasst die Ergebnisse zusammen.



**Abb. 3.4 Striatale IL-10-Konzentration**

Striatale IL-10-Konzentration an Tag 2 nach akuter MPTP-Intoxikation und Behandlung mit PNU-282987 (PNU) bzw. Mecamylamin (Meca). Die Striata wurden an Tag 2 nach MPTP-Intoxikation entnommen. Die IL-10-Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA und Post-Hoc-Test nach Tukey (\* $p \leq 0,05$ : MPTP-behandelte Gruppen verglichen mit Kontrollen; n = 6).

### 3.2.2 MIKROGLIA-AKTIVIERUNG

Iba-1 stellt ein spezifisches Enzym der Mikroglia dar, welches bei Mikroglia-Aktivierung vermehrt von den Zellen exprimiert wird. Iba-1-positive Mikroglia lassen sich immunhistochemisch nachweisen.

Die Anzahl Iba-1-positiver Mikroglia der SNpc wurde in 10-facher Vergrößerung am Mikroskop und mit Hilfe der Software Nis Elements BR bestimmt. Pro Tier wurden fünf durch die SNpc ziehende Hirnschnitte einer Schnittserie ausgezählt und die durchschnittliche Mikroglia-Anzahl bestimmt. Aufgrund von technischen Fehlern im Herstellungsprozess der Hirnschnitte bzw. bei Durchführung der Iba-1-IHC konnten zwei Tiere der MPTP-2d/Saline-Gruppe nicht ausgewertet werden. In Tabelle 3.6 werden die durchschnittlichen Anzahlen Iba-1-positiver Mikrogliazellen der SNpc nach Behandlungsgruppen aufgeführt.

**Tabelle 3.6 Anzahl Iba-1-positiver Mikrogliazellen der SNpc**

Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) pro SN-Schnitt der Saline-Tiere (n = 6) sowie der MPTP-2d-Tiere (n = 4-6) an Tag 2 nach MPTP-Intoxikation.

	Saline	MPTP
Saline	33,43 ( $\pm$ 2,16)	130,10 ( $\pm$ 5,15)
Mecamylamin	54,90 ( $\pm$ 3,25)	105,73 ( $\pm$ 4,08)
PNU-282987	50,30 ( $\pm$ 2,17)	54,27 ( $\pm$ 1,90)

Die MPTP-Behandlung führte zu einer signifikanten Zunahme der Mikroglia-Anzahl in der SNpc verglichen mit den Kontrolltieren. Während die Saline/Saline-Tiere  $33,43 \pm 2,16$  Mikrogliazellen pro Schnitt ( $100 \pm 6,46$  %) aufwiesen, stieg die Mikroglia-Anzahl zwei Tage nach MPTP-Intoxikation auf  $389,17 \pm 15,4$  % an ( $p \leq 0,001$ ).

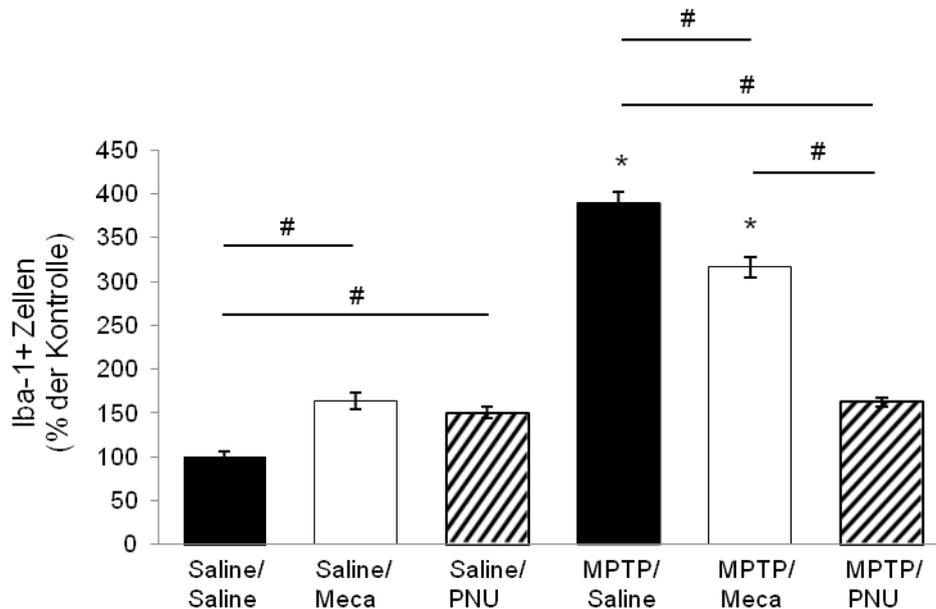
Bei MPTP-intoxikierten Tieren führte die Behandlung mit PNU-282987 zu einer deutlichen Reduktion der Mikroglia-Zellzahl um 58,29 % auf das Niveau gesunder Kontrollen ( $162,34 \pm 5,68$  %;  $p \leq 0,001$ ). So unterschied sich die Mikroglia-Anzahl der MPTP/PNU-282987-Tiere nicht von dem Wert der Saline/PNU-282987-Tiere ( $150,46 \pm 6,49$  %;  $p = 0,957$ ).

Mecamylamin reduzierte die durch MPTP erhöhte Anzahl an Mikroglia ebenfalls, jedoch in geringerem Ausmaß, um 18,73 % auf  $316,27 \pm 12,2$  % ( $p \leq 0,001$ ). Im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe ( $164,22 \pm 9,72$  %) waren die Werte signifikant erhöht. Auch im Vergleich zu PNU-282987-behandelten Tieren wiesen die mit Mecamylamin behandelten Tiere nach MPTP-Intoxikation eine erhöhte Mikroglia-Anzahl auf ( $p \leq 0,001$ ).

Der Vergleich einzelner Kontrollgruppen zeigt, dass allein die Gabe von PNU-282987 zu einer Zunahme der Mikroglia-Anzahl im Vergleich zu unbehandelten

Kontrolltieren geführt hat ( $p = 0,015$ ). Ebenso führte Mecamylamin zu einer erhöhten Anzahl von Mikroglia ( $p = 0,001$ ).

Die Behandlung mit PNU-282987 hat die MPTP-induzierte Mikroglia-Aktivierung in der SNpc signifikant und in weitaus größerem Ausmaß als Mecamylamin abgeschwächt (s. Abbildung 3.5).

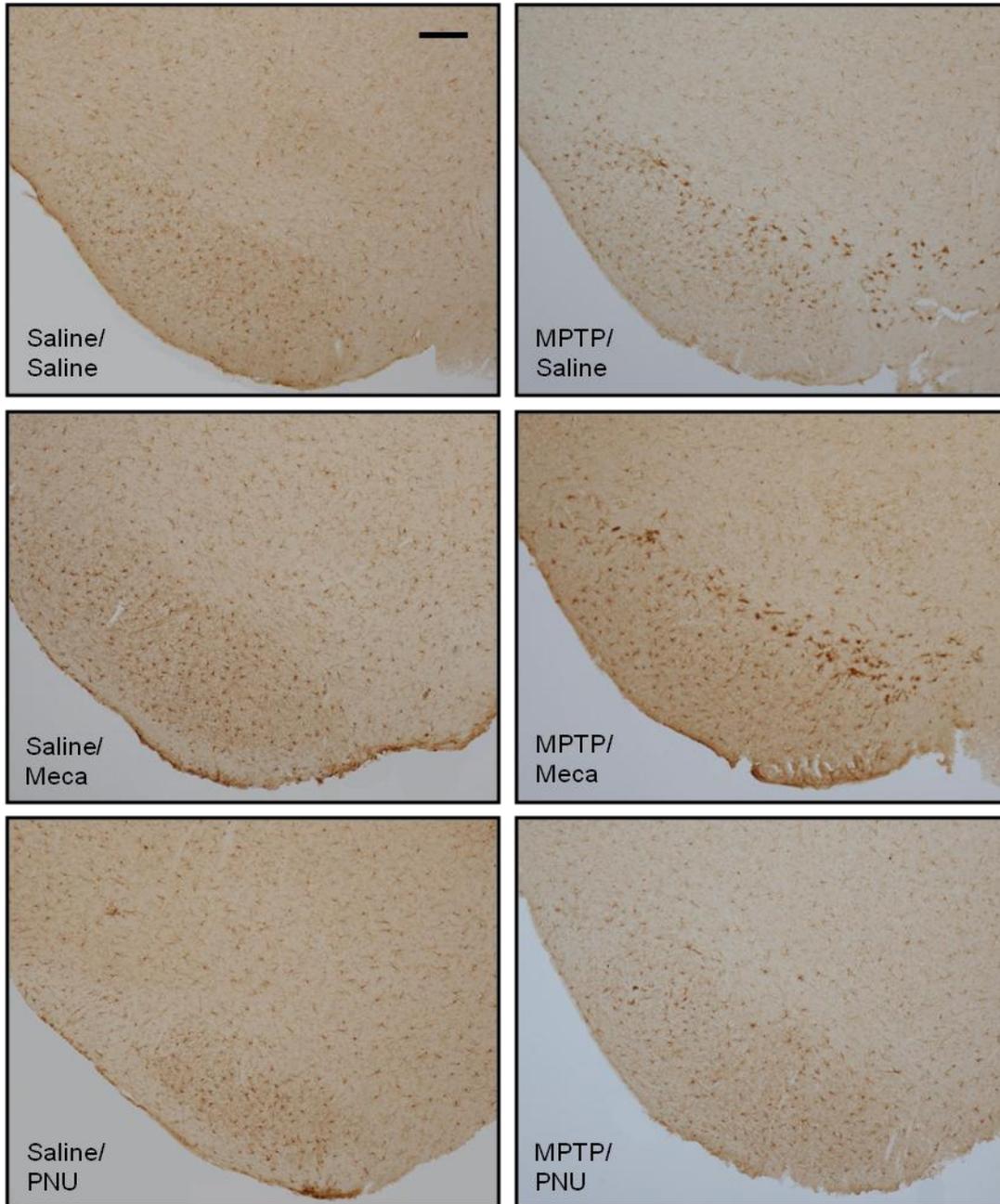


**Abb. 3.5 Anzahl Iba-1-positiver Mikrogliazellen der SNpc**

Anzahl Iba-1-positiver Mikroglia in der SNpc an Tag 2 nach akuter MPTP-Intoxikation und Behandlung mit PNU-282987 (PNU) bzw. Mecamylamin (Meca). Nach Entnahme der Hirne wurden am Kryostat 20 $\mu$ m-Schnitte der SN gefertigt. In *free floating*-Technik wurden Mikroglia immunhistochemisch nachgewiesen. Die Auszählung von jeweils fünf Schnitten pro Tier erfolgte am Mikroskop in 10-facher Vergrößerung. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorier ANOVA und Post-Hoc-Test nach Tukey (\* $p \leq 0,05$ : MPTP-behandelte Gruppen verglichen mit Kontrollen; # $p \leq 0,05$ : MPTP-behandelte Gruppen bzw. Kontrollgruppen untereinander verglichen;  $n = 4-6$ ).

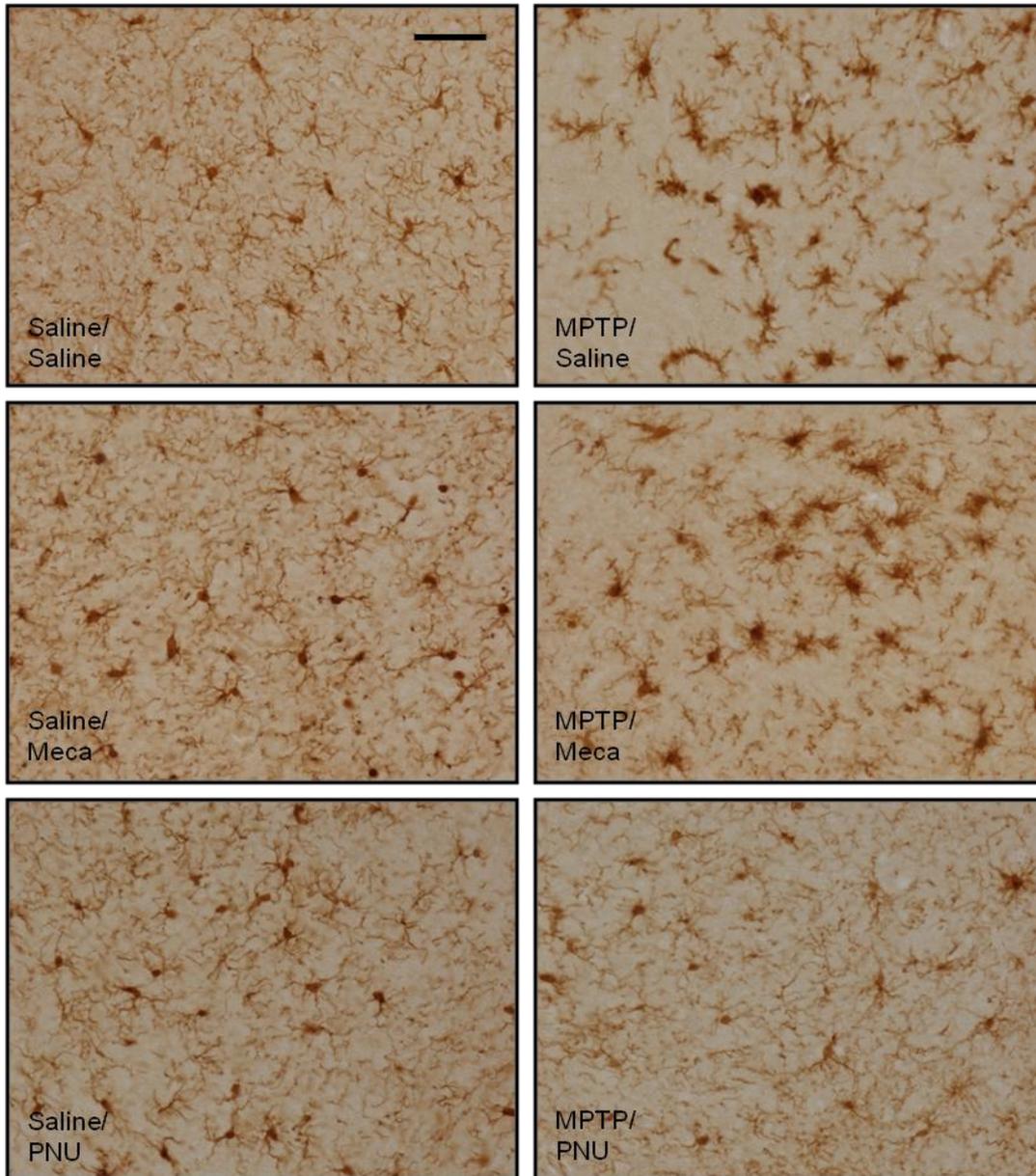
Im mikroskopischen Bild wurde die Aktivierung der Mikroglia in der SNpc nach MPTP-Intoxikation nicht nur durch eine Zunahme der Zellzahl sichtbar, sondern auch durch morphologische Veränderungen. Im Ruhestadium wies die Mikrogliazelle eine ramifizierte Morphologie mit einem kleinen, ovalen Zellkörper und einer Vielzahl langer, dünner, weit verzweigter Fortsätze auf (Kontrolltiere, s. Abbildungen 3.6 und 3.7, linke Spalte, 1. Zeile). Im aktivierten Stadium war die Mikrogliazelle charakterisiert durch einen hypertrophen, rundlichen Zellkörper mit eingezogenen, eher proximalen, verdickten Zellausläufern und einer abnehmenden distalen Ramifizierung. Optisch kam es zu einer Intensivierung des immunhistochemischen Signals und zur Größenzunahme der Mikroglia, die sich besonders deutlich bei den MPTP/Saline- und den MPTP/Mecamylamin-Tieren zeigte (s. Abbildungen 3.6 und 3.7, rechte Spalte, 1. und 2.

Zeile). Das mikroskopische Bild der MPTP/PNU-282987-Tiere ähnelte eher dem Bild der entsprechenden Kontrolltiere (s. Abbildungen 3.6 und 3.7, 3. Zeile). Auch die alleinige Gabe des  $\alpha 7$ -nACh-Agonisten PNU-282987 bzw. des nACh-Antagonisten Mecamylamin führte bei gesunden Tieren zu einer leichten Intensivierung des immunhistochemischen Signals (s. Abbildung 3.7, linke Spalte, 2. und 3. Zeile).



**Abb. 3.6 20  $\mu$ m-Schnitte der SNpc mit Darstellung Iba-1-positiver Mikroglia (4x)**

Repräsentative Mikrofotografien der mit einem Iba-1-Antikörper immunhistochemisch gefärbten SNpc an Tag 2 nach akuter MPTP-Intoxikation und Behandlung mit PNU-282987 (PNU) bzw. Mecamylamin (Meca). Zu erkennen ist eine Intensivierung des immunhistochemischen Signals und Zunahme der Mikroglia-Zellzahl bei den MPTP/Saline- und den MPTP/Mecamylamin-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren und den MPTP/PNU-282987-Tieren. Vergrößerung: 4x; Maßstabsleiste: 200  $\mu$ m.



**Abb. 3.7 20 µm-Schnitte der SNpc mit Darstellung Iba-1-positiver Mikroglia (40x)**

Repräsentative Mikrofotografien der mit einem Iba-1-Antikörper immunhistochemisch gefärbten SNpc an Tag 2 nach akuter MPTP-Intoxikation und Behandlung mit PNU-282987 (PNU) bzw. Mecamylamin (Meca). Die Aufnahmen stellen einen Ausschnitt mittig aus der SNpc dar. Die Kontrolltiere weisen ruhende, ramifizierte Mikrogliazellen mit langen, verzweigten, zarten Fortsätzen auf. Nach MPTP-Intoxikation sind morphologische Veränderungen der Mikroglia zu beobachten. Die Mikroglia der MPTP/Saline- und der MPTP/Mecamylamin-Tiere weisen hypertrophierte Zellkörper mit proximalen, verdickten Fortsätzen und eine geringere distale Ramifizierung auf. Das Bild der MPTP/PNU-282987-Tiere ähnelt dem der Saline/PNU-282987-Tiere. Auch die alleinige Gabe von PNU-282987 bzw. Mecamylamin führt zu einer Intensivierung des immunhistochemischen Signals. Vergrößerung: 40x; Maßstabsleiste: 50 µm.

Zwei Tage nach akuter MPTP-Intoxikation fanden sich Zeichen der Neuroinflammation in der SNpc und im Striatum. MPTP führte zur Zunahme der Anzahl und zu morphologischen Veränderungen Iba-1-positiver Mikroglia in der SNpc im Sinne einer mikroglialen Aktivierung sowie zum Konzentrationsanstieg der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  im Striatum. Auf die striatale Konzentration des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 hatte MPTP keine Auswirkungen.

Der  $\alpha$ 7-nACh-Agonist PNU-282987 wirkte anti-inflammatorisch und reduzierte den MPTP-induzierten Anstieg der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und (n.s.) IL-6 sowie die durch MPTP erhöhte Mikroglia-Anzahl auf das Niveau gesunder Kontrollen.

