

**Anti-Gehirn-Autoantikörper
und deren Bedeutung bei Morbus Parkinson**

Anti-brain-Autoantibodies and their role in Parkinson's Disease



**Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

Eva Maria Gschmack

Geb. in Neuburg/Donau

Würzburg, 2016

Eingereicht am: _____

Mitglieder der Promotionskommission

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Carsten Scheller

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Tag des Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertationsschrift „Anti-Gehirn-Autoantikörper und deren Bedeutung bei Morbus Parkinson“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg,

.....

Zusammenfassung

Hintergrund: Die der Pathogenese von Morbus Parkinson (PD, Parkinson's disease) zugrunde liegenden Mechanismen sind bis heute nur unvollständig verstanden. Insbesondere ist unklar, durch welche ursächlichen Faktoren Parkinson ausgelöst wird. Bei der HIV-Infektion treten bei vielen Patienten neurologische Störungen auf (HIV-Associated Neurological Disorders, HAND), die in der klinischen Symptomatik und der Lokalisation der betroffenen Gehirnareale dem Morbus Parkinson ähneln. Möglicherweise könnte eine Fehlregulation der Immunantwort eine Rolle als Auslöser beider Erkrankungen spielen. In dieser Arbeit wurde die Autoimmunantwort von PD- und HAND-Patienten und gesunden Kontrollen gegen verschiedene Gehirnhomogenate untersucht, die während der Parkinsonerkrankung in unterschiedlichem Ausmaß geschädigt werden. Das Autoimmun-Signal wurde quantifiziert und prominente Autoantigene wurden identifiziert.

Methoden: In dieser Arbeit wurde ein Western-Blot-basiertes Verfahren zum Nachweis von Autoantikörpern gegen Gehirngewebe entwickelt. Dieses Verfahren wurde nach Optimierung mit Plasmaproben von gesunden Kontrollen, PD-Patienten und Patienten mit HIV-Infektion insbesondere an einer Gruppe von 40 Parkinson-Patienten (Durchschnittsalter 65 Jahre, 45 % weiblich) und 40 alters- und geschlechtsgemachten Kontrollen (Durchschnittsalter 62 Jahre, 50 % weiblich) angewendet und die humorale Autoimmunität gegen verschiedene Gehirnareale untersucht. Dazu wurden die verschiedenen Areale (dorsaler Motornucleus des Glossopharynx- und Vagusnervs (dm), Substantia nigra (SN), anteromedialer temporaler Mesocortex (MC), high order sensorische Assoziations- und präfrontale Felder (HC), first oder sensorische Assoziations- und prämotorische Felder, primäre sensorische und motorische Felder (FC)) von post-mortem Gehirnen homogenisiert, auf SDS-Gradienten-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Die Membranen wurden mit den Plasmen inkubiert und gebundene Autoantikörper immunologisch detektiert. Die Signale wurden qualitativ und quantitativ ausgewertet. Mit Hilfe einer zweidimensionalen Elektrophorese und anschließender Immunfärbung wurden prominente Autoantigene durch Massenspektroskopie identifiziert.

Ergebnisse: Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Assay lässt sich die humorale Autoimmunantwort gegen Gehirngewebe semiquantitativ bestimmen. In allen untersuchten

Proben konnten verschiedene Autoantikörper gegen unterschiedliche Antigene nachgewiesen werden. Der Gesamt-IgG-Gehalt der Plasmen unterscheidet sich weder zwischen PD-Patienten und gesunden Kontrollen, noch zwischen Männern und Frauen signifikant. Weibliche PD-Patienten zeigen signifikant stärkere Signale gegen dm als männliche ($p = 0.02$, Mann-Whitney-*U*-Test), der wiederum in jedem Patienten - unabhängig vom Geschlecht - von den untersuchten Hirnarealen signifikant stärker autoimmunologisch erkannt wird, als die übrigen Hirnareale ($p < 0.0001$, Friedman-ANOVA). In jedem Hirnareal wurden drei Banden besonders häufig erkannt (45, 40 und 37 kDa), jede davon am stärksten im dm ($p < 0.0001$, Friedman-ANOVA). Die Einzelanalysen der Signalintensitäten zeigt, dass PD-Patienten signifikant weniger Autoreaktivität gegen die 45 kDa-Bande in der SN ($p = 0.056$), im MC ($p = 0.0277$) und im FC ($p = 0.0188$) zeigen, als Kontrollen. Weitere Analysen zeigen, dass männliche PD-Patienten hochsignifikant weniger das 45 kDa-Protein im SN ($p < 0.0001$), MC ($p = 0.0042$) und FC ($p = 0.0088$) erkennen als Kontrollen, wohingegen bei den weiblichen Kontroll- und PD-Plasmen kein Unterschied festzustellen war. Ein weiteres Protein bei 160 kDa wird signifikant unterschiedlich stark in allen Gehirnarealen erkannt ($p < 0.0001$, Friedman-ANOVA), wobei die stärkste Immunreaktivität gegen FC besteht.

Basierend auf dem Nachweis der 45 kDa-Bande aus der SN ergibt sich eine Odds Ratio für das Merkmal Parkinson von 3.38 (CI 1.11 – 10.30). Bei Männern ist diese Odds Ratio sogar 53.12 (CI 2.79 - 1012), bei Frauen 0.44 (CI 0.09 – 2.09). Die Sensitivität dieses Tests liegt bei Männern bei 1 (CI 0.84 – 1), die Spezifität bei 4.41 (0.31 – 0.78). Die negativ prädiktiven Werte liegen in allen Gruppen über 99.15 %. Die Identifizierung der Proteine mittels Massenspektroskopie ergab, dass es sich bei den 37 – 45 kDa Banden um Isoformen oder posttranslational modifizierte Formen des *GFAP* (glial fibrillary acidic protein), einem Bestandteil von Neurofilamenten v.a. in Astrozyten handelt. Außerdem wurde *Fructose-Bisphosphate Aldolase A* und *Aspartat-Aminotransferase* (mitochondriale Isoform 1 Vorläufer), beides Proteine des Kohlenhydrat-Stoffwechsels und der Glykolyse, als weitere Proteine mit ebenfalls 45 kDa identifiziert. Bei dem identifizierten Protein mit dem Molekulargewicht von 160 kDa handelt es sich wahrscheinlich um *Dihydropyrimidinase-related protein 2*, wie GFAP ebenfalls bei der Bildung des Zytoskeletts beteiligt.

Diskussion: Autoantikörper gegen Gehirnantigene sind ein physiologisches Phänomen, das unabhängig von dem Vorliegen einer neurologischen Erkrankung besteht. Gehirnareale, die

bei Parkinson besonders stark geschädigt werden, werden von dieser humoralen Autoimmunantwort besonders stark erkannt. Eine vorübergehende Permeabilisierung der Blut-Hirn-Schranke durch Infektion oder Trauma könnte den Zutritt der Autoantikörper zum Gehirn erlauben und so autoreaktive Prozesse in Gang setzen und zum Untergang dopaminerger Neuronen führen. Bei den identifizierten Proteinen handelt es sich um grundlegende Bestandteile eukaryotischer Zellen, was die Hypothese eines Art Beseitigungsmechanismus der Autoantikörper und damit die Aufgabe der Aufrechterhaltung der Homöostase darstellen könnte. Bei männlichen PD Patienten wird die 45 kDa Bande signifikant weniger stark von Auto-IgGs erkannt; dieser Mechanismus könnte somit in den männlichen PD-Patienten vermindert sein. Als Folge wäre die Ablagerung von Zelltrümmern im Gehirn vorstellbar, die dann auch langfristig eine Angriffsfläche für Autoimmunprozesse mit dem Verlust dopaminerger Neuronen bieten könnte.

Abstract

Background: The pathogenic mechanisms of Parkinson's disease (PD) are not yet fully understood. Particularly the basic cause of the disease remains unclear. In HIV-Infection many patients show neurologic impairments (HIV-associated neurological disorders, HAND), which are similar in clinic symptoms and localization of the affected brain areas to these observed in Parkinson's disease. Possibly a dysregulation of immunologic responses might play a role as a cause for PD. In this work autoimmune processes in PD- and HAND-patients as well as in healthy controls against different brain homogenates were measured, which are damaged in variable extent during pathogenesis of PD. The autoimmune-signal was quantified and prominent autoantigens were identified.

Methods: In this work we established a Western-Blot-based method to detect autoantibodies against brain homogenates. After the optimization with plasma of healthy controls, PD-patients and HIV-infected patients, the technique was used to measure the humoral autoimmunity against different brain areas in a group of 40 PD-patients (mean age 65, 45 % females), and 40 age- and sex-matched controls (mean age 62 years, 50 % female). Different brain areas (of the dorsal motor nucleus of the glossopharyngeal and vagal nerves (dm), substantia nigra (SN), anteromedial temporal mesocortex (MC), high order sensory

association areas and prefrontal fields (HC), first order sensory association areas, premotor areas, as well as primary sensory and motor fields (FC)) of post-mortem brains were homogenized, separated by gel electrophoresis and blotted on a nitrocellulose membrane. The membranes were incubated with plasma and bound antibodies were detected immunologically. The signals were analyzed by quality and quantity. With a two-dimensional electrophoresis and following immune staining prominent autoantigens were identified by mass spectroscopy.

Results: With the established assay, the humoral autoimmunity against brain tissue can be analyzed semi-quantitatively. In all investigated samples several autoantibodies against different antigens could be proven. The overall IgG-content did not differ significantly between PD-patients and healthy controls, nor between men and women. Female PD-patients show significant stronger signals against dm than male ($p = 0.02$, Mann-Whitney-*U*-test), which was recognized significantly stronger than the other brain areas in each patient, independently from sex ($p < 0.0001$, Friedman-ANOVA). In each brain area 3 bands were recognized stronger than others (45, 40 and 37 kDa), each of them the strongest in dm ($p < 0.0001$, Friedman-ANOVA). The single analysis of the signal intensities show that PD-patients display significantly less autoreactivity against the 45 kDa-band in SN ($p = 0.056$), MC ($p = 0.0277$) and FC ($p = 0.0188$) than controls. Further analyses show that plasma of male PD-patients detect highly significantly less the 45 kDa-protein in SN ($p < 0.0001$), MC ($p = 0.0042$) and FC ($p = 0.0088$) than controls, whereas there was no difference measurable in female control- and PD-plasma. Another protein at 160 kDa is recognized at significantly different intensities in all brain areas ($p < 0.0001$, Friedman-ANOVA), whereas the strongest immunoreactivity is shown against FC.

Based on the detection of the 45 kDa-band from the SN the odds ratio for the feature PD is 3.38 (CI 1.11 – 10.30). In men the odds ratio is even 53.12 (CI 2.79 - 1012), in female 0.44 (CI 0.09 – 2.09). The sensitivity for the test in the group of men displays 1 (CI 0.84 – 1), the specificity is 4.41 (0.31 – 0.78). The negative predictive values exceed 99.15 % in all investigated groups.

The identification of the proteins by mass spectroscopy showed that the 37 – 45 kDa-bands might be isoforms of posttranslational modified forms of GFAP (glial fibrillary acidic protein), a part of neurofilaments in astrocytes. Furthermore, *fructose-bisphosphate aldolase A* and

aspartate aminotransferase (mitochondrial isoform 1 precursor), both in the metabolism of carbon hydrates and glycolysis, have been identified for further 45 kDa-bands. The identified protein with a molecular weight of 160 kDa is probably *dihydropyrimidinase-related protein 2*, like GFAP involved in the formation of the cytoskeleton.

Conclusion: The presence of anti-brain-autoantibodies are a physiological occurrence in human plasma, independent of the presence of neurological disease. Brain areas that are damaged prominently during the pathogenesis of PD are recognized stronger by humoral autoimmunity. A temporal permeabilization of the blood brain barrier through infection or trauma might allow autoantibodies access to the brain and initiate autoreactive processes that lead to the demise of dopaminergic neurons. The identified proteins are basic members of eukaryotic cells. This could suggest the hypothesis of sort of a cleaning mechanism of the antibodies, which might have the function of sustaining homeostasis. Male PD patients showed significantly decreased levels of autoreactive antibodies against the 45 kDa band in SN, MC and FC, which could enhance the accumulation of protein debris due to a missing removal mechanism and in long-distance might be responsible for neurodegenerative processes.

Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Western-Blot-basierten Assays zur qualitativen und quantitativen Untersuchung der humoralen Autoimmunantwort gegen Antigene aus unterschiedlichen Gehirnarealen beim Menschen. Nach Validierung des Assays sollte mit dieser Methode die humorale Immunantwort von gesunden Probanden und Patienten mit subkortikaler Demenz (insbesondere Morbus Parkinson, exemplarisch auch bei HIV-Patienten mit HAND) untersucht werden. Nachgewiesene prominente Autoantigene sollten mittels 2D-Gelelektrophorese und nachfolgender massenspektroskopischer Analyse identifiziert werden.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	3
Zielsetzung	6
I. Einleitung	11
1.1 Definition der Demenz	11
1.1.1 Einteilung verschiedener Demenzerkrankungen	11
1.1.2 Abgrenzung der kortikalen von der subkortikalen Demenz	11
1.1.3 Ursachen subkortikaler Demenzen	12
1.1.4 Basalganglien	13
1.1.4.1 Anatomie der Basalganglien	13
1.1.4.2 Funktionsweise der Basalganglien	15
1.2 Morbus Parkinson als subkortikale Demenz	15
1.2.1 Klinische Merkmale	15
1.2.2 Neuropathologische Merkmale	16
1.2.2.1 Neurodegeneration und daraus resultierende Symptome	16
1.2.2.2 Lewy-Körperchen	18
1.2.3 Ätiopathogenese des PD	19
1.2.3.1 Pathogenese des idiopathischen PD	20
1.2.3.1.1 Oxidativer Stress führt zu Neurodegeneration in der SNC	20
1.2.3.1.2 Beeinträchtigung der Atmungskette führt zu Neurodegeneration	21
1.2.3.1.3 Pestizide als Risikofaktoren	22
1.2.3.2 Die Rolle des Immunsystems bei der Pathogenese von PD	23
1.2.3.2.1 Mikroglia lösen Neuroinflammation aus	23
1.2.3.2.1.1 Trauma	24
1.2.3.2.1.2 Exogene Pathogene	25
1.2.4 Immunsystem bei PD	26
1.2.4.1 Neuromelanin aktiviert die adaptive Immunität	27
1.2.4.2 α -Synuklein als Autoantigen	28
1.2.4.3 Andere Antigene als Ziel einer Autoimmunreaktion	28
1.3. HIV als Auslöser einer subkortikalen Demenz	30
1.3.1 Definition der HIV-Demenz	30
1.3.2 Inzidenz von HAD	30
1.3.3 Neuroinvasion und Pathologie	31

1.4. Autoimmunität	32
1.4.1 Mechanismen der zentralen und peripheren Toleranz	32
1.4.2 Durchbrechen der Toleranz und Auslösen einer Autoimmunantwort	34
1.5 HERV als Marker für Immunaktivierung	35
II Material	37
2.1 Geräte	37
2.2 Verbrauchsmaterialien	38
2.2.1 Glas	38
2.2.2. Kunststoff	38
2.3 Chemikalien	40
2.4 Enzyme	41
2.5 Puffer und Lösungen	42
2.6 Proteine & Antikörper	42
2.7 Primer	43
2.8 Kits	43
2.9 Größenstandards	44
2.10 Medien	44
2.11 Programme	44
2.12 Sonstiges	45
III Methoden	46
3.1 Patientenkohorten	46
3.2 Zellbiologische Methoden	47
3.2.1 Gewinnung von Serum aus Vollblut	47
3.2.2 Plasmagewinnung aus Vollblut	47
3.2.3 Isolierung von PBMCs aus Vollblut	47
3.2.4 Ermittlung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer	48
3.2.5 Einfrieren von Zellen	49
3.3 Histologische Methoden	49
3.3.1 Präparation von Gewebeschnitten	49
3.3.2 Herstellen der Gewebemomogenate	50
3.3.3 Isolierung von Neuromelanin aus der SN	52

3.4 Proteinbiochemische Methoden	53
3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	53
3.4.2 SDS-PAGE	54
3.4.3 Western Blot	56
3.4.3.1 Proteintransfer mittels semi-dry-Verfahren	57
3.4.3.2 Proteintransfer mittels tankblot-Verfahren	57
3.4.3.3 Ponceau S Färbung	58
3.4.3.4 Blocken unspezifischer Bindestellen	58
3.4.3.5 Immunfärbung	58
3.4.3.6 Quantifizierung des Signals	60
3.4.4 2D-Gelelektrophorese und nanoHPLC-ESI-MS/MS	62
3.4.5 Nachweis der Proteine im Gel mittels Coomassi	62
3.4.6 Quantitative Immunoassays	62
3.4.6.1 IgG-ELISA	63
3.4.6.2 ANA ELISA	63
3.4.7 ELISpot Assay	63
3.5. Molekularbiologische Methoden	64
3.5.1 Isolierung von RNA aus Patienten-Plasma	64
3.5.2 Isolierung von DNA aus Patienten-Plasma	64
3.5.3 PCR	65
3.5.3.1 PCR zur Generierung des Standards	65
3.5.3.2 Real time PCR	65
3.6. Statistische Auswertung	66
<i>IV Ergebnisse</i>	68
4.1. Untersuchung der zellulären Immunantwort mittels ELISpot	68
4.2. Untersuchung der humoralen Auto-Immunantwort gegen Gehirngewebe	69
4.2.1 Etablierung des Western Blot-Verfahrens	70
4.2.1.1. Auswahl und Titration des Sekundärantikörpers	70
4.2.1.2 Etablierung eines Standards	71
4.2.1.3 Validierung des Semi-dry-Verfahrens für Western Blots	72
4.2.1.3.1 Studiengruppe 1	72
4.2.1.3.2 Anwendung des semi-dry-Verfahrens im BSL3-Labor	75
4.2.1.4 Überprüfung des semi-dry-Verfahrens	76
4.2.1.5 Test des tankblot-Verfahrens	80
4.2.1.6 Anwendung des Li-Cor-Imagers (Odyssey) zur Entwicklung	81

4.3. Immunoblots zur Detektion von Autoantikörpern gegen Gehirnregionen in Plasmen von Parkinson-Patienten und Kontrollen	81
4.3.1 Zusammensetzung der untersuchten Plasma-Proben (Tübingen)	83
4.3.2 Messung der IgG-Konzentration im Plasma	84
4.3.3 Messung der Auto-Immunreaktivität gegen verschiedene Gehirnareale	85
4.3.4 Messung der Autoreaktivität gegen Proteine mit ca. 37, 40 und 45 kDa	95
4.3.5 Autoreaktivität gegen das Protein mit ca. 160 kDa	107
4.3.6 Identifikation der erkannten Banden	108
4.3.7 Anzahl der Autoantikörper-Banden	111
4.3.8 HERV-K-RNA Bestimmung der Tübinger Plasma-Proben	116
<i>V Diskussion</i>	120
5.1 Auto-Ak gegen Gehirnareale sind ubiquitär präsent in humanem Plasma	120
5.2 Hypothese eines Beseitigungsmechanismus durch Auto-Ak im Gehirn	121
5.3 Gehirn als immunprivilegiertes Areal – Blut-Hirn-Schranke	125
5.4 dm wird stärker erkannt als alle anderen Gehirnbereiche	127
5.5 Bedeutung des entwickelten Verfahrens als diagnostischer Test für Morbus Parkinson	129
5.6 HERV-RNA-Expression hat keine Pathogenese-Indikation	130
<i>Literaturverzeichnis</i>	132
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	150
<i>Tabellenverzeichnis</i>	153
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	154
<i>Appendix</i>	157
<i>Danksagung</i>	160

I. Einleitung

1.1 Definition der Demenz

Bei einer Demenz (lat.: de = abnehmend, mens = Verstand) handelt es sich laut ICD-10 (international statistical classification of diseases and related health problems, 2012) um ein klinisches Syndrom, bei dem durch chronische Erkrankung des Gehirns Defizite in höheren kortikalen Funktionen auftreten. Dabei handelt es sich u.a. um Störungen des Gedächtnisses, des Denkens, der Orientierung, der Lernfähigkeit, der Sprache und des Urteilsvermögens. Das Bewusstsein und die Wahrnehmung sind dabei nicht betroffen, gelegentlich werden dennoch Veränderungen des Sozialverhaltens, der Persönlichkeit und der Motivation beobachtet (<http://www.dgn.org>).

1.1.1 Einteilung verschiedener Demenzerkrankungen

Die Einteilung der verschiedenen Demenzerkrankungen orientiert sich entweder an der Genese, also der Ursache oder Entstehung der Krankheit, oder aber am Ort der Entstehung (Hirnrinde = Kortex versus Subkortex). Die Deutsche Gesellschaft für Neurologie (<http://www.dgn.org>) greift dabei auf ersteres zurück und unterteilt die verschiedenen Demenzen in vaskuläre und (neuro-)degenerative Demenzen (z.B. Morbus Alzheimer). Global ist jedoch letzteres weit verbreitet.

1.1.2 Abgrenzung der kortikalen von der subkortikalen Demenz

Im amerikanischen Raum hat sich seit Ende des 19. Jahrhunderts eine Einteilung der Demenzformen nach dem Ort der Entstehung herauskristallisiert. Die kortikale Demenz entsteht durch eine Hirnatrophie durch Läsionen bzw. Dysfunktion verschiedener Areale im Kortex (Großhirnrinde) (Albert, Feldman, & Willis, 1974). Klassisches Beispiel für eine kortikale Demenz ist der Morbus Alzheimer, bei dem v.a. der Neokortex (Pearson, Esiri, Hiorns, Wilcock, & Powell, 1985; Rogers & Morrison, 1985), aber auch der Hippocampus, der olfaktorische Kortex und Bulbus und der Locus caeruleus (LC) betroffen sein können, wodurch sich ein typisches neuropathologisches Muster von Symptomen abzeichnet. Indikativ für kortikale

Demenzen sind Dyskalkulie (Rechenschwäche), Aphasie (Sprachverarbeitungsstörung), Apraxie (Störung bei der Ausführung von zielgerichteten Bewegungen) und Agnosie (Wahrnehmungsstörung) (Turner, Moran, & Kopelman, 2002).