Der nACh-Antagonist Mecamylamin verringerte den MPTP-induzierten Konzentrationsanstieg der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und (n.s.) IL-6 und führte zur Reduktion der Mikroglia-Anzahl, die im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe jedoch weiterhin um nahezu das Doppelte erhöht war.

### **3.3 DOPAMINERGE NEURODEGENERATION**

Um zu beurteilen, ob die Reduktion der Neuroinflammation Auswirkungen auf das dopaminerge System hat und eine MPTP-induzierte Degeneration nigrostriataler dopaminerge Neurone verhindern bzw. abschwächen kann, wurden die Anzahl dopaminerge Neurone in der SNpc sowie die Konzentrationen des Neurotransmitters Dopamin und seiner Metaboliten bestimmt.

Die Degeneration dopaminerge Neurone in der SNpc ist das neuropathologische Korrelat des IPS und auch im akuten MPTP-Mausmodell zu beobachten. In der Folge kommt es zum Untergang nigrostriataler Projektionen und zur Konzentrationsabnahme des Neurotransmitters Dopamin und seiner Metaboliten DOPAC und HVA im Striatum. Charakteristisch für die Schädigung dopaminerge Neurone ist außerdem ein erhöhter Dopamin-Umsatz. Zur Beurteilung des dopaminergen Systems wurden neben den Kontrolltieren die MPTP-7d-Tiere untersucht, da an Tag 7 nach MPTP-Intoxikation die Degeneration dopaminerge Neurone weitestgehend stattgefunden haben sollte (64, 71).

#### **3.3.1 ANZAHL TH-POSITIVER DOPAMINERGER NEURONE DER SNPC**

Die TH ist im Gehirn ein spezifisches Enzym dopaminerge Neurone. Durch den immunhistochemischen Nachweis der TH lassen sich dopaminerge Neurone im mikroskopischen Bild darstellen.

Die Anzahl TH-positiver dopaminerge Neurone der SNpc wurde in 100-facher Vergrößerung am Mikroskop mit Hilfe des CAST-Systems bestimmt. Von jedem Tier

wurde von allen durch die SNpc ziehenden Schnitten einer Schnittserie die Anzahl TH-positiver Zellen bestimmt und summiert. Auf diese Weise wurden im Durchschnitt pro Tier 9,5 Schnitte ausgewertet. In Tabelle 3.7 ist die durchschnittliche Anzahl TH-positiver dopaminerger Neurone einer Schnittserie nach Behandlungsgruppen aufgeführt.

**Tabelle 3.7 Anzahl TH-positiver dopaminerger Neurone der SNpc**

Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) pro Schnittserie der Saline-Tiere (n = 6) sowie der MPTP-7d-Tiere (n = 8) an Tag 7 nach MPTP-Intoxikation.

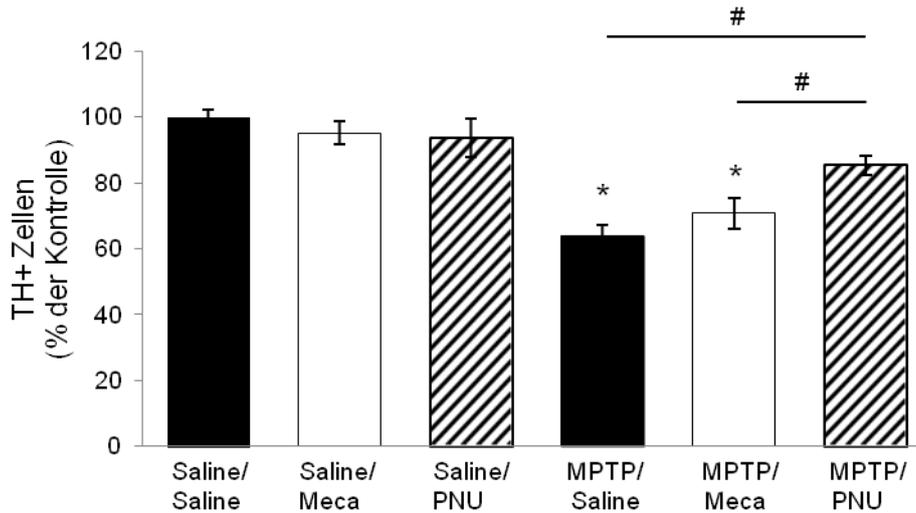
	Saline	MPTP
<b>Saline</b>	1728,17 ( $\pm$ 35,89)	1107,38 ( $\pm$ 52,14)
<b>Mecamylamin</b>	1642,83 ( $\pm$ 59,87)	1222,00 ( $\pm$ 78,19)
<b>PNU-282987</b>	1618,67 ( $\pm$ 100,20)	1473,88 ( $\pm$ 52,68)

Die Saline/Saline-Tiere wiesen mit durchschnittlich 1728,17 ( $\pm$  35,89) TH-positiven Neuronen in der SNpc je Schnittserie den höchsten Wert auf (100  $\pm$  2,08 %). Die alleinige Gabe von PNU-282987 (93,66  $\pm$  5,8 %) bzw. Mecamylamin (95,06  $\pm$  3,46 %) führte zu keiner signifikanten Veränderung dieser Zellzahl.

Nach MPTP-Intoxikation kam es zum Verlust TH-positiver dopaminerger Neurone auf 64,08  $\pm$  3,02 % (p = 0,002). Die zusätzliche Gabe von PNU-282987 reduzierte diesen Verlust TH-positiver Neurone in der SN um 59,04 %. Im Vergleich zu den MPTP/Saline-Tieren ließen sich bei den MPTP/PNU-282987-Tiere deutlich mehr TH-positive Neurone nachweisen (85,29  $\pm$  3,05 %; p = 0,001), deren Anzahl sich nicht vom Wert der entsprechenden Kontrollgruppe Saline/PNU-282987 (93,66  $\pm$  5,8 %; p = 0,121) unterschied. Somit wirkte sich bei MPTP-Intoxikation die zusätzlich Gabe des  $\alpha$ 7-nACh-Agonisten PNU-282987 neuroprotektiv auf die TH-positiven dopaminerger Neurone aus.

Die Gabe von Mecamylamin zusätzlich zu MPTP hatte keine Auswirkungen auf den Untergang TH-positiver Neurone in der SN. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Anzahl TH-positiver Neurone mit 70,71  $\pm$  4,52 % weiterhin signifikant erniedrigt. Auch im Vergleich zur MPTP/PNU-282987-Behandlung wiesen die MPTP/Mecamylamin-Tiere signifikant erniedrigte Zellzahlen auf.

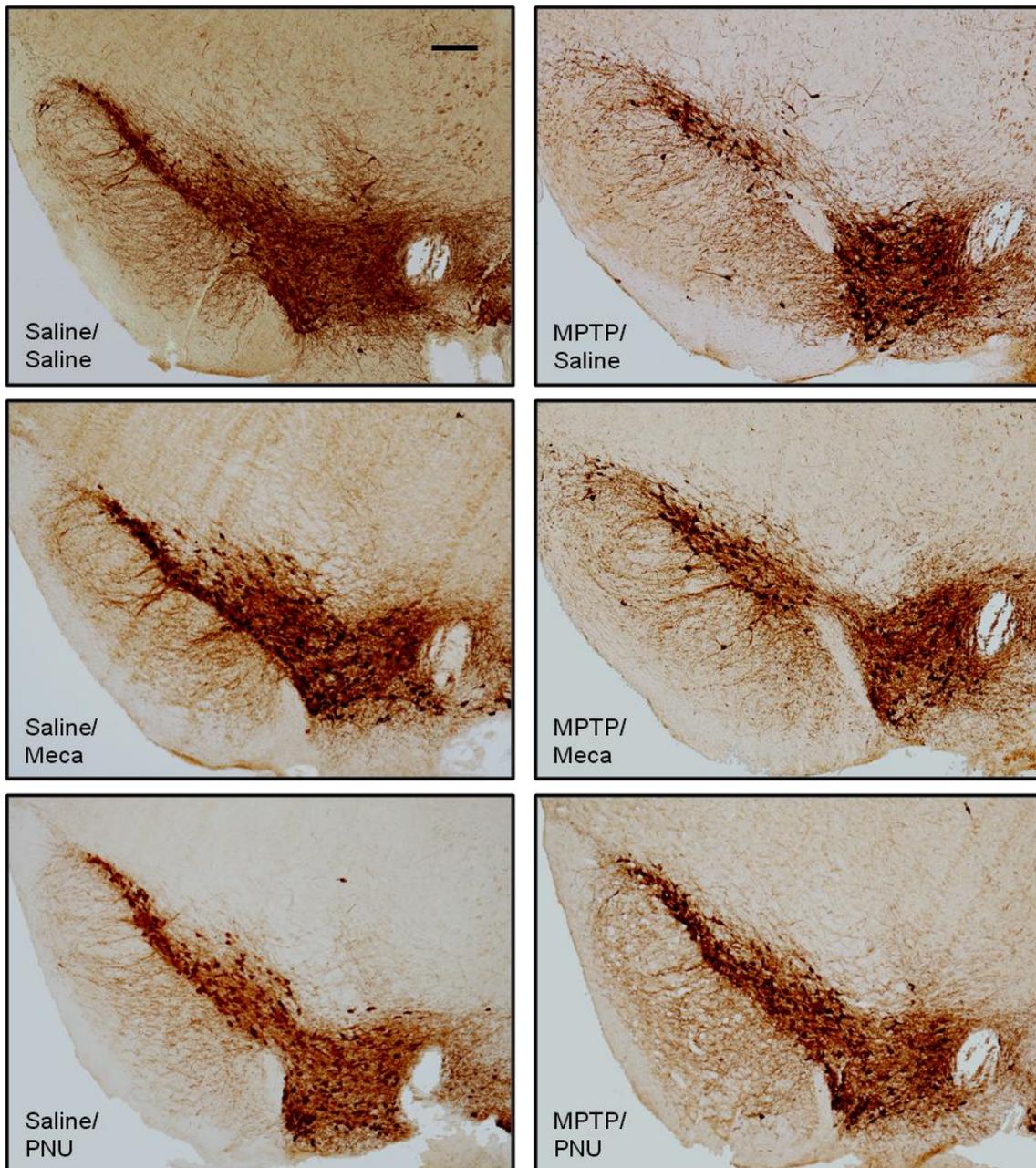
Im Gegensatz zu Mecamylamin hat PNU-282987 im akuten MPTP-Mausmodell neuroprotektiv auf dopaminerge Neurone in der SN gewirkt. Abbildung 3.8 fasst die Ergebnisse zusammen.



**Abb. 3.8 Anzahl TH-positiver dopaminergener Neurone der SNpc**

Anzahl TH-positiver Neurone in der SNpc an Tag 7 nach akuter MPTP-Intoxikation und Behandlung mit PNU-282987 (PNU) bzw. Mecamylamin (Meca). Nach Entnahme der Hirne wurden am Kryostat 20µm-Schnitte der SN gefertigt. In *free floating*-Technik wurden dopaminerge Neurone immunhistochemisch nachgewiesen. Für jedes Tier erfolgte die Auszählung aller durch die SNpc gehenden Schnitte einer Schnittserie am Mikroskop in 40-facher Vergrößerung. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney-U-Test (\* $p \leq 0,05$ : MPTP-behandelte Gruppen verglichen mit Kontrollen; # $p \leq 0,05$ : MPTP-behandelte Gruppen untereinander verglichen;  $n = 6-8$ ).

Die reduzierte Anzahl TH-positiver dopaminergener Neurone in der SNpc nach MPTP-Intoxikation war auch im mikroskopischen Bild sichtbar. Die SNpc der MPTP/Saline-Tiere sowie der MPTP/Mecamylamin-Tiere (s. Abbildung 3.9, rechte Spalte, 1. und 2. Zeile) wies weniger TH-positiv Neurone auf im Vergleich zu den Kontrollen (s. Abbildung 3.9, linke Spalte) und war entsprechend weniger intensiv immunhistochemisch nachweisbar. Das mikroskopische Bild der MPTP/PNU-282987-Tiere (s. Abbildung 3.9, rechte Spalte, 3. Zeile) ähnelte dem der Kontrollgruppe.



**Abb. 3.9 20 µm-Schnitte der SNpc mit Darstellung TH-positiver Neurone**

Repräsentative Mikrofotografien der mit einem TH-Antikörper immunhistochemisch gefärbten SNpc an Tag 7 nach akuter MPTP-Intoxikation und Behandlung mit PNU-282987 (PNU) bzw. Mecamylamin (Meca). Es fällt die reduzierte Anzahl TH-positiver dopaminergere Neurone in der SNpc nach MPTP-Intoxikation sowie in Kombination mit Mecamylamin auf. PNU-282987 verhinderte die MPTP-bedingte Neurodegeneration. Vergrößerung: 4x; Maßstabsleiste: 200µm.

### 3.3.2 DOPAMIN UND SEINE METABOLITEN

Die Konzentrationen des Neurotransmitters Dopamin und seiner Metaboliten DOPAC und HVA wurden mittels HPLC und elektrochemischer Detektion im Hirnlysate des Striatums bestimmt. Die Quotienten DOPAC/Dopamin und HVA/Dopamin stellen den Dopamin-Umsatz dar. Tiere, deren aus den entnommenen Striata hergestellten Lysate mengenmäßig für die Messung nicht ausreichten und so für die HPLC nicht in vollem Umfang verwertbar waren, mussten aus der Wertung genommen werden.

#### 3.3.2.1 DOPAMIN

Die striatalen Dopamin-Konzentrationen der einzelnen Behandlungsgruppen sind in Tabelle 3.8 aufgeführt.

**Tabelle 3.8 Striatale Dopamin-Konzentration**

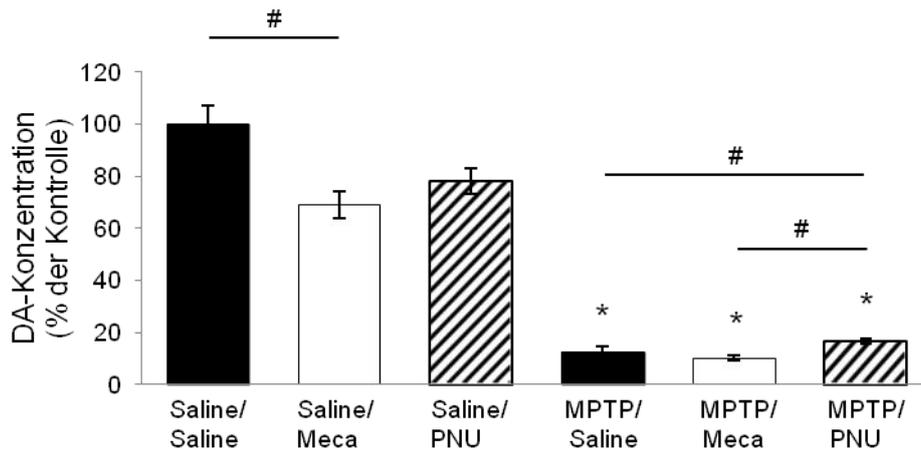
Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) in ng/mg Feuchtgewebe der Saline-Tiere (n = 5-6) sowie der MPTP-7d-Tiere (n = 8) an Tag 7 nach MPTP-Intoxikation.

	Saline	MPTP
Saline	16,716 ( $\pm$ 1,23)	2,064 ( $\pm$ 0,411)
Mecamylamin	11,549 ( $\pm$ 0,882)	1,703 ( $\pm$ 0,169)
PNU-282987	13,056 ( $\pm$ 0,825)	2,774 ( $\pm$ 0,182)

Die Saline/Saline-Tiere wiesen eine Dopamin-Konzentration von  $16,716 \pm 1,23$  ng/mg Feuchtgewebe ( $100 \pm 7,36$  %) im Striatum auf. Die alleinige Applikation von PNU-282987 hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Dopamin-Konzentration ( $78,11 \pm 4,96$  %). Die alleinige Gabe von Mecamylamin führte zur Reduktion des Dopamin-Spiegels um  $30,92 \pm 5,26$  % ( $p = 0,025$ ).

Nach MPTP-Intoxikation sank der Dopamin-Spiegel auf  $12,32 \pm 2,45$  % ( $p = 0,002$ ). PNU-282987 führte zu einer reduzierten Abnahme des Dopamin-Spiegels durch MPTP um  $4,84$  % ( $p = 0,046$ ). Mit einer Dopamin-Konzentration von  $16,57 \pm 1,08$  % lag jedoch bei den MPTP/PNU-282987-Tieren im Vergleich zur Kontrolle weiterhin ein Dopamin-Mangel vor ( $p = 0,003$ ). Mecamylamin hatte keine Auswirkungen auf den MPTP-bedingten Dopamin-Mangel im Striatum ( $10,17 \pm 1,02$  %). Die Dopamin-Konzentration der MPTP/PNU-282987-Tiere war signifikant höher als die der MPTP/Mecamylamin-Tiere.

Während PNU-282987 dem striatalen Dopaminmangel signifikant entgegenwirken konnte, hatte Mecamylamin keine Auswirkungen auf das MPTP-bedingte Dopamin-Defizit. Einen Überblick über die Ergebnisse liefert Abbildung 3.10.



**Abb. 3.10 Striatale Dopamin-Konzentration**

Striatale Dopamin-Konzentration an Tag 7 nach akuter MPTP-Intoxikation und Behandlung mit PNU-282987 (PNU) bzw. Mecamylamin (Meca). Nach Entnahme und Präparation der Hirne wurden die Striata homogenisiert und im Hirnlysat die Konzentration von Dopamin mittels HPLC bestimmt. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney-U-Test (\* $p \leq 0,05$ : MPTP-behandelte Gruppen verglichen mit Kontrollen; # $p \leq 0,05$ : MPTP-behandelte Gruppen bzw. Kontrollgruppen untereinander verglichen;  $n = 5-8$ ).

### 3.3.2.2 DOPAC

Die durchschnittlichen Konzentrationen des Dopamin-Metaboliten DOPAC im Striatum werden in Tabelle 3.9 aufgeführt.

**Tabelle 3.9 Striatale DOPAC-Konzentration**

Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) in ng/mg Feuchtgewebe der Saline-Tiere ( $n = 5-6$ ) sowie der MPTP-7d-Tiere ( $n = 8$ ) an Tag 7 nach MPTP-Intoxikation.