Bei subkortikalen Demenzen sind vorwiegend die unter der Hirnrinde liegenden Bereiche betroffen. Hierzu gehören die Basalganglien (BG), der Hirnstamm und das Cerebellum (Kleinhirn) (Darvesh & Freedman, 1996), auf deren Anatomie und Funktion in Kapitel 1.4 näher eingegangen wird. Albert und seine Kollegen haben 1974 die klinischen Merkmale der subkortikalen Demenz definiert, die bis heute ihre Gültigkeit besitzen. Diese umfassen (1) Gedächtnisstörung, (2) Verlangsamung der intellektuellen Aktivität (Bradyphrenie), (3) Veränderung der Persönlichkeit, typischerweise Trägheit oder Apathie, episodische Reizbarkeit und (4) eine Störung der Fähigkeit, das erlernte Wissen zu verarbeiten. Die für die kortikale Demenz typischen Merkmale Aphasie, Apraxie und Agnosie sind bei subkortikalen Demenzen stets abwesend (Albert et al., 1974).

Diese Einteilung wird bis heute kontrovers diskutiert (Arango-Lasprilla et al., 2006; R. G. Brown & Marsden, 1988; Cummings, 1986; Turner et al., 2002; Whitehouse, 1986). Da sie jedoch von der ätiologischen (Darvesh & Freedman, 1996) wie von der klinischen Perspektive (Cummings, 1986; Cummings & Benson, 1988; Dunne, 1993; Foster, 1986; Huber & Paulson, 1985; Turner et al., 2002) her aufgrund von neurologischen, neuropsychologischen und neuropathologischen Profilen unterstützt wird, hat das Konzept der subkortikalen und kortikalen Demenzen bis heute allgemeine Anerkennung erlangt.

1.1.3 Ursachen subkortikaler Demenzen

Der Grund für die Entstehung subkortikaler Demenzen wie des Morbus Parkinson (PD), der Progressiven supranukleären Blickparese (PSP) oder der Chorea Huntington ist noch immer weitgehend unbekannt. Bei der virologisch ausgelösten subkortikalen Demenz HAND (HIV-assoziierte neurokognitive Störung) ist das Agens jedoch bekannt, es handelt sich um das humane Immunschwäche-Virus HIV. Bei dieser Art der Demenz ist das Immunsystem in der Degeneration subkortikaler Regionen involviert, wodurch eine Beteiligung immunologischer Prozesse auch bei anderen Demenzen zu vermuten sein könnte. Das klinische Krankheitsbild, sowie der immunologische Hintergrund der subkortikalen Demenz werden in dieser Arbeit

anhand des PD genauer betrachtet. Im Zentrum der Neurodegeneration stehen die Basalganglien, die im Aufbau und ihrer Funktion eine besondere Stellung einnehmen, wie im Folgenden erläutert wird.

1.1.4 Basalganglien

Im Mittelpunkt subkortikaler Demenzen stehen die Basalganglien, bei denen es sich um eine Reihe subkortikaler Kerne, sog. Nuclei, handelt, die für motorische und kognitive/limbische Funktionen verantwortlich sind (L. L. Brown, Schneider, & Lidsky, 1997). Sie bilden eine Schleife, die wie ein Filter funktioniert, indem sie vielfältige Informationen vom Kortex (Hazrati & Parent, 1993) und Subkortex (McHaffie, Stanford, Stein, Coizet, & Redgrave, 2005) erhalten, sie verarbeiten und entweder direkt oder indirekt über den Thalamus zum Kortex zurückprojizieren (Alexander & Crutcher, 1990; McHaffie et al., 2005). Abhängig von den Neurotransmittern, die für die jeweiligen Neuronen der Nuclei zur Reizweiterleitung spezifisch sind, wirken diese erregend (exzitatorisch) oder hemmend (inhibierend). In den Basalganglien vorwiegend vorkommende Neurotransmitter sind Dopamin (DA), γ -Aminobuttersäure (GABA) und Glutamat. Im Folgenden wird sowohl die Anatomie als auch die Bedeutung der Basalganglien in der Pathogenese subkortikaler Demenzen veranschaulicht.

1.1.4.1 Anatomie der Basalganglien

Anatomisch bestehen die Basalganglien aus dem Striatum und dem Pallidum. Das Striatum setzt sich aus dem Putamen und dem Nucleus caudatus zusammen, die wiederum über den Nucleus accumbens ventral miteinander verbunden sind. Das Pallidum ist eine Struktur, die sich in den Globus pallidus externa (GPe) und den Globus pallidus interna (GPi) untergliedert. Funktionell zählen zudem die Substantia nigra (SN), bestehend aus SN pars compacta (SNc) und pars reticulata (SNr), und der Nucleus subthalamicus (STN) zu den Basalganglien (Gerfen, 1996).

In Abbildung 1 ist die funktionelle Verschaltung der Basalganglien schematisch dargestellt.

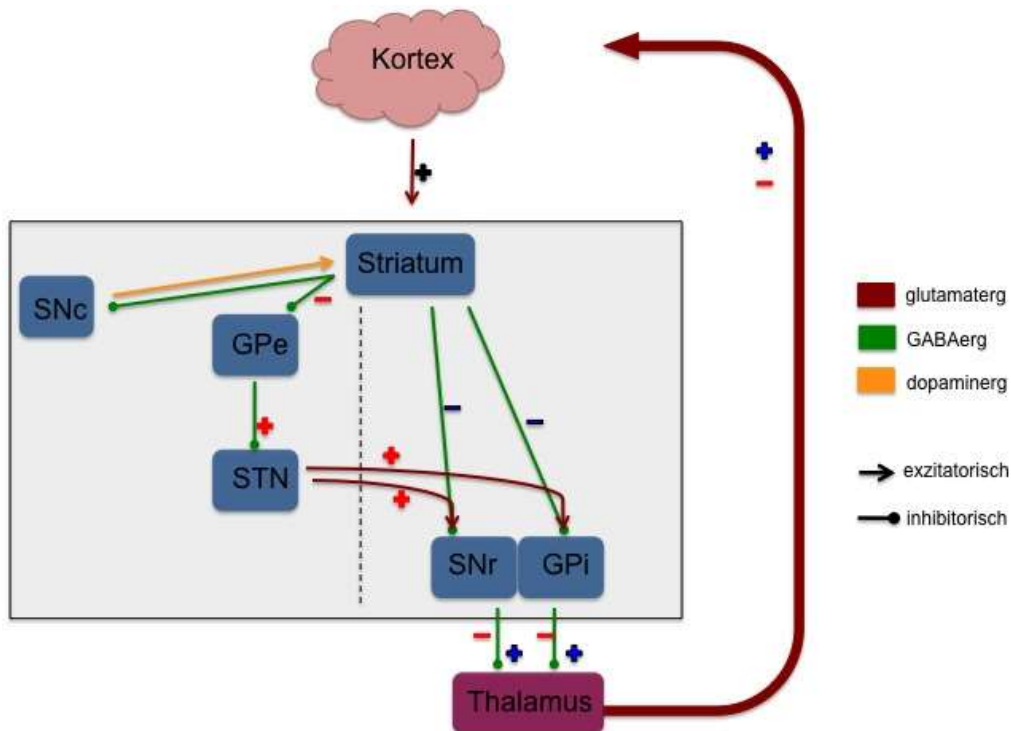


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Basalganglien mit deren funktionellen Verschaltungen.

Ein Plus bedeutet eine exzitatorische, ein Minus eine inhibitorische Reizweiterleitung. Die verschiedenen Neurotransmitter sind mit der Farbe der Pfeile angegeben (GPe Globus Pallidus externa, SNc Substantia nigra pars compacta, STN Nucleus subthalamicus, SNr Substantia nigra pars reticulata, GPi Globus Pallidus interna). Die Strukturen der Basalganglien sind grau hinterlegt.

Eintrittspunkt ist das Striatum, das Informationen über exzitatorische, glutamaterge Neuronen direkt aus dem Kortex erhält (Cordingley & Weight, 1986; Gerfen, 1996; Malenka & Kocsis, 1988; McGeorge & Faull, 1989). Vom Striatum wird die Information an die SNr und den GPi weitergeleitet, die den Austrittspunkt der Basalganglien bilden. Dies kann entweder direkt über GABAerge, inhibitorische Neuronen erfolgen (Graybiel, 1990) wie im Review von Angulo et al. beschrieben (Angulo & McEwen, 1994), oder aber die Information wird indirekt über ebenfalls GABAerge Neuronen zum GPe und weiter zum STN geleitet, der wiederum exzitatorisch über glutamaterge Neuronen (Alexander & Crutcher, 1990) auf die SNr und den GPi wirkt (Albin, Young, & Penney, 1989) (Bolam, Hanley, Booth, & Bevan, 2000; Bolam & Smith, 1992; DeLong, 2000). Diese projizieren über GABAerge Neuronen (Graybiel & Ragsdale, 1979) zum Thalamus, der wiederum eine Schleife zurück zum Kortex bildet.

1.1.4.2 Funktionsweise der Basalganglien

Bei Betrachtung der inhibitorischen und exzitatorischen Reizweiterleitungen der einzelnen neuronalen Verschaltungen kann man zwei unterschiedliche Effekte auf den Kortex erkennen, je nachdem, ob man den direkten oder den indirekten Weg verfolgt. Beim direkten Weg wird die Reizweiterleitung vom Striatum gehemmt, wodurch die Projektionen vom SNr und GPi disinhibiert werden. Dadurch ist eine exzitatorische Wirkung auf die Kortex-Neuronen zu verzeichnen (Albin et al., 1989). Beim indirekten Weg inhibieren die GABAergen Neuronen des Striatums den GPe, dessen Reizweiterleitung wiederum disinhibiert wird. Dadurch kann der STN durch seine glutamatergen Neuronen exzitatorisch auf den SNr und GPi wirken, was wiederum einen inhibierenden Effekt auf den Thalamus hat, der so wiederum hemmend auf die Kortex-Neuronen wirkt (Albin et al., 1989).

Durch dieses System hemmender und erregender Reizweiterleitungen an den motorischen und kognitiven/limbischen Kortex ist eine genaue Feinabstimmung von Bewegungen und anderen Funktionen möglich. Dementsprechend weitläufig sind die Auswirkungen, wenn Strukturen der Basalganglien degenerieren, wie es beim Morbus Parkinson (PD, Parkinson's disease) oder der virologisch ausgelösten HIV-Demenz der Fall ist.

1.2 Morbus Parkinson als subkortikale Demenz

1.2.1 Klinische Merkmale

PD ist nach Alzheimer die zweithäufigste progressive, neurodegenerative Erkrankung. Sie beginnt mit einem Lebensalter von durchschnittlich 60 Jahren (Elbaz et al., 2002), die Prävalenz steigt dabei mit fortschreitendem Alter auf bis zu 3% bei Personen über 75 Jahren an, wie in den Reviews von Nussbaum und Tanner beschrieben wurde (Nussbaum & Ellis, 2003; Tanner & Goldman, 1996), wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen (Van Den Eeden et al., 2003); die Mortalitätsrate liegt bei PD-Patienten 1,6 mal höher als bei gleichaltrigen, gesunden Individuen (Elbaz et al., 2003). Die Ursache des idiopathischen PD ist bis heute unbekannt. Im Folgenden werden die Neuropathologie, die Ätiopathogenese und die Rolle des Immunsystems bei PD genauer erläutert.

1.2.2 Neuropathologische Merkmale

PD ist neuropathologisch genau definiert. Zum einen kommt es zur Degeneration v.a. DA-produzierender Zellen in der SNc, aber auch in anderen – extranigralen – Bereichen des Gehirns, und zum anderen wird die Erkrankung post-mortem durch die Präsenz von sog. Lewy-Körperchen bestätigt. Dabei handelt es sich um Einschlusskörperchen, die v.a. α -Synuklein enthalten.

1.2.2.1 Neurodegeneration und daraus resultierende Symptome

PD ist vorwiegend durch motorische Symptome gekennzeichnet, die auf eine Fehlfunktion in den BG zurückzuführen sind. Dabei handelt es sich um einen progressiven Verlust der DA-produzierenden Neuronen v.a. in der SNc, woraus ein striatales DA-Defizit resultiert (Ehringer H., 1960), das sich auf die thalamo-kortikale Reizweiterleitung und damit die Ausführung motorischer Aktivitäten auswirkt. Die Funktion der BG wurde bereits in Kapitel 1.4 erläutert. Die SNc nimmt bei einer funktionierenden BG-Schleife eine wichtige Rolle ein. Sie enthält DA-produzierende Neuronen, die zum Striatum projizieren. Dieses besitzt zwei unterschiedliche DA-Rezeptoren, den exzitatorischen D1-, der in die SNc, die SNr und den GPi projiziert, und den inhibitorischen D2-Rezeptor, der das Signal in den GPe weiterleitet. Bei gesunden Individuen verstärkt der D1 den aktivierenden thalamo-kortikalen Signalweg, der D2 schwächt dessen hemmende Wirkung, was insgesamt eine Erleichterung der motorischen Bewegungsabläufe bewirkt. Wenn es nun aufgrund der Neurodegeneration der SN bei PD zu einem DA-Verlust im Striatum kommt, so führt dies zum gegenteiligen Effekt. Die übermäßige Aktivierung des STN und des GPi führt zu einer verstärkten Inhibierung des Thalamus und damit letztendlich des zerebralen Kortex (Miller & DeLong, 1988; Mitchell, Jackson, Sambrook, & Crossman, 1989; Penney & Young, 1986) (siehe Abb. 1).

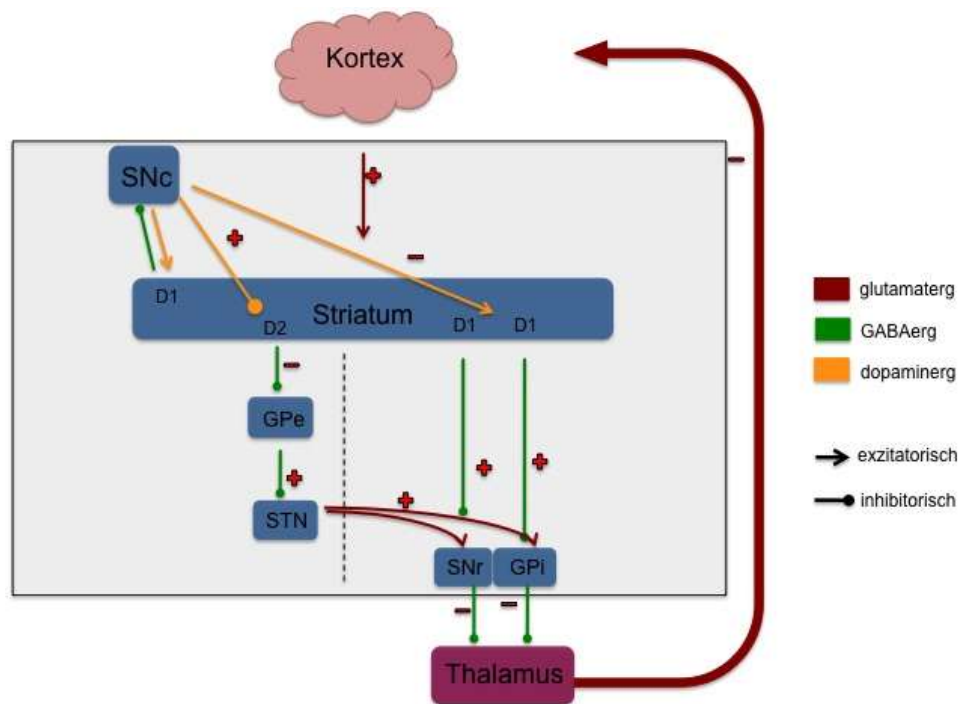


Abbildung 2: Verschaltung der D1 und D2-Dopaminrezeptoren zwischen SNc und Striatum mit Auswirkungen auf die Basalganglien und den zerebralen Kortex bei PD.

Ein rotes Plus und Minus zeigt die Netto-Reizweiterleitung bei PD-Patienten. Durch das DA-Defizit in der SNc kommt es zu einer Erregung der SNr und des GPI, was zur Inhibierung des Thalamus und damit zur Inhibierung des Kortex führt.

Zunächst wird das DA-Defizit durch eine erhöhte Sensitivität der DA-Rezeptoren kompensiert, wodurch die ersten motorischen Symptome erst bei einem Verlust von 80 % der DA-Konzentration im Putamen bzw. 60 % der dopaminergen Neuronen in der SN festgestellt werden (Bernheimer, Birkmayer, Hornykiewicz, Jellinger, & Seitelberger, 1973). Da das Putamen der Teil des Striatums ist, der vorwiegend mit motorischen Regionen des Frontallappens verbunden ist (Crossman, 2000), kommt es bei PD zu den typischen motorischen Kardinalsymptomen, die bereits 1817 von James Parkinson beobachtet wurden (Parkinson, 2002). Sie umfassen eine Verlangsamung der Bewegung (Bradykinese), ein Zittern im Ruhezustand (Ruhetremor), eine Muskelstarre (Rigor), sowie eine gebeugte Haltung mit Gleichgewichtsproblemen. Und obwohl die Bewegungsstörungen PD definieren und das auffälligste Merkmal sind, kommt es bei Patienten auch sehr häufig zu nicht-motorischen Symptomen (Crossman, 2000). Diese resultieren zum einen aus der Verbindung des Nucleus caudatus, der ebenfalls Teil des Striatums ist, mit assoziativen kortikalen Regionen. Zum anderen kommt es schon lange vor der SN-Degeneration zu Läsionen in anderen Bereichen des Gehirns, beginnend mit dem olfaktorischen Nucleus und dem unteren Hirnstamm, weiter über die Amygdala und die SN und schließlich bis hin zum Thalamus und zerebralen Kortex

(Braak, Rub, Gai, & Del Tredici, 2003; Lerner & Bagic, 2008). Diese extranigralen Läsionen spielen eine Rolle in den nicht-motorischen Symptomen (Braak & Del Tredici, 2009; Dubois & Pillon, 1997), zu denen eine Veränderung der Persönlichkeit gehören, wie Angstzustände, Depression, Verlust der Motivation bis hin zu Apathie, oder auch kognitive und mentale Einschränkungen wie eine Verlangsamung des Denkens (Bradyphrenie) oder gar Demenz. Des Weiteren sind sensorische Defizite häufig; die Betroffenen leiden oftmals an einer Einschränkung bis hin zum totalen Verlust des Geruchssinns (Anosmie) (Benkler, Agmon-Levin, & Shoenfeld, 2009). Weiterhin fühlen sie oft Schmerzen, Taubheit, Brennen oder eine Unruhe in den Extremitäten (restless legs). Auch Schlafstörungen und Veränderungen in autonomen Körperfunktionen gehören zum Bild der nicht-motorischen Störungen bei PD (zusammengefasst von (Fahn, 2003)).

1.2.2.2 Lewy-Körperchen

Das zweite neuropathologische Kennzeichen von PD ist das Auftreten von Lewy-Körperchen (Holdorff, 2002; Schiller, 2000), wobei es sich um intrazelluläre Einschlusskörperchen v.a. im Zytoplasma der überlebenden SN-Neuronen handelt. Als Hauptkomponente enthalten sie aggregiertes fibrilläres α -Synuklein (Spillantini, Crowther, Jakes, Hasegawa, & Goedert, 1998), das in seiner nativen Form im gesamten Körper vorkommt. Dessen Aufgabe ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch wird vermutet, dass es bei der Vesikelbildung (Cabin et al., 2002; Chandra et al., 2004; Murphy, Rueter, Trojanowski, & Lee, 2000) und bei der Freisetzung von Neurotransmittern (Di Rosa, Puzzo, Sant'Angelo, Trinchese, & Arancio, 2003; S. Liu et al., 2004), besonders von DA (Lotharius & Brundin, 2002; Yavich, Tanila, Vepsäläinen, & Jakala, 2004) eine wichtige Rolle spielt. Bei PD liegt jedoch vorwiegend die aggregierte Form von α -Synuklein vor, von der vermutet wird, dass sie toxisch ist (Lundvig, Lindersson, & Jensen, 2005). Die Umfaltung wird von verschiedenen Faktoren bewirkt (siehe Ätiopathogenese des idiopathischen PD), doch in wie weit Lewy-Körperchen bei der Pathogenese von PD mit beteiligt sind, ist noch nicht geklärt. Fakt ist jedoch, dass sich die intrazellulären Einschlusskörperchen nach einem bestimmten Muster ausbreiten, denen Braak und seine Kollegen die sechs Stufen der PD zugeordnet haben (Braak et al., 2002). Die ersten Lewy-Körperchen treten bereits Jahre bis Jahrzehnte vor den ersten motorischen Symptomen im unteren Hirnstamm und im olfaktorischen Bulbus auf. Damit einhergehende Läsionen der

dortigen Neuronen führen zur Einschränkung (Hyposmie) oder gar zum Verlust des Geruchssinns (Anosmie). Die Lewy-Körperchen breiten sich weiter entlang des Vagusnervs ins Vorderhirn, die Amygdala und die SN aus, die der symptomatischen motorischen Stufe entspricht (Stufe 3 und 4). Letztendlich erreichen die Lewy-Körperchen auch den zerebralen Kortex und den Thalamus, wodurch die letzte Stufe der Demenz erklärt wird (Braak et al., 2002; Dubois & Pillon, 1997; Lerner & Bagic, 2008). Die Präsenz der Lewy-Körperchen ist jedoch kein hinreichendes Symptom für die Diagnose von Parkinson, da nur einige wenige genetische Fälle mit ihnen verbunden werden und auch im sporadischen PD das Auftreten nicht immer gegeben ist (Forno, 1996). Auch enthält die Mehrzahl der sterbenden Neuronen keine α -Synuklein-Inklusionen und es wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von Lewy-Körperchen die SN-Neuronen nicht anfälliger für Apoptose machen als andere Zellen, in denen es keine α -Synuklein-Ablagerungen gibt (Tompkins & Hill, 1997). Dies zeigt, dass Lewy-Körperchen selbst noch nicht für die Apoptose der betroffenen Zellen ausreichen, vermutlich jedoch trotzdem mehr eine pathologische denn eine normale Begleiterscheinung von PD sind (Braak, Del Tredici, et al., 2003).

1.2.3 Ätiopathogenese des PD

Beim PD werden zwei Krankheitsbilder voneinander unterschieden. Der genetische Parkinson macht 5 – 10 % der Fälle aus (Mizuno, Hattori, Mori, Suzuki, & Tanaka, 2001) und ist meist durch einen frühen Ausbruch der Krankheit bei einem Alter unter 50 Jahren gekennzeichnet (Tanner et al., 1999). Bisher wurden neun Gene identifiziert, deren Mutationen oder Vervielfältigungen zu funktionseingeschränkten oder gar funktionslosen Proteinen führen. Einige werden dominant, andere rezessiv vererbt. Einen Überblick über die verschiedenen Formen des genetischen PD zeigen die Reviews von Lesage und Brice (Lesage & Brice, 2012) und Rosner-Giladi (Rosner, Giladi, & Orr-Urtreger, 2008). Viele der Proteine betreffen das proteosomale System, das für den Abbau von Proteinen verantwortlich ist, oder aber Gene der Atmungskette in den Mitochondrien, deren Fehlfunktion zu oxidativem Stress führen kann. Ein Beispiel für eine autosomal-dominante Vererbung von PD ist eine Mutation im *snca*-Gen, das für das Protein α -Synuklein kodiert. Es wurden bisher drei Punktmutationen identifiziert, die zu einer Veränderung der Aminosäure-Sequenz und so zur Aggregation von

α -Synuklein führen (Polymeropoulos et al., 1997; Singleton et al., 2003). Dieser Schritt ist entscheidend bei der Bildung von Lewy-Körperchen (Gosal, Ross, & Toft, 2006).

Bei 95 % der PD-Fälle ist die Ursache jedoch nicht bekannt; sie werden unter dem Begriff des idiopathischen oder sporadischen PD zusammengefasst. In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Hypothesen untersucht, und obwohl das initiale Ereignis der Neurodegeneration noch nicht bekannt ist, wurden verschiedene Faktoren identifiziert, die bei der Entstehung des idiopathischen PD beteiligt sein können.

1.2.3.1 Pathogenese des idiopathischen PD

Der Auslöser für die Neurodegeneration in der SNc und somit der Grund für PD ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Es wurden verschiedene Risikofaktoren identifiziert, die einzeln oder auch synergistisch zu diesem Krankheitsbild führen können, indem sie oxidativen Stress oder eine Entzündungsreaktion im Gehirn (Neuroinflammation) auslösen, die zur Schädigung der Neuronen im Gehirn führen. Die SN ist dabei ein besonders sensibler Teil des Gehirns, der durch verschiedene Faktoren anfälliger ist und leichter degeneriert als andere (Double, 2012; E. Hirsch, Graybiel, & Agid, 1988), wodurch die selektive Neurodegeneration der SNc bei PD zu erklären wäre. Die verschiedenen Gründe für die Neurodegeneration bei PD werden im Folgenden näher beleuchtet.

1.2.3.1.1 Oxidativer Stress führt zu Neurodegeneration in der SNc

Bei den normalen Stoffwechselprozessen wird in der Atmungskette der Mitochondrien Energie in Form von ATP (Adenosintriphosphat) gebildet. Dabei entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), zu denen das Superoxidanion (O_2^-), Stickstoffmonoxid (NO), Hydroxylionen (OH^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zählen. Im intakten System herrscht ein Gleichgewicht zwischen deren Aufbau durch den Metabolismus und den Abbau durch Antioxidantien und verschiedener Schutzmechanismen. Wenn nun dieses Gleichgewicht aufgrund von Fehlfunktionen gestört ist, nehmen die ROS und freien Radikale überhand und können aufgrund ihrer hohen Reaktivität mit Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren reagieren, was zu deren Schädigung führt. Dieses Ungleichgewicht wird als oxidativer Stress (OS)

bezeichnet und hat die Apoptose der geschädigten Zellen zur Folge (Review (Lang & Lozano, 1998a, 1998b). In PD wurde ein Übermaß an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und ein vermehrter OS durch eine erhöhte Eisenkonzentration in der SNc festgestellt (E. C. Hirsch & Faucheux, 1998), wohingegen die Level der Antioxidantien entweder gleich bleiben, wie es bei Vitamin C und E der Fall ist (Dexter et al., 1991; Riederer et al., 1989) oder leicht gesenkt sind, wie man es bei Katalase oder Glutathion vorfindet (Kish, Morito, & Hornykiewicz, 1985).

Die SNc ist vermehrt OS ausgesetzt als andere Regionen des Gehirns, weil dort der DA-Umsatz sehr hoch ist. DA wird in den SNc-Neuronen produziert und wieder abgebaut, was u.a. durch die Monoaminoxidase (MAO) geschieht. Dabei entsteht Wasserstoffperoxid, das zum OS beiträgt und zum Zelltod führen kann (Spina & Cohen, 1989). DA kann jedoch auch autoxidieren, wodurch toxische Zwischenprodukte wie Quinone und Semiquinone entstehen, die zur Generierung von ROS führen (Olanow, 1990) und so ebenfalls zur selektiven Neurodegeneration beitragen.

1.2.3.1.2 Beeinträchtigung der Atmungskette führt zu Neurodegeneration

Auch die Funktionalität der Atmungskette spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von PD, wie es in dem Review von Lang beschrieben wurde (Lang & Lozano, 1998a). Bei einer Fehlfunktion wird die betroffene Zelle nicht ausreichend mit Energie versorgt, wodurch Apoptose ausgelöst (Haas et al., 1995; Krige, Carroll, Cooper, Marsden, & Schapira, 1992; Mann et al., 1992) und OS erhöht wird. Die Beeinträchtigung der Atmungskette kann an verschiedenen Stellen erfolgen, gut untersucht ist dabei die Dysfunktion des Komplex I (NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase) der Elektronentransportkette. Bei PD Patienten wurde eine um 30 – 40 % verminderte Aktivität des Komplex I in der SNc festgestellt (Mann et al., 1992), was zum selektiven Tod der dopaminergen Neuronen beitragen könnte.

In den letzten Jahrzehnten wurden aber auch einige toxische Stoffe identifiziert, die OS erhöhen oder die Atmungskette an verschiedenen Punkten inhibieren.

1.2.3.1.3 Pestizide als Risikofaktoren

Pestizide gelten als Risikofaktoren für die Entstehung von PD (Engel et al., 2001; Gorell, Johnson, Rybicki, Peterson, & Richardson, 1998; Petrovitch et al., 2002; Ritz & Yu, 2000; Seidler et al., 1996). Dabei handelt es sich aber nicht um eine direkte Schädigung der Neuronen durch Pestizid-Einwirkung. Die Neurodegeneration wird indirekt durch die Fähigkeit einiger Pestizide hervorgerufen, die Bildung freier Radikale zu induzieren, wie es das Herbizid Paraquat (Fukushima et al., 1995; Yumino, Kawakami, Tamura, Hayashi, & Nakamura, 2002) und auch das Insektizid Dieldrin (Kitazawa, Anantharam, & Kanthasamy, 2001) vermag.

Einige Pestizide interagieren auch mit der Atmungskette, wie beispielsweise das Insektizid Rotenon, das den Komplex I inhibiert (Earley & Ragan, 1984), oder das Fungizid Maneb (Manganethylen-1,2-bis-dithiocarbamat), das mit dem Komplex III interagiert (J. Zhang et al., 2003).

Manche Pestizide bewirken außerdem die Faltung und somit Aggregation von α -Synuklein, wie das Insektizid Rotenon (Sherer, Kim, Betarbet, & Greenamyre, 2003) oder Dieldrin und Paraquat (Kitazawa et al., 2001; Uversky, Li, & Fink, 2001), wodurch die Bildung von Lewy-Körperchen begünstigt wird.

Eine weitere chemische Verbindung wurde identifiziert, die bei der Herstellung von Heroin als Nebenprodukt gebildet wird. Das Neurotoxin MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3-tetrahydropyridin) wird vom Organismus aufgenommen, in die aktive Form MPP⁺ (1-Methyl-4-phenylpyridinium) metabolisiert und durch den Dopamintransporter in die dopaminergen Zellen im Gehirn geschleust (Javitch, D'Amato, Strittmatter, & Snyder, 1985). Dort inhibiert es den Komplex I der Atmungskette in den Mitochondrien (Swerdlow et al., 1996), wodurch OS entsteht und dopaminerge Neuronen absterben (Cleeter, Cooper, & Schapira, 1992; Singer, Castagnoli, Ramsay, & Trevor, 1987). Durch diese Wirkung wird MPTP heute häufig im Tiermodell benutzt um Parkinsonismus auszulösen.

Pestizide haben jedoch noch weitreichende Auswirkungen auf den Organismus im Zusammenhang mit Neurodegeneration; sie aktivieren Mikroglia (Gao, Hong, Zhang, & Liu, 2002), die immunkompetenten Zellen des Gehirns. Dies führt zu einer entzündlichen Reaktion im zentralen Nervensystem (ZNS), die man als Neuroinflammation bezeichnet und die die

Degeneration von Neuronen verstärken kann. Wie sie zustande kommt und welche Auswirkungen sie auf den Organismus hat, wird im Folgenden erklärt.

1.2.3.2 Die Rolle des Immunsystems bei der Pathogenese von PD

Verschiedene Studien lassen vermuten, dass eine wesentliche Komponente der Pathogenese von PD das Immunsystem selbst ist. Der Untergang der SN-Neuronen geht mit einer lokalen Entzündungsreaktion des Gehirns (Neuroinflammation) einher, die vorwiegend von aktivierten Mikroglia vermittelt wird. Dies führt zu der Annahme, dass eine Entzündungsreaktion im Gehirn der wesentliche Grund für die Neurodegeneration ist. Unterstützt wird diese Hypothese durch Studien, die gezeigt haben, dass die Langzeitgabe von entzündungshemmenden Medikamenten, namentlich Ibuprofen, das Risiko, an PD zu erkranken, um 45 % senken kann (H. Chen et al., 2005; H. Chen et al., 2003). Vermittelt wird solch eine Reaktion an erster Stelle durch Mikroglia.

1.2.3.2.1 Mikroglia lösen Neuroinflammation aus

Mikroglia sind die wesentlichen immunkompetenten Zellen des Gehirns (Aloisi, 2001), deren Aufgabe die Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase ist. Werden sie aktiviert, verändern sie zum einen ihre Morphologie hin zum amöboiden Phänotyp (Heppner, Skutella, Hailer, Haas, & Nitsch, 1998), wodurch sie an Motilität gewinnen und zu beeinträchtigten Neuronen wandern können. Zum anderen wird ihre Oberfläche verändert wobei sie durch die Expression des MHC-II-Rezeptors (major histocompatibility complex II), sowie Komplement-Rezeptoren (Graeber, Streit, & Kreutzberg, 1988; Kreutzberg, 1996) zur Phagozytose und Antigen-Präsentation befähigt werden. Des Weiteren sezernieren aktivierte Mikroglia lösliche Faktoren, die in erster Linie zur Eliminierung von Pathogenen dienen, als Nebeneffekt jedoch auch körpereigenes Gewebe schädigen. Zu diesen löslichen Faktoren zählen freie Radikale wie O_2^- (Albert et al., 1974; Gao, Hong, et al., 2002; Gao, Jiang, et al., 2002; B. Liu, Du, & Hong, 2000; Qin et al., 2002; Xie et al., 2002) und NO (Chao, Hu, Molitor, Shaskan, & Peterson, 1992; Gao, Jiang, et al., 2002; Gayle et al., 2002; Jeohn, Kim, & Hong, 2000), wodurch aktivierte Mikroglia als Hauptquelle für OS gelten. Aber auch Zytokine wie IL-1 β (Interleukin-1- β)

(Downen, Amaral, Hua, Zhao, & Lee, 1999; Gayle et al., 2002; Ma, Gottschall, Chen, Wiranowska, & Phelps, 2002; Wu et al., 2002) und TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) (Downen et al., 1999; Gayle et al., 2002; McGuire et al., 2001), die eine neurotoxische Wirkung besitzen, werden sezerniert und führen synergistisch zu Neurodegeneration (Chao, Hu, & Peterson, 1995; Jeohn, Kong, Wilson, Hudson, & Hong, 1998).

Die SN nimmt einen besonderen Stellenwert ein, weil sich in dieser Region des Gehirns sehr viele Mikroglia befinden, wodurch der neurotoxische Effekt stärkere Konsequenzen hat als anderswo, wo Mikroglia nicht in so großer Zahl auftreten (W. G. Kim et al., 2000; Lawson, Perry, Dri, & Gordon, 1990).

1.2.3.2.1.1 Trauma

Eine Hypothese zur Pathogenese von PD ist die Einwirkung von Gewalt auf das Gehirn, wie es bei Stürzen o.a. Traumata vorkommt. Epidemiologische Studien und Fallbeispiele stellen einen solchen Zusammenhang her (Ben-Shlomo, Wenning, Tison, & Quinn, 1997; Factor, Sanchez-Ramos, & Weiner, 1988). Plassman hat eine Gruppe von Kriegsveteranen untersucht und stellte dabei ebenfalls eine Verbindung zwischen Kopfverletzungen und dem Auftreten von Parkinson in späteren Jahren fest (Plassman et al., 2000). Gegenteilige Studien (McCann et al., 1998; Williams, Annegers, Kokmen, O'Brien, & Kurland, 1991) zeigen jedoch auch die Schwierigkeit, exakte Parameter für die Untersuchung zu finden und komplexe Daten richtig zu interpretieren (B. Liu & Hong, 2003). Trotz allem gibt es Hinweise darauf, dass ein Hirntrauma zur Aktivierung von Mikroglia führt. Diese Aktivierung kann durch den Verlust der Zell-Zell-Kontakte zwischen Neuronen und Gliazellen (Chang, Hudson, Wilson, Haddon, & Hong, 2000; Chang, Hudson, Wilson, Liu, et al., 2000) oder durch Faktoren, die von verletzten Neuronen als Stimulus ausgesendet werden, entstehen (Giulian & Ingeman, 1988; Giulian, Johnson, Krebs, George, & Tapscott, 1991; Raivich et al., 1999). Die aktivierten Mikroglia sezernieren, wie oben beschrieben, zytotoxische Faktoren, die wiederum die Neurodegeneration verstärken. Studien an Ratten haben gezeigt, dass nach einer Kopfverletzung die Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- α erhöht sind (Shohami, Gallily, Mechoulam, Bass, & Ben-Hur, 1997), was darauf hindeutet, dass durch Kopfverletzungen eine Entzündungsreaktion im Gehirn ausgelöst werden kann.

1.2.3.2.1.2 Exogene Pathogene

Verschiedene Studien lassen vermuten, dass Viren bei der Pathogenese des idiopathischen PD beteiligt sein können. Die 1915 und 1927 verlaufene Spanische Grippe, die von Influenza A (Reid et al., 2003; Toovey, Jick, & Meier, 2011) ausgelöst wurde, trat zeitgleich mit der sog. *Enzephalitis lethargica* (von Economo-Krankheit) auf (Dickman, 2001; Elizan & Casals, 1991), wobei es sich um eine Gehirnentzündung mit parkinsonähnlichen Symptomen handelt (Dickman, 2001; Dourmashkin, 1997; Taubenberger, 2006). Bei der Untersuchung der SN von PD-Patienten wurden allerdings keine Hinweise auf Viruspartikel, Inklusionen oder Antigene von Herpes Simplex 1-, Influenza- und Masernviren gefunden (Dale et al., 2004; J. Schwartz & Elizan, 1979). Das virale Agens ist daher sehr wahrscheinlich nicht der direkte Auslöser der Neurodegeneration. Vielmehr geht man davon aus, dass eine Infektion des Gehirns ebenfalls zur Aktivierung von Mikroglia und somit zur Neuroinflammation führt (B. Liu & Hong, 2003). Dieses Ereignis kann Jahrzehnte vor dem Ausbruch des PD liegen und eine Kaskade der Neuroinflammation und Hirnatrophie auslösen, die erst in späteren Jahren voll zum Tragen kommt. Ein weiteres Virus, das Parkinsonismus auslöst, ist HIV (human acquired immunodeficiency virus). Bei der HIV-assoziierten neurokognitiven Störung (HAND) werden u.a. dieselben Symptome wie beim Morbus Parkinson hervorgerufen (Mirsattari, Power, & Nath, 1998). Aufgrund der Lokalisierung der geschädigten neuronalen Strukturen (Price et al., 1988), die sich vorwiegend in den Basalganglien befinden (Brew, Rosenblum, Cronin, & Price, 1995), wird HIV-Demenz ebenfalls zu den subkortikalen Demenzen gezählt (Price, 1996). Die SNc ist dabei besonders betroffen (Reyes, Faraldi, Senseng, Flowers, & Fariello, 1991), wodurch die motorischen Defizite bei HIV-Demenz-Patienten hervorgerufen werden.

Auch einige Bakterien stehen im Verdacht, Parkinsonismus auszulösen. So wurden *Helicobacter pylori* (Charlett et al., 1999; Dobbs, Charlett, Dobbs, Weller, & Peterson, 2000) und *Nocardia asteroides* (Kohbata & Beaman, 1991; Tam, Barry, Beaman, & Beaman, 2002) als mögliche Kandidaten genauer untersucht, konnten aber als Verursacher von PD nicht bestätigt werden (Hubble, Cao, Kjelstrom, Koller, & Beaman, 1995).

1.2.4 Immunsystem bei PD

Eine Hypothese der Autoimmunität als Auslöser für PD (Koutsilieri, Lutz, & Scheller, 2013) besagt, dass durch Mikroglia eine inflammatorische Reaktion ausgelöst und dadurch dendritische Zellen (DCs) angelockt werden. Diese nehmen als phagozytierende, Antigen-präsentierende Zellen (Auto-) Antigene aus dem ZNS auf und migrieren anschließend in die zervikalen Lymphknoten, wo sie die aufgenommenen Antigene den dort vorhandenen T- und B-Zellen präsentieren (Banchereau & Steinman, 1998). Für das Antigen spezifische Lymphozyten werden so aktiviert und zur Proliferation veranlasst. Durch eine lokale Permeabilisierung der Blut-Hirn-Schranke durch Astrozyten aufgrund der Entzündungsreaktion können möglicherweise die Effektor-Lymphozyten und (Auto-) Antikörper ins ZNS gelangen (von Hawkins in seinem Review erläutert (Hawkins & Davis, 2005)) und dort neuronale Strukturen schädigen.

Die einzelnen Schritte, die zum Auslösen einer solchen Immunantwort nötig sind, wurden durch verschiedene Studien beschrieben. So befinden sich im gesunden Gehirn zwar nur sehr wenige DCs (McMenamin, 1999), doch akkumulieren diese bei lokalen Entzündungsreaktionen (McMahon, Bailey, & Miller, 2006), wie sie von Mikroglia aufgrund der oben genannten Faktoren (Pathogene, Pestizide, Traumata) ausgelöst werden können. Im ZNS angekommen nehmen DCs freie (Auto-) Antigene auf und wandern anschließend in die zervikalen Lymphknoten in der Peripherie, wo diese präsentiert werden und je nach Natur des Antigens naive B- und T-Zellen aktivieren oder Toleranz auslösen (de Vos et al., 2002; Hochmeister et al., 2008; Karman, Ling, Sandor, & Fabry, 2004; Kivisakk et al., 2004). So wurden 1994 von Fiszer und seinen Kollegen aktivierte CD25+ $\gamma\delta$ + T-Zellen in PD-Patienten entdeckt (Fiszer et al., 1994), die eine Schlüsselfunktion in anderen Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose spielen (Z. Chen & Freedman, 2011).

Bisher standen zwei Antigene als Autoantigene im Verdacht. Neuromelanin, ein Pigment, das in den dopaminergen Neuronen in der SN und im Locus caeruleus vorkommt (Zecca et al., 2001; Zecca et al., 2004; Zecca, Zucca, Wilms, & Sulzer, 2003), und α -Synuklein, das als Hauptkomponente der Lewy-Körperchen in fehlgefalteter Form vorliegt.

1.2.4.1 Neuromelanin aktiviert die adaptive Immunität

Neuromelanin (NM) ist ein schwarzes Pigment, das im Lauf der Zeit im Zytoplasma von dopaminergen Neuronen v.a. in der SNc, aber auch im LC akkumuliert (Zecca et al., 2001; Zecca et al., 2004). Forschungen haben ergeben, dass NM-haltige Zellen leichter degenerieren als Zellen, die dieses Pigment nicht enthalten (E. Hirsch et al., 1988; Kastner et al., 1992), wodurch es in den Fokus der Pathogenese-Forschung des idiopathischen Parkinsons gerückt ist. Diesem Neuropigment, das ein Abbauprodukt im Katecholamin-Stoffwechsel ist, werden sowohl protektive als auch toxische Eigenschaften zugeschrieben (Review (Rao et al., 2006; Zecca et al., 2003)). Zum einen fängt intrazelluläres NM freie Radikale und Toxine ab, wodurch die Neuronen vor deren schädigender Wirkung geschützt werden (Zecca et al., 2003), zum anderen wirkt NM v.a. extrazellulär toxisch, was durch den hohen Eisengehalt bedingt wird (Ben-Shachar, Riederer, & Youdim, 1991; Double et al., 2003). *In vitro* wurde gezeigt, dass NM DCs funktionell aktiviert, die wiederum eine proliferative T-Zellantwort auslösen können (Oberlander et al., 2011). Neben DCs werden aber auch Mikroglia aktiviert (Wilms et al., 2003), die Chemoattraktoren und proinflammatorische Zytokine ausschütten.