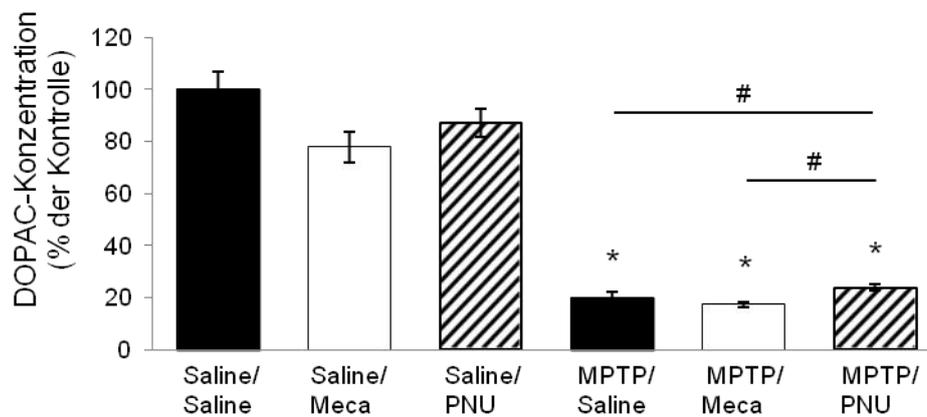
	Saline	MPTP
Saline	1,234 ( $\pm 0,083$ )	0,245 ( $\pm 0,029$ )
Mecamylamin	0,961 ( $\pm 0,072$ )	0,214 ( $\pm 0,013$ )
PNU-282987	1,078 ( $\pm 0,069$ )	0,294 ( $\pm 0,015$ )

Die striatale DOPAC-Konzentration der Saline/Saline-Tiere betrug  $1,234 \pm 0,083$  ng/mg Feuchtgewebe ( $100 \pm 6,5$  %). PNU-282987 bzw. Mecamylamin allein führten zu keinen signifikanten Änderungen des DOPAC-Spiegels ( $87,8 \pm 5,69$  % bzw.  $78,05 \pm 5,69$  %).

Nach-MPTP-Intoxikation kam es zu einem signifikanten Abfall der DOPAC-Konzentration auf  $20,33 \pm 2,44$  %. Die Gabe von PNU-282987 reduzierte die Konzentrationsabnahme von DOPAC um 4 % auf  $23,58 \pm 1,63$  % ( $p = 0,036$ ). Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren die Werte der MPTP/PNU-282987-Tiere weiterhin signifikant erniedrigt.

Die Gabe von Mecamylamin zusätzlich zu MPTP zeigte keine signifikanten Effekte, sodass die MPTP/Mecamylamin-Tiere mit  $17,07 \pm 0,81 \%$  im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigte DOPAC-Spiegel aufwiesen. Auch im Vergleich zu den MPTP/PNU-282987-Tieren wiesen die MPTP/Mecamylamin-Tiere eine erniedrigte DOPAC-Konzentration auf ( $p = 0,006$ ).

PNU-282987 hat den Mangel an DOPAC im Striatum nach MPTP-Intoxikation signifikant abgeschwächt. Mecamylamin hingegen hatte keine Auswirkung auf den reduzierten DOPAC-Spiegel. Abbildung 3.11 verdeutlicht die Ergebnisse.



**Abb. 3.11 Striatale DOPAC-Konzentration**

Striatale Konzentration von 3,4-Dihydroxyphenylethylsäure (DOPAC) an Tag 7 nach MPTP-Intoxikation und Behandlung mit PNU-282987 (PNU) bzw. Mecamylamin (Meca). Nach Entnahme und Präparation der Hirne wurden die Striata homogenisiert und im Hirnlysate die Konzentration von DOPAC mittels HPLC bestimmt. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney-U-Test (\* $p \leq 0,05$ : MPTP-behandelte Gruppen verglichen mit Kontrollen; # $p \leq 0,05$ : MPTP-behandelte Gruppen untereinander verglichen;  $n = 5-8$ ).

### 3.3.2.3 HVA

Die Ergebnisse der HVA-Konzentrations-Bestimmung im Striatum sind in Tabelle 3.10 aufgeführt.

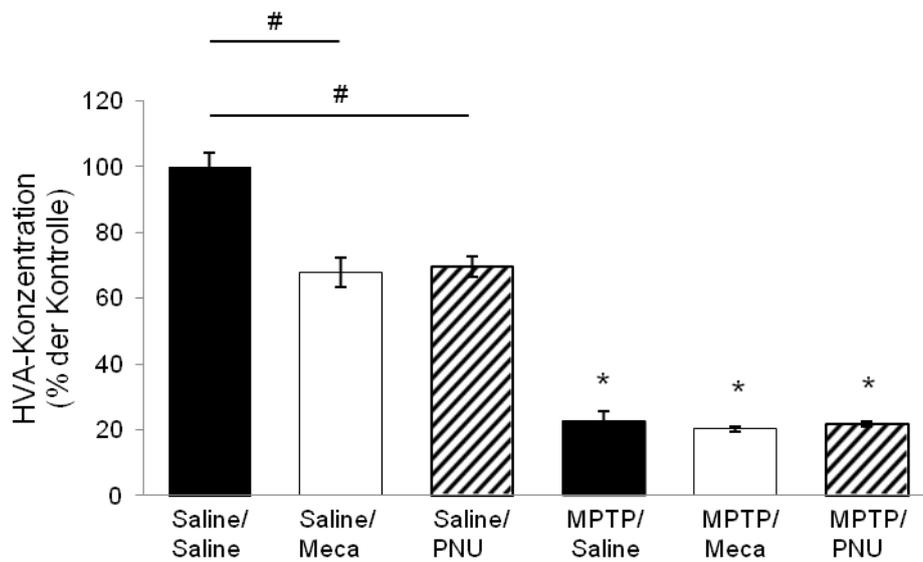
**Tabelle 3.10 Striatale HVA-Konzentration**

Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) in ng/mg Feuchtgewebe der Saline-Tiere ( $n = 5-6$ ) sowie der MPTP-7d-Tiere an Tag 7 nach MPTP-Intoxikation ( $n = 5$ ).

	Saline	MPTP
<b>Saline</b>	1,473 ( $\pm 0,062$ )	0,336 ( $\pm 0,039$ )
<b>Mecamylamin</b>	1,001 ( $\pm 0,067$ )	0,298 ( $\pm 0,012$ )
<b>PNU-282987</b>	1,025 ( $\pm 0,044$ )	0,32 ( $\pm 0,013$ )

Die Saline/Saline-Tiere wiesen eine striatale HVA-Konzentration von  $1,473 \pm 0,062$  ng/mg Feuchtgewebe ( $100 \pm 4,08$  %) auf. Sowohl die alleinige Gabe von PNU-282987 als auch von Mecamylamin führte zu einem signifikanten Abfall des HVA-Spiegels auf  $70,07 \pm 2,72$  % bzw.  $68,03 \pm 4,76$  %.

Nach MPTP-Intoxikation sank die striatale HVA-Konzentration auf  $23,13 \pm 2,72$  % ( $p \leq 0,001$ ). Die zusätzliche Applikation von PNU-282987 oder Mecamylamin führte zu keiner signifikanten Änderung des MPTP-induzierten Konzentrationsabfalls. Abbildung 3.12 stellt die Ergebnisse dar.



**Abb. 3.12 Striatale HVA-Konzentration**

Striatale Konzentration von Homovanillinsäure (HVA) an Tag 7 nach MPTP-Intoxikation und Behandlung mit PNU-282987 (PNU) bzw. Mecamylamin (Meca). Nach Entnahme und Präparation der Hirne wurden die Striata homogenisiert und im Hirnlysat die Konzentration von HVA mittels HPLC bestimmt. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA und Post-Hoc-Test nach Games-Howell (\* $p \leq 0,05$ : MPTP-behandelte Gruppen verglichen mit Kontrollen; # $p \leq 0,05$ : Kontrollgruppen untereinander verglichen;  $n = 5-6$ ).

### 3.3.2.4 DOPAC/DOPAMIN-QUOTIENT

Die durchschnittlichen Werte des DOPAC/Dopamin-Quotienten, einem Messwert für den Dopamin-Umsatz, sind in Tabelle 3.11 aufgeführt.

**Tabelle 3.11 Striataler DOPAC/Dopamin-Quotient**

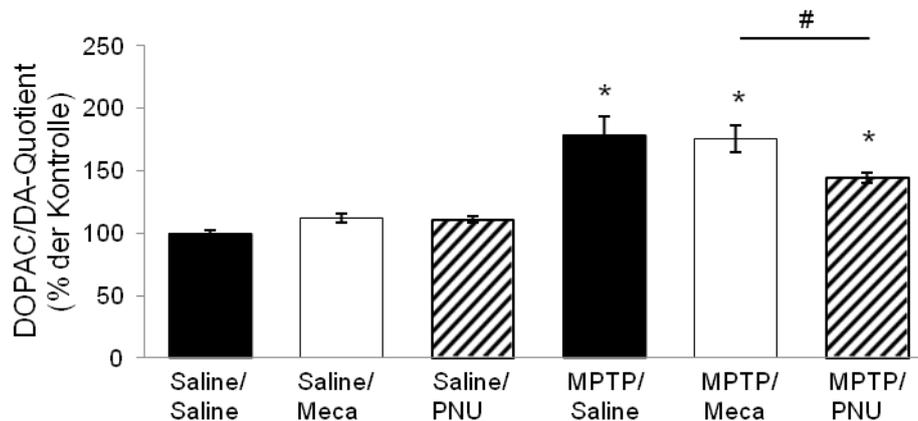
Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) der Saline-Tiere ( $n = 5-6$ ) sowie der MPTP-7d-Tiere ( $n = 8$ ) an Tag 7 nach MPTP-Intoxikation.

	Saline	MPTP
Saline	0,074 ( $\pm 0,002$ )	0,132 ( $\pm 0,011$ )
Mecamylamin	0,083 ( $\pm 0,003$ )	0,13 ( $\pm 0,008$ )
PNU-282987	0,082 ( $\pm 0,002$ )	0,107 ( $\pm 0,003$ )

Der DOPAC/Dopamin-Quotient der Saline/Saline-Tiere betrug  $0,074 \pm 0,002$  ( $100 \pm 2,86\%$ ). Die alleinige Gabe von PNU-282987 ( $114,29 \pm 2,86\%$ ) oder Mecamylamin ( $114,29 \pm 4,29\%$ ) führte zu keiner signifikanten Änderung des Quotienten.

Nach MPTP-Intoxikation stieg der DOPAC/Dopamin-Quotient um  $85,71 \pm 15,71\%$  ( $p = 0,002$ ). PNU-282987 führte zu einer geringen Reduktion dieses Quotienten auf  $157,14 \pm 4,29\%$  (n.s.,  $p = 0,093$ , Reduktion des Anstiegs um  $33,33\%$ ). Der Wert des Quotienten lag jedoch weiterhin signifikant über dem Kontrollwert. Mecamylamin zeigte keinen signifikanten Effekt bezüglich des durch MPTP erhöhten DOPAC/Dopamin-Quotienten ( $p = 0,916$ ). So wiesen die MPTP/Mecamylamin-Tiere mit  $185,71 \pm 11,43\%$  weiterhin einen signifikant erhöhten DOPAC/Dopamin-Quotienten im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe auf. Im Vergleich zur MPTP/Mecamylamin-Gruppe war der DOPAC/Dopamin-Quotient der MPTP/PNU-282987-Tiere erniedrigt ( $p = 0,027$ ).

Weder PNU-282987 noch Mecamylamin reduzierten den erhöhten DOPAC/Dopamin-Quotienten signifikant. Abbildung 3.13 fasst die Ergebnisse zusammen.



**Abb. 3.13 Striataler DOPAC/Dopamin-Quotient**

Striataler DOPAC/Dopamin-Quotient, der den Dopamin-Umsatz beschreibt, an Tag 7 nach MPTP-Intoxikation und Behandlung mit PNU-282987 (PNU) bzw. Mecamylamin (Meca). Aus den im Hirnlysat gemessenen Konzentrationen von DOPAC und Dopamin wurde der Quotient gebildet. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney-U-Test (\* $p \leq 0,05$ : MPTP-behandelte Gruppen verglichen mit Kontrollen; # $p \leq 0,05$ : MPTP-behandelte Gruppen untereinander verglichen;  $n = 5-8$ ).

### 3.3.2.5 HVA/DOPAMIN-QUOTIENT

Die durchschnittlichen Werte des HVA/Dopamin-Quotienten, der ebenfalls einen Messwert des Dopamin-Umsatzes darstellt, sind in Tabelle 3.12 aufgeführt.

**Tabelle 3.12 Striataler HVA/Dopamin-Quotient**

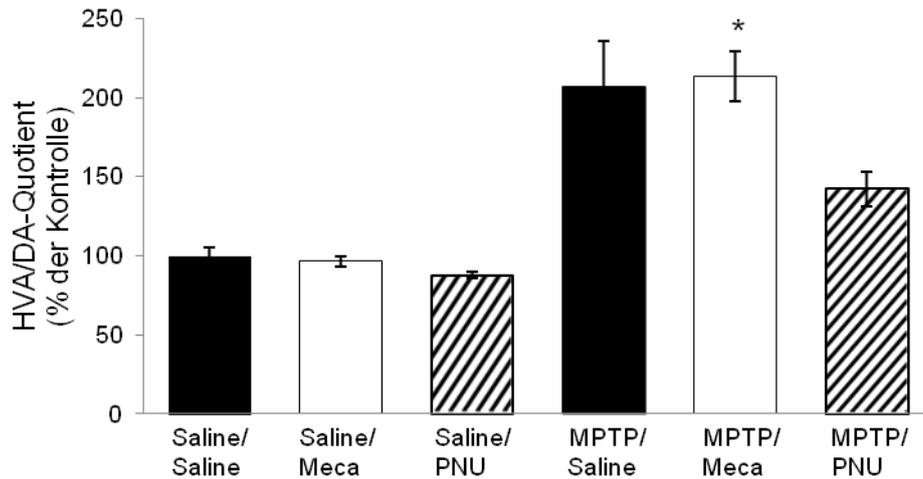
Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) der Saline-Tiere (n = 5-6) sowie der MPTP-7d-Tiere (n = 5) an Tag 7 nach MPTP-Intoxikation.

	Saline	MPTP
Saline	0,09 ( $\pm$ 0,005)	0,186 ( $\pm$ 0,026)
Mecamylamin	0,087 ( $\pm$ 0,003)	0,192 ( $\pm$ 0,014)
PNU-282987	0,079 ( $\pm$ 0,002)	0,128 ( $\pm$ 0,01)

Der HVA/Dopamin-Quotient der Saline/Saline-Tiere betrug  $0,09 \pm 0,005$  ( $100 \pm 5,56$  %). Die alleinige Gabe von PNU-282987 ( $88,89 \pm 2,22$  %) bzw. Mecamylamin ( $100 \pm 3,33$  %) hatte keine signifikanten Auswirkungen.

Nach Gabe von MPTP stieg der HVA/Dopamin-Quotient auf  $211,11 \pm 28,89$  % an (n.s.,  $p = 0,143$ ). PNU-282987 reduzierte den Anstieg des HVA-Dopamin-Quotienten um 60 % auf  $144,44 \pm 11,11$  % (n.s.,  $p = 0,493$ ), sodass sich der Wert der MPTP/PNU-282987-Tiere nicht vom Wert der Kontrollen unterschied ( $p = 0,057$ ). Die zusätzliche Gabe von Mecamylamin zu MPTP hatte keine Auswirkungen auf den HVA/Dopamin-Quotienten ( $211,11 \pm 15,56$  %). Im Vergleich zur Kontrolle war der Wert des Quotienten weiterhin erhöht ( $p = 0,015$ ).

Weder PNU-282987 noch Mecamylamin konnten den erhöhten HVA/Dopamin-Quotienten signifikant reduzieren. Allerdings unterschied sich der Wert der MPTP/PNU-282987-Tiere nicht signifikant von ihrem Kontrollwert. Abbildung 3.14 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse.



**Abb. 3.14 Striataler HVA/Dopamin-Quotient**

Striataler HVA/Dopamin-Quotient, der den Dopamin-Umsatz beschreibt, an Tag 7 nach MPTP-Intoxikation und Behandlung mit PNU-282987 (PNU) bzw. Mecamylamin (Meca). Aus den im Hirnlysate gemessenen Konzentrationen von HVA und Dopamin wurde der Quotient gebildet. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA und Post-Hoc-Test nach Games-Howell (\* $p \leq 0,05$ : MPTP-behandelte Gruppen verglichen mit Kontrollen;  $n = 5-6$ ).

Die akute MPTP-Intoxikation führte zur Degeneration dopaminerger Neurone. Es kam zur Reduktion TH-positiver Neurone in der SNpc und zu einem Abfall der striatalen Konzentrationen von Dopamin und seinen Metaboliten DOPAC und HVA. Außerdem wurde kompensatorisch der Dopamin-Umsatz erhöht.

Der  $\alpha 7$ -nACh-Agonist PNU-282987 verhinderte den MPTP-induzierten Untergang dopaminerger Neurone in der SNpc und hielt die Zellzahl auf dem Niveau der Kontrolltiere. Darüber hinaus reduzierte es den Dopamin- und DOPAC-Mangel im Striatum, hatte jedoch auf den reduzierten HVA-Spiegel keinen Einfluss. Der durch MPTP gesteigerte Dopamin-Umsatz wurde tendenziell gesenkt.

Der nACh-Antagonist Mecamylamin hatte weder einen Effekt auf die Anzahl TH-positiver dopaminerger Neurone in der SNpc noch auf die Konzentrationen von Dopamin und seinen Metaboliten oder den Dopamin-Umsatz bei MPTP-intoxikierten Tieren. Bei gesunden Kontrolltieren führte die Applikation des nACh-Antagonisten Mecamylamin allerdings zur Reduktion der Dopamin- und HVA-Konzentrationen.

## 4 DISKUSSION

Knapp 200 Jahre nach der erstmaligen Beschreibung der Erkrankung durch James Parkinson (111) steht noch immer keine kausale Therapie des IPS zur Verfügung, die das Fortschreiten der Erkrankung verhindern könnte. Dies liegt nicht zuletzt daran, dass die Ätiologie des IPS trotz intensiver Forschungsbemühungen bisher noch weitestgehend unbekannt ist.

Seit Ende der 1980er Jahre gibt es Hinweise, dass das IPS mit einer Neuroinflammation im Sinne einer Mikroglia-Aktivierung in der SNpc und im Locus coeruleus einhergeht (95). Dabei stellt die Mikroglia-Aktivierung möglicherweise jedoch nicht nur die Folge der Neurodegeneration dar. Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass Mikroglia durch Freisetzung pro-inflammatorischer, zytotoxischer Faktoren selbst dazu beitragen, dass der Zelluntergang dopaminergener Neurone in der SNpc über Monate und Jahre aufrecht erhalten wird (28, 56, 123).

Die Beeinflussung der Erkrankung auf Ebene der Neuroinflammation könnte demnach einen möglichen Therapieansatz des IPS darstellen und das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamen.

In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Ansatz verfolgt und es wurden die Auswirkungen einer Abschwächung der Neuroinflammation auf die dopaminerge Neurodegeneration in der SNpc untersucht. Als anti-inflammatorische Substanz diente PNU-282987, ein selektiver Agonist am  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptor, der zu einer Aktivierung des cholinergen anti-inflammatorischen Signalwegs führte. Im Gegensatz dazu wurden ebenso die Effekte des nACh-Antagonisten Mecamylamin untersucht.

Erst kürzlich wurde eine Studie von Liu *et al.* veröffentlicht, die diesen Ansatz ebenfalls verfolgt (92). Die Ergebnisse von Liu *et al.* beziehen sich allerdings auf Untersuchungen mit dem unselektiven nACh-Agonisten Nikotin und dem selektiven  $\alpha 7$ -nACh-Antagonisten Methyllycaconitin. In der hier vorliegenden Studie hingegen wurden erstmals die Folgen einer direkten und selektiven Aktivierung des  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptors im akuten MPTP-Mausmodell untersucht. Zusätzlich wurden in dieser Studie auch die Auswirkungen auf Interleukine, die wichtige Komponenten der reaktiven Mikroglie und des cholinergen anti-inflammatorischen Signalwegs darstellen, betrachtet. Passend zu den Ergebnissen von Liu *et al.* zeigte der selektive  $\alpha 7$ -nACh-Agonist PNU-282987 ein anti-inflammatorisches und neuroprotektives Potential.

### 4.1 AUSWAHL DES TIERMODELLS

Die Studie wurde am akuten MPTP-Mausmodell durchgeführt (71, 136), welches derzeit als das am besten untersuchte und etablierte Tiermodell des IPS gilt (48, 117).

MPTP hat gegenüber anderen toxininduzierten Parkinson-Modellen den Vorteil, dass es selektiv zur Zerstörung dopaminerger Neurone in der SNpc führt und ebenso beim Menschen ein Parkinson-Syndrom auslöst. Zudem kommt es zum Dopaminmangel im Striatum und zur Mikroglia-Aktivierung in der SNpc (90). Während der dopaminerge Zelluntergang beim IPS über Jahre andauert, ist die Phase der aktiven Neurodegeneration bereits wenige Tage nach MPTP-Intoxikation beendet (70). Es gibt jedoch Hinweise, dass auch nach dieser akuten Phase die MPTP-induzierte Neurodegeneration weiter anhält und fortschreitet (82, 147). Lewy-Körperchen als neuropathologisches Korrelat des IPS treten nach MPTP-Gabe nicht auf (118). Die genaue Ursache dafür ist bis heute noch nicht bekannt.

Mäuse, insbesondere Mäuse, sind in der experimentellen Forschung die am häufigsten verwendete Tierart. Dabei ist zu beachten, dass Mäuse im Gegensatz zu Affen, die ebenfalls als MPTP-Versuchstiere dienen, keine Parkinson-Symptome entwickeln und weniger empfindlich auf MPTP reagieren, sodass wesentlich höhere Dosierungen erforderlich sind, um eine neuronale Degeneration in der SNpc auszulösen (117). Zudem weisen verschiedene Mausstämme eine unterschiedliche MPTP-Suszeptibilität auf. Die Mauslinie C57Bl/6 reagiert besonders empfindlich auf MPTP. Eine kumulative Dosis von 90 mg/kg Körpergewicht reicht bei diesem Mausstamm aus, um einen Dopamin-Verlust von 76 % zu erzielen. Im Vergleich dazu ist beispielsweise eine kumulative Dosis von 410 mg/kg Körpergewicht notwendig, um einen 65-prozentigen Dopamin-Verlust bei Swiss-Webster-Mäusen zu erreichen (49). Auch im Hinblick auf histologische Parameter, wie die Anzahl dopaminerger Neurone in der SNpc, sowie auf das Tierverhalten ist die C57Bl/6-Maus anderen Mauslinien im MPTP-Modell überlegen (131). Optimale Reproduzierbarkeit der MPTP-Neurotoxizität wird dabei bei der Verwendung männlicher 8 bis 10 Wochen alter C57Bl/6-Mäuse mit einem Körpergewicht von 25 bis 30 g erreicht (117), wie sie hier in der Studie verwendet wurden. Das Ausmaß der nigrostriatalen Schädigung hängt sowohl von der Dosis als auch vom Dosierungsschema ab. Die größten Effekte werden im akuten MPTP-Mausmodell mit einer Dosierung von 4x 20 mg/kg Körpergewicht MPTP i.p. in einem 2-Stunden-Intervall bei C57Bl/6-Mäusen erzielt (136). Gleichzeitig führt diese Dosierung verlässlich zum begleitenden Auftreten einer Neuroinflammation in der SNpc und im Striatum, was im Hinblick auf die Fragestellung dieser Studie von besonderer Bedeutung war. Aus diesen Gründen wurde diese Studie unter Verwendung des akuten MPTP-Mausmodells mit männlichen, zum Zeitpunkt der MPTP-Intoxikation 8 Wochen alten C57Bl/6-Mäusen durchgeführt.

## 4.2 TIERVERHALTEN

Unmittelbar nach MPTP-Applikation wiesen die Tiere kurzzeitig körperliche Symptome wie struppiges Fell, Zittern und Hypokinese auf. Diese Symptome sind typische Intoxikationserscheinungen nach MPTP-Gabe, die in der Regel für 24 bis 48 Stunden anhalten (71). Eine MPTP-bedingte Letalität wurde in dieser Versuchsserie nicht beobachtet. Grund hierfür könnte die Unterbringung der Tiere in einem Wärmeschrank bei +27 °C nach MPTP-Intoxikation sein. Auf diese Weise konnte die Hypothermie, welche auf die kardiovaskuläre Wirkung von MPTP zurückzuführen ist und den Hauptgrund für die hohe akute Letalität nach MPTP-Intoxikation darstellt (71), verhindert werden.

Das motorische Verhalten der Tiere wurde anhand des Rotarod-Tests untersucht. Es konnten keine Unterschiede sowohl zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen, als auch beim Vergleich vor und sechs Tage nach der MPTP-Behandlung festgestellt werden. Die oben beschriebenen körperlichen Symptome, die eventuell zu Defiziten der motorischen Leistung auf dem Rotarod hätten führen können, waren zum Zeitpunkt des zweiten Testlaufs bereits abgeklungen. Zudem löst MPTP bei Mäusen, wie bei allen Nagern, keine typische Parkinson-Symptomatik – Akinese, Rigor, Tremor und posturale Instabilität – aus. Dies könnte erklären, warum im Rotarod-Test keine Unterschiede bei MPTP-behandelten Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren festgestellt werden konnten.

Auch Sedelis *et al.* konnten im Rotarod-Versuch wie auch in weiteren Verhaltensversuchen keine signifikanten MPTP-bedingten Verhaltensunterschiede bei C57Bl/6-Mäusen feststellen (131). Rozas *et al.* beschrieben den Rotarod-Test als einen geeigneten Test, das motorische Verhalten von MPTP-behandelten C57Bl/6-Mäusen zu untersuchen. In einem anders als in dieser Studie gewählten MPTP-Regime konnten sie ein Defizit im motorischen Verhalten beobachten, welches jedoch erst nach der vierten MPTP-Gabe an Tag 45 nachweisbar war. Zu einem früheren Zeitpunkt konnte auch hier kein Verhaltensunterschied nachgewiesen werden (127). Luchtman *et al.* hingegen beobachteten, dass die insgesamt zurückgelegte Strecke auf dem Rotarod 48 Stunden nach akuter MPTP-Intoxikation im Vergleich zur Kontrolle vermindert war (93).

Beim Vergleich dieser Studien sind allerdings Unterschiede in der jeweiligen Testdurchführung zu beachten. Man kann zwei Arten des Rotarod-Tests unterscheiden. Beim sogenannten *Fixed-speed Rotarod*, der hier angewandten Methode, bleibt die Geschwindigkeit über die gesamte Testzeit konstant (40). Diese Methode ist vor allem geeignet, um das Erlernen motorischer Fähigkeiten zu testen und um – wie in dieser Studie angestrebt – minimale Veränderungen, die auf eine behandlungsassoziierte Genesung zurückzuführen sind, nachzuweisen (104). Den größten Einfluss hat

hier die Rotationsgeschwindigkeit. Die in dieser Studie verwendete Geschwindigkeit von 10 rpm war relativ gering, sodass die kardiopulmonale Leistung keinen Einfluss auf die Rotarod-Leistung nehmen konnte. Beim sogenannten *Accelerating Rotarod* hingegen nimmt die Geschwindigkeit im Testverlauf zu (73, 127, 150). Auf diese Weise lässt sich das maximale motorische Leistungsvermögen der Tiere testen. Dieses Verfahren ist geeignet, wenn das Ausmaß einer nigrostriatalen Schädigung beispielsweise bei verschiedenen Tiermodellen verglichen werden soll (104). Zu beachten ist außerdem, dass beim Rotarod die motorische Koordination in der Bewegung untersucht wird und nicht die Ausführung freiwilliger Bewegungen.

PNU-282987 oder Mecamylamin alleinig haben bei den gegebenen Dosierungen zu keinen Veränderungen der lokomotorischen Aktivität geführt und zeigten ebenso keinen Effekt bei MPTP-intoxikierten Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren.

### **4.3 NEUROINFLAMMATION**

Das Ausmaß der Neuroinflammation, einer der wesentlichen potentiellen therapeutischen Angriffspunkte dieser Studie, wurde anhand der striatalen Zytokin-Konzentrationen von IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-10 sowie der Anzahl aktivierter Mikroglia in der SNpc beurteilt.

#### *MPTP führt zur ausgeprägten Neuroinflammation in SNpc und Striatum*

Bereits zwei Tage nach akuter MPTP-Intoxikation waren die Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  im Striatum signifikant erhöht im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren, während die Konzentration des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 durch MPTP nicht beeinflusst wurde.

Erhöhte Zytokin-Konzentrationen im Striatum sind Anzeichen einer Neuroinflammation – in diesem Fall ausgelöst durch MPTP. Im Rahmen einer Neuroinflammation werden Zytokine im ZNS vor allem von aktivierten Mikrogliazellen, den einzig immunkompetenten Zellen des ZNS, produziert und sezerniert (91, 123). Proinflammatorische Zytokine können ihrerseits bei übermäßiger Sekretion zur Neurodegeneration beitragen. TNF- $\alpha$  unterstützt in besonderem Ausmaß die neurotoxische Wirkung von MPTP. So konnte gezeigt werden, dass MPTP in transgenen Mäusen, die keinen der beiden TNF- $\alpha$ -Rezeptoren exprimieren, nicht neurotoxisch wirkt (139). Auch IL-1 $\beta$  wird eine bedeutende Rolle in Bezug auf das Fortschreiten des IPS zugeschrieben. Polymorphismen im IL-1 $\beta$ -Gen bei Menschen sind assoziiert mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten eines IPS und einem geringeren Erkrankungsalter (98, 108). IL-6 nimmt eine Sonderstellung unter den Zytokinen ein, da es nicht nur pro-inflammato-

risch, sondern auch anti-inflammatorisch wirken kann. Eine Deletion im IL-6-Gen führt zu erhöhter Sensitivität gegenüber MPTP (18, 24), was darauf hindeutet, dass IL-6 im Zusammenhang mit MPTP eher neuroprotektiv zu wirken scheint. IL-10 zählt zu den anti-inflammatorischen Zytokinen. Es gibt nur wenige Veröffentlichungen, die über IL-10 nach MPTP-Intoxikation berichten. Ciesielska *et al.* konnten einen phasischen Verlauf der IL-10-mRNA-Expression nach akuter MPTP-Intoxikation bei C57Bl/6-Mäusen nachweisen. Nach einem ersten signifikanten Anstieg sechs Stunden nach MPTP-Gabe nahm die Expression der IL-10-mRNA im Striatum 24 Stunden nach Intoxikation wieder ab und unterschied sich nicht mehr vom Kontrollwert, bis an Tag 3 wieder ein Anstieg der IL-10-mRNA-Expression eintrat (31). Dies erklärt möglicherweise, warum in dieser Studie an Tag 2 nach akuter MPTP-Intoxikation keine Veränderung der striatalen IL-10-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden konnte.

In Bezug auf die mikrogliale Aktivierung kam es zwei Tage nach MPTP-Intoxikation zu einer signifikanten Zunahme der Anzahl Iba-1-positiver Mikroglia in der SNpc auf fast 400 % des Ausgangswertes. Zusätzlich konnten morphologische Veränderungen der Mikroglia von einer ramifizierten Form hin zu einer hypertrophen Form mit eher proximalen, verdickten Zellausläufern und einer abnehmenden distalen Ramifizierung beobachtet werden.

Die Zunahme der Zellzahl sowie die morphologischen Veränderungen sind charakteristisch für die Aktivierung von Mikroglia. MPTP hat demnach in der SNpc zu einer Mikroglia-Aktivierung und zur Neuroinflammation geführt. Dass MPTP nicht nur zum dopaminergen Zelluntergang in der SNpc führt, sondern begleitend auch eine Glia-reaktion induziert, wurde bereits mehrfach beschrieben (34, 77, 80, 82, 90). Man geht davon aus, dass Mikroglia nicht direkt durch MPTP selbst aktiviert werden, sondern dass MPTP-geschädigte dopaminerge Neurone Substanzen freisetzen, die zur reaktiven Mikroglia-Aktivierung führen (47, 77). Mikroglia sind die einzig immunkompetenten Zellen des ZNS und reagieren als erste auf die neuronale Schädigung durch MPTP. Man kann daher davon ausgehen, dass zwei Tage nach MPTP-Intoxikation die erhöhten Zytokin-Konzentrationen von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  auf die Mikroglia-Aktivierung zurückzuführen sind.

Zusammenfassend hat die akute MPTP-Intoxikation zu einer ausgeprägten Neuroinflammation in der SNpc und im Striatum geführt und somit die Voraussetzung zur Untersuchung der anti-inflammatorischen Effekte des  $\alpha 7$ -nACh-Agonisten PNU-282987 geschaffen.

*PNU-282987 führt zur Abschwächung der Neuroinflammation in SNpc und Striatum*

Der selektive  $\alpha 7$ -nACh-Agonist PNU-282987 konnte in dieser Studie die durch MPTP ausgelöste Neuroinflammation in der SNpc und im Striatum reduzieren, indem er Zytokin-Konzentrationen gesenkt und die Aktivierung von Mikroglia abgeschwächt hat. PNU-282987 reduzierte im Striatum die durch MPTP ausgelöste Konzentrationszunahme der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  signifikant. Der MPTP-induzierte Anstieg des IL-6-Spiegels wurde nur geringfügig (n.s.) gesenkt. Auf den IL-10-Spiegel hatte PNU-282987 keine Auswirkung.

Es liegt nahe, dass PNU-282987 als selektiver Agonist am  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptor über die Aktivierung des cholinergen anti-inflammatorischen Signalwegs gewirkt und so zur Reduktion der pro-inflammatorischen Zytokin-Konzentrationen und zur Abschwächung der Neuroinflammation beigetragen hat. Über diesen Signalweg kann das autonome Nervensystem Immunantworten regulieren. Die Aktivierung des cholinergen anti-inflammatorischen Signalwegs führt dabei u.a. zu einer Reduktion der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  (33), die bei der Neuroinflammation im Rahmen des Parkinson-Syndroms von Bedeutung sind (106).

Man kann davon ausgehen, dass nach Bindung von PNU-282987 an den  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptor, der u.a. auf Mikroglia exprimiert wird, die Translokation des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B in den Zellkern unterbunden und die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine, darunter IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$ , verhindert wird. Die Freisetzung des Zytokins HMGB1, welches die Expression von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  induziert, wird gehemmt. Zusätzlich wird der Jak2/STAT3-Signalweg aktiviert, der anti-inflammatorische Effekte induziert und möglicherweise ebenfalls den NF $\kappa$ B-Signalweg inhibiert. Die Aktivierung des anti-inflammatorischen Signalwegs reduziert demnach also die Transkription und Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine durch Mikroglia. Entsprechend waren in dieser Studie die Konzentrationen von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und (n.s.) von IL-6 im Hirnlysat nach Behandlung mit PNU-282987 reduziert. Auch Shytle *et al.* konnten über die Aktivierung des cholinergen anti-inflammatorischen Signalwegs eine (wenn auch LPS-induzierte) TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus mikroglialen Zellen verhindern (133).

Den striatalen IL-6-Spiegel konnte PNU-282987 nur leicht, aber nicht signifikant senken. Borovikova *et al.* hingegen konnten zeigen, dass die Aktivierung des cholinergen anti-inflammatorischen Signalwegs mittels Acetylcholin einen Endotoxin-induzierten IL-6-Anstieg in einer Makrophagen-Kultur senken kann (19). Mikroglia, die Makrophagen des ZNS, sind jedoch nicht die einzigen Zellen, die IL-6 freisetzen. Auch Astrozyten produzieren und sezernieren IL-6. Bolin *et al.* waren die Ersten, die über eine Astrozyten-spezifische IL-6-Induktion im Striatum nach MPTP-Intoxikation berichteten (18). Dies könnte erklären, warum PNU-282987 den striatalen IL-6-Spiegel nur

geringfügig, aber nicht signifikant senken konnte. Einen weiteren Grund, warum die Aktivierung des cholinergen anti-inflammatorischen Signalwegs den IL-6-Spiegel nicht signifikant gesenkt hat, könnte STAT3 darstellen. STAT3 ist an der Produktion von IL-6 beteiligt. Es wird bei Aktivierung des Jak2/STAT3-Signalwegs – in diesem Fall über die Bindung von PNU-282987 an den  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptor – vermehrt exprimiert. Während gezeigt werden konnte, dass die Herunterregulierung der STAT3-Expression die LPS-induzierte IL-6-Produktion nachweislich senkt (12), könnte eine durch PNU-282987 gesteigerte Expression von STAT3 die IL-6-Produktion anheben.

Da IL-6 nicht nur pro-inflammatorische, sondern auch anti-inflammatorische Eigenschaften besitzt, kann die Nicht-Reduktion des IL-6-Spiegels durch PNU-282987 ggf. auch als protektiver Effekt gewertet werden. Auch IL-6 kann den Jak2/STAT3-Signalweg nachweislich aktivieren (38). Der Jak2/STAT3-Signalweg kann wiederum den NF $\kappa$ B-Signalweg inhibieren und so zum anti-inflammatorischen Effekt beitragen.

PNU-282987 hat den MPTP-induzierten Anstieg des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 nicht beeinflusst. IL-10 wird zwar auch von Mikroglia freigesetzt, jedoch wird seine Expression nicht über den NF $\kappa$ B-Signalweg reguliert (15). Entsprechend wird seine Genexpression auch nicht durch den cholinergen anti-inflammatorischen Signalweg beeinflusst (19). Dies deutet darauf hin, dass PNU-282987 selektiv anti-inflammatorisch am  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptor gewirkt hat.

Ein wichtiger zusätzlicher Aspekt in der Beurteilung neuroinflammatorischer Prozesse im murinen MPTP-Modell ist die mikrogliale Aktivierung. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Gabe des selektiven  $\alpha 7$ -nACh-Agonisten PNU-282987 bei MPTP-intoxikierten Tieren die erhöhte Mikroglia-Anzahl in der SNpc auf den Kontrollwert gesunder Tiere reduziert. Zudem führte die Behandlung mit PNU-282987 zu morphologischen Veränderungen der Mikroglia. Die zuvor aktivierte, hypertrophe Mikrogliazelle erlangte wieder ein ruhendes, ramifiziertes Zellstadium. PNU-282987 hat also auch die Neuroinflammation in Bezug auf die Mikroglia-Aktivierung abgeschwächt.