Somit besitzt Neuromelanin alle Eigenschaften, um eine Immunantwort auslösen zu können. Auch *in vivo* führt humanes NM nach Injektion in Rattengehirne zur Aktivierung von HLA-positiven Mikroglia und Neuroinflammation, sowie Neurodegeneration (Zecca et al., 2008; W. Zhang et al., 2011). In *post-mortem* Gehirnen von PD-Patienten wurde außerdem eine Korrelation zwischen extrazellulärem NM und HLA-positiven Mikroglia in der SN festgestellt (McGeer, Itagaki, Boyes, & McGeer, 1988), was die Hypothese unterstützt, dass NM von Mikroglia aufgenommen und so eine entzündliche Reaktion im Gehirn ausgelöst wird. Und obwohl B-Zellen noch nicht konkret auf die Reaktivität mit Neuromelanin getestet wurden, so wurden dennoch Hinweise auf Antikörper im Plasma, Blut oder direkt in *post-mortem* Gehirnen festgestellt (Depboylu et al., 2011; Diamond, Huerta, Mina-Osorio, Kowal, & Volpe, 2009; Papachroni et al., 2007; Papuc et al., 2014). Antikörper gegen synthetisches Melanin in PD (Double et al., 2009), sowie die Tatsache, dass humanes NM Neuroinflammation und –degeneration in Ratten SN auslöst (Zecca et al., 2008), stützen die Hypothese, dass NM als Autoantigen fungieren kann.

Neben NM wurden auch andere Antigene mit PD in Verbindung gebracht, so z.B. α -Synuklein.

1.2.4.2 α -Synuklein als Autoantigen

Wie bereits in Kapitel 1.2.2.2 erwähnt, stellt α -Synuklein den Hauptbestandteil von Lewy-Körperchen dar und spielt in der Pathogenese des genetischen PD eine wichtige Rolle. Auch im sporadischen PD wurde α -Synuklein häufig diskutiert, da es ebenfalls Auslöser einer Autoimmunantwort sein kann.

Bestimmte Intermediate bei der Faltung von α -Synuklein stehen im Verdacht, toxisch zu sein, was sich besonders auf dopaminerge Neuronen auswirkt, weil Lewy-Körperchen gehäuft dort vorkommen (Lundvig et al., 2005). Durch den daraus resultierenden Zelltod werden diese in den Extrazellulärraum freigesetzt, wo sie Mikroglia aktivieren (W. Zhang et al., 2005), was eine Neuroinflammation sowie eine Nitrierung von α -Synuklein zur Folge hat. Das wiederum führt zum neuronalen Zelltod (Shavali, Combs, & Ebadi, 2006). Formen von α -Synuklein wurden bereits im CSF (cerebrospinal fluid = Liquor) und im Plasma von PD-Patienten gefunden (El-Agnaf et al., 2006). Denkbar wäre nun derselbe Immunprozess, wie er in Kapitel 1.2.4.1 für NM beschrieben wurde, was durch Funde von anti- α -Synuklein-Antikörper im Plasma von Patienten des genetischen PD bekräftigt wird (Papachroni et al., 2007). Außerdem wurde gezeigt, dass Lewy-Körperchen durch Komplement-Komponenten in PD erkannt werden (Yamada, McGeer, & McGeer, 1992), was das Potential als Auslöser einer Autoimmunreaktion unterstreicht.

1.2.4.3 Andere Antigene als Ziel einer Autoimmunreaktion

Auch wenn sich NM und α -Synuklein als immunreaktiv herausgestellt haben, so wäre es denkbar, dass sie nur den initialen Auslöser für die Neuroinflammation und Aktivierung des Immunsystems darstellen. Ist diese Kaskade erst einmal aktiviert, so hat dies eine weitere Schädigung der betroffenen Strukturen zur Folge, was es den DCs ermöglichen könnte, ganz verschiedene neuronale Antigene aufzunehmen und eine Autoimmunantwort auszulösen. In der Tat wurden im Plasma und im Liquor von PD-Patienten eine Vielzahl von Autoantikörpern gegen verschiedenste Proteine (Dale et al., 2004; Hassin-Baer, Levy, Langevitz, Nakar, & Ehrenfeld, 2007; Orr, Rowe, Mizuno, Mori, & Halliday, 2005; Papachroni et al., 2007; Roselli et al., 2006; Wilhelm et al., 2007), sowie Komponenten des klassischen Komplementwegs

entdeckt (Depboylu et al., 2011; Yamada et al., 1992). Chen und Mitarbeiter haben festgestellt, dass die Übertragung von isolierten Antikörpern (Ak) aus PD-Patienten in die SN von Ratten eine Neurodegeneration auslöst, wohingegen Ak von Kontrollen eine wesentlich geringere Schädigung herbeiführten (S. Chen et al., 1998).

Somit wäre auch denkbar, dass nicht eine einzige sondern mehrere unterschiedliche Autoantikörperspezies gegen verschiedene Strukturen in ihrer Gesamtzeit zur Schädigung der neuronalen Strukturen führen. Die genannten Fakten deuten auf die Apoptose der von Lewy-Körperchen betroffenen Neuronen hin, was die Phagozytose der einzelnen Bestandteile der degenerierenden Zellen durch Mikroglia und DCs zur Folge hätte. Dies könnte ebenfalls eine Autoimmunantwort auslösen. Laut Braak sind die unterschiedlichen Stadien der PD-Erkrankung durch die Anwesenheit von Lewy-Körperchen gekennzeichnet, was somit eine Immunantwort gegen die betroffenen Gewebe des jeweiligen PD-Stadiums zur Folge hätte, mit der Voraussetzung, dass sich die Antigene der jeweiligen Gewebe unterscheiden und sie bei der Entwicklung der zentralen Toleranz nicht berücksichtigt wurden.

Abb. 3 zeigt zusammenfassend das komplexe Zusammenspiel verschiedener Faktoren bei der Pathogenese von PD, die letztendlich zu Neuroinflammation und -degeneration führt.

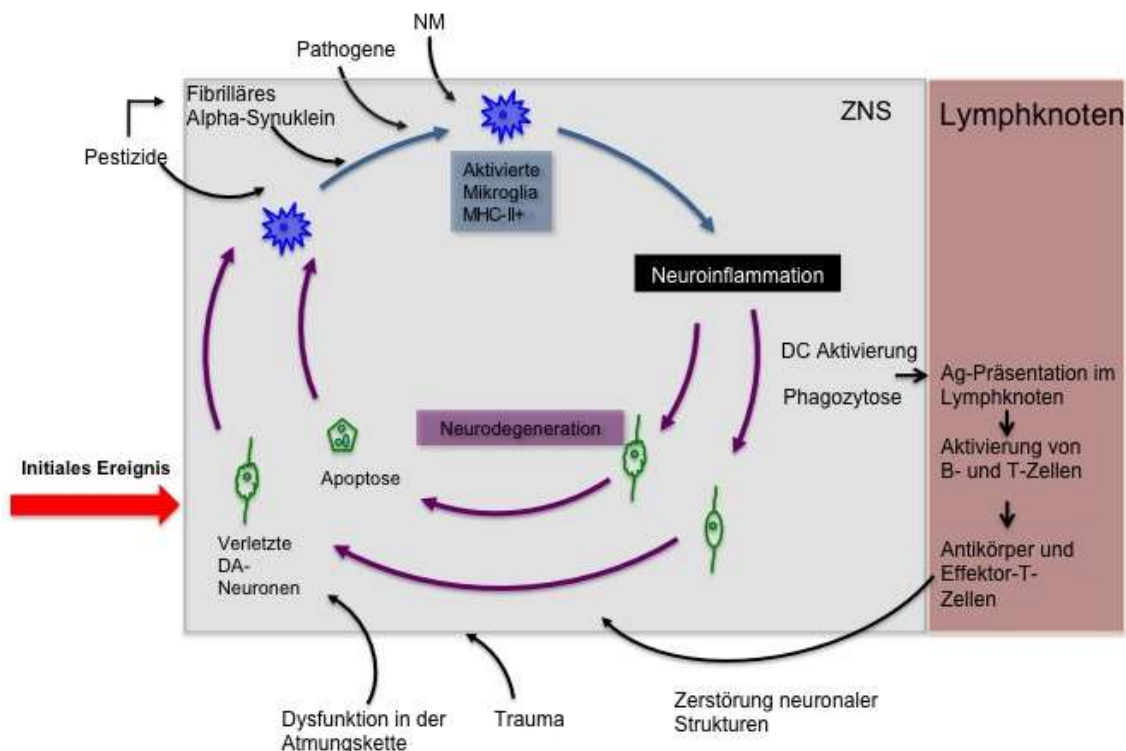


Abbildung 3: Neuroinflammation und -degeneration bei der Pathogenese von PD.

Ein initiales Ereignis führt zur Verletzung von dopaminergen Neuronen, was eine Aktivierung von Mikroglia zur Folge hat. Diese schütten proinflammatorische Zytokine aus und führen so zu OS und Neuroinflammation, was zur Schädigung weiterer Neurone und der Verstärkung der Neurodegeneration führt. Außerdem werden Komponenten der adaptiven und der angeborenen Immunität aktiviert, Antigene werden von DCs phagozytiert, in den zervikalen Lymphknoten präsentiert und lösen so die Bildung von Effektor-T-Zellen und Antikörper-sezernierende B-Zellen aus, die wiederum ins ZNS wandern und dort neuronale Strukturen schädigen. Exogene Faktoren wie Traumata, Pestizide, Pathogene, sowie endogene Faktoren wie NM, fibrilläres α -Synuklein und Dysfunktionen der Atmungskette verstärken hierbei die schädigenden Effekte auf neuronale Strukturen, insbesondere der SNC (Verändert nach Hunot & Hirsch 2003).

1.3. HIV als Auslöser einer subkortikalen Demenz

1.3.1 Definition der HIV-Demenz

Bei der HIV-assoziierten Demenz (HAND) (HIV-assoziierte neurokognitive Störung, auch HIV-Enzephalopathie, HIV-Demenz-Komplex genannt) handelt es sich um ein neurologisches Syndrom, das durch die Infektion des Gehirns mit dem HI-Virus hervorgerufen wird. In der Folge kommt es zu psychiatrischen und neurologischen Störungen (Price et al., 1988), wodurch es u.a. zu Parkinson-ähnlichen Symptomen kommt. Diese können kognitive Einschränkungen, Verhaltensänderungen und motorische Störungen umfassen. Durch die Lokalisierung der neuronalen Schäden und die Ähnlichkeit der hervorgerufenen Symptome wird HAND ebenfalls zu den subkortikalen Demenzen gezählt (Price, 1996).

1.3.2 Inzidenz von HAD

Die ersten Fälle der AIDS-Demenz wurden schon kurz nach der AIDS-Epidemie (acquired immunodeficiency syndrome) 1981 beschrieben (Snider et al., 1983). Das Center for Disease Control (CDC) hat 1991 angegeben, dass jährlich 7,3 % der AIDS-Patienten eine HAD entwickelten. Auch wenn HAD charakteristisch für die fortgeschrittene AIDS-Erkrankung ist, wird auch bei ca. 2,8% adulter Patienten zum Zeitpunkt der AIDS-Diagnose HAND diagnostiziert (Janssen et al., 1989). Seit der highly active antiretroviral therapy (HAART) ist die Inzidenz von HAD stetig von 50 bis 70 % der Erkrankten (Price et al., 1988) um die Hälfte gesunken. Allerdings steigt HAND seit 1994 wieder an, was der erhöhten Lebenserwartung von HIV-Patienten durch verbesserte antiretrovirale zuzuschreiben ist (Finzi et al., 1997; McArthur, 2004).

1.3.3 Neuroinvasion und Pathologie

Das Gehirn gilt als immunprivilegiertes Areal. In ihm bildet sich schon früh im Verlauf der HIV-Infektion ein Virusreservoir. Wie das Virus in das Gehirn gelangt ist noch nicht vollständig geklärt, allerdings werden drei verschiedene Hypothesen vertreten. Das Virus könnte über Transzytose durch die Endothelzellen (N. Q. Liu et al., 2002; Saphire, Bobardt, & Galloway, 2000), oder aber über die Blut-Liquor-Schranke des Plexus choroideus (Harouse et al., 1989) übertragen werden. Eine dritte Hypothese, die mittlerweile als generell anerkannt gilt, ist die des „Trojanischen Pferds“, wie sie im Review von Gabuzda erläutert wird (Gabuzda & Wang, 1999; Peluso, Haase, Stowring, Edwards, & Ventura, 1985), bei der das Virus über infizierte aktivierte Monozyten in das Gehirn einwandert und dort Mikroglia (und möglicherweise auch Dendritische Zellen) infiziert.

Durch die Infektion des Gehirns kommt es zu einer zerebralen Atrophie, die von reaktiven Zellveränderungen, vielkernigen Riesenzellen und Glia-Mikroglia-Infiltraten in der grauen Substanz, v.a. des Nucleus caudatus und des Putamen, begleitet wird (Cornford, Holden, Boyd, Berry, & Vinters, 1992; Navia, Cho, Petito, & Price, 1986; Reyes et al., 1991). In Übereinstimmung mit der immunologischen Antwort in den Basalganglien zeigten Studien die Präsenz verschiedener Strukturproteine des HI-Virus in diesen Arealen. So wurden die Transmembran-Domäne des Glykoproteins gp41 (Kure, Weidenheim, Lyman, & Dickson, 1990) in hohen Konzentration, sowie Makophagen, Mikroglia und Riesenzellen, die positiv für das Kapsid-Protein p24 sind, im GP und in den Nuclei der Basalganglien (Brew et al., 1995) nachgewiesen.

Auch die SNc ist bei HIV-Patienten betroffen. So haben Reyes et al 91 die Dichte der Melaninpigmentierten Neurone der SNc untersucht und – auch ohne Parkinsonismus - einen Neuronenverlust von 25 % in AIDS Patienten festgestellt. Itoh hat dies 2000 auch bei HIV-infizierten Patienten in späten Stadien gezeigt (Itoh, Mehraein, & Weis, 2000). Dies hat selbstverständlich Auswirkungen auf das nigrostriatale dopaminerge System, wie es beim Morbus Parkinson der Fall ist.

Durch die Degeneration der Neuronen der SNc kommt es zu einer drastischen Reduktion der DA-Konzentration in den nigrostriatalen Gehirnstrukturen (Sardar, Czudek, & Reynolds, 1996). Das Striatum wird mit DA unterversorgt, wodurch es zu den gleichen klinischen Symptomen

wie beim PD kommt, die allerdings erst dann auftreten, wenn die DA-Konzentration um 70 % oder mehr fällt (Riederer & Wuketich, 1976). Erste Anzeichen für eine HAD sind gestörte psychomotorische Geschwindigkeit (Arendt, Hefter, Elsing, Strohmeyer, & Freund, 1990), die sich dann zu den typischen Parkinson-Symptomen Bradyphrenie, Vergesslichkeit, Apathie, gestörte manuelle Fertigkeiten (Navia, Cho, et al., 1986), posturale Instabilität (Arendt, Maecker, Purrmann, & Homberg, 1994; Navia, Jordan, & Price, 1986), Gang-Abnormitäten, Rigor und hypomimetische Faszien ausweiten.

1.4. Autoimmunität

In der Vergangenheit wurde mehrfach die Hypothese diskutiert, dass PD durch Autoimmunprozesse ausgelöst werden könnte (Benkler et al., 2009; Moscovitch, Szyper-Kravitz, & Shoenfeld, 2009). Hinweise darauf geben verschiedene Studien, die eine Beteiligung des angeborenen und adaptiven Immunsystems bei PD-Patienten zeigen. Durch die sehr ähnlich verlaufende Inflammationsreaktion und deren Lokalisierung wäre solch eine Autoimmun-Hypothese auch für die Entwicklung der durch HIV ausgelösten HAND denkbar. Wie eine solche Autoimmunreaktion zustande kommt, wird nachfolgend näher betrachtet.

1.4.1 Mechanismen der zentralen und peripheren Toleranz

Das Immunsystem besitzt verschiedene Mechanismen, um Autoimmunität, also das Erkennen und Bekämpfen körpereigener Strukturen durch das Immunsystem zu vermeiden. Lymphozyten durchlaufen in ihrer Reifung eine Selektionsmaschinerie, in der sie zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung auf Autoreaktivität hin untersucht und gegebenenfalls beseitigt werden. Bei der zentralen Toleranz werden autoreaktive B-Zellen bereits im Knochenmark – dem Ort ihrer Entstehung – klonal deletiert (D. A. Nemazee & Burki, 1989). Alle übrigen B-Lymphozyten verlassen daraufhin das Knochenmark und wandern in die peripheren Lymphorgane Milz und Lymphknoten, wo der Prozess der peripheren Toleranz stattfindet. Dabei werden sie in der T-Zell-Zone erneut getestet und gegen eigene Strukturen gerichtete Zellen deletiert (Rathmell, Townsend, Xu, Flavell, & Goodnow, 1996). Weitere Mechanismen zur Verhinderung der Autoimmunität ist die Inaktivierung von B-Zellen

(Anergie) (Goodnow et al., 2009), sowie das Rezeptor-Editing, bei der die Spezifität des B-Zellrezeptors (BCR) verändert wird (D. Nemazee, 2000).

Trotz dieser Mechanismen durchbrechen manche B-Zellen die Toleranz und werden durch körpereigene Peptide aktiviert, wodurch Autoantikörper gebildet werden. Doch obwohl diese für viele Autoimmunerkrankungen spezifisch sind, wird vermutet dass besonders Autoantikörper gegen intrazelluläre Proteine nicht pathogen, sondern vielmehr eine sekundäre Konsequenz des Immunprozesses sind (Naparstek & Plotz, 1993). Andererseits zeigen verschiedene Studien, dass Antikörper aus Patienten auch bei gesunden Kontrollen eine Autoimmunantwort auslösen. Gezeigt wurde dies im Mausmodell für Autoimmunarthritis (Korganow et al., 1999), bei der aus Plasma aufgereinigte Antikörper aus Patienten in gesunde Mäuse injiziert wurden, wodurch kurze Zeit später die Krankheit ausgelöst wurde. Auch bei PD wurde dieser Versuch gemacht und beobachtet, dass Antikörper aus dem Plasma von Patienten in gesunden Mäusen ebenfalls Parkinson mit der typischen SN-Degeneration auslöst (S. Chen et al., 1998).

Auch T-Zellen durchlaufen während ihrer Reifung den Prozess, der zur zentralen Toleranz führt, in denen die Autoreaktivität des T-Zellrezeptors (TCR) gegenüber Autoantigenen, die vom MHC im Thymus präsentiert werden (Delves & Roitt, 2000a, 2000b), überprüft wird. Ist diese zu gering, erkennen T-Zellen den MHC nicht richtig, wodurch der „Tod durch Vernachlässigung“ (death by neglect) ausgelöst wird. Ist die Affinität zu hoch, erkennt der TCR auch körpereigene Peptide, wodurch die T-Zelle durch negative Selektion in Apoptose übergeht. Nur T-Zellen mit einer mittleren Affinität erfahren eine positive Selektion, reifen im Thymus heran und migrieren anschließend in die Peripherie (Delves & Roitt, 2000a; Kamradt & Mitchison, 2001). Da jedoch nicht alle Autoantigene im Thymus exprimiert werden, dient die periphere Toleranz als weiterer Mechanismus, Autoreaktivität zu verhindern (Akkaraju et al., 1997; Klein & Kyewski, 2000; Pugliese et al., 1997).

Die periphere Toleranz wird vorwiegend über Dendritische Zellen (DCs) vermittelt (P. H. Tan et al., 2005). Nehmen diese ein Autoantigen aus beispielsweise apoptierenden Körperzellen auf, so werden sie nicht aktiviert (K. Liu et al., 2002; Sauter et al., 2000). Dennoch wandern sie in den Lymphknoten, um das Autoantigen zu präsentieren. Bindet eine T-Zelle nun an diesen Autoantigen-MHC-Komplex der DC, so wird entweder Apoptose (Kurts, Kosaka, Carbone, Miller, & Heath, 1997), Anergie (Adler et al., 1998) oder die Entwicklung regulatorischer T-

Zellen (Verhasselt et al., 2004) ausgelöst. Damit ist das Durchbrechen der peripheren Toleranz zum großen Teil DCs zuzuschreiben, die durch Autoantigene in einen aktiven Zustand übergehen und eine Immunreaktion auslösen (Morelli & Thomson, 2007; Steinman & Nussenzweig, 2002; J. K. Tan & O'Neill, 2005).

1.4.2 Durchbrechen der Toleranz und Auslösen einer Autoimmunantwort

Autoreaktive Mechanismen spielen im Organismus eine wichtige Rolle bei der Überwachung des ZNS und Gewebereparatur und werden deshalb als protektive Autoimmunität bezeichnet (Moalem et al., 1999). So wurden auch in gesunden Menschen CD4⁺-T-Zellen entdeckt, die spezifisch gegen Gehirn-Antigene gerichtet sind (Mor & Cohen, 2006). Dies zeigt, dass nicht jeder Autoimmunprozess in eine pathogene Autoimmunerkrankung mündet, solange sie geordnet abläuft.

Das Durchbrechen der Toleranz führt jedoch auch in vielen Fällen zu einer echten Autoimmunerkrankung und kann durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden. Verletzungen oder Infektionen mit Viren (Bianchi et al., 2007; Munz, Lunemann, Getts, & Miller, 2009) oder Bakterien (Root-Bernstein, Vonck, & Podufaly, 2009) können als Trigger dienen, indem sie eine normale Immunantwort auslösen. Durch die dadurch bedingte Entzündungsreaktion werden Antigen-präsentierende Zellen aktiviert, was wiederum die Reifung unspezifischer autoreaktive B- und T-Zellen als Nebeneffekt zur Folge hat (Bach, 2005). Zusätzliche gegen Selbstantigene gerichtete Lymphozyten können durch den Mechanismus des „Epitope-spreading“ (Streuung der Epitope) aktiviert werden (Lehmann, Forsthuber, Miller, & Sercarz, 1992). Dabei handelt es sich um eine Erweiterung der erkannten Epitope, wodurch das Immunsystem auch Pathogene erkennt, wenn diese ihr Epitop durch Punktmutationen verändert haben. Es kann jedoch auch vorkommen, dass so Autoantigene erkannt und eine Autoimmunreaktion ausgelöst wird (Delogu, Deidda, Delitala, & Manetti, 2011; Kamradt & Mitchison, 2001). Ein weiterer Mechanismus ist die Molekulare Mimikry (Chastain & Miller, 2012). Pathogene Strukturen gleichen dabei sehr oft körpereigenen Antigenen, um dem Immunsystem zu entkommen. Wenn autoreaktive Lymphozyten den Toleranzmechanismen entgehen und in der Peripherie auf das Mimikry-Protein treffen, ist die folgende Immunantwort dementsprechend auch gegen körpereigene Strukturen gerichtet.

Weiter wäre denkbar, dass die infektiöse Umgebung eine chemische Veränderung von Autoantigenen herbeiführt, wodurch diese nicht mehr als eigen erkannt würden (Chervonsky, 2010). Wie bereits erwähnt werden im Thymus nicht alle Autoantigene exprimiert, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass diese Zellen in der Peripherie auf ein körpereigenes Peptid treffen, das sie erkennen und zerstören. Dies gilt v.a. für Peptide aus immunprivilegierten Arealen, wie dem ZNS oder dem Auge (in den Reviews von Munz und Schwartz beschrieben (Munz et al., 2009; M. Schwartz & Baruch, 2014)). Kommt es in diesem Bereich zu einer Infektion oder Verletzung, erfolgt eine Infiltration mit DCs, wodurch eine Autoimmunantwort ausgelöst werden kann.

1.5 HERV als Marker für Immunaktivierung

Bei HERVs (humane endogene Retroviren) handelt es sich um Retroelemente, die im humanen Genom zahlreich vorkommen. Sie entstanden durch Infektion der humanen Keimbahn vor 2 bis 40 Millionen Jahren (Martin, Herniou, Cook, Waugh O'Neill, & Tristem, 1997) und haben im Laufe der Zeit ihre Infektosität durch Mutation, Deletion und Rekombination verloren (Boeke & Stoye, 1997). HERVs machen ca. 8 % des humanen Genoms aus (Bock & Stoye, 2000) und lassen sich je nach Verwandtschaft zu anderen Retroviren in drei Klassen unterteilen. Manche HERVs besitzen nur noch Long terminal repeats und bringen daher keine funktionsfähigen Proteine hervor, andere hingegen weisen einen offenen Leserahmen auf und führen zur Produktion funktioneller Proteine (de Parseval, Lazar, Casella, Benit, & Heidmann, 2003; Villesen, Aagaard, Wiuf, & Pedersen, 2004). Die HERV-K-Familie, ein Subtyp der Klasse 2, ist die jüngste und aktivste Form (K steht für die Aminosäure Lysin, die als tRNA zur reversen Transkription benutzt wird) und kann nicht-infektiöse virus-ähnliche Partikel bilden, wie Kurth 2010 in seinem Review beschrieben hat (Bieda, Hoffmann, & Boller, 2001; Boller et al., 1993; Boller et al., 2008; Kurth & Bannert, 2010; Simpson et al., 1996)).

Die Expression von HERV und dessen Funktion sind umstritten. Allerdings wurden Transkripte des HERV-K-Proteins *rec* in der menschlichen Plazenta sowie in fetalen Geweben entdeckt (Andersson et al., 2002), was auf einen Beitrag der HERV-K-Expression bei der Plazentabildung sowie der Entwicklung von Geweben hinweist.

In gesunden Individuen ist HERV-K jedoch wenig bis gar nicht exprimiert, wohingegen eine Hochregulation der Expression während bestimmter Krankheitsverläufe zu verzeichnen ist. Dies gilt im Besonderen für einige Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, einer chronischen systemischen Entzündung besonders der Gelenke (Freimanis et al., 2010) oder der Multiplen Sklerose, dessen Ursache noch nicht vollständig geklärt ist (Tselis, 2011). Bei beiden ist ein signifikanter Anstieg der HERV-K-Transkripte zu verzeichnen. Ob die HERV-K-Transkription dabei eine kausale Rolle spielt, ist jedoch noch völlig ungeklärt (Antony, Deslauriers, Bhat, Ellestad, & Power, 2011). Des Weiteren wurden HERV-Transkripte bei malignen Tumorerkrankungen festgestellt (Buscher et al., 2006; Buscher et al., 2005; Herbst, Sauter, & Mueller-Lantzsch, 1996; Wang-Johanning et al., 2007).

Auch infektiöse Krankheiten können die Transkription von HERV-K auslösen. So wurde in HIV-Demenz-Patienten eine erhöhte Transkription von HERV-K festgestellt (Johnston et al., 2001). Diese geht unter HAART zurück, wird jedoch bei Therapie-Versagern oder Resistenzen wieder hochreguliert (Contreras-Galindo et al., 2012).

Durch die signifikante Transkription von HERV-K in autoimmunologisch regulierten Erkrankungen könnten HERV-K-Partikel oder mRNA ebenfalls bei Parkinson-Patienten erhöht sein. Dies war ebenfalls Bestandteil dieser Arbeit.

II Material

2.1 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Arbeitswerkbank	BSB 4A	Gelaire
Binokular		Olympus
Brutschrank	Incubat	Heraeus, CO2 begast
Blotkammer		Institutswerkstatt
Dark Box	LAS-3000	Fujifilm
Einfrierbox		Nalgene
Eismaschine	AF-10	Scotsman
ELISA reader	Spectra max plus 384	Molecular Devices
ELISA reader	S3	Molecular Devices
ELISPOT Reader	Immuno Spot 4.0.16	Cellular Technology Ltd
Feinwaage	HL52	Mettler & Geissen
Fluoreszenzmikroskop	DMIRES 2	Leitz
Gefrier- u Kühlschränke		Bosch/Liebherr
Heizblock	TDB120	Biosan
Kühlplatte -15°C		
Lichtmikroskop	Fluovert	Leitz
Magnetrührer		Janke und Kunkel?
Mikroliterpipetten		Gilson, Eppendorf
Multipipette		Labsystems
Nanodrop		Thermo Scientific
Netzgerät	E835	Consort
Neubauer-Zählkammer		Fuchs-Rosenthal
pH-Meter	PB-11	Sartorius
PCR-Cycler	iCycler	Biorad
Pipetten	2, 200, 1000 µl	Gilson
Pipetten	10 – 100 µl	Eppendorf
Pipettierhilfe (elektrisch)	Pipetboy comfort	Integra

Plattformschwenker	PR50	Instruments
Schüttler für Reaktionsgefäße	Typ VX2E	Janke-Kunkel
Schüttler: Plattform	Certomat S2	B.Braun
SDS PAGE Laufkammer	XCell Surelock® mini	Invitrogen
Schwenker		HSI
Sterilwerkbank	BSB4A Laboratories	Gelaire Flow
Tischzentrifuge		Heraeus
Vortexer	L46	GLW
Waage	SBA 51	SeblTec
Wasserbad	WB14	Memmert
Zentrifuge	Multifuge 1sr	Hettich

2.2 Verbrauchsmaterialien

2.2.1 Glas

Material	Volumen	Firma
Erlenmeyerkolben	250 ml	Schott
Messzylinder	50, 100 ml	Schott
Objektgläser		Marienfeld
Objektträger		Marienfeld
Pipetten	5, 10, 25 ml	Brand
Schraubverschlussflaschen	50, 250, 500, 1000 ml	Schott

2.2.2. Kunststoff

Material	Typ	Firma
Blotting Papier	0,76 mm, 330 g/m ²	Hartenstein
Blotting Papier	1,3 mm, 550 g/m ²	Hartenstein

ELISA-Platten Maxisorp		nunc
FACS-Röhrchen	5 ml	BD
Griffstopfen		Hartenstein
Handschuhe	powder free nitrile	SensiCare Ice
Kryoröhrchen nalgene	2 ml	Thermo Scientific
Nitrocellulose (0,45 µm)	Optritran BA-S85	Whatman
Nitrocellulose (0,45 µm)	Protran BA 85	Whatman
Parafilm		Roth
Pipetten	2 ml, 5 ml, 10 ml	Greiner
Pipettenspitzen:		
Pipettenspitzen	1-1000 µl	Hartenstein
Pipettenspitzen Multi UNIVERSAL	1 – 200 µl	Roth
Pipettenspitzen Multi Standard	0 – 10 µl	Roth
Pipettenspitzen mit Filter	0,5 - 10 µl	nerbe plus,
	0 – 20 µl	nerbe plus
	0 – 200 µl	nerbe plus, biozym
	1000 µl	Biozym, Hartenstein
PVDF-ELISPOT MultiScreen Filter	96 well	Millipore
qPCR plates	96 well	peqlab
Reaktionsgefäße	1,5 ml	Eppendorf
Spitzen	5 ml	Primo Luer lock
Sterilfilter Minisart 0,45 um		sartorius stedim
Tris-Glycerine Gele 4 – 12 %	1 mm, 15 wells	novex life technologies
Wägschälchen		Hartenstein
Zellkulturflaschen	50, 250 ml	Greiner
Zentrifugenbecher	500 ml	Nalgene
96-well cell culture Cluster	flat bottom	Costar
96-well cell culture plates		greiner bio-one
Zentrifugenröhrchen	15, 50 ml	Greiner

2.3 Chemikalien

Substanz	Firma
Agarose	Roth
3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC)	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Gibco, BRL
β -Mercaptoethanol	Roth
Bromphenolblau	Sigma
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth
Cell stimulation cocktail	eBioscience
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dinatriumhydrogencarbonat	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Essigsäure	AppliChem
Ethanol	Roth
Fetales Kälberserum (FCS)	GIBCO
Formaldehyd 4 % Roti histofix	Roth
GelRed	VWR International
Glutamin L(+)	Roth
Glycerin	AppliChem
Glycin	AppliChem
Isopropanol	Roth
Lymphoprep	AXIS-SHIELD
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma Aldrich
Lymphoprep (Ficoll)	Axis-Shield
Magermilchpulver	AppliChem
Methanol	Roth
Natriumacetat-Trihydrat	Roth
Natriumcarbonat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumchlorid-Lösung 0,9 %	B. Braun

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	AppliChem
Natriumthiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃)	Roth
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Sigma Aldrich
Polyethylenimin (PEI, linear 25 kD)	Polyscience
Penicillin/Streptomycin	Gibco, BRL
PIPES	AppliChem
Ponceau S solution	Sigma-Aldrich
2-Propanol	Roth
Rinderserumalbumin (BSA)	Gibco
Roti nanoquant	Roth
Salzsäure	Merck
Silbernitrat (AgNO ₃)	Sigma-Aldrich
Stop Solution	Invitrogen
SuperSignal West Pico ECL	Thermo Scientific
Tris-aminomethan (Tris)	AppliChem
Trypanblau	Fluka
Tween-20	AppliChem
Wasserstoffperoxid 30 %	AppliChem
Western bright ECL Quantum	Biozym

2.4 Enzyme

Enzym	Firma
Proteinase-Inhibitor	Sigma
DNase	Invitrogen
RNase	Invitrogen

2.5 Puffer und Lösungen

Puffer	Firma/Zusammensetzung
Ladepuffer 6x:	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 52 % Glycerin 50 mM Tris, pH 7,6
TAE-Puffer 50x:	2,0 M Tris, pH 8,0 0,1 M EDTA 1,0 M CH ₂ COOH
Tris-Glycine SDS:	novex life technologies
TEVP:	
Lämmli 4x:	8 ml 8 g 40 ml 0,4 g 20 ml ad. 100 ml

2.6 Proteine & Antikörper

Antikörper/Antigene	Firma
anti-GAPDH (HRP) loading control	abcam
goat pAb to human IgG (HRP)	abcam
goat pAb to human IgG+M+A	abcam
goat pAb to human IgM (HRP)	abcam
goat pAb to Tetanus Toxoid	abcam
goat pAb to Ms IgG + gM + IgA	abcam
goat pAb to human IgG (kappa light)	perbio

Mouse mAb to Ovalbumin	Sigma Aldrich
Tetanus-Toxoid, Clostridium tetani	Merck Calbiochem
α -Synuklein, human, recombinant, E.	Merck Millipore
Ovalbumin	Sigma Aldrich

2.7 Primer

Primer	Sequenz	Konzentration	Schmelztemp.	Firma
Kenv fwd	GCT GTA GCA GGA GTT GCA TTG	10 μ M	54,4°C	Sigma
Kenv rev	GCT GTA GCA GGA GTT GCA TTG	10 μ M	51,7°C	Sigma
Kgag fwd	AGC AGG TCA GGT GCC TGT AAC ATT	10 μ M	57,4°C	Sigma
Kgag rev	TGG TGC CGT AGG ATT AAG TCT CCT	10 μ M	57,4°C	Sigma

2.8 Kits

Kit	Hersteller
Ana IgG-ELISA	Calbiotech
CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit	Molecular Probes™
human IgG total Ready-SET-Go!	eBioscience affymetrix
human IFN γ ELISPOT Ready-SET-Go!	eBioscience
IgG human ELISA kit	abcam
Melon Gel IgG Spin Purification Kit	Thermo Scientific
QIAshredder	QIAGEN
SYBR-Green rt PCR kit Quantifast	QIAGEN
SYBR-Green rt-PCR Kit QuantiNova	QIAGEN
Taq PCR (2x)	NEB

2.9 Größenstandards

Größenstandard	
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas
Protein-Ladder	Fermentas
GeneRuler DANN ladder Mix	Thermo Scientific

2.10 Medien

Medium	Firma/Zusammensetzung
Komplettmedium	RPMI (GIBCO, 21875-034) 500 µg/ml L(+)-Glutamin 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin 10 % FCS
AIM-V	GIBCO

2.11 Programme

Programm	Hersteller/ Homepage
Entrez PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/
EndNote X7	Thomson Reuters
Graphpad Prism® 4.0	Graphpad
ImageJ 1.46r	National Institutes of Health, USA http://imagej.nih.gov/ij
Microsoft Word	Microsoft
Microsoft Excel	Microsoft
Microsoft Powerpoint	Microsoft

2.12 Sonstiges

	Firma
Desderman	Schülke
Gigasept	Schülke
Optische Klebefolie	BioRad
Schutzärmel	Hygonorm
Terralin	Schülke
Überschuhe	CPE efficient

III Methoden

3.1 Patientenkohorten

Für diese Arbeit wurden verschiedene Patienten-Gruppen untersucht. Studiengruppe 1 für die Optimierung des Western Blot-Verfahrens bestand aus Parkinson-Patienten und Kontrollen, die in Zusammenarbeit mit der Kopfklinik, Neurochirurgische Poliklinik der Universität Würzburg rekrutiert wurden (Wue). Zusätzliche Kontrollseren wurden aus der VITA-Studie herangezogen, in der verschiedene Risikofaktoren der Alzheimer-Krankheit untersucht wurden (Grunblatt, 2009) und die altersgematcht und gut charakterisiert waren (Tab. 1).

Tabelle 1: Patienten-Charakterisierung der Studiengruppe 1.

Studiengruppe 1	Wue		VITA
	Parkinson	Kontrollen	
Anzahl n der Patienten	34	5	36
Alter [Jahre]	64,62 ± 9,165 (40 – 78)	68,6 ± 7,57 (56 – 74)	
Geschlecht	unbekannt	unbekannt	unbekannt
Gesamt - IgG [mg/ml] im Plasma	6,45 ± 4,54	8,18 ± 1,1	4,42 ± 2,51
ANA [AB Index < 0,9 ANA-IgG unter der Nachweisgrenze]	0,11 ± 0,035	0,103 ± 0,044	0,13 ± 0,054

Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte mit Standardabweichung. Der Wertebereich wurde in Klammern angegeben.

Für die Versuche, die Methode des Western Blot auch für das BSL3-LABOR zu etablieren, um HIV-infizierte Patienten auf Autoantikörper gegen Gewebe zu untersuchen, wurden Proben der Studiengruppe 2 getestet (Tab. 2).

Tabelle 2: Charakterisierung der Studiengruppe 2

	SA				
	naiv	Kontrollen	imp. ARV	ARV	imp. naiv
Anzahl n der Patienten	8	11	3	15	2

Gezeigt wurde die Anzahl n der Patienten in den unterschiedlich charakterisierten Kohorten (naiv: nicht behandelt, Kontrollen: nicht-infizierte, imp. ARV: neurologisch auffällig unter antiretroviraler Therapie, ARV: antiretrovirale Therapie, imp. Naiv: neurologisch auffällig ohne Therapie).

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Gewinnung von Serum aus Vollblut

Für die Gewinnung des Serums wurde das entnommene Vollblut eine Stunde bei RT inkubiert. In dieser Zeit koagulierte es und wurde anschließend bei 4°C und 3000 rpm für 20' zentrifugiert. Das Serum verbleibt als klare Flüssigkeit im Überstand und wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Hitzeinaktivierung bei 56°C für 10' folgte entweder direkt vor dem Einfrieren oder erst kurz vor Gebrauch.

3.2.2 Plasmagewinnung aus Vollblut

Für die Entnahme des Blutes mit anschließender Gewinnung des Plasmas wurden EDTA-Monovetten von Sarstedt verwendet. In einem anschließenden Zentrifugationsschritt bei 2000 rpm wurde das Plasma von den übrigen Bestandteilen des Blutes mittels eines Filters getrennt. Die Gerinnungsfaktoren, anders als beim Serum, bleiben im Plasma enthalten, da EDTA als Antikoagulans die Blutgerinnung verhindert.

3.2.3 Isolierung von PBMCs aus Vollblut

Um die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC; peripheral blood mononuclear cells) aus EDTA-Vollblut zu isolieren, wurde dieses zunächst im Verhältnis 1:1 mit vorgewärmtem (37°C) RPMI (0 % FCS) verdünnt. In einem 50 ml Falcon-Röhrchen wurden

dann je 10 ml zimmerwarmes Histopaque-1077 (Ficoll) vorgelegt und mit je 20 ml Blut-RPMI-Suspension überschichtet. Um die Blutbestandteile ihrer Dichte nach im Ficoll-Gradienten aufzutrennen erfolgte ein 30-minütiger Zentrifugationsschritt (1200 rpm, 24°C, Anlauf 120 Sekunden, Bremse 1). Die PBMCs wurden mit einer 1000 µl Pipette abgesaugt (gräulich-weiße Schicht über der Ficoll-Schicht) und in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. In einem anschließenden Waschschrift mit 15 ml FCS-freiem RPMI wurde das Ficoll entfernt (Zentrifugation bei 1200 rpm, 10', Bremse 5). Der Überstand wurde abgekippt, das Pellet aufgeschlagen und falls mehrere Ansätze von demselben Spender erfolgten, die Pellets in einem Falcon vereint und erneut mit 12 ml RPMI10 gewaschen (Zentrifugation bei 1200 rpm, 10', Bremse 9). Nun wurde die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Kammer bestimmt und die PMBCs anschließend eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.2.4 Ermittlung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer

Die Zellzahl einer Zellsuspension wurde unter Zuhilfenahme der Neubauerkammer bestimmt. Dies ist ein Objektträger mit vier eingravierten Großquadraten, die wiederum jeweils in 16 kleine Quadrate unterteilt sind. Auf dem Objektträger wurde ein Deckgläschen platziert, unter das eine mit Trypanblau angefärbte Zellsuspension aufgebracht wurde. Üblicherweise wurde eine 1:4 oder 1:10 Verdünnung hergestellt, bei dem 5 µl Trypanblau mit 10 µl Zellsuspension und entsprechend der Verdünnung PBS hinzugefügt wurde. Lebende Zellen bleiben ungefärbt, wohingegen tote Zellen durch ihre blaue Färbung erkannt werden. Ausgezählt wurden alle vier Großquadrate. Die Konzentration der Zellen errechnete sich aus folgender Formel:

$$Z = n \cdot V / G \cdot 10^4 \text{ Zellen/ml}$$

wobei Z die Zellzahl pro ml der Zellsuspension, n die gezählten Zellen, V der Verdünnungsfaktor und G die Zahl der ausgezählten Großquadrate bedeuten. 10^4 ist dabei der Volumenfaktor, der nötig ist, um die Zahl pro ml zu errechnen, da der Objektträger ein Volumen von 0,1 µl fasst.

Die Zellsuspension konnte nun mit dem entsprechenden Medium auf die gewünschte Konzentration eingestellt werden. Für PBMCs wurde RPMI mit 10 % FCS verwendet.

3.2.5 Einfrieren von Zellen

Um Zellen für einen späteren Zeitpunkt zu konservieren, wurden sie unter Zugabe von DMSO eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. Da DMSO toxisch ist, kann es sehr leicht die Zellen schädigen. Um dies zu vermeiden, wurde es – zusammen mit FCS und der Einfrierbox im Kühlschrank oder auf Eis vorgekühlt. In der Zwischenzeit wurden die Zellen gezählt und auf 5×10^6 Zellen pro 0,5 ml eingestellt, oder der gesamte Inhalt einer konfluenten mittleren Zellkulturflasche bei adhärenen Zellen in 2 ml aufgenommen. Nun wurde das Einfriermedium hergestellt, das aus 20 % DMSO und 80 % FCS besteht, und jeweils 0,5 ml in die beschrifteten Kryoröhrchen vorgelegt, wodurch die Endkonzentrationen 10 % DMSO und 40 % FCS betragen. Darauf wurden jeweils 0,5 ml Zellsuspension gegeben, die Röhrchen verschlossen und in der Einfrierbox bei -80°C über Nacht gelagert. Die Einfrierbox garantiert dabei ein kontrolliertes Herunterkühlen der Zellsuspension um jeweils 1°C pro Stunde, womit eine Schädigung der Zellen vermieden wird. Am darauffolgenden Tag wurden die Kryos zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.3 Histologische Methoden

3.3.1 Präparation von Gewebeschnitten

Für die Präparation der Gewebehomogenate aus unterschiedlichen Gehirn-Arealen wurden die entsprechenden Gehirnstrukturen zunächst aus einem gesunden, neurologisch unauffälligen Spender isoliert und bis zur Präparation der Kryoschnitte bei -80°C gelagert. Dieser Schritt erfolgte in der Abteilung Neurophatologie, Institut für Pathologie der Universität Würzburg unter der Leitung von Dr. Camelia Monoranu.