Wie oben bereits erläutert, liegt es nahe, dass PNU-282987 über eine Bindung an den mikroglialen  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptor den cholinergen anti-inflammatorischen Signalweg aktiviert und die Zytokin-Produktion der Mikroglia reduziert hat. Geringere Zytokin-Spiegel haben zur Folge, dass weniger Zytokine an die Zytokin-Rezeptoren der Mikroglia binden und diese autokrin aktivieren können. Außerdem wird die Schädigung dopaminerger Neurone durch pro-inflammatorische Zytokine abgeschwächt bzw. unterbunden (s. auch Kapitel 4.4). Gehen weniger dopaminerge Neurone zugrunde, so werden wiederum auch weniger mikrogliale Aktivatoren wie beispielsweise  $\alpha$ -Synuclein und Neuromelanin freigesetzt.

PNU-282987 konnte also durch Aktivierung des cholinergen anti-inflammatorischen Signalwegs den *Circulus vitiosus* der reaktiven Mikroglie durchbrechen und so die Neuroinflammation zwar nicht vollständig unterbinden, jedoch deutlich abschwächen. Die Anzahl der Mikroglia in der SNpc sowie die morphologischen Veränderungen konnten auf dem Kontrollwert gesunder Tiere gehalten werden. Diese Ergebnisse werden durch die Befunde von Shytle *et al.* unterstützt, die zeigen konnten, dass die Aktivierung des cholinergen anti-inflammatorischen Signalwegs die (allerdings LPS-induzierte) Mikroglia-Aktivierung abschwächen kann (133).

Beim Vergleich der Kontrollgruppen untereinander fällt auf, dass PNU-282987 bei gesunden Tieren zu einer Erhöhung der Mikroglia-Anzahl um ca. 50% geführt hat. Die Erklärungen hierfür können nur rein spekulativ sein. Da diese Art der Mikroglia-Aktivierung nicht zum dopaminergen Zelluntergang in der SNpc geführt hat, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die Aktivierung des  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptors zu einem inflammatorischen Milieu führt, welches sich von der Neuroinflammation beim IPS unterscheidet und welches kein neurotoxisches Potential besitzt. Es ist außerdem denkbar, dass die alleinige Mikroglia-Aktivierung ohne ein primäres neurotoxisches Ereignis nicht zur Neurodegeneration führen kann. Immerhin sind Neuroinflammation und eine milde Aktivierung von Mikroglia als vorübergehende Antwort des Immunsystems auf einen schädigenden Einfluss nicht nachteilig. Sie dienen primär der Abwehr und können sogar neuroprotektiv wirken (34). Bei neurodegenerativen Erkrankungen wie dem IPS jedoch wird die Mikroglia-Aktivierung als Antwort auf den dopaminergen Zelluntergang chronisch und führt zu weiterer Zellschädigung, indem pro-inflammatorische und neurotoxische Faktoren freigesetzt werden. Diese sogenannte reaktive Mikroglie führt zu einem sich selbst aufrecht erhaltenden Prozess und unterhält die Neurodegeneration (16). Neuroinflammation und Mikroglia-Aktivierung scheinen demnach je nach Grad der Aktivierung unterschiedliche Funktionen und Auswirkungen zu haben. Möglich wäre es auch, dass der  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptor ein intrinsisches neuroprotektives Potential aufweist, welches unabhängig von seiner Wirkung auf die Neuroinflammation ist. Daher hat möglicherweise auch die Behandlung mit dem nACh-Antagonisten Mecamylamin zu einer Abschwächung der Neuroinflammation geführt ohne jedoch Auswirkungen auf das Ausmaß des dopaminergen Zelluntergangs zu haben (s. Kapitel 4.4). Dagegen spricht, dass bereits in früheren Studien mit dem unselektiven nACh-Agonisten Nikotin gezeigt wurde, dass die protektiven Eigenschaften des  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptors auf dopaminerge Neurone auf seine anti-inflammatorische Wirkung zurückzuführen sind (110). Letztendlich bleibt die Wirkung von PNU-282987 auf Saline-behandelte Tiere nicht vollständig verstanden.

*Auch Mecamylamin zeigt anti-inflammatorische Effekte*

Die Behandlung MPTP-intoxizierter Tiere mit dem nACh-Antagonisten Mecamylamin führte – ähnlich wie die Behandlung mit dem Agonisten PNU-282987 – zu einer Abschwächung der Neuroinflammation in der SNpc und im Striatum. Mecamylamin reduzierte die durch MPTP ausgelöste Konzentrationszunahme der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  im Striatum. Der MPTP-induzierte Anstieg des IL-6-Spiegels wurde nicht signifikant beeinflusst und der IL-10-Spiegel lediglich im Vergleich zu gesunden Kontrollen gesenkt.

Diese Befunde ähneln stark den Effekten des selektiven  $\alpha 7$ -nACh-Agonisten PNU-282987 auf die Zytokin-Konzentrationen bei MPTP-intoxizierten Tieren. Dabei war man davon ausgegangen, dass Mecamylamin als Antagonist am  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptor den cholinergen anti-inflammatorischen Signalweg inhibiert und die Neuroinflammation aufrechterhält oder sogar verstärkt. Van Westerloo *et al.* konnten beispielsweise mit Mecamylamin die Schwere der Pankreatitis im experimentellen Maus-Modell erhöhen (151).

Eine mögliche Erklärung, warum Mecamylamin zur Reduktion des durch MPTP ausgelösten striatalen IL-1 $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -Anstiegs geführt hat, könnte sein, dass es sich bei Mecamylamin um einen nicht-selektiven nACh-Antagonisten handelt, der folglich auch an andere Untereinheiten des nACh-Rezeptors bindet. Dabei weist Mecamylamin beispielsweise eine höhere Affinität für  $\alpha 4\beta 2$ - und  $\alpha 3\beta 4$ -nACh-Rezeptoren auf als für den  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptor (5). Möglicherweise hatte Mecamylamin zunächst diese anderen Rezeptoren besetzt und konnte so den  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptor nur noch partiell inhibieren. Zudem ist die Blockade des  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptors durch Mecamylamin besonders schnell reversibel, verglichen mit einer Blockade dieser anderen Rezeptoren (109). Es könnte daher möglich sein, dass eine einmal tägliche Applikation von Mecamylamin nicht ausgereicht hat, die  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptoren dauerhaft zu blockieren. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass Mecamylamin in hohen Dosierungen den prokognitiven Effekt von Nikotin am  $\alpha 4\beta 2$ -nACh-Rezeptor inhibieren (88), in niedrigen Dosierungen ( $\leq 1$  mg/kg Körpergewicht) jedoch die kognitive Leistungsfähigkeit im Tiermodell wie ein Agonist steigern kann (143). Es könnte sein, dass auch die Wirkung am  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptor dosisabhängig ist und die hier verwendete Dosierung (einmal täglich 1 mg/kg Körpergewicht) so zu unerwarteten PNU-282987-ähnlichen Effekten geführt hat.

Den durch MPTP erhöhten IL-6-Spiegel konnte Mecamylamin möglicherweise deshalb nicht signifikant beeinflussen, da ein Teil des IL-6 nach MPTP-Intoxikation von Astrozyten gebildet wird und sich seine Produktion somit nicht über den cholinergen anti-inflammatorischen Signalweg beeinflussen lässt.

Der durch MPTP ausgelöste IL-10-Anstieg wurde durch Mecamylamin nicht beeinflusst. Da die IL-10-Produktion, wie oben beschrieben, nicht über den NF $\kappa$ B-Weg reguliert wird, war dieses Ergebnis zu erwarten.

Darüber hinaus zeigte sich, dass die Gabe von Mecamylamin die MPTP-induzierte Zunahme der Mikroglia-Anzahl unerwarteter Weise um nahezu 20% reduzieren konnte. Die Morphologie der durch MPTP aktivierten Mikroglia konnte im Gegensatz dazu nicht beeinflusst werden. Auch war im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren die Anzahl der Mikroglia in der SNpc weiterhin stark erhöht und ihre Morphologie deutete auf ein aktiviertes Stadium hin. Diese leichte, aber signifikante Reduktion der Anzahl aktivierter Mikroglia in der SNpc kann durch die ebenfalls durch Mecamylamin reduzierten Zytokin-Spiegel erklärt werden. Dennoch wies die SNpc nach Gabe des nACh-Antagonisten Mecamylamin nahezu doppelt so viele Mikrogliazellen auf wie nach Gabe des  $\alpha$ 7-nACh-Agonisten PNU-282987. Mecamylamin hat demnach weitaus weniger anti-inflammatorisch gewirkt als PNU-282987.

Auch Mecamylamin hat, ebenso wie PNU-282987, bei Kontrolltieren zu einer Zunahme der Mikroglia-Anzahl geführt. Diesen Effekt des nACh-Antagonisten hätte man durchaus erwarten und mit der Inhibierung des cholinergen anti-inflammatorischen Signalwegs erklären können. Allerdings hat Mecamylamin bei MPTP-intoxikierten Tieren genau den gegenteiligen Effekt gezeigt, sodass man nun hier von diesem Erklärungsansatz absehen muss. Hatte es bei MPTP-behandelten Tieren wie PNU-282987 gewirkt, so zeigte es nun auch bei gesunden Tieren den (unerwarteten) PNU-282987-ähnlichen Effekt.

#### **4.4 DOPAMINERGE NEURODEGENERATION**

Das Ausmaß der dopaminergen Neurodegeneration wurde experimentell anhand der Anzahl TH-positiver dopaminergener Neurone in der SNpc, der striatalen Konzentrationen von Dopamin, DOPAC und HVA sowie anhand des Dopaminsatzes charakterisiert.

##### *MPTP führt zur Neurodegeneration in der SNpc und zum Dopaminmangel im Striatum*

Sieben Tage nach akuter MPTP-Intoxikation betrug die Anzahl TH-positiver dopaminergener Neurone in der SNpc nur noch etwa 64 % des Kontrollwertes. MPTP hat folglich in der SNpc zur Degeneration dopaminergener Neurone geführt. Der dopaminerge Zellverlust in der SNpc ist sowohl charakteristisch für die MPTP-Intoxikation als auch für das IPS selbst. In der Literatur wird von einer Reduktion TH-positiver dopaminergener Neurone in der SNpc um 16,5 % bis 71 % bei 8 Wochen alten C57Bl/6-Mäusen nach akuter MPTP-Intoxikation berichtet (70, 79, 90, 155). Nach systemischer Applikation

überwindet MPTP die Blut-Hirn-Schranke und wird u.a. in Gliazellen zu MPP<sup>+</sup> metabolisiert. MPP<sup>+</sup> wird als eigentliches Neurotoxin spezifisch in dopaminerge Neurone aufgenommen und führt dort u.a. zur Inhibition der mitochondrialen Atmungskette und in der Folge zur Verarmung der Zelle an ATP, zu vermehrtem Auftreten von ROS und schließlich zum Zelltod. Die SNpc ist von der Degeneration dopaminerger Neurone in besonderem Ausmaß betroffen.

Die Anzahl dopaminerger Neurone in der SNpc wurde, wie auch in den oben genannten Studien, über den immunhistochemischen Nachweis der TH bestimmt. Da die TH im ZNS ein spezifisches Enzym der dopaminergen Zellen ist, lassen sich auf diese Weise dopaminerge Neurone spezifisch nachweisen. Diese Methode ist in ihrer Durchführung und Auswertung wesentlich praktischer und spezifischer als die Nissl-Färbung (70). Mit Hilfe der Nissl-Färbung lassen sich saure, basophile Zellbestandteile, Ribonukleinsäure (RNA) und DNA in den Nukleoli und Ribosomen von Neuronen anfärben. Da sich diese Zellorganellen nur im Zellkörper befinden, wird bei der Nissl-Färbung entsprechend nur der Zellkörper der Neurone angefärbt. Sowohl die Abnahme der TH-Immunreaktivität als auch der Verlust Nissl-gefärbter Neurone weisen auf eine Neurodegeneration hin.

Zu beachten ist, dass MPTP zu einer Reduktion der TH-Immunreaktivität führen kann, ohne dass es zwingend zum Zelltod kommt (70, 132). Daher korrelieren während der aktiven Phase der MPTP-induzierten Neurodegeneration die TH-Immunreaktivität und die Anzahl Nissl-gefärbter Neurone nicht miteinander. Die Anzahl TH-positiver dopaminerger Neurone fällt in den ersten Tagen nach MPTP-Intoxikation geringer aus als die Nissl-Zellzahl. Sieben Tage nach MPTP-Intoxikation hingegen korreliert die Anzahl TH-positiver dopaminerger Zellen und Nissl-gefärbter Neurone wieder miteinander. Da der Nachweis der TH-Immunreaktivität die spezifischere Methode ist, ist sie ab Tag 7 nach MPTP-Intoxikation der Nissl-Färbung vorzuziehen. Dann ist die dopaminerge Neurodegeneration weitestgehend abgeschlossen, sodass die Bestimmung der Zellzahl zu diesem Zeitpunkt ebenso präzise ist wie an Tag 28 nach MPTP-Intoxikation (70). Entsprechend wurden in dieser Studie die dopaminergen Zellen in der SNpc an Tag 7 nach MPTP-Intoxikation mit Hilfe der TH-IHC nachgewiesen.

Im Striatum führte MPTP zur Reduktion der Dopamin-Konzentration um ca. 88%. Die Konzentrationen der Dopamin-Metaboliten DOPAC und HVA wurden um etwa 80 bzw. 77 % gesenkt. Die Reduktion dieser Neurotransmitterspiegel ist auf den durch MPTP ausgelösten dopaminergen Zelluntergang in der SNpc zurückzuführen. Die in dieser Studie beobachtete Abnahme der Neurotransmitterspiegel entspricht in ähnlichem Ausmaß den Ergebnissen anderer Studien. Jakowec *et al.* beobachteten eine

Abnahme der Dopamin-Konzentration an Tag 7 um 93,4 %, welche zu diesem Zeitpunkt auch den niedrigsten Wert aufwies (72).

Vergleicht man die prozentuale Abnahme der Neurotransmitter-Konzentrationen mit dem Zellverlust in der SNpc, so fällt auf, dass die Neurotransmitter-Spiegel in wesentlich größerem Ausmaß gesenkt wurden als die Anzahl dopaminerger Zellen in der SNpc. Erklärt werden kann dies dadurch, dass die dopaminerge Neurodegeneration einen sogenannten „*Dying Back*-Prozess“ darstellt (36, 66). Die Schädigung erfolgt primär an den terminalen Nervenendigungen und schreitet von hier aus zum Zellkörper hin fort (132). Entsprechend ist die Destruktion terminaler Nervenendigungen im Striatum wesentlich ausgeprägter als der Untergang dopaminerger Zellkörper in der SNpc. Gehen nach MPTP-Intoxikation nun insbesondere die terminalen Nervenendigungen zugrunde, so werden entsprechend auch die Konzentrationen von Dopamin, DOPAC und HVA wesentlich stärker gesenkt als die Anzahl dopaminerger Neurone in der SNpc.

Die Werte des DOPAC/Dopamin- und HVA/Dopamin-Quotienten waren nach MPTP-Intoxikation erhöht. Dies deutet auf einen kompensatorisch gesteigerten Dopamin-Umsatz überlebender Neurone hin, welcher das striatale Dopamin-Defizit ausgleichen soll (57).

MPTP hat zusammenfassend also zu einer ausgeprägten Degeneration dopaminerger Neurone in der SNpc sowie zum Dopaminmangel im Striatum geführt und demnach Charakteristika eines Parkinson-Syndroms in der Maus ausgelöst.

#### *PNU-282987 wirkt neuroprotektiv auf dopaminerge Neurone in der SNpc*

Die Behandlung mit PNU-282987 konnte die Schädigung dopaminerger Neurone durch MPTP abschwächen. Dies zeigte sich sowohl quantitativ anhand der Zellzahl als auch funktionell anhand des Dopaminstoffwechsels. Der durch MPTP verursachte Untergang dopaminerger Neurone in der SNpc wurde durch Gabe von PNU-282987 soweit abgeschwächt, dass sich die Zellzahl der MPTP/PNU-282987-Tiere nicht mehr von dem Wert gesunder Kontrollen unterschied. PNU-282987 hat demnach neuroprotektiv gewirkt. Dabei sind zwei verschiedene mögliche Mechanismen zu unterscheiden, über die PNU-282987 diesen neuroprotektiven Effekt ausgeübt haben könnte.

Es liegt nahe, dass PNU-282987 über die in dieser Studie bereits nachgewiesene Abschwächung der Neuroinflammation in der SNpc den *Circulus vitiosus* der reaktiven Mikroglie durchbrochen und die sich selbst aufrecht erhaltende Neurotoxizität unterbunden hat. Werden durch PNU-282987 weniger Mikroglia aktiviert, setzen diese u.a. weniger Zytokine frei, die zur Schädigung dopaminerger Neurone beitragen könnten. Unterstützt wird dies durch die Ergebnisse von Park *et al.*, welche den neuro-

protektiven Effekt von Nikotin auf dopaminerge Neurone auf die Abschwächung der Mikroglia-Aktivierung zurückführen (110). Erst kürzlich haben Liu *et al.* gezeigt, dass sich dieser neuroprotektive Effekt von Nikotin durch die Gabe des selektiven  $\alpha 7$ -nACh-Antagonisten Methyllycaconitin aufheben lässt (92). Diese Befunde unterstreichen nachhaltig die Hypothese, dass PNU-282987 seine neuroprotektive Wirkung auf dopaminerge Neurone in der SNpc durch die Aktivierung des mikroglialen  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptors und die Abschwächung der Neuroinflammation geleistet hat.

Allerdings weisen nicht nur Immunzellen den  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptor auf, sondern auch Neurone. Hier fungiert der  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptor als ligandengesteuerter Calciumkanal und moduliert die Neurotransmitter-Freisetzung aus präsynaptischen Nervenendigungen (3). Zwar weisen dopaminerge Nervenzellendigungen im Striatum keinen solchen  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptor auf (27), dafür jedoch glutamaterge Nervenzellendigungen (3), die wiederum im Striatum die Dopamin-Freisetzung modulieren können. Für das VTA wurde bereits nachgewiesen, dass präsynaptische  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptoren die glutamaterge Neurotransmission positiv beeinflussen können (99, 129). Eine mögliche Erklärung könnte demnach sein, dass PNU-282987 über eine vermehrte Glutamat-Ausschüttung die Dopamin-Freisetzung im Striatum gesteigert hat. Eine erhöhte Dopamin-Ausschüttung bringt entsprechend eine erhöhte Dopamin-Wiederaufnahme in dopaminerge Neurone mit sich, welche ebenso wie die Aufnahme von MPP<sup>+</sup> über den DAT geschieht. Der neuroprotektive Effekt von PNU-282987 könnte demnach auch auf eine kompetitive Hemmung der MPP<sup>+</sup>-Aufnahme in dopaminerge Neurone zurückzuführen sein. Park *et al.* konnten jedoch unabhängig von MPTP bzw. MPP<sup>+</sup> auch an *in-vivo*- und *in-vitro*-Modellen der LPS-induzierten Neuroinflammation die neuroprotektive Wirkung des  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptors nachweisen (110).