Zur Anfertigung der Kryoschnitte wurden die isolierten Gehirnareale in ein Kryotom eingespannt und bei -75°C wenige μm dicke Späne geschnitten, in ein Gefäß überführt und bis zur Homogenisierung weiter bei -80°C gelagert.

3.3.2 Herstellen der Gewebekomogenate

Um die Plasmen von Parkinson- und HIV-Patienten auf Autoantikörper, bzw. PBMCs auf autoreaktive T-Zellen gegen bestimmte Gehirnareale zu untersuchen, wurden diese durch einen Homogenisierungsschritt für den Western Blot und die ELISPOTS aufbereitet. Je nach Patientenkohorte wurden dafür unterschiedliche Gehirnareale verwendet.

In der Studiengruppe 1, bei der Parkinson-Patienten, sowie Kontrollen auf Autoantikörper gegen Substantia nigra (SN) getestet wurden, wurde ein Pool aus der SN verschiedener gesunder Spender hergestellt. Die Isolierung der SN aus humanen post-mortem Makro-Gewebeschnitten wurde von Herrn Dr. Tatschner aus der Rechtsmedizin der Universität Würzburg auf einer Kühlplatte bei -15°C durchgeführt.

Die Kohorte der Südafrikaner wurde auf Autoantikörper gegen Striatum getestet, welches von der Abteilung der Neuropathologie, Institut für Pathologie der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt wurde.

Bei beiden Gewebe-Pools war der Vorgang der Homogenatherstellung identisch. Dabei wurden die Gewebe eingewogen und mit eisgekühltem TEVP-Puffer versetzt, wobei ca. 0,1 g/ml TEVP-Puffer benutzt wurde. Dem TEVP-Puffer wurde Proteinase-Inhibitor (1:1000) zugesetzt, um die Protein-Degradierung zu verhindern. Bei den SN-Geweben wurden 6,4 g SN-Schnitte verschiedener gesunder Spender mit 35 ml TEVP-Puffer versetzt, wovon 4 ml für die Homogenatherstellung und der Rest für die Isolierung von NM verwendet wurden. Für das Striatum-Homogenat wurden Striata von fünf gesunden Kontrollen (S139/00, S19/05/ S4/00, S37/00 und S208/02) in ausreichender Menge TEVP-Puffer gepoolt. Die Homogenisierung selbst fand mechanisch und auf Eis statt, benutzt wurde dafür Potter S von Braun. Anschließend wurden die SN- und Striatum-Homogenate bei 2000 rpm für 10' bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorfgesäß überführt. Durch die Zentrifugation setzten sich die Zellfragmente und Membranbestandteile im Pellet ab, das verworfen wurde. Die Proteinkonzentration des Überstands wurde anschließend mittels Bradford gemessen und die Homogenate bei -20°C bei kurzfristiger und -80°C bei langfristiger Lagerung aufbewahrt.

Aufgrund technischer Probleme bei der Verwendung von Homogenat als Erstantikörper anstelle rekombinanter Ak war eine Optimierung des Western Blots vonnöten. Im Vorversuch

wurde das Verfahren für die Detektion von Autoantikörpern gegen die Gehirnareale nach Braak optimiert. Dafür wurden die folgenden Gehirnareale aus drei gesunden post-mortem-Gehirnschnitten (neurologisch gesund-verstorbene Spender 111, 23, 38) entnommen und gepoolt: dm (dorsaler Motornukleus des Glossopharynx- und Vagusnervs, Braak-Stufe 1), LC (Coeruleus-Subcoeruleus-Komplex, Braak-Stufe 2), SN (Substantia nigra, Braak-Stufe 3), MC (temporaler Mesocortex, Braak-Stufe 4), HC (high order sensory association areas, präfrontale Felder, Braak-Stufe 5), und FC (first-order sensory association areas, prämotorische, motorische Felder, Braak-Stufe 6). Als Negativkontrolle wurden außerdem Gewebeschnitte des Cbl/2 (Cerebellum, Kleinhirn) angefertigt und im WB mit analysiert. Die Gewebeschnitte wurden dabei mit so wenig 1 x TE-Puffer (Sigma-Aldrich) (Proteinase-Inhibitor 1:1000) wie möglich homogenisiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 2000 rpm bei 4°C für 10' erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford und anschließend wurden die aliquotierten Homogenate bei -20°C für die kurzfristige, und bei -80°C für eine langfristige Lagerung eingefroren.

Für das Tübingen-Projekt wurden Parkinson-Patienten auf Autoantikörper gegen fünf verschiedene Gehirn-Gewebe (dm, SN, MC, HC, FC, s.o.) untersucht, die nach Braak eine unterschiedlich starke Rolle bei der Parkinson-Pathogenese spielen (Siehe Vorversuch). Bei der Homogenat-Herstellung wurden die angefertigten Kryoschnitte mit 1 x TE-Puffer (Sigma-Aldrich) (Proteinase-Inhibitor 1:1000) versetzt (Tab. 3) und ebenfalls mechanisch und auf Eis homogenisiert. Nach erfolgtem Zentrifugationsschritt (2000 rpm, 10', 4°C) wurde der Überstand aliquotiert und bei -20°C gelagert. Für das Tübingen-Projekt wurden die Gehirngewebe aus nur einem gesunden post-mortem-Gehirn (111) verwendet.

Tabelle 3: Angaben für die Herstellung von Gewebemogenaten.

Gewebe	Gewicht (g)	V (TE, Proteinase-Inhib.) (ml)
dm	0,233	2
SN	0,663	2
MC	0,536	2,5
HC	0,363	1,5
FC	0,654	2,5

Für jedes Hirnareal wurde die Einwaage an gefriergetrocknetem Gewebe in g und das zur Homogenisierung verwendete Volumen an TE-Puffer in ml angegeben.

Bei allen Homogenaten wurde anschließend eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford durchgeführt.

3.3.3 Isolierung von Neuromelanin aus der SN

Die Neuromelanin (NM)-Isolierung erfolgte aus den von Herrn Dr. Tatschner isolierten SN-Geweben. Diese wurden zunächst in einem 20 ml Glasteflon-Kolben mit 20 ml Aqua dest. homogenisiert, wobei der Kolben in Eiswasser gekühlt wurde. Zur Homogenisierung reichten bei 1000 rpm 10 Hübe mit der Pistille aus. Das Homogenat wurde nun auf 24 Du Pont Zentrifugenröhrchen (18 ml) portioniert und bei einer Temperatur von 3 – 7°C für 10 min bei 10 000 rpm zentrifugiert (Sorval Du Pont). Nach dem Abgießen des Überstands wurde das Pellet mit 1 ml Phosphatpuffer (pH 7,4; 50 mM) gevortext und bis zum oberen Rand mit Phosphatpuffer aufgefüllt. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt und anschließend das Pellet in 1 ml Tris-HCl-Puffer (pH 4; 50 mM; mit Natrium-Dodecylsulfat 0,5 mg/ml) gevortext, aufgefüllt und verschlossen. Es folgte ein dreistündiger Inkubationsschritt bei 37°C im Wasserbad unter permanentem Schwenken. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt und Abgießen des Überstands wurde das Pellet mit einem ml Tris-HCl Puffer (pH 7,4; 50 mM, Natrium-Dodecylsulfat 0,5 mg/ml und Proteinase K 0,2 mg/ml) gevortext, aufgefüllt und verschlossen, woraufhin ein zweiter dreistündiger Inkubationsschritt im Wasserbad folgte. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert und der Überstand abgegossen, das Pellet wiederum mit einem ml isotonischer Natriumchlorid-Lösung (0,9 %; B. Braun) resuspendiert und jeweils der Inhalt von je zwei Röhrchen vereint. Nach erneutem Zentrifugieren (wie oben) wurde das Pellet mit einem ml Aqua dest. resuspendiert und in einem Du Pont Cortex Zentrifugenröhrchen (Glas) vereint und wie oben abzentrifugiert (unter Zuhilfenahme eines kleinen Gummiadapters, der unter den Glasboden gelegt wurde). Der Überstand wurde abgenommen und das NM-Pellet in Lämmli-PBS aufgenommen.

Die Menge der für den Western Blot eingesetzten NM-Lämmli-Suspension wurde abgeschätzt. Nach der Faustformel ergibt 1 g SN ca. 1 mg NM. Bei dieser NM-Isolierung wurden 5,6 g SN eingesetzt, was eine ungefähre Menge von 5,6 mg NM ergibt. Dieses wurde mit 56 µl Lämmli-PBS aufgefüllt, für 10' bei 92°C denaturiert und für spätere Zwecke eingefroren. Bevor

Patientenseren auf Autoantikörper gegen NM untersucht wurden, wurde die geeignete Menge für die Analyse im Western Blot austitriert.

Lösungen:

Lösung A: 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

Lösung B: 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

Zusammensetzung: 180 ml Lösung A + 620 ml B pH = 7,4

Tris-HCl Puffer Stammlösung: 0,5 M Trishydroxymethylaminomethan, pH auf 7,4

Versuchslösung 50 mM: 200 ml 0,5 M Stammlösung + 800 ml Aqua dem.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Der Proteingehalt der Gewebhomogenate wurde photometrisch nach der Methode der Bradford-Messung mittels Roti nanoquant (Roth) bestimmt. Diese beruht auf den Farbstoff Coomassi®, der in seiner ungebundenen kationischen Form rot erscheint (Absorptionsmaximum $\lambda = 470 \text{ nm}$) und bei Proteinbindung einen Komplex bildet und in seine anionische Form übergeht, die blau erscheint ($\lambda = 595 \text{ nm}$). Um den genauen Proteingehalt zu messen, wurde eine Standardreihe mit BSA angefertigt, die es erlaubte, über eine Standardgerade die Proteinkonzentrationen der verschiedenen Homogenate anhand ihrer Farbveränderung zu extrapolieren. Es wurde eine Standardreihe von 0 bis 100 μl pipettiert.

Die Gewebhomogenate wurden jeweils 1:20 (10 μl + 190 μl) und 1:40 (5 μl + 195 μl) mit Aqua dest. verdünnt.

Jeweils 50 μl des Standards und der Proben wurden in Duplikaten in die 96 well Platte übertragen und jeweils 200 μl der 2:5,5 mit Wasser verdünnten Roti-nanoquant-Lösung zugegeben. Nach einer Inkubation von 5' bei RT wurde die Platte mittels ELISA-reader bei

590 nm eingelesen. Die Auswertung erfolgte durch die Auftragung der OD₅₉₀-Werte gegen die Konzentration des Standards, wodurch die Proteinkonzentration der Homogenate mittels einer Standardgerade errechnet wurde.

3.4.2 SDS-PAGE

Studiengruppe 1 und 2

Bei dieser Gelelektrophorese handelt es sich um eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Dabei wird das zu untersuchende Antigen mit Hilfe von Natriumdodecylsulfat (SDS), das im Lämmli-Puffer enthalten ist, negativ geladen und bei 92°C für 10' denaturiert, wodurch sich die enthaltenen Proteine nach ihrem Molekulargewicht im Tris-Glycin-Gel auftrennen. In dieser Arbeit wurde das Surelock®-System von Invitrogen verwendet, das die vorgefertigten Gradientengele (4-12 %), die Laufkammer, sowie den Laufpuffer (10x) umfasst. Vor dem Applizieren der Antigene wurden die einzelnen Taschen der Gele je zweimal mit 200 µl Laufpuffer (1x) gespült und anschließend vertikal in die dafür vorgesehene Laufkammer gespannt, die nun mit Laufpuffer (1x) befüllt wurde. Die Gewebehomogenate wurden in der entsprechenden Konzentration mit 4-fach konzentriertem Lämmli-Puffer und entsprechender Menge PBS versetzt. Somit lag in allen Proben eine Endkonzentration von 2 % β-Mercaptoethanol, 2 % SDS, 10 % Glycerin, 0,2 % Bromphenolblau und 50 mM TRIS-HCl (pH 6,8) vor. Nach einem Hitzeschritt von 92°C für 10' mit anschließender kurzer Zentrifugation wurden die Proben auf das Gel aufgetragen und bei 35 mA und 125 V aufgetrennt. Dies umfasste einen Zeitraum von 1 h 40' bei einem Gel und 2 h 30 bei zwei Gelen zur selben Zeit. Als Größenstandard wurden zwischen 3 und 5 µl des PageRuler™ Protein Ladder (Fermentas) aufgetragen, der neben der Funktion als Größenstandard auch die optische Überwachung der Gelelektrophorese, sowie die Überprüfung des Blotting-Erfolgs auf die Nitrocellulosemembran erlaubte. Für die verschiedenen Projekte wurden unterschiedliche Proteine und Homogenate in verschiedenen Konzentrationen aufgetragen, was in den Tabellen 4 bis 7 gezeigt wird.

Studiengruppe 1

Tabelle 4: Angaben für die Proteinmengen, die als Antigene auf das SDS-Gel in der Studiengruppe 1 aufgetragen wurden.

Protein	pro Tasche im Gel
SN Pool	10 µg
NM	3 µl
TTX	0,25 µg
α-Synuklein	2 µg
prestained ladder	5 µl

Angegeben ist die die Menge des jeweiligen auf das Gel aufgetragenen Homogenats.

Studiengruppe 2

Tabelle 5: Angaben für die Proteinmengen, die als Antigene auf das SDS-Gel für die Studiengruppe 2 aufgetragen wurden.

Homogenat	pro Tasche im Gel
Striatum	9 µg
TTX	0,25 µg
prestained ladder	5 µl

Angegeben ist die die Menge der Antigene, die auf das Gel aufgetragen wurden

Vorversuch

Tabelle 6: Angaben für die Proteinmengen, die als Antigene auf das SDS-Gel für die Optimierung der Methode aufgetragen wurden.

Homogenat	pro Tasche im Gel
dm (Pool)	20 µg
SN (Pool)	20 µg
MC (Pool)	20 µg
HC (Pool)	20 µg
FC (Pool)	20 µg
LC (Pool)	20 µg
CS Plasma	5 µl (1:500)

Ovalbumin	25 ng
TTX	0,25 µg
prestained ladder	5 µl

Angegeben ist Menge des jeweiligen Antigens, die auf das Gel aufgetragen wurde

Tübingen-Projekt

Tabelle 7: Angaben für die Proteinmengen, die als Antigene auf das SDS-Gel für das Tübingen-Projekt aufgetragen wurden.

Homogenat	pro Tasche im Gel
dm	12 µg
SN	12 µg
MC	12 µg
HC	12 µg
FC	12 µg
Kontroll-Plasma	7 µl (1:500)
prestained ladder	3 µl

Angegeben ist Menge des jeweiligen Homogenats, das auf das Gel aufgetragen wurde

3.4.3 Western Blot

Beim Western Blot werden die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen, die anschließend immunologisch detektiert wurden. In dieser Arbeit wurden die Proteine aus den Gehirngeweben auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, um anschließend Plasmen von Parkinson- und HIV-Patienten, sowie Kontrollen auf die Präsenz von spezifischen, gegen Gehirngewebe gerichteten Plasma-Autoantikörper zu untersuchen. Bei der Etablierung dieser Methode wurde zunächst das semi-dry-Verfahren getestet, das Anwendung in der Studiengruppe 1 und 2 fand und später aufgrund besserer Reproduzierbarkeit und geringerer Variabilität durch das tankblot-Verfahren ersetzt wurde, mit dem die Tübinger-Proben analysiert wurden.

3.4.3.1 Proteintransfer mittels semi-dry-Verfahren

Für die Etablierung der Methode (Studiengruppe 1 und 2) wurden die Gewebeproteine durch das semi-dry-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran (0,45 µm) übertragen. Dabei wurden Membran und Filterpapiere für ca. 20' in Transfer-Puffer (10 % Methanol) äquilibriert, was zur Aktivierung der Proteinbindestellen der Membran führte, und anschließend in die mit Transferpuffer befeuchtete Blotkammer eingelegt. Auf drei dicke Filterpapiere (550 g/m²) wurde ein dünnes (330 g/m²) gelegt, auf das anschließend die Membran und darauf wiederum das Tris-Glycin-Gel mit den aufgetrennten Proteinen gelegt und etwaige Luftblasen entfernt wurden. Das Gel wurde dann mit jeweils zwei dünnen und zwei dicken Filterpapiere bedeckt und die Kammer mit dem Deckel geschlossen. Durch ein Spannungsfeld senkrecht zum Gel mit 25 V und 125 mA erfolgte der Proteintransfer auf die Membran in ca. 50'. Der Erfolg des Transfers wurde durch den prestained Protein-Ladder (fermentas) angezeigt, der nach dem Transfer gut auf der Membran sichtbar war.

3.4.3.2 Proteintransfer mittels tankblot-Verfahren

Für das Tübingen-Projekt wurde der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran mittels tankblot-Verfahren mit dem zum XCell Surelock®-System gehörenden Blotmodul (Invitrogen) durchgeführt. Für zwei Gele wurden dafür sechs Schwammpads, 4 Filterpapiere und zwei Nitrocellulosemembranen für ca. 20' in Transferpuffer (20 % Methanol) äquilibriert. Anschließend wurden Gele, Filterpapiere und Schwammpads in richtiger Reihenfolge aufeinander gestapelt. Auf zwei Schwammpads wurde ein Filterpapier gelegt und eventuelle Luftblasen herausgedrückt. Nun wurde das erste Gel auf dem Filterpapier platziert, auf das erst eine Nitrocellulosemembran und dann ein weiteres Filterpapier gelegt wurden. Erneutes Entfernen der Luftblasen war für einen erfolgreichen Blot unerlässlich. Nach einem weiteren Schwammpad wurde mit dem zweiten Gel genauso verfahren und auf das erste gelegt. Das so zusammengefügte Blot-Paket wurde nun auf die Kathode des Blotmoduls gelegt, wobei das oberste Schwammpad ca. einen halben cm über den Rand hinausragen sollte, wodurch beim Verschließen der Kammer mit der Anode ein ausreichend starker Kontakt zwischen den Membranen und den Gelen gewährleistet werden konnte. Das Blot Modul wurde in die Surelock®-Kammer eingespannt. Die innere Kammer

wurde nun mit gekühltem Transferpuffer, die äußere Kammer mit Aqua dest. befüllt und für 1 h bei 30 V an eine Stromquelle angeschlossen. Nach dem Blot wurde der Erfolg mit Hilfe der Ponceau S-Färbung überprüft.

3.4.3.3 Ponceau S Färbung

Um den Erfolg des Western Blots zu überprüfen und die Membran gegebenenfalls zu schneiden, wurden die transferierten Proteine mit Ponceau S angefärbt. Nach dem Blotten wurde die Membran kurz mit Aqua dest. gewaschen und 5' lang in Ponceau S Lösung geschwenkt. Der Überstand wurde dekantiert und die Membran nochmals mit Aqua dest. gespült, bis der Hintergrund der Membran wieder weiß und die Proteinbanden rot gefärbt sichtbar wurden. Nun wurde die Membran geschnitten und im Anschluss mit Natriumhydroxid (0,1N) 2' entfärbt. Nach erneutem Waschen mit H₂O erfolgte das Blocken der unspezifischen Bindungen mit anschließender Immunfärbung.

3.4.3.4 Blocken unspezifischer Bindestellen

Um die unspezifischen Bindungen auf der Membran zu blocken und damit unspezifische Banden zu verhindern und den Hintergrund zu reduzieren, wurde die Nitrocellulosemembran für eine Stunde bei RT in 5 % iger Milchlösung (5 % [v/v] Milchpulver, 0,05 % [v/v] Tween-20 in PBS) geschwenkt. Anschließend erfolgte die Immunfärbung.

3.4.3.5 Immunfärbung

Bei der Immunfärbung wurde die zuvor geblottete Membran mit einem Primärantikörper inkubiert, der die sich darauf befindlichen Proteine erkennt und bindet. Diese wurden wiederum mit einem Sekundärantikörper detektiert, der gegen die Spezies des Erstantikörpers gerichtet und mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert ist. Die so gebundenen Antikörper und damit die Größe des Proteins wurden durch die Entwicklung des Blots mittels Luminol sichtbar gemacht, da Luminol mit HRP des Sekundärantikörpers unter

Emission blauen Lichts reagiert. Dieses wurde über empfindliche Kameras erfasst und digital gespeichert.

Je nach Projekt wurden unterschiedliche Bedingungen und Inkubationsmethoden angewandt, die im Folgenden erläutert werden.

Autoantikörper-Nachweis in Studiengruppe 1

Bei der Untersuchung der Patienten und Kontrollen auf Autoantikörper gegen SN-Gewebehomogenat wurde deren Plasmen bzw. Seren als Erstantikörper benutzt. Diese wurden zunächst mittels Melon™ Gel IgG Spin Purification Kit (Thermo Scientific) aufgereinigt, bevor sie mit einer Verdünnung von 1:25, bzw. 1:50 mit PBS-Tween (0,05 %) + 5 % Milch über Nacht bei 4°C geschwenkt wurden. Da die Immunblots nur bei relativ geringen Volumina von 2 bis 3 ml durchgeführt werden konnten, wurden die Membranen zusammen mit den Plasma-Verdünnungen in Polypropylen-Folie eingeschweißt. In dieser Zeit konnten evtl. im Plasma enthaltene Autoantikörper an den verschiedenen Homogenaten binden, die ihrerseits wiederum nach einem weiteren Waschschrift mit einem HRP-konjugierten Zweitantikörper (goat-anti-human-IgG (H&L) (HRP), 1:50 000) sichtbar gemacht wurden. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei RT auf dem Schwenker folgten drei je 10 minütige Waschschriffe mit PBS-Tween, bevor die Membran mittels ECL-System von Advansta entwickelt und die dabei entstehende Chemilumineszenz mit einer sensitiven CCD-Kamera im 10-Sekundenintervall DarkBox (Fujifilm) detektiert und gespeichert wurde.

Autoantikörper-Nachweis in Studiengruppe 2

Die HIV-Patienten wurden auf Autoantikörper gegen Striatum-Homogenat mit Tetanustoxoid als Positivkontrolle untersucht. Die Plasmen wurden mittels Melon Gel IgG Isolation Kit aufgereinigt. Die Inkubation der Membran erfolgte mit 3 ml Patientenplasma-Verdünnung (1:50) im BSL3-Labor über Nacht bei RT unter Schwenken. Nach einmaligem Waschschrift mit PBS-Tween wurden die Membranen in 3 ml Formaldehyd (4 %) für 20' inaktiviert. Die Färbung mit dem Sekundärantikörper (goat-anti-human-IgG (H&L) (HRP), 1:50 000) erfolgte im S2-Labor für eine Stunde bei RT.

Autoantikörper-Nachweis im Vorversuch

Plasmen von Patienten der VITA-Studie wurden mit dem Melon Gel IgG Isolation Kit aufgereinigt und in 1:50 Verdünnungen mit der Membran inkubiert. Diese erfolgte über Nacht bei 4°C unter Schwenken. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper bei RT unter Schwenken (Tab. 8).

Tabelle 8: Autoantikörper und Verdünnungen für die Optimierung der tankblot-Methode

Primärantikörper	Verdünnung	Inkubationsbedingungen
humanes Plasma	1:50 (3 ml)	ü.N. 4°C
Mouse-anti-Ovalbumin	1:50 000	ü.N. 4°C
Sekundärantikörper		
goat-anti-human-IgG (H&L) (HRP)	1:50 000	RT, 1 Stunde
goat-anti-human-IgG (L) (HRP)	1:30 000	RT, 1 Stunde
goat-anti-Mouse (HRP)	1:30 000	RT, 1 Stunde

Autoantikörper-Nachweis im Tübingen-Projekt

Die Membranen, auf die Proteine der verschiedenen Gehirngewebe geblottet wurden, wurden in einer Polypropylenfolie mit Plasmen von Parkinson-Patienten und Kontrollen in einer 1:50 Verdünnung (2,5 % Milch in 0,05 % Tween, PBS) bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschschrift mit PBS-Tween erfolgte die Sekundärantikörperfärbung (goat-anti-human-IgG (L) (HRP), 1:30 000) bei RT für eine Stunde unter schwenken.

3.4.3.6 Quantifizierung des Signals

Anzahl der Banden

Bei allen Projekten wurde die Anzahl der Banden ermittelt. Dies geschah für die Studiengruppe 1 und 2 doppelblind durch Auszählen durch einen Mitarbeiter des Labors. Im Vorversuch wurde die Auswertung mit dem Programm ImageJ durchgeführt, das die Anzahl der Banden

angab. Beim Tübingen-Projekt wurden die Blots im Odyssey-Imager entwickelt und anschließend mit der Western Blot-Funktion des zugehörigen Programms analysiert, das sowohl die Anzahl der Banden, also auch deren Intensität angab.

Signalintensität

Die Intensität der Banden wurde beim Vorversuch, sowie dem Tübingen-Projekt bestimmt. Beim Tübingen-Projekt erfolgte die Bestimmung der Intensität mit der zum Li-Cor Imager gehörigen Software.

Beim Vorversuch wurde die Erhebung der Daten mit dem Programm ImageJ durchgeführt, mit dessen Hilfe die relative Signalintensität gemessen wurde. Dabei wurde um die jeweilige Laufspur ein Rechteck gezogen und geplottet, wobei ein Diagramm entstand, in dem jede Bande der Spur als Peak eingezeichnet war. Manuell wurde der Peak mit einer manuell gezogenen Linie an der jeweiligen Basis abgeschlossen, wobei der lokale Hintergrund mitberücksichtigt wurde. Die Netto-Intensität der jeweiligen Bande konnte mit Hilfe des Zauberstab-tools angezeigt werden. Für die Definition einer Bande wurden zwei hinreichende Kriterien eingeführt:

1. Die Bandenbreite

Dabei wurden die Banden in je zwei vertikale Hälften geteilt und mit ImageJ ausgewertet. Die Bande wurde nur dann gezählt, wenn das Peakmuster der beiden Teile einer Bande übereinstimmte.

2. Peakhöhe

Die Bande wurde nur dann gezählt, falls der Peak eine gewisse Höhe gegenüber dem Hintergrund erreichte.

Falls beide Kriterien erfüllt waren, wurde von einer Laufspur die Summe der Intensitäten aller Banden ermittelt und auf das Ovalbumin-Signal normalisiert, indem der Quotient aus beiden gebildet wurde. Somit erhielt man für jeden Patienten und jedes Antigen einen Wert, der die relative Signalintensität angab und einen Vergleich der Menge an Autoantikörper erlaubte.

3.4.4 2D-Gelelektrophorese und nanoHPLC-ESI-MS/MS

Die Identifikation der im Western Blot immunologisch erkannten Proteine wurde von der Firma Proteome Factory AG (Berlin, Germany) durchgeführt. Dazu wurde eine 2D-Gelelektrophorese durchgeführt und die entsprechenden Proteine mittels Trypsin im Gel verdaut. Die Analyse der Aminosäuresequenz erfolgte durch nanoHPLC-ESI-MS/MS (Agilent, Waldbronn, Germany). Diese wurde anschließend mit der RefSeq Proteindatenbank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA) abgeglichen und evtl. Proteinkandidaten erhielten entsprechend ihrer prozentualen Übereinstimmung einen Score. Nur Proteine mit einem Score > 20 wurden akzeptiert.

3.4.5 Nachweis der Proteine im Gel mittels Coomassi

Das Gel wurde nach dem SDS-PAGE für 1-2 Stunden in 0,1 % iger Coomassi-Lösung geschwenkt. Dabei färbten sich die Protein-Banden im Gel blau. Nach dem Waschen mit VE-Wasser konnte es eingescannt oder ein Foto gemacht werden. Die Entfärbung erfolgte ün im Destain-Puffer, diese war allerdings oftmals nur unvollständig möglich.

3.4.6 Quantitative Immunoassays

Um lösliche Faktoren im Plasma nachzuweisen wurden verschiedenen ELISAs (enzyme-linked immunosorbend assay) durchgeführt. Dabei wurden die Patientenplasmen auf eine mit spezifischen Antikörpern gecoatete Platte aufgetragen und mit Hilfe von Sekundärantikörpern nachgewiesen. Der Nachweis erfolgt dabei über einen Farbumschlag und die photometrische Messung mit einem ELISA-Reader bei einer bestimmten Wellenlänge. Über eine Standardreihe bekannter Konzentration wurden die Mengen des jeweiligen nachgewiesenen löslichen Faktors extrapoliert. In dieser Arbeit wurden folgende ELISAs verwendet.

3.4.6.1 IgG-ELISA

Die IgG-Konzentration der untersuchten Plasmaproben wurde in der Studiengruppe 1 mit dem human IgG-ELISA-Kit von abcam und im Tübingen-Projekt mit dem Kit von eBioscience nach Anleitung bestimmt.

3.4.6.2 ANA ELISA

Die Plasmaproben der Studiengruppe 1 wurden für den ANA-ELISA von Calbiotech wie beschrieben 1:21 verdünnt und der ELISA nach Anleitung durchgeführt

3.4.7 ELISpot Assay

Um die zelluläre Immunantwort gegen bestimmte Antigene bestimmen zu können, wurde ein Enzyme linked immuno spot (ELISpot) assay durchgeführt. Diese Methode beruht auf dem Nachweis von Interferon- γ , das von aktivierten T-Zellen sezerniert wird. In unserer Versuchsanordnung wurden PBMCs von südafrikanischen HIV-Patienten und Kontrollen mit PMA/Ionomycin stimuliert und mit Striatum-Homogenat inkubiert, wodurch die T-Zellen, die gegen Striatumproteine gerichtet sind, aktiviert wurden und INF- γ ausschütteten. So kann die zelluläre Autoimmunantwort gemessen werden.

An Tag 1 wurden die PBMCs aufgetaut, einmal mit RPMI (10 % FCS) gewaschen und in AIM-V aufgenommen, das GM-CSF (10^3 U/ML) und IL-4 (500 U/ML) enthielt. Pro Vertiefung der Platte wurden 1×10^6 Zellen in 100 μ l AIM-V (GM-CSF (1×10^3 U/ml) IL-4 (500 U/ml)) aufgenommen. Die zu untersuchenden Antigene wurden ebenfalls zugegeben, 1 μ l Striatumhomogenat, 2 μ l TTX (10 μ g/ml, 1 μ g/well; stock: 0,5 μ g/ μ l) und über Nacht bei 37°C inkubiert.

An Tag 2 wurden der Positivkontrolle PMA/Ionomycin (500x) und den restlichen Ansätzen zusätzlich LPS (0,1 ng/ μ l) als Stimulator zugefügt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Platte wurde mit 100 μ l dem sich im Kit befindlichen Capture-Antikörper nach Anleitung gecoatet, mit einer Folie versiegelt und ebenfalls über Nacht bei 4°C inkubiert.

An Tag 3 wurde der Capture-Antikörper abgesaugt, die Platte zweimal mit dem Coating Puffer gewaschen und anschließend mit RPMI (10 % FCS) für eine Stunde bei RT geblockt. Die Blocking-Lösung wurde im Anschluss abgesaugt und die zuvor mit AIM-V gewaschenen und in je 100 µl neu aufgenommenen PBMCs in die Platte überführt. Nun wurden die Zellen eine weitere Nacht bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit begannen evtl. vorhandene spezifische autoreaktive T-Zellen mit der Sekretion von INF- γ , das sogleich an den Capture-Antikörper band und am nachfolgenden Tag analysiert wurde.

An Tag 4 wurden die Zellen abgesaugt, die Platte drei Mal mit je 200 µl PBS-Tween gewaschen und mit dem Detektions-Antikörper laut Anleitung für zwei Stunden bei RT inkubiert. Nach viermaligem Waschen wie oben beschrieben wurde das Enzym Avidin-HRP laut Anleitung zubereitet und für 45' bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween und weiteren zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Immun-Spots mit einer frisch angesetzten AEC-H₂O₂-Lösung (1:2000) für 45' bei RT entwickelt. Nach dreimaligem Waschen mit je 200 µl H₂O wurde die Platte getrocknet und die Spots entweder unter einem Binokular oder mit Hilfe des ELISpot-Readers ausgewertet.

3.5. Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Isolierung von RNA aus Patienten-Plasma

Zur Untersuchung von HERV-Partikeln im Plasma von Tübinger Parkinson-Patienten wurde RNA aus dem Blutplasma isoliert. Dazu wurde das MinElute Virus Spin Kit (Qiagen) verwendet. Anders als in der Anleitung angegeben wurden zur Isolierung 100 µl Plasma eingesetzt und in 25 µl AVE-Puffer eluiert. Bis zur Messung des RNA-Gehalts wurde das Eluat bei -80°C eingefroren.

3.5.2 Isolierung von DNA aus Patienten-Plasma

Für die Gewinnung des Standards, der zur Messung der HERV-DNA- und RNA-Konzentration herangezogen wurde, wurde die DNA aus A3.01-Zellen mit Hilfe des DNeasy Blood & Tissue

Kits (Qiagen) isoliert. Die Isolation erfolgte nach Anleitung; im Anschluss wurde eine PCR durchgeführt und im Agarose Gel analysiert.

3.5.3 PCR

3.5.3.1 PCR zur Generierung des Standards

Für die Generierung des HERV-K-Standards wurde eine Vervielfältigung der A3.01-DNA mit den folgenden Primern (Contreras-Galindo et al., 2012) durchgeführt.

KgagRTF fwd: 5'-AGC AGG TCA GGT GCC TGT AAC ATT-3'

KgagRTR rev: 5'-TGG TGC CGT AGG ATT AAG TCT CCT-3'

PCR-Ansatz:

<u>PCR-Ansatz</u>		<u>PCR-Programm</u>		
25 µl	taq Mastermix (2x)	1	95°C	15 Min
0,2 µM	KgagRTF fwd	2 (30x)	95°C	15 s
0,2 µM	KgagRTR rev		58°C	30 s
2 µl	A3.01 gDNA		68°C	30 s
21 µl	H ₂ O	3	68°C	10 M
		4	4°C	∞

Der Erfolg der HERV-K-PCR wurde mit einem Agarose Gel (1,5 %, Gelred) überprüft und die DNA-Konzentration im nanodrop gemessen. Da der Standard sofort verwendet wurde, wurde er lediglich bei 4°C kurzfristig gelagert.

3.5.3.2 Real time PCR

Der Plasma-RNA-Gehalt von HERV-K in Parkinson-Patienten wurde mittels reverser real time PCR bestimmt.

Da das zur RNA-Isolierung angewendete Kit auch DNA mit isolierte, und das QuantiTect SYBR-Green-RT-PCR-Kit von Qiagen ebenfalls DNA mit quantifizierte, wurde eine zweite qPCR durchgeführt, die nur DNA vervielfältigte (QuantiNova SYBR-Green PCR Kit). Um das Netto-RNA-Signal zu erreichen, wurden die DNA-Werte von den RNA-Werten subtrahiert.

Für die Untersuchung der HERV-K-Expression wurde das gag-Element mit folgenden Primern (Contreras-Galindo et al., 2012) analysiert:

KgagRTF fwd: 5'-AGC AGG TCA GGT GCC TGT AAC ATT-3'

KgagRTR rev: 5'-TGG TGC CGT AGG ATT AAG TCT CCT-3'

Zusammensetzung der qPCR

PCR-Ansatz

Quantifast SybrGreen RT-PCR-Kit

6,25 µl	SYBR-Green Mastermix (2x)
0,125 µl	RT-Mix
0,2 µM	Primer KgagRTF fwd
0,2 µM	Primer KgagRTR rev
2,5 µl	RNA
ad 12 µl	H ₂ O (DEPC)

PCR-Programm

RT	50°C	10 Min
	95°C	5 Min
40 x	95°C	10 s
	60°C	30 s

PCR-Ansatz

QuantiNova SybrGreen PCR-Kit

6,25 µl	SYBR-Green Mastermix (2x)
0,125 µl	RT-Mix
0,2 µM	Primer KgagRTF fwd
0,2 µM	Primer KgagRTR rev
2,5 µl	RNA
ad 12 µl	H ₂ O (DEPC)

PCR-Programm

RT	95°C	2 Min
40 x	95°C	5 s
	60°C	10 s

3.6. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden mittels GraphPad Prism® ausgewertet, die angewandten Tests sind in Tab. 8 aufgelistet

Tabelle 8: Anwendung der statistischen Tests bei unterschiedlichen Stichproben mittels GraphPad Prism®

	Parametrisch	Nicht-parametrisch
Daten	Normalverteilt	Nicht-normalverteilt
Vgl. von 2 unabh. Stichproben	t-Test	Mann-Whitney- <i>U</i> -Test
Vgl. von 2 abh. Stichproben	Gepaarter t-Test	Wilcoxon-Test
Vgl. von > 2 unabh. Stichproben	Varianzanalyse mit Messwiederholungen	Friedman-Test
Vgl. von > 2 abh. Stichproben	Pearson-Korrelation	Spearman-Korrelation

IV Ergebnisse

Vorversuche zur immunologischen Charakterisierung von Patienten-Plasma

4.1. Untersuchung der zellulären Immunantwort mittels ELISpot

Für die immunologische Charakterisierung von Patienten-Blut besteht die Möglichkeit, die zelluläre Immunantwort zu messen. Dies geschieht über die Methode des ELISpot, bei dem das von aktivierten zytotoxischen T-Zellen sezernierte INF- γ gemessen wird. In der Studiengruppe 2 wurden 11 Kontrollen, 8 Therapie-naive HIV-Patienten, 15 unter HAART stehende HIV-Patienten und 4 Patienten, die unter HAART stehen und neurologisch auffällig sind, auf spezifische T-Zellen gegen humanes Striatum-Homogenat untersucht. Die ELISpot-Platten wurden mit einem Binokular ausgezählt. Dabei zeigten die Wells, die mit Striatum-Homogenat behandelt wurden, weniger Spots als die Negativkontrolle. Dies deutet auf einen toxischen Effekt des TEVP-Puffers hin, mit dem die Gehirnhomogenate hergestellt wurden. Aufgrund dessen wurde folgender Versuch durchgeführt, um den Effekt von TEVP auf PBMCs eines gesunden Spenders zu messen. Dieser ELISpot wurde mit dem ELISpot-Reader analysiert (Abb. 4).

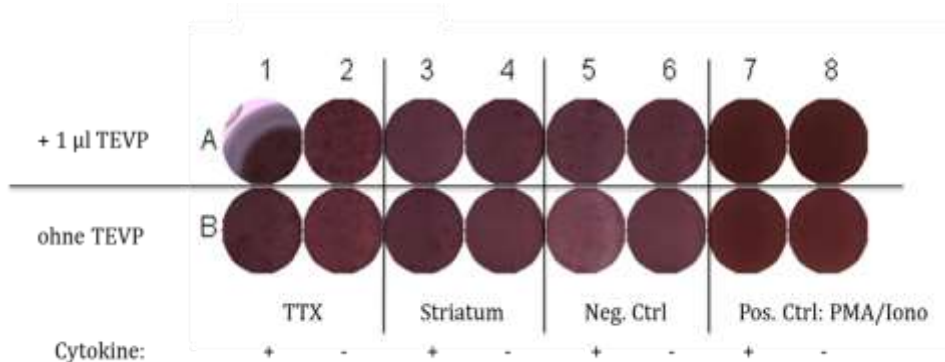


Abbildung 4: Toxischer Einfluss des Homogenisierungspuffers TEVP auf die Detektion von spezifischen T-Zellen in PBMCs.

Verglichen wurden die PBMC-Reaktionen im ELISpot bei Gabe von TTX (Tetanustoxoid), Striatumhomogenat, ohne Antigen-Behandlung (Negativkontrolle), sowie eine mit PMA/Ionomycin behandelte Positivkontrolle.

Die Spotanzahl wird in Tabelle 13 gezeigt:

Tabelle 13 Sportanzahl der einzelnen Ansätze

+ TEVP	Zytokine	Anzahl der Spots
TTX	+	n.a.
TTX	-	376
Striatum	+	40
Striatum	-	84
Neg. Ctrl	+	83
Neg. Ctrl	-	54
Pos. Ctrl	+	n.a.
Pos. Ctrl	-	n.a.
- TEVP		
TTX	+	219
TTX	-	134
Striatum	+	178
Striatum	-	23
Neg. Ctrl	+	23
Neg. Ctrl	-	1
Pos. Ctrl	+	n.a.
Pos. Ctrl	-	297

Es fällt auf, dass bei den Proben, die TEVP-Puffer enthalten, die Zytokinzugabe zu einer geringeren Anzahl an Spots führt als bei Weglassen der Zytokine. Bei den Ansätzen ohne TEVP-Puffer scheint sich dieser Effekt umzukehren. Es wurden mehr Spots bei Zytokin-haltigen Ansätzen gezählt als bei nicht Zytokin-behandelten.

Um einen möglichst aussagekräftigen ELISpot durchführen zu können, ist es vorteilhaft, frische PBMCs zu verwenden. Da für diesen Versuch jedoch nur eingefrorene PBMCs der HIV-Patienten zur Verfügung standen, sollte das hier erzielte Ergebnis in zukünftigen Untersuchungen mit frischem Material wiederholt werden, um zu sehen, ob eine Messung der Immunantwort auf Ebene von reaktiven T-Zellen durchführbar und aussagekräftig wäre.

4.2. Untersuchung der humoralen Auto-Immunantwort gegen Gehirngewebe

Die humorale Auto-Immunantwort gegen Gehirngewebe wurde durch die Bestimmung von Autoantikörpern gegen Antigene aus Gehirnhomogenaten festgestellt. Dazu wurde die Methode des Western Blot etabliert, wobei verschiedene Gehirngewebehomogenate als

Antigene auf ein SDS-Gel aufgetragen und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet wurden. Als Primärantikörper diente die Plasma-Verdünnung von Patienten und Kontrollen (1:50), wodurch die Anzahl und Intensität der sich darin befindlichen Autoantikörper mittels Immunfärbung detektiert werden konnten.

4.2.1 Etablierung des Western Blot-Verfahrens

4.2.1.1. Auswahl und Titration des Sekundärantikörpers

Beim Nachweis von Autoantikörpern in humanem Plasma mittels Western Blot wurde zunächst untersucht, ob es sich bei der Antikörperantwort um eine Primär- oder Sekundärantwort handelt. Dabei wurde bei der Sekundärfärbung der sich im Plasma befindlichen Autoantikörper ein anti-IgG mit einem Anti-IgM-Antikörper verglichen. Die Anti-IgM-Antwort verblieb negativ, wohingegen die anti-IgG-Antwort ein deutliches Bandenmuster ergab (Abb. 5) Damit steht fest, dass es sich bei der Autoimmunreaktion nicht um eine akut ablaufende Immunreaktion, sondern um eine länger bestehende Immunität handelt.

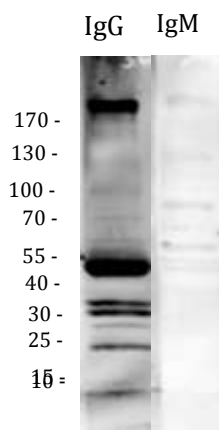


Abbildung 5: Bei der Autoantikörperreaktion handelt es sich um eine länger bestehende Immunität.

Western Blot Analyse: 15 µg SN-Homogenat, Plasmaverdünnung 1:50 (PD) 4°C ü.N., Sekundärantikörper je 1:500 anti-IgM und anti-IgG für 1 h bei RT.