Der MPTP-induzierte Dopaminmangel im Striatum wurde durch Behandlung mit PNU-282987 abgeschwächt. Ebenso wurde auch die reduzierte DOPAC-Konzentration erhöht, während PNU-282987 auf den verminderten HVA-Spiegel keinen Einfluss hatte. Der kompensatorisch gesteigerte Dopamin-Umsatz überlebender Neurone wurde durch PNU-282987 geringfügig (n.s.) gesenkt, sodass sich der HVA/Dopamin-Quotient der MPTP/PNU-282987-Tiere nicht vom Kontrollwert unterschied. PNU-282987 hat also – in gewissem Maße – auch auf physiologischer Ebene neuroprotektiv gewirkt.

Beim Vergleich der Effekte von PNU-282987 sowohl auf funktioneller als auch auf morphologischer Ebene fällt jedoch auf, dass PNU-282987 in wesentlich größerem Ausmaß den dopaminergen Zelluntergang in der SNpc beeinflusst hat als den Dopaminmangel im Striatum. Dies könnte erneut auf den „*Dying back*“-Prozess“ der Neurodegeneration unter MPTP zurückzuführen sein (36, 66). Es wäre möglich, dass

PNU-282987 grundsätzlich zwar – wie in dieser Studie nachgewiesen – den Zelluntergang in der SNpc aufgehalten hat, jedoch die Zerstörung terminaler Nervenendigungen im Striatum nicht verhindern konnte. Entsprechend konnte PNU-282987 auch die dopaminerge Neurotransmission nicht wesentlich positiv beeinflussen. Zu beachten ist außerdem, dass nach MPTP-Intoxikation die Schädigung bezüglich des Dopaminstoffwechsels wesentlich ausgeprägter war, als die Reduktion der Zellzahl.

Dass PNU-282987 den Dopaminmangel zwar signifikant, aber doch in relativ geringem Ausmaß gesenkt hat, könnte ein Hinweis darauf sein, dass die neuroprotektive Wirkung von PNU-282987 weniger auf eine Modulation der Neurotransmitter-Freisetzung, sondern eher auf die Abschwächung der Neuroinflammation in der SNpc zurückzuführen ist. Die Wirkung über die Neurotransmitter-Modulation ließe höhere striatale Dopamin-Spiegel erwarten.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass PNU-282987 höchst wahrscheinlich über die Abschwächung der Neuroinflammation die Degeneration dopaminergener Neurone in der SNpc aufhalten kann. Entsprechend wurde auch der striatale Dopamin-Mangel durch PNU-282987 reduziert. Der erhöhte Dopamin-Umsatz wurde geringfügig (n.s.) gesenkt.

*Mecamylamin hat keinen Effekt auf den dopaminergen Zelluntergang in der SNpc*

Die Gabe des unselektiven nACh-Antagonisten Mecamylamin konnte die Schädigung des dopaminergen Systems durch MPTP nicht aufhalten oder abschwächen. So kam es auch nach Gabe von Mecamylamin zu einem MPTP-bedingten Untergang dopaminergener Neurone in der SNpc. Die gesenkten Spiegel von Dopamin, DOPAC und HVA im Striatum wurden ebenso wie der Dopamin-Umsatz nicht beeinflusst.

Mecamylamin hat zwar unerwarteter Weise auch zu einer Abschwächung der Neuroinflammation in der SNpc und im Striatum geführt, dies konnte allerdings die Neurodegeneration in der SNpc nicht verhindern. Eine mögliche Erklärung könnten die Eigenschaften von Mecamylamin als unselektiver nACh-Antagonist und das dadurch erweiterte Wirkspektrum liefern. Mecamylamin bindet auch an andere nACh-Rezeptoren, die zum Teil sogar in größerer Zahl im Striatum vorkommen als der  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptor. Beispielsweise kommen  $\alpha 4\beta 2$ -nACh-Rezeptoren, die ebenfalls die Dopamin-Freisetzung modulieren, im Striatum wesentlich häufiger vor als  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptoren (119). Zudem zeigt Mecamylamin an  $\alpha 4\beta 2$ -nACh-Rezeptoren eine höhere Affinität und Wirkung als an  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptoren (5, 109). Mecamylamin kann im Striatum also nicht nur die Effekte des  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptors inhibieren, sondern auch andere nACh-Rezeptoren blockieren. Es wäre somit möglich, dass Mecamylamin über die Hemmung diverser nACh-Rezeptoren die Glutamat-Ausschüttung und konsekutiv

die Dopamin-Ausschüttung geschwächt hat. Passend dazu hat Mecamylamin die striatalen Spiegel von Dopamin und HVA in gesunden Kontrolltieren reduziert. Eine verminderte Dopamin-Freisetzung hätte bei MPTP-intoxikierten Tieren wiederum zur Folge, dass weniger Dopamin über den DAT in die dopaminerge Zelle wiederaufgenommen wird und vermehrt neurotoxisches MPP<sup>+</sup> in die dopaminerge Zelle gelangt.

Dass das Ausmaß der dopaminergen Schädigung nach Behandlung mit Mecamylamin das der alleinigen MPTP-Behandlung nicht überstieg, könnte man wiederum mit der unerwarteten anti-inflammatorischen Wirkung von Mecamylamin erklären. Diese könnte die vermehrte MPP<sup>+</sup>-Aufnahme möglicherweise wieder ausgeglichen haben. So unterschied sich das Ausmaß der Schädigung des nigrostriatalen Systems nach zusätzlicher Mecamylamin-Gabe nicht von der alleinigen Behandlung mit MPTP.

Wie oben bereits erwähnt, könnte es auch möglich sein, dass der  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptor ein intrinsisches neuroprotektives Potential besitzt, welches unabhängig von seiner Wirkung auf die Neuroinflammation ist. Dies könnte erklären, warum die Behandlung mit dem nACh-Antagonisten Mecamylamin trotz anti-inflammatorischer Wirkung keine Auswirkungen auf die dopaminerge Neurodegeneration hatte.

Insgesamt ist festzustellen, dass eine Behandlung mit dem unselektiven nACh-Antagonisten Mecamylamin die durch MPTP ausgelöste Neurodegeneration in der SNpc nicht beeinflussen kann.

## 4.5 FAZIT

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass der selektive  $\alpha 7$ -nACh-Agonist PNU-282987 die Neuroinflammation im akuten MPTP-Mausmodell abschwächt und darüber hinaus auch den dopaminergen Zelluntergang in der SNpc reduziert. Anders als erwartet, zeigte Mecamylamin in der verwendeten Dosierung nicht den genau entgegengesetzten Effekt zu PNU-282987, was sich möglicherweise auf seine Eigenschaften als unselektiver Antagonist an nACh-Rezeptoren zurückführen lässt. Mecamylamin führte zur Abschwächung der Neuroinflammation, zeigte jedoch keinen neuroprotektiven Effekt.

Die Ergebnisse dieser Studie stärken die Hypothese, dass ein zentraler cholinerg anti-inflammatorischer Signalweg existiert und dass die Aktivierung des  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptors einen möglichen therapeutischen Ansatz in der Behandlung des IPS darstellt. Zwar kann durch die Aktivierung des cholinergen anti-inflammatorischen Signalwegs die derzeit noch unbekannt Ursache der Erkrankung nicht behoben werden, dafür kann die Neuroinflammation als ein wichtiger pathogenetischer Faktor des IPS, der zusätzlich zum dopaminergen Zelluntergang in der SNpc beiträgt, abgeschwächt werden.

PNU-282987 hat im akuten MPTP-Mausmodell eine vielversprechende neuroprotektive Wirkung in Bezug auf die dopaminerge Neurodegeneration gezeigt. Bevor jedoch klinische Konsequenzen gezogen werden können, müssen zunächst die chemischen, physikalischen und toxischen Eigenschaften von PNU-282987 genauer untersucht werden. Derzeit ist die Substanz nur für Forschungszwecke und nicht für den menschlichen Gebrauch zugelassen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptor als Bestandteil des cholinergen anti-inflammatorischen Signalwegs einen potentiellen Angriffspunkt in der Behandlung des IPS darstellt.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Das idiopathische Parkinson-Syndrom zählt zu den häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen. Es ist pathogenetisch durch die Degeneration dopaminerger Neurone, das Auftreten von Lewy-Körperchen in überlebenden Neuronen und eine begleitende Neuroinflammation in der Substantia nigra pars compacta gekennzeichnet. Die Ätiologie der Erkrankung ist trotz intensiver Forschung unbekannt. Ein kausaler Therapieansatz konnte bisher nicht gefunden werden.

Zunehmend gibt es Evidenz dafür, dass die durch aktivierte Mikroglia ausgelöste Neuroinflammation in der Substantia nigra pars compacta nicht nur Folge der dopaminerger Degeneration ist, sondern selbst zum Zellertergang beiträgt. Mikroglia sind die einzig immunkompetenten Zellen des Gehirns. Bei Schädigung dopaminerger Neurone in der Substantia nigra pars compacta kommt es zur Mikroglia-Aktivierung. Aktivierte Mikroglia sezernieren eine Reihe pro-inflammatorischer und potentiell neurotoxischer Faktoren, darunter die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$ , die wiederum dopaminerge Neurone schädigen können. Dieser *Circulus vitiosus* – auch als reaktive Mikrogliose bezeichnet – beschreibt eine sich selbst aufrechterhaltende Neurotoxizität, die zu einer chronischen, fortschreitenden Neurodegeneration führt.

Bei schweren Infektionen hat der Körper die Möglichkeit, das Ausmaß der Inflammation über den inflammatorischen Reflex des autonomen Nervensystems zu regulieren. Der efferente Arm dieses inflammatorischen Reflexes wird als cholinerg anti-inflammatorischer Signalweg bezeichnet. Wichtiger Bestandteil dieses Signalwegs ist der  $\alpha$ 7-nikotinerge Acetylcholin-Rezeptor, der auf Immunzellen wie Mikroglia exprimiert wird. Seine Aktivierung führt u.a. zu einer Hemmung der NF $\kappa$ B-Translokation in den Zellkern, zur Aktivierung des Jak2/STAT3-Signalwegs und in der Folge zu einer verminderten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine. In experimentellen Modellen verschiedener entzündlicher Erkrankungen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung dieses cholinergen anti-inflammatorischen Signalwegs die Inflammation eindämmen und das Überleben verbessern kann.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob die Neuroinflammation in der Substantia nigra pars compacta über diesen Signalweg beeinflussbar ist und ob dies einen möglichen Therapieansatz der Parkinson-Erkrankung darstellen könnte. Anhand des akuten MPTP-Mausmodells wurden die Effekte des selektiven  $\alpha$ 7-nikotinerger Acetylcholin-Agonisten PNU-282987 und des nikotinerger Acetylcholin-Antagonisten Mecamylamin auf Neuroinflammation und dopaminerge Neurodegeneration untersucht.

Das MPTP-Mausmodell ist das am häufigsten verwendete Tiermodell der Parkinson-Erkrankung. MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin) ist ein Neurotoxin, das selektiv dopaminerge Neurone in der Substantia nigra pars compacta

zerstört und zur Parkinson-Erkrankung führt. Die relativ hohe Dosierung der hier angewandten akuten MPTP-Intoxikation (4x 20mg/kg Körpergewicht intraperitoneal im Abstand von 2 Stunden) führt zudem zu einer ausgeprägten Neuroinflammation mit Mikroglia-Aktivierung. Um das Ausmaß der Neuroinflammation nach MPTP-Intoxikation und Behandlung mit den jeweiligen Substanzen zu beurteilen, wurden die striatalen Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  sowie des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 mittels ELISA bestimmt. Die Anzahl aktivierter Mikroglia in der Substantia nigra pars compacta wurde immunhistochemisch erfasst. Die Auswirkungen der Behandlung auf die dopaminerge Neurodegeneration im akuten MPTP-Mausmodell wurden anhand der Anzahl immunhistochemisch nachgewiesener dopaminergener Neurone in der Substantia nigra pars compacta untersucht. Zudem wurden die striatalen Konzentrationen von Dopamin, 3,4-Dihydroxyphenylethylsäure und Homovanillinsäure ebenso wie der Dopamin-Umsatz bestimmt. Mögliche Auswirkungen auf das motorische Verhalten der Tiere sollten mit Hilfe des Rotarod-Tests erfasst werden.

Die Behandlung mit PNU-282987 hat die Neuroinflammation in der Substantia nigra pars compacta im akuten MPTP-Mausmodell abgeschwächt. PNU-282987 konnte die Mikroglia-Aktivierung vermindern und den MPTP-induzierten Konzentrationsanstieg von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und in geringem Ausmaß auch von IL-6 hemmen ohne den IL-10-Spiegel zu beeinflussen. PNU-282987 konnte darüber hinaus den MPTP-bedingten dopaminergen Zelluntergang in der Substantia nigra sowie den striatalen Dopaminmangel reduzieren. Auch die Konzentration von 3,4-Dihydroxyphenylethylsäure wurde erhöht. Der Dopamin-Umsatz wurde geringfügig beeinflusst. Auf das motorische Verhalten der Tiere hatte PNU-282987 keinen Einfluss, allerdings hatte auch MPTP selbst zu keinen Abweichungen im Rotarod-Test geführt. Die neuroprotektive Wirkung von PNU-282987 ist wahrscheinlich auf sein anti-inflammatorisches Potential zurückzuführen. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass PNU-282987 auch über eine Modulation der Neurotransmitter-Freisetzung gewirkt haben könnte. Immerhin findet sich der  $\alpha 7$ -nikotinerge Acetylcholin-Rezeptor auch auf präsynaptischen Neuronen im Striatum, wo er als ligandengesteuerter Calciumkanal fungiert.

Die Gabe des nikotineren Acetylcholin-Antagonisten Mecamylamin führte wider Erwarten ebenfalls zu einer reduzierten Neuroinflammation. Allerdings wirkte Mecamylamin nicht neuroprotektiv, was möglicherweise auf seine Eigenschaften als unselektiver Antagonist an nikotineren Acetylcholin-Rezeptoren zurückzuführen ist.

Die Ergebnisse dieser Studie bekräftigen die Annahme, dass ein zentraler cholinerg anti-inflammatorischer Signalweg existiert, und demonstrieren das therapeutische Potential einer Aktivierung des  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptors in der Behandlung des IPS.

## 6 SUMMARY

Parkinson's disease is one of the most common neurodegenerative disorders. Its pathogenetic hallmarks are the degeneration of dopaminergic neurons, the presence of Lewy bodies in surviving neurons and an accompanying neuroinflammation in the substantia nigra pars compacta. Despite intensive research, the aetiology of Parkinson's disease remains still unknown and there is no causal treatment yet available.

Increasing evidence suggests that neuroinflammation in the substantia nigra pars compacta caused by activated microglia is not only a result of dopaminergic neurodegeneration but also contributing to the cell loss. Microglial cells are the resident immune cells in the brain. Damage of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta results in an activation of microglial cells. Activated microglia produce a range of pro-inflammatory and potentially neurotoxic factors, e.g. the cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ , that can harm dopaminergic neurons in turn. This vicious circle – also known as reactive microgliosis – describes a self-propelling neurotoxicity which leads to a chronic and progressive neurodegeneration.

During severe infections, the body has the potential to adjust the magnitude of inflammation by means of the inflammatory reflex by the autonomic nervous system. The efferent arm of this inflammatory reflex is termed the cholinergic anti-inflammatory signaling pathway. A major component of this pathway is the  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptor which is expressed on immune cells like microglia. Its activation results in an inhibition of NF $\kappa$ B nuclear translocation, an activation of the Jak2/STAT3 signaling pathway and accordingly a decreased production of pro-inflammatory cytokines. Experimental models of several inflammatory diseases have shown that activation of the cholinergic anti-inflammatory signaling pathway can dampen inflammation and improve survival.

Whether neuroinflammation caused by activated microglia in the substantia nigra pars compacta can be affected by activation of the cholinergic anti-inflammatory signaling pathway and whether this could be a putative therapy approach of Parkinson's disease was to be examined in this study. Using the acute MPTP mouse model, the effects of the selective  $\alpha$ 7 nicotinic agonist PNU-282987 and the nicotinic antagonist mecamylamine have been investigated.

The MPTP mouse model is the most commonly used animal model of Parkinson's disease. As a neurotoxin MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) selectively destroys dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and induces Parkinson's disease. The relatively high dosing of the acute MPTP intoxication

applied in this study (4x 20mg/kg body weight intraperitoneal at intervals of 2 hours) produces a distinct neuroinflammation and activation of microglia.

To evaluate the extent of neuroinflammation after MPTP intoxication and treatment with the particular substances, the striatal concentrations of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  as well as of the anti-inflammatory cytokine IL-10 were quantified using an ELISA. The amount of activated microglia in the substantia nigra pars compacta was assessed using immunohistochemistry. The impact of the treatment on dopaminergic neurodegeneration in the acute MPTP mouse model was assessed by means of the number of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. In addition, striatal levels of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and homovanillic acid as well as the dopamine turnover were determined. Possible effects on motor performance were investigated using the rotarod test.

Treatment with PNU-282987 resulted in an attenuation of neuroinflammation in the MPTP-lesioned substantia nigra pars compacta. PNU-282987 was able to dampen activation of microglia in the substantia nigra pars compacta and to diminish the MPTP-induced increase of striatal IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and in a small extent of IL-6 without affecting the IL-10 level. Furthermore, PNU-282987 attenuated the MPTP-induced dopaminergic cell loss in the substantia nigra pars compacta and reduced striatal dopamine depletion. The concentration of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid was increased as well. Dopamine turnover was slightly affected. The animals' motor behaviour remained unaffected but had not changed after MPTP intoxication admittedly. This neuroprotective effect of PNU-282987 is likely due to its anti-inflammatory potential, but may also be partly explained by its possible modulating effect on neurotransmitter release, as the  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptor is also found presynaptically on neurons where it acts as a ligand-gated ion channel.

Application of the nicotinic acetylcholine antagonist mecamylamine led to an attenuation of neuroinflammation against one's expectations. It did not act neuroprotective though. This is probably due to its properties as an unselective nicotinic acetylcholine antagonist.

The findings of this study strongly support the idea of a central cholinergic anti-inflammatory signaling pathway and demonstrate that activation of the  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptor may provide a putative therapeutic target in the treatment of Parkinson's disease.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Ahlskog JE, Muentner MD.** Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov Disord* 16: 448–458, 2001.
2. **Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K.** *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 9. Aufl. München: Elsevier, 2005.
3. **Albuquerque EX, Pereira EFR, Alkondon M, Rogers SW.** Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 89: 73–120, 2009.
4. **Alvarez-Fischer D, Guerreiro S, Hunot S, Saurini F, Marien M, Sokoloff P, Hirsch EC, Hartmann A, Michel PP.** Modelling Parkinson-like neurodegeneration via osmotic minipump delivery of MPTP and probenecid. *J Neurochem* 107: 701–711, 2008.
5. **Bacher I, Wu B, Shytle DR, George TP.** Mecamylamine – a nicotinic acetylcholine receptor antagonist with potential for the treatment of neuropsychiatric disorders. *Expert Opin Pharmacother* 10: 2709–2721, 2009.
6. **Barbeau A.** L-dopa therapy in Parkinson's disease. A critical review of nine years' experience. *J Can Med Ass* : 791–800, 1969.
7. **Barclay AN, Wright GJ, Brooke G, Brown MH.** CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends Immunol* 23: 285–290, 2002.
8. **Beal MF.** Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2: 325–334, 2001.
9. **Bencherif M, Lippiello PM, Lucas R, Marrero M.** Alpha7 nicotinic receptors as novel therapeutic targets for inflammation-based diseases. *Cell Mol Life Sci* 68: 931–949, 2011.
10. **Berg DK, Conroy WG.** Nicotinic  $\alpha 7$  receptors: synaptic options and downstream signaling in neurons. *J Neurobiol* 53: 512–523, 2002.
11. **Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F.** Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci* 20: 415–55, 1973.
12. **Beurel E, Jope R.** Lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production is controlled by glycogen synthase kinase-3 and STAT3 in the brain. *J Neuroinflammation* 6: 9, 2009.
13. **Bian M, Li L, Yu M, Fei J, Huang F.** Elevated interleukin-1beta induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine aggravating dopaminergic neurodegeneration in old male mice. *Brain Res* 1302: 256–264, 2009.
14. **Birkmayer W, Hornykiewicz O.** Der L-Dioxyphenylalanin (= L-DOPA)-Effekt beim Parkinson-Syndrom des Menschen: Zur Pathogenese und Behandlung der Parkinson-Akinese. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 5: 560–574, 1962.

15. **Blackwell TS, Christman JW.** The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17: 3–9, 1997.
16. **Block ML, Zecca L, Hong J-S.** Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8: 57–69, 2007.
17. **Bodnar AL, Cortes-Burgos LA, Cook KK, Dinh DM, Groppi VE, Hajos M, Higdon NR, Hoffmann WE, Hurst RS, Myers JK, Rogers BN, Wall TM, Wolfe ML, Wong E.** Discovery and structure–activity relationship of quinuclidine benzamides as agonists of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors. *J Med Chem* 48: 905–908, 2005.
18. **Bolin LM, Strycharska-Orczyk I, Murray R, Langston JW, Di Monte D.** Increased vulnerability of dopaminergic neurons in MPTP-lesioned interleukin-6 deficient mice. *J Neurochem* 83: 167–175, 2002.
19. **Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ.** Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405: 458–462, 2000.
20. **Braak H, Sastre M, Del Tredici K.** Development of  $\alpha$ -synuclein immunoreactive astrocytes in the forebrain parallels stages of intraneuronal pathology in sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 114: 231–241, 2007.
21. **Braak H, Del Tredici K.** Neue Sicht des kortiko-striato-thalamo-kortikalen Regelkreises bei M. Parkinson. *Nervenarzt* 79: 1440–1445, 2008.
22. **Brautigam VM, Frasier C, Nikodemova M, Watters JJ.** Purinergic receptor modulation of BV-2 microglial cell activity: Potential involvement of p38 MAP kinase and CREB. *J Neuroimmunol* 166: 113–125, 2005.
23. **Brochard V, Combadière B, Prigent A, Laouar Y, Perrin A, Beray-Berthet V, Bonduelle O, Alvarez-Fischer D, Callebert J, Launay J-M, Duyckaerts C, Flavell RA, Hirsch EC, Hunot S.** Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J Clin Invest* 119: 182–192, 2009.
24. **Cardenas H, Bolin LM.** Compromised reactive microgliosis in MPTP-lesioned IL-6 KO mice. *Brain Res* 985: 89–97, 2003.
25. **Carlsson A.** The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol Rev* 11: 490–493, 1959.
26. **Carter RJ, Morton J, Dunnett SB.** Motor coordination and balance in rodents. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 8: Unit 8.12, 2001.
27. **Champtiaux N, Gotti C, Cordero-Erausquin M, David DJ, Przybylski C, Léna C, Clementi F, Moretti M, Rossi FM, Le Novère N, McIntosh JM, Gardier AM, Changeux J-P.** Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. *J Neurosci* 23: 7820–7829, 2003.

28. **Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Peterson PK.** Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol* 149: 2736–2741, 1992.
29. **Charcot JM.** *Leçons sur les maladies du système nerveux faites à la Salpêtrière.* Paris: 1880.
30. **Chen Y, Swanson RA.** Astrocytes and Brain Injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 23: 137–149, 2003.
31. **Ciesielska A, Joniec I, Przybylkowski A, Gromadzka G, Kurkowska-Jastrzëbska I, Czlonkowska A, Czlonkowski A.** Dynamics of expression of the mRNA for cytokines and inducible nitric synthase in a murine model of the Parkinson's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 63: 117–126, 2003.
32. **Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R.** Modification of Parkinsonism - chronic treatment with L-dopa. *NEJM* : 337–345, 1969.
33. **Cui W-Y, Li MD.** Nicotinic modulation of innate immune pathways via  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor. *J Neuroimmune Pharmacol* 5: 479–488, 2010.
34. **Czlonkowska A, Kohutnicka M, Kurkowska-Jastrzebska I, Czlonkowski A.** Microglial reaction in MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) induced Parkinson's disease mice model. *Neurodegeneration* 5: 137–143, 1996.
35. **Czura CJ, Tracey KJ.** Autonomic neural regulation of immunity. *J Intern Med* 257: 156–166, 2005.
36. **Dauer W, Przedborski S.** Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39: 889–909, 2003.
37. **Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan W-B.** ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8: 752–758, 2005.
38. **Dominguez E, Rivat C, Pommier B, Mauborgne A, Pohl M.** JAK/STAT3 pathway is activated in spinal cord microglia after peripheral nerve injury and contributes to neuropathic pain development in rat. *J Neurochem* 107: 50–60, 2008.
39. **Drisdel RC, Green WN.** Neuronal  $\alpha$ -bungarotoxin receptors are  $\alpha 7$  subunit homomers. *J Neurosci* 20: 133–139, 2000.
40. **Dunham NW, Miya TS.** A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim)* 46: 208–209, 1957.
41. **Eggert KM, Oertel WH.** Parkinson-Syndrom: Diagnostik und Therapie. In: *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*, edited by Diener HC, Putzki N. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2008, p. 82–112.
42. **Ehringer H, Hornykiewicz O.** Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems. *Klin Wschr* 38: 1236–1239, 1960.

43. **Ek M, Kurosawa M, Lundeberg T, Ericsson A.** Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1 $\beta$ : role of endogenous prostaglandins. *J Neurosci* 18: 9471–9479, 1998.
44. **Emre M.** Dementia associated with Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2: 229–237, 2003.
45. **Fearnley JM, Lees AJ.** Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114: 2283–2301, 1991.
46. **Gahring LC, Rogers SW.** Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression and function on nonneuronal cells. *AAPS J* 7: 885–894, 2006.
47. **Gao H-M, Liu B, Zhang W, Hong J-S.** Critical role of microglial NADPH oxidase-derived free radicals in the in vitro MPTP model of Parkinson's disease. *FASEB J* 17: 1954–1956, 2003.
48. **Gerlach M, Reichmann H, Riederer P.** *Die Parkinson-Krankheit - Grundlagen, Klinik, Therapie.* 4. Aufl. Wien: Springer, 2007.
49. **Gerlach M, Riederer P.** Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J Neural Transm* 103: 987–1041, 1996.
50. **Goehler LE, Relton JK, Dripps D, Kiechle R, Tartaglia N, Maier SF, Watkins LR.** Vagal paraganglia bind biotinylated interleukin-1 receptor antagonist: a possible mechanism for immune-to-brain communication. *Brain Res Bull* 43: 357–364, 1997.
51. **Goetz CG.** Charcot on Parkinson's disease. *Mov Disord* 1: 27–32, 1986.
52. **Gotti C, Clementi F.** Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* 74: 363–396, 2004.
53. **Gu X-L, Long C-X, Sun L, Xie C, Lin X, Cai H.** Astrocytic expression of Parkinson's disease-related A53T alpha-synuclein causes neurodegeneration in mice. *Molecular Brain* 3: 12, 2010.
54. **Hajós M, Hurst RS, Hoffmann WE, Krause M, Wall TM, Higdon NR, Groppi VE.** The selective  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor agonist PNU-282987 [N-[(3R)-1-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]-4-chlorobenzamide hydrochloride] enhances GABAergic synaptic activity in brain slices and restores auditory gating deficits in anesthetized rats. *J Pharmacol Exp Ther* 312: 1213–1222, 2005.
55. **Halliday GM, Stevens CH.** Glia: Initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease. *Mov Disord* 26: 6–17, 2011.
56. **Hartmann A, Hunot S, Hirsch EC.** Inflammation and dopaminergic neuronal loss in Parkinson's disease: a complex matter. *Exp Neurol* 184: 561–564, 2003.
57. **Hefti F, Enz A, Melamed E.** Partial lesions of the nigrostriatal pathway in the rat. Acceleration of transmitter synthesis and release of surviving dopaminergic neurones by drugs. *Neuropharmacology* 24: 19–23, 1985.

58. **Heikkila RE, Hess A, Duvoisin RC.** Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice. *Science* 224: 1451–1453, 1984.
59. **Heikkila RE, Hess A, Duvoisin RC.** Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse: relationships between monoamine oxidase, MPTP metabolism and neurotoxicity. *Life Sci* 36: 231–236, 1985.
60. **Hellström-Lindahl E.** Modulation of  $\beta$ -amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation by acetylcholine receptors. *Eur J Pharmacol* 393: 255–263, 2000.
61. **Hernán MA, Takkouche B, Caamano-Isorna F, Gestal-Otero JJ.** A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 52: 276–84, 2002.
62. **Hindle JV.** Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease. *Age Ageing* 39: 156–161, 2010.
63. **Hirsch E, Graybiel AM, Agid YA.** Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 334: 345–348, 1988.
64. **Hirsch EC, Hunot S.** Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol* 8: 382–397, 2009.
65. **Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, Wright GJ, Goddard R, Zurawski SM, Blom B, Homola ME, Streit WJ, Brown MH, Barclay AN, Sedgwick JD.** Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science* 290: 1768–1771, 2000.
66. **Hornykiewicz O.** Biochemical aspects of Parkinson's disease. *Neurology* 51: S2–S9, 1998.
67. **Hunot S, Hirsch EC.** Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53: 49–58, 2003.
68. **Huston JM, Gallowitsch-Puerta M, Ochani M, Ochani K, Yuan R, Rosas-Ballina M, Ashok M, Goldstein RS, Chavan S, Pavlov VA, Metz CN, Yang H, Czura CJ, Wang H, Tracey KJ.** Transcutaneous vagus nerve stimulation reduces serum high mobility group box 1 levels and improves survival in murine sepsis. *Crit Care Med* 35: 2762–2768, 2007.
69. **Huston JM, Tracey KJ.** The pulse of inflammation: heart rate variability, the cholinergic anti-inflammatory pathway and implications for therapy. *Journal of Internal Medicine* 269: 45–53, 2011.
70. **Jackson-Lewis V, Jakowec M, Burke RE, Przedborski S.** Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegeneration* 4: 257–269, 1995.
71. **Jackson-Lewis V, Przedborski S.** Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Nat Protoc* 2: 141–151, 2007.

72. **Jakowec MW, Nixon K, Hogg E, McNeill T, Petzinger GM.** Tyrosine hydroxylase and dopamine transporter expression following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurodegeneration of the mouse nigrostriatal pathway. *J Neurosci Res* 76: 539–550, 2004.
73. **Jones B, Roberts D.** The quantitative measurement of motor inco-ordination in naive mice using an accelerating rotarod. *J Pharm Pharmacol* 20: 302–304, 1968.
74. **de Jonge WJ, Ulloa L.** The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *Br J Pharmacol* 151: 915–929, 2007.
75. **de Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bennink RJ, Berthoud H-R, Uematsu S, Akira S, van den Wijngaard RM, Boeckxstaens GE.** Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol* 6: 844–851, 2005.
76. **Kim W-G, Mohny RP, Wilson B, Jeohn G-H, Liu B, Hong J-S.** Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci* 20: 6309–6316, 2000.
77. **Kohutnicka M, Lewandowska E, Kurkowska-Jastrzebska I, Czlonkowski A, Czlonkowska A.** Microglial and astrocytic involvement in a murine model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Immunopharmacology* 39: 167–180, 1998.
78. **Kreutzberg GW.** Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19: 312–318, 1996.
79. **Kühn K, Wellen J, Link N, Maskri L, Lübbert H, Stichel CC.** The mouse MPTP model: gene expression changes in dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 17: 1–12, 2003.
80. **Kurkowska-Jastrzebska I, Wronska A, Kohutnicka M, Czlonkowski A, Czlonkowska A.** The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. *Exp Neurol* 156: 50–61, 1999.
81. **Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I.** Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219: 979–980, 1983.
82. **Langston JW, Forno LS, Tetrud J, Reeves AG, Kaplan JA, Karluk D.** 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, 1999.
83. **Lau Y-S, Meredith GE.** From drugs of abuse to parkinsonism. The MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Methods Mol Med* 79: 103–116, 2003.
84. **Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S.** Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39: 151–170, 1990.
85. **Lee H-G, Zhu X, Takeda A, Perry G, Smith MA.** Emerging evidence for the neuroprotective role of alpha-synuclein. *Exp Neurol* 200: 1–7, 2006.

- 
86. **Lee J-K, Tran T, Tansey MG.** Neuroinflammation in Parkinson's disease. *J Neuroimmune Pharmacol* 4: 419–429, 2009.
  87. **Lees AJ, Selikhova M, Andrade LA, Duyckaerts C.** The black stuff and Konstantin Nikolaevich Tretiakoff. *Mov. Disord.* 23: 777–783, 2008.
  88. **Levin ED, Simon BB.** Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology* 138: 217–230, 1998.
  89. **Lewy FH.** Paralysis agitans. I. Pathologische Anatomie. In: *Handbuch der Neurologie*, edited by Lewandowsky M. Berlin: Springer, 1912, p. 920–933.
  90. **Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, Dawson VL, Dawson TM, Przedborski S.** Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med* 5: 1403–1409, 1999.
  91. **Liu B.** Modulation of microglial pro-inflammatory and neurotoxic activity for the treatment of Parkinson's disease. *AAPS J* 8: E606–E621, 2006.
  92. **Liu Y, Hu J, Wu J, Zhu C, Hui Y, Han Y, Huang Z, Ellsworth K, Fan W.**  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection against dopaminergic neuron loss in an MPTP mouse model via inhibition of astrocyte activation. *J Neuroinflammation* 9: 98, 2012.
  93. **Luchtman DW, Shao D, Song C.** Behavior, neurotransmitters and inflammation in three regimens of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Physiol Behav* 98: 130–138, 2009.
  94. **McDonald WM, Richard IH, DeLong MR.** Prevalence, etiology, and treatment of depression in Parkinson's disease. *Biol Psychiatry* 54: 363–375, 2003.
  95. **McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG.** Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38: 1285–1291, 1988.
  96. **McGeer PL, McGeer EG.** Inflammation and the degenerative diseases of aging. *Ann N Y Acad Sci* 1035: 104–116, 2004.
  97. **McGeer PL, McGeer EG.** Glial reactions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 23: 474–483, 2008.
  98. **McGeer PL, Yasojima K, McGeer EG.** Association of interleukin-1 beta polymorphisms with idiopathic Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 326: 67–69, 2002.
  99. **McGehee D, Heath M, Gelber S, Devay P, Role L.** Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science* 269: 1692–1696, 1995.
  100. **Meredith GE, Totterdell S, Potashkin JA, Surmeier DJ.** Modeling PD pathogenesis in mice: advantages of a chronic MPTP protocol. *Parkinsonism Relat Disord* 14: S112–S115, 2008.
-

101. **Metz CN, Tracey KJ.** It takes nerve to dampen inflammation. *Nat Immunol* 6: 756–757, 2005.
102. **Mirza B, Hadberg H, Thomsen P, Moos T.** The absence of reactive astrocytosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. *Neuroscience* 95: 425–32, 2000.
103. **Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R.** Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol* 101: 249–255, 2001.
104. **Monville C, Torres EM, Dunnett SB.** Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model. *J Neurosci Methods* 158: 219–223, 2006.
105. **Murphy DD, Rueter SM, Trojanowski JQ, Lee VM-Y.** Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J Neurosci* 20: 3214–3220, 2000.
106. **Nagatsu T, Sawada M.** Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines. *Curr Pharm Des* 11: 999–1016, 2005.
107. **Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F.** Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308: 1314–1318, 2005.
108. **Nishimura M, Mizuta I, Mizuta E, Yamasaki S, Ohta M, Kuno S.** Influence of interleukin-1beta gene polymorphisms on age-at-onset of sporadic Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 284: 73–76, 2000.
109. **Papke RL, Sanberg PR, Shytle RD.** Analysis of mecamylamine stereoisomers on human nicotinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 297: 646 –656, 2001.
110. **Park HJ, Lee PH, Ahn YW, Choi YJ, Lee G, Lee D-Y, Chung ES, Jin BK.** Neuroprotective effect of nicotine on dopaminergic neurons by anti-inflammatory action. *Eur J Neurosci* 26: 79–89, 2007.
111. **Parkinson J.** *An Essay on the Shaking Palsy.* London: Whittingham and Rowland, 1817.
112. **Pavlov VA, Ochani M, Yang L-H, Gallowitsch-Puerta M, Ochani K, Lin X, Levi J, Parrish WR, Rosas-Ballina M, Czura CJ, LaRosa GJ, Miller EJ, Tracey KJ, Al-Abed Y.** Selective  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves survival in murine endotoxemia and severe sepsis. *Crit Care Med* 35: 1139–1144, 2007.
113. **Paxinos G, Franklin KBJ.** *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.* 2. Aufl. San Diego: Academic Press, 2001.
114. **Petroske E, Meredith GE, Callen S, Totterdell S, Lau Y-S.** Mouse model of Parkinsonism: a comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/probenecid treatment. *Neuroscience* 106: 589–601, 2001.

115. **Poeck K, Hacke W.** Krankheiten der Basalganglien. In: *Neurologie*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2006, p. 510–540.
116. **Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, Priyadarshi SS.** Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environ Res* 86: 122–127, 2001.
117. **Przedborski S, Jackson-Lewis V, Naini AB, Jakowec M, Petzinger G, Miller R, Akram M.** The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. *J Neurochem* 76: 1265–1274, 2001.
118. **Przedborski S, Vila M.** The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991: 189–198, 2003.
119. **Quik M, Huang LZ, Parameswaran N, Bordia T, Campos C, Perez XA.** Multiple roles for nicotine in Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* 78: 677–685, 2009.
120. **Quilty MC, King AE, Gai W-P, Pountney DL, West AK, Vickers JC, Dickson TC.** Alpha-synuclein is upregulated in neurones in response to chronic oxidative stress and is associated with neuroprotection. *Exp Neurol* 199: 249–56, 2006.
121. **R&D Systems.** Surveyor™ IC ELISA Assay Principle [Online]. *R&D Systems* 2011.  
[http://www.rndsystems.com//product\\_detail\\_objectname\\_surveyoricelisaassayprinciple.aspx](http://www.rndsystems.com//product_detail_objectname_surveyoricelisaassayprinciple.aspx) [29 Nov. 2011].
122. **Riley JK, Takeda K, Akira S, Schreiber RD.** Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J Biol Chem* 274: 16513–16521, 1999.
123. **Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK.** Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev* 17: 942–964, 2004.
124. **Rodrigues e Silva AM, Geldsetzer F, Holdorff B, Kielhorn FW, Balzer-Geldsetzer M, Oertel WH, Hurtig H, Dodel R.** Who was the man who discovered the “Lewy bodies”? *Mov. Disord.* 25: 1765–1773, 2010.
125. **Rodriguez RL, Fernandez HH, Haq I, Okun MS.** Pearls in patient selection for deep brain stimulation. *The Neurologist* 13: 253–260, 2007.
126. **Rosas-Ballina M, Tracey KJ.** Cholinergic control of inflammation. *J Intern Med* 265: 663–679, 2009.
127. **Rozas G, Lopez-Martin E, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL.** The overall rod performance test in the MPTP-treated-mouse model of Parkinsonism. *J Neurosci Methods* 83: 165–175, 1998.
128. **Schapira AH, Jenner P.** Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord* 26: 1049–1055, 2011.

129. **Schilström B, Svensson HM, Svensson TH, Nomikos GG.** Nicotine and food induced dopamine release in the nucleus accumbens of the rat: putative role of  $\alpha 7$  nicotinic receptors in the ventral tegmental area. *Neuroscience* 85: 1005–1009, 1998.
130. **Schintu N, Frau L, Ibba M, Garau A, Carboni E, Carta AR.** Progressive dopaminergic degeneration in the chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neurotox Res* 16: 127–139, 2009.
131. **Sedelis M, Hofele K, Auburger GW, Morgan S, Huston JP, Schwarting RKW.** MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences. *Behav Genet* 30: 171–182, 2000.
132. **Seniuk NA, Tatton WG, Greenwood CE.** Dose-dependent destruction of the coeruleus-cortical and nigral-striatal projections by MPTP. *Brain Res* 527: 7–20, 1990.
133. **Shytle RD, Mori T, Townsend K, Vendrame M, Sun N, Zeng J, Ehrhart J, Silver AA, Sanberg PR, Tan J.** Cholinergic modulation of microglial activation by  $\alpha 7$  nicotinic receptors. *J Neurochem* 89: 337–343, 2004.
134. **Sidoryk-Wegrzynowicz M, Wegrzynowicz M, Lee E, Bowman AB, Aschner M.** Role of Astrocytes in Brain Function and Disease. *Toxicologic Pathology* 39: 115–123, 2011.
135. **Song YJC, Halliday GM, Holton JL, Lashley T, O'Sullivan SS, McCann H, Lees AJ, Ozawa T, Williams DR, Lockhart PJ, Revesz TR.** Degeneration in different parkinsonian syndromes relates to astrocyte type and astrocyte protein expression. *J Neuropathol Exp Neurol* 68: 1073–1083, 2009.
136. **Sonsalla PK, Heikkila RE.** The influence of dose and dosing interval on MPTP-induced dopaminergic neurotoxicity in mice. *Eur J Pharmacol* 129: 339–45, 1986.
137. **Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M.**  $\alpha$ -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6469–6473, 1998.
138. **Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM-Y, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M.**  $\alpha$ -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388: 839–840, 1997.
139. **Sriram K, Matheson JM, Benkovic SA, Miller DB, Luster MI, O'Callaghan JP.** Mice deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: implications for Parkinson's disease. *FASEB J* 16: 1474–1476, 2002.
140. **Su X, Lee JW, Matthay ZA, Mednick G, Uchida T, Fang X, Gupta N, Matthay MA.** Activation of the  $\alpha 7$  nAChR reduces acid-induced acute lung injury in mice and rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37: 186–192, 2007.
141. **Sundström E, Luthman J, Goldstein M, Jonsson G.** Time course of MPTP-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine system in C57 BL/6 mice. *Brain Res Bull* 21: 257–263, 1988.

142. **Suzuki T, Hide I, Matsubara A, Hama C, Harada K, Miyano K, Andrä M, Matsubayashi H, Sakai N, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y.** Microglial  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors drive a phospholipase C/IP3 pathway and modulate the cell activation toward a neuroprotective role. *J Neurosci Res* 83: 1461–1470, 2006.
143. **Terry AV, Buccafusco JJ, Prendergast MA.** Dose-specific improvements in memory-related task performance by rats and aged monkeys administered the nicotinic-cholinergic antagonist mecamylamine. *Drug Dev Res* 47: 127–136, 1999.
144. **Tracey KJ.** The inflammatory reflex. *Nature* 420: 853–859, 2002.
145. **Trétiakoff K.** *Contribution à l'étude de l'anatomie pathologique du locus niger de Soemmering avec quelques déductions relatives à la pathogenie des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson [Dissertation].* Paris: Université von Paris, 1919.
146. **Varastet M, Riche D, Maziere M, Hantraye P.** Chronic MPTP treatment reproduces in baboons the differential vulnerability of mesencephalic dopaminergic neurons observed in Parkinson's disease. *Neuroscience* 63: 47–56, 1994.
147. **Vingerhoets FJG, Snow BJ, Tetrud JW, Langston JW, Schulzer M, Calne DB.** Positron emission tomographic evidence for progression of human MPTP-induced dopaminergic lesions. *Ann Neurol* 36: 765–770, 1994.
148. **Waldburger J-M, Boyle DL, Pavlov VA, Tracey KJ, Firestein GS.** Acetylcholine regulation of synoviocyte cytokine expression by the  $\alpha 7$  nicotinic receptor. *Arthritis & Rheumatism* 58: 3439–3449, 2008.
149. **Wang H, Liao H, Ochani M, Justiniani M, Lin X, Yang L, Al-Abed Y, Wang H, Metz C, Miller EJ, Tracey KJ, Ulloa L.** Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med* 10: 1216–1221, 2004.
150. **Watzman N, Barry H.** Drug effects on motor coordination. *Psychopharmacologia* 12: 414–423, 1968.
151. **van Westerloo DJ, Giebelen IA, Florquin S, Bruno MJ, Larosa GJ, Ulloa L, Tracey KJ, van der Poll T.** The vagus nerve and nicotinic receptors modulate experimental pancreatitis severity in mice. *Gastroenterology* 130: 1822–1830, 2006.
152. **Williams A, Gill S, Varma T, Jenkinson C, Quinn N, Mitchell R, Scott R, Ives N, Rick C, Daniels J, Patel S, Wheatley K.** Deep brain stimulation plus best medical therapy versus best medical therapy alone for advanced Parkinson's disease (PD SURG trial): a randomised, open-label trial. *Lancet Neurol.* 9: 581–591, 2010.
153. **Wilms H, Rosenstiel P, Sievers J, Deuschl G, Zecca L, Lucius R.** 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, 2003.

154. **Wooten GF, Currie LJ, Bovbjerg VE, Lee JK, Patrie J.** Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75: 637–639, 2004.
155. **Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, Tieu K, Teismann P, Vadseth C, Choi D-K, Ischiropoulos H, Przedborski S.** Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J Neurosci* 22: 1763–1771, 2002.
156. **Yahr MD, Brodsky MA.** Parkinson's Disease. In: *Encyclopedia of the Human Brain*, edited by Ramachandran VS. New York: Academic Press, 2002, p. 777–786.
157. **Zhang W, Wang T, Pei Z, Miller DS, Wu X, Block ML, Wilson B, Zhang W, Zhou Y, Hong J-S, Zhang J.** Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J* 19: 533–542, 2005.

## 8 ANHANG

### 8.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Fremdsprachliche Begriffe erscheinen kursiv.

$\alpha$ 7-nACh-Rezeptor	$\alpha$ 7-nikotinerger Acetylcholin-Rezeptor
A $\beta$	$\beta$ -Amyloid
ACh	Acetylcholin
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ANOVA	Varianzanalyse, <i>Analysis of variance</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	Cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CAST	<i>Computer Assisted Stereological Toolbox</i>
CBD	Kortikobasale Degeneration, <i>Corticobasal degeneration</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
COX-2	Cyclooxygenase-2
DA	Dopamin
DAB	3,3'-Diaminobenzid
DAT	Dopamin-Transporter
DLK	Demenz vom Lewy-Körper-Typ
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylethylsäure, <i>3,4-Dihydroxyphenylacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbant assay</i>
<i>et al.</i>	und andere, <i>et alii/et aliae</i>
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure, <i><math>\gamma</math>-Aminobutyric acid</i>
GDNF	<i>Glia cell line-derived neurotrophic factor</i>
Glu	Glutamat
GP	Globus pallidus
GPe	Pallidum externum
GPi	Pallidum internum
HMGB1	<i>High-Mobility-Group-Protein B1</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, <i>High performance liquid chromatography</i>

HRP	Meerrettich-Peroxidase, <i>Horseradish-Peroxidase</i>
HVA	Homovanillinsäure, <i>Homovanillic acid</i>
i.p.	intraperitoneal
Iba-1	<i>Ionized calcium binding adaptor molecule 1</i>
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IPS	Idiopathisches Parkinson-Syndrom, Morbus Parkinson
IκB	NF-κB-Inhibitor
Jak2	Januskinase 2
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
LPS	Lipopolysaccharid
MANF	<i>Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor</i>
MAO-A/B	Monoaminoxidase A/B
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MD-2	Lymphozyten-Antigen 96
Meca	Mecamylamin
MHC II	<i>Major Histocompatibility Complex II</i>
MMP3	Matrixmetalloprotease-3
MPDP <sup>+</sup>	1-Methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium
MPP <sup>+</sup>	1-Methyl-4-phenylpyridinium
MPPP	1-Methyl-4-phenyl-4-propionoxy-piperidin
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure, <i>Messenger ribonucleic acid</i>
MSA	Multisystematrophie
MT	3-Methoxytyramin
NFκB	Nukleärer Faktor κ B
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
n.s.	nicht signifikant
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, <i>Phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PNU	PNU-282987

PSP	Progressive supranukleäre Blickparese, <i>Progressive supranuclear palsy</i>
q.s.	so viel wie nötig, <i>quantum satis /quantum sufficit</i> ,
RNA	Ribonukleinsäure, <i>Ribonucleic acid</i>
RNS	Reaktive Stickstoffverbindungen, <i>Reactive nitrogen species</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffverbindungen, <i>Reactive oxygen species</i>
rpm	Rotationen pro Minute
SEM	Standardfehler des Mittelwerts, <i>Standard error of the mean</i>
SN	Substantia nigra
SNpc	Substantia nigra pars compacta
SNpr	Substantia nigra pars reticularis
SOCS3	<i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
STN	Nucleus subthalamicus
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung, <i>Tris-buffered saline</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math></i>
TH	Tyrosin-Hydroxylase
TLR	Toll-like-Rezeptor
TM	Transmembrandomäne
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
VMAT2	Vesikulärer Monoamintransporter 2
VTA	Ventrales tegmentales Areal
ZNS	Zentralnervensystem

## 8.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1	Anatomie der Basalganglien im Koronarschnitt.....	4
Abb. 1.2	Stoffwechsel und synaptische Übertragung von Dopamin .....	6
Abb. 1.3	Physiologie der Basalganglienschleife.....	7
Abb. 1.4	Pathophysiologie der Basalganglienschleife beim Morbus Parkinson .....	8
Abb. 1.5	Neuropathologie des Parkinson-Syndroms.....	10
Abb. 1.6	Reaktive Mikrogliose.....	14
Abb. 1.7	Cholinerg anti-inflammatorischer Signalweg .....	18
Abb. 1.8	MPTP-Metabolismus und MPP <sup>+</sup> -Wirkung .....	22
Abb. 1.9	Reaktionen in der SN nach akuter MPTP-Intoxikation .....	24
Abb. 2.1	Schematische Darstellung des Rotarod .....	28
Abb. 2.2	Prinzip des Sandwich-ELISAs .....	29
Abb. 2.3	Avidin-Biotin-Methode .....	33
Abb. 2.4	Histologische Auswertung TH-positiver Zellen der SNpc.....	38
Abb. 3.1	Striatale IL-1 $\beta$ -Konzentration.....	48
Abb. 3.2	Striatale IL-6-Konzentration.....	49
Abb. 3.3	Striatale TNF- $\alpha$ -Konzentration.....	50
Abb. 3.4	Striatale IL-10-Konzentration.....	51
Abb. 3.5	Anzahl Iba-1-positiver Mikrogliazellen der SNpc.....	53
Abb. 3.6	20 $\mu$ m-Schnitte der SNpc mit Darstellung Iba-1-positiver Mikroglia (4x) ....	54
Abb. 3.7	20 $\mu$ m-Schnitte der SNpc mit Darstellung Iba-1-positiver Mikroglia (40x) ..	55
Abb. 3.8	Anzahl TH-positiver dopaminerg Neurone der SNpc.....	58
Abb. 3.9	20 $\mu$ m-Schnitte der SNpc mit Darstellung TH-positiver Neurone .....	59
Abb. 3.10	Striatale Dopamin-Konzentration.....	61
Abb. 3.11	Striatale DOPAC-Konzentration .....	62
Abb. 3.12	Striatale HVA-Konzentration.....	63
Abb. 3.13	Striataler DOPAC/Dopamin-Quotient .....	64
Abb. 3.14	Striataler HVA/Dopamin-Quotient.....	66

### 8.3 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1	Klassifikation der Parkinson-Syndrome .....	3
Tabelle 2.1	Einteilung in Behandlungsgruppen .....	26
Tabelle 3.1	Anzahl der Aufsetzversuche im Rotarod-Versuch.....	46
Tabelle 3.2	Striatale IL-1 $\beta$ -Konzentration .....	47
Tabelle 3.3	Striatale IL-6-Konzentration .....	49
Tabelle 3.4	Striatale TNF- $\alpha$ -Konzentration .....	50
Tabelle 3.5	Striatale IL-10-Konzentration .....	51
Tabelle 3.6	Anzahl Iba-1-positiver Mikrogliazellen der SNpc.....	52
Tabelle 3.7	Anzahl TH-positiver dopaminergere Neurone der SNpc .....	57
Tabelle 3.8	Striatale Dopamin-Konzentration .....	60
Tabelle 3.9	Striatale DOPAC-Konzentration .....	61
Tabelle 3.10	Striatale HVA-Konzentration.....	62
Tabelle 3.11	Striataler DOPAC/Dopamin-Quotient.....	63
Tabelle 3.12	Striataler HVA/Dopamin-Quotient.....	65

## 8.4 PUBLIKATIONEN

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit sind entstanden:

Stuckenholz V, Bacher M, Alvarez-Fischer D, Oertel WH, Dodel R, Noelker C: Effects of the cholinergic anti-inflammatory pathway on neuroinflammation in the acute MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroinflammation* (zur Veröffentlichung eingereicht).

Stuckenholz V, Bacher M, Alvarez-Fischer D, Dodel R, Nölker C: Die Effekte des  $\alpha$ 7-nikotineren Acetylcholin-Agonisten PNU-282987 und des nikotineren Acetylcholin-Antagonisten Mecamylamin auf die Neuroinflammation im akuten MPTP-Mausmodell des Morbus Parkinson. *84. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN)*, 28.09.-01.10.2011, Wiesbaden.

Stuckenholz V: Die Effekte des  $\alpha$ 7-nikotineren Acetylcholin-Agonisten PNU-282987 und des nikotineren Acetylcholin-Antagonisten Mecamylamin auf die Neuroinflammation im akuten MPTP-Mausmodell des Morbus Parkinson. *Neurowissenschaftlicher Dissertationswettbewerb 2011 im Rahmen der „Brain Awareness Week“ der European Dana Alliance for the Brain*, 08.03.2011, Marburg.

Veröffentlichungen ohne Zusammenhang zur vorliegenden Arbeit:

Noelker C, Stuckenholz V, Reese JP, Alvarez-Fischer D, Sankowski R, Rausch T, Dodel RC, Oertel WH, Hartmann A, van Patten S, Al-Abed Y, Bacher M: CNI-1493 attenuates neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neurodegenerative Dis* (zur Veröffentlichung angenommen).

Noelker C, Stuckenholz V, Reese JP, Alvarez-Fischer D, Sankowski R, Dodel RC, Oertel WH, Hartmann A, van Patten S, Al-Abed Y, Bacher M: CNI-1493 attenuates neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *16<sup>th</sup> International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders*, 17.-21.06.2012, Dublin, Irland. *Mov Disord* 27 (Suppl. 1): 152, 2012.

## 8.5 VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

in Marburg: Adamkiewicz, Aumüller, Bals, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, A. Becker, K. Becker, S. Becker, Behr, Berger, Bien, Bolm, Cetin, Czubayko, Daut, Dodel, Donner-Banzhoff, Eilers, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Garten, Glorius, Gress, Grundmann, Grzeschik, Gudermann, Hasilik, Hassan, Hertl, Hofmann, Hoyer, Hundt, Jaques, Kann, Kill, Kircher, Klose, Koch, König, Koolman, Konrad, Kroll, Krones, Kuhlmann, Leube, Lill, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Maisner, Mandrek, Mittag, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Oertel, Opitz, Pagenstecher, Petz, Pfützner, Plant, Renz, Richter, Röper, Röttgers, Rose, Ruchholtz, H. Schäfer, J. Schäfer, Schiel, Schmidt, Schofer, Schrader, Schu, Schultz, Schurrat, Seitz, Sekundo, Steiniger, Sure, Vogelmeier, Wagner, Waldegger, Weihe, Werner, Westermann, Wulf

in Gießen: Riße, Schneider.

## 8.6 DANKSAGUNG

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Richard Dodel für die Ermöglichung dieser Arbeit, für seine Unterstützung und die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe *Neurologische Therapieforschung*.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Carmen Nölker für die hervorragende Betreuung, die Einarbeitung im Labor, die zahlreichen Ratschläge, ihre Geduld und freundschaftliche Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Dissertation. Eine bessere Betreuerin hätte ich mir nicht wünschen können.

Herrn Dr. Daniel Alvarez Fischer danke ich für seine Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der HPLC.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern der *AG Neurologische Therapieforschung*, insbesondere bei Carola Gäckler und Tanja Rausch, für die gute Zusammenarbeit.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Jens-Peter Reese, der immer ein offenes Ohr für meine Fragen zur Statistik hatte.

Frau Dr. Tanja Dicke vom Institut für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik unter Leitung von Prof. Dr. H. Renz danke ich dafür, dass sie mir das CAST-Mikroskop für die Auswertungen der TH-Schnitte zur Verfügung gestellt hat.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern und meinem Bruder, die mich stets unterstützt und mir den nötigen Rückhalt gegeben haben. Eure Fürsorge und Liebe waren mir stets eine Hilfe.