Für die Titration des Sekundärantikörpers wurde zunächst eine Negativkontrolle durchgeführt, wobei verschiedene SN-Homogenate (10 bis 18) auf ein Gel aufgetragen wurden und die Blotting-Membranen ohne Plasma als Erstantikörper und lediglich mit dem anti-IgG-Sekundär-Antikörper gefärbt wurden. Bei einer Verdünnung von 1:500 des Sekundärantikörpers erschienen verschiedene Banden (Abb. 6 A), was durch eine unspezifische Bindung des Antikörpers an die Proteine auf der Membran bedingt sein könnte. Durch eine Verdünnungsreihe wurde festgestellt, dass ab einer Verdünnung des

Sekundärantikörpers von 1 zu 40 000 diese unspezifischen Banden verschwanden (Abb. 6 B), weshalb für alle nachfolgenden Versuche eine Antikörperverdünnung von 1 zu 50 000 benutzt wurde.

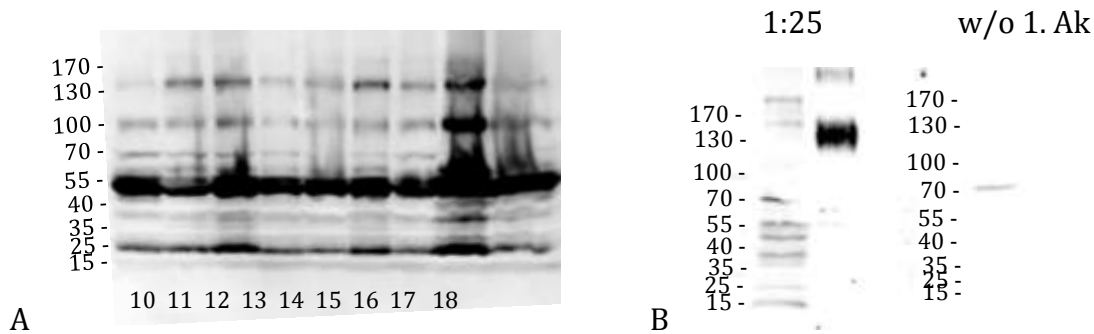


Abbildung 6: Titration des Sekundärantikörpers anti-IgG.

A Bei einer Sekundärantikörper-Verdünnung von 1:500 ergibt sich ein deutliches Bandenmuster auch ohne Primärantikörper. Als Antigen wurden 15 µg der SN-Homogenate von 10 unterschiedlichen Donoren aufgetragen und ohne Primärantikörper mit dem anti-human-IgG in einer 1:500 Verdünnung 1 h bei RT inkubiert. **B** Die Sekundärantikörperverdünnung von 1:40 000 liefert ein deutliches Bandenmuster (links) bei nahezu negativer Negativkontrolle (rechts). Inkubation von Patientenserum (1:25, 4°C), links, Sekundärantikörper 1 h bei RT.

4.2.1.2 Etablierung eines Standards

Um die Signalintensität der Autokörperantwort quantifizieren zu können, wurden GAPDH und Ovalbumin als möglicher Standard getestet (Abb. 7).

GAPDH

Bei GAPDH handelt es sich um ein Protein der Glykolyse, das ubiquitär exprimiert wird. Durch diese Eigenschaften eignet es sich gut als interner Standard, es besitzt jedoch ein Molekulargewicht von 38 kDa und liegt somit auf derselben Höhe, wie Autoantikörperbanden der Patienten (Abb. 4). Daher war GAPDH als Standard ungeeignet. Des Weiteren scheint das Spiken des Erstantikörpers, also das Hinzufügen des anti-GAPDH-Ak zum Patientenplasma, das Bandenmuster generell zu verstärken, was eine Verfälschung des Netto-Patienten-Signal bedeutete.

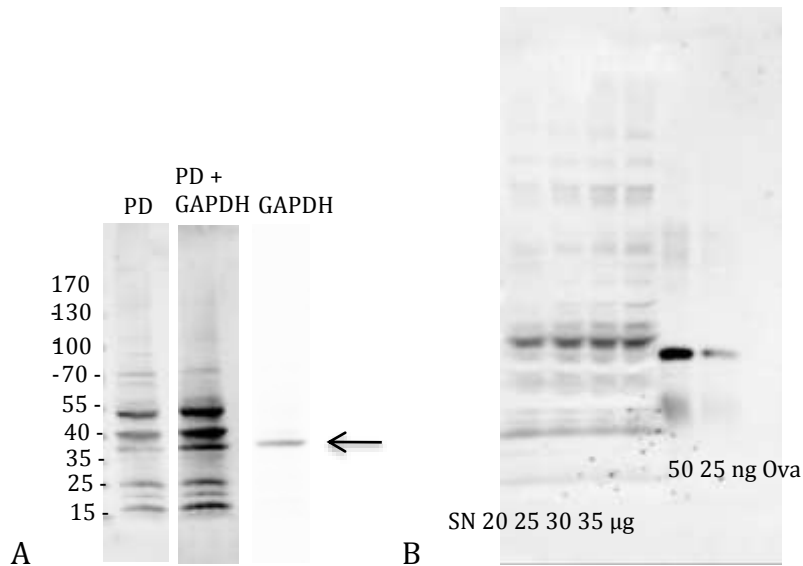


Abbildung 7: Test von GAPDH und Ovalbumin als Standard im Western Blot.

A Spikes des Patientenplasmas mit dem anti-GAPDH-Antikörper führt zu einer Verstärkung des Signals. 10 µg SN-Pool, PD 1:25 4°C üN., anti-GAPDH 1:10 000, anti-hu-IgG 1:50 000. **B** 25 ng Ovalbumin zeigt eine ähnliche Signalintensität wie die Autoantikörperantwort gegen SN. Vergleich von 50 und 25 ng Ovalbumin als Standard. Plasma 1:50, anti-IgG 1:50 000, anti-Ova 1:50 000, anti-mouse 1:30 000.

Ovalbumin

Als weiteren möglichen Standard wurde Ovalbumin als Antigen getestet. Der Vergleich von 50 und 25 ng Ovalbumin pro Bahn zeigt, dass das 50 ng Signal bereits nach kurzer Zeit gesättigt und somit nicht mehr zur Analyse geeignet war (Abb. 7 B). 25 ng Ovalbumin entsprachen in ihrer Signalstärke den Patienten-Signalen, weshalb es im Vorversuch als Standard getestet wurde.

4.2.1.3 Validierung des Semi-dry-Verfahrens für Western Blots

4.2.1.3.1 Studiengruppe 1

Würzburger Parkinson-Patienten (n=34), fünf gesunden Kontrollen und 36 Kontrollen aus der VITA-Studie wurden auf Autoantikörper gegen SN-Gewebe und Neuromelanin untersucht. Dieser Test wurde zunächst mit dem im Labor bereits etablierten semi-dry-Verfahren durchgeführt. Die Qualität des Verfahrens wird in Abb. 8 beispielhaft gezeigt, wobei auffällt, dass der Hintergrund, sowie die Qualität der Signale sehr unterschiedlich ausfallen.

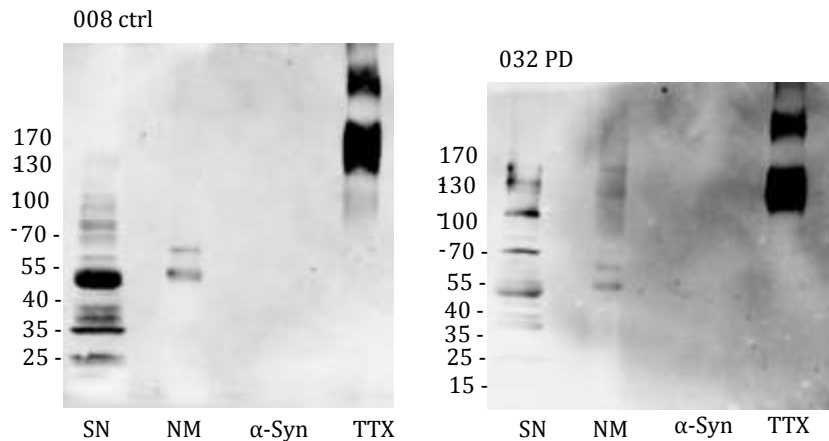


Abbildung 8: Semi-dry Western Blot Verfahren zeigt ein hohes Hintergrundsignal sowie unzureichende Bandenqualität.

Vergleich zweier Patienten der Studiengruppe 1. Aufgetragen wurde SN-Homogenat, NM, α -Synuklein und Tetanustoxoid (TTX) als Positivkontrolle. Patientenserum (1:25) ü.N. bei 4°C, anti-hu-IgG (1:50 000) 1h RT, Entwickelt wurde der Blot mit WesternBright Quantum von advansta, die Aufnahme des Signals erfolgte mit der Dark Box, LAS-3000.

Die Anzahl der Autoantikörperbanden wurde doppelblind ausgezählt und mittels GraphPad Prism® analysiert (Abb. 9). Parkinson-Patienten zeigen eine signifikant höhere Anzahl an Autoantikörpern gegen SN als Kontrollen ($p=0,0272$, Abb. 9 A). Dahingegen ist in der Autoimmunantwort der Patienten gegen NM kein signifikanter Unterschied festzustellen (Abb. 9 B).

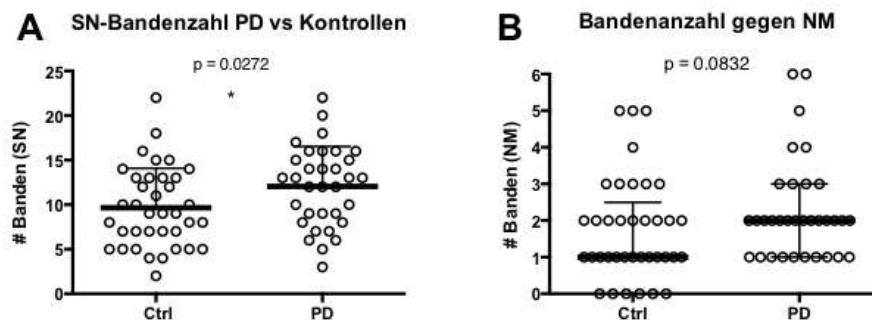


Abbildung 9: Anzahl der Autoantikörperbanden gegen SN und NM in PD-Patienten und Kontrollen gegen verschiedene Hirnareale im semi-dry-Western Blot Verfahren.

A Anzahl der Banden gegen SN im Plasma ist signifikant höher in Parkinson-Patienten ($n = 34$) als in Kontrollen ($n = 37$) ($p=0,027$, unpaired t-test), **B** Kein Unterschied zwischen Parkinson-Patienten und Kontrollen in der Anzahl der Banden gegen NM ($p = 0.0832$, Mann-Whitney-U). Aufgetragen wurden 10 μ g SN bzw. 3 μ l NM-Suspension, Plasma-Verdünnung 1:25 üN 4°C, anti-human-IgG 1:50 000 1 h RT.

Bestimmung der IgG-Konzentration der Studiengruppe 1

Um die Gesamtkonzentration an IgG im Plasma der Teilnehmer zu bestimmen, wurde der IgG-ELISA nach Anleitung durchgeführt und mittels GraphPad Prism® ausgewertet. Die statistische

Auswertung zeigt einen signifikant erhöhten Plasma-IgG-Wert in Parkinson-Patienten im Vergleich mit Kontrollen (Abb. 10 A). Allerdings korrelieren diese Werte weder bei den Patienten noch bei den Kontrollen mit der Anzahl der Autoantikörper-Banden (Abb. 10, B und C).

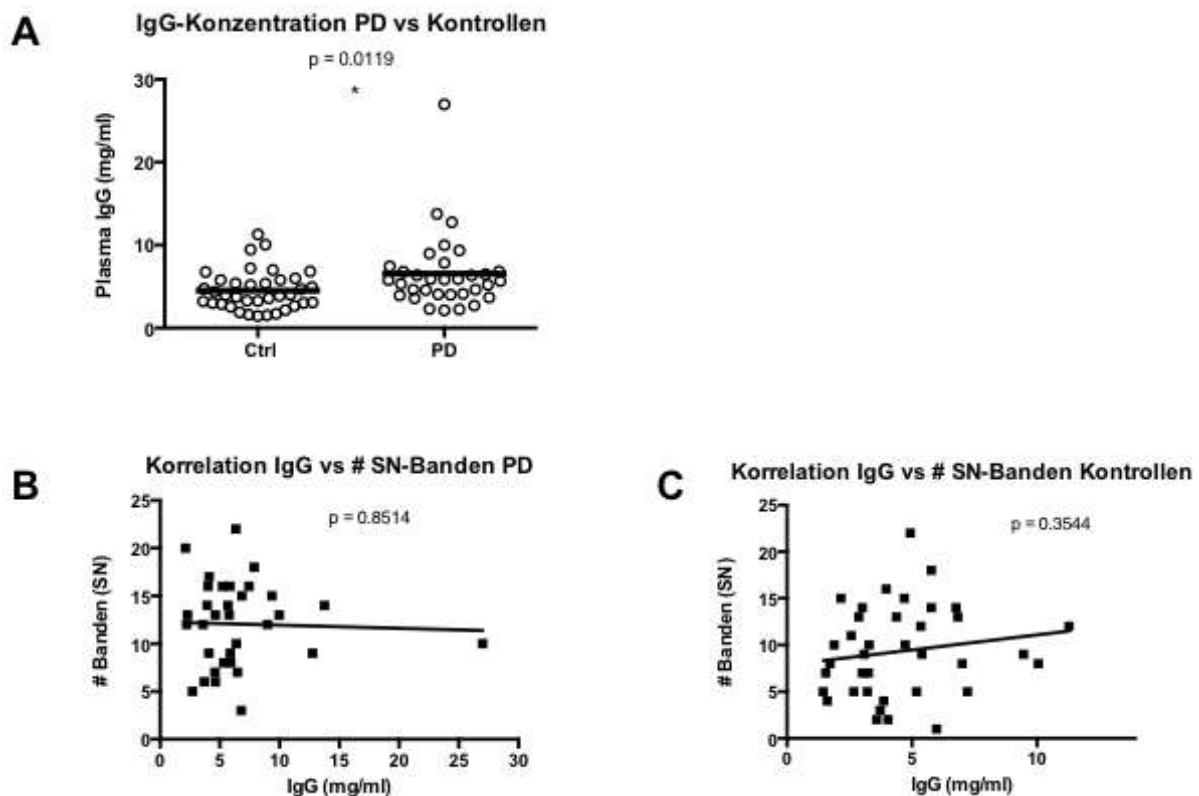


Abbildung 10: PD-Patienten zeigen eine signifikant höhere IgG-Konzentration (mg/ml) als Kontrollen

A Weder bei den PD-Patienten **B** noch bei den Kontrollen **C** korreliert die Anzahl der Autoantikörperbanden mit dem Plasma-IgG-Level. **A** PD (n = 34) vs Ctrl (n = 37) (p = 0,0119, Mann-Whitney U). **B, C** Lineare Regression des IgG vs Anzahl der Banden gegen SN (p = 0.35). Der Test wurde mit dem Kit von abcam durchgeführt.

ANA-ELISA

Der ANA-ELISA (antinuclear antibody, Calbiotech), bei dem Antikörper gegen Bestandteile des Zellkerns gerichtet sind, ergab keinen Unterschied zwischen Parkinson-Patienten und Kontrollen (Daten hier nicht gezeigt).

4.2.1.3.2 Anwendung des semi-dry-Verfahrens im BSL3-Labor

Um die Autoantikörperantwort von infizierten Proben zu messen, wurde das semi-dry-Verfahren des Western Blots auch für die Anwendung im BSL3-Labor getestet. Dabei wurde das Gel, sowie das Blottem im S2-Labor durchgeführt, die Membran geschnitten und im BSL3-Labor in einzelnen Wännchen mit Südafrikanischen HIV-Plasmaproben inkubiert. Da die Inkubation auf einem Schwenker stattfand, konnte dies nicht bei 4°C durchgeführt werden, sondern erfolgte bei RT. Des Weiteren wurden die Membranen nach der Inkubation mit 4 % Formalin fixiert, bevor die Inkubation mit dem Zweitantikörper wieder im S2-Labor stattfand. Das Ergebnis ist beispielhaft gezeigt (Abb. 11).

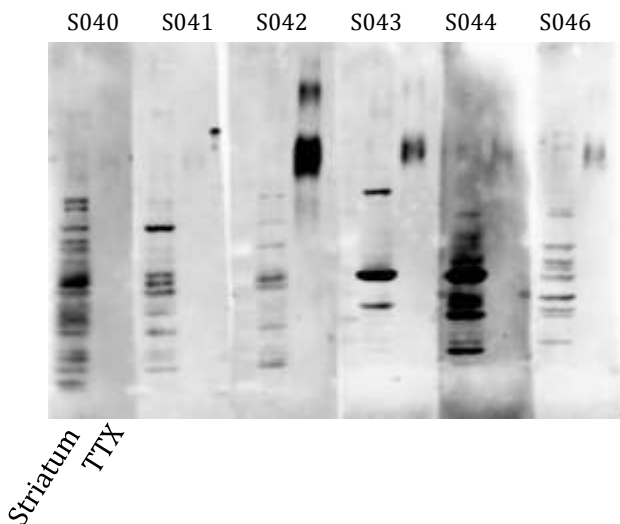


Abbildung 11: Vergleich des Autoantikörpersignals gegen Striatum von 6 verschiedenen südafrikanischen HIV-Patienten.

Es wurden 9 µg Striatum (jeweils links) und 0,5 µg TTX als Positivkontrolle (jeweils rechts) aufgetragen und 20 min bei 4 % FA fixiert. Den Primärantikörper stellte 1:50-verdünntes Plasma von HIV-Patienten dar, der Sekundärantikörper (anti-human-(H&L)-IgG, abcam) wurde 1:50 000 verdünnt und 1 h bei RT inkubiert.

Die Abbildungen der NM-Blots sowie der SA-Blots zeigten deutlich die sehr variable Hintergrundfärbung der Membranen. Auch durch mehrmaliges Waschen konnte der Hintergrund nicht reduziert werden. Vergleiche mit rekombinanten Systemen haben deutlich gezeigt, dass der starke Hintergrund von der Inkubation mit humanem Plasma abhängig ist. Das semi-dry-Verfahren scheint nicht geeignet, um das Blottem in kontinuierlich hoher Qualität zu ermöglichen, wodurch große Unterschiede in der Signalintensität auftreten. Um die Schwächen des semi-dry-Verfahrens genauer definieren zu können, wurden folgende Versuche unternommen.

4.2.1.4 Überprüfung des semi-dry-Verfahrens

Optimierung der Blottingzeit

Für die Spannung des semi-dry Western Blottings gilt die Faustformel

Spannung = Fläche der Membran x 0,8 V für eine Stunde

Bei einer Membran der Größe 8 x 6 cm ergibt sich somit eine Spannung von 38,4 V. Die bisherige große Variabilität in der Signalstärke deutete darauf hin, dass die sich im Gel befindenden Proteine nicht vollständig geblottet wurden, was auf eine zu kurze Blottingzeit rückschließen lässt. Abb. 12 zeigt einen Vergleich zwischen 55' und 3 Stunden mit anschließender Coomassi-Färbung der Gele.

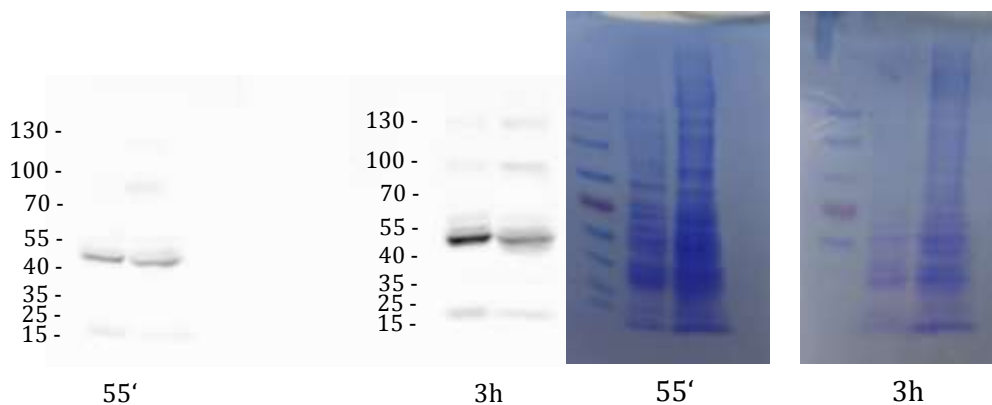


Abbildung 12: Unterschiedliche Blottingzeiten.

Nach knapp einer Stunde Blotten ist die Signalstärke im WB sehr gering (links), auch nach 3-stündigem Blotten verblieb Protein im Gel (rechts). 10 µl SN, Plasma 1:25, Sekundärantikörper 1:50 000.

Nach 55' zeigt die Membran ein relativ schwaches Signal im Vergleich zum 3-stündigen Blot, die Coomassifärbung des Gels zeigt, dass sich nach 55' noch sehr viel mehr Protein im Gel anfärben lässt als nach drei Stunden. Dies zeigt ganz deutlich, dass die einstündige Blottingzeit im semi-dry-Verfahren nicht ausreicht, um einen ausreichenden Proteintransfer zu gewährleisten.

Intra-assay-Fehler-Bestimmung

Da die bisherige Qualität der Blottingmethode Grund zu der Annahme gibt, dass der Proteintransfer nicht gleichmäßig über die gesamte Membran erfolgte und somit unterschiedliche Signalintensitäten ergab, wurde der intra-assay-Fehler bestimmt. Dazu wurden 2 Gele mit je 7 LC-Homogenaten und je einer Negativkontrolle angefertigt, geblottet und anschließend mit einer Patienten-Plasma-Verdünnung gefärbt. Der Blot zeigt ganz deutlich, dass die am Rand verlaufenden Proben ein deutlich helleres Signal liefern, als die mittig liegenden (Abb. 13). Auch unterscheidet sich die Signalintensität bei jedem Entwickeln, was zum einen der semi-dry-Methode, zum anderen dem Imager zur Entwicklung zuzuschreiben ist. Die Negativkontrollen sind trotz der zuvor titrierten Verdünnung des Zweitantikörpers von 1:50 000 positiv bei ca. 50 kDa. Dies deutet darauf hin, dass sich entweder Antikörper im Gewebehomogenat befunden haben, die hier mit dem anti-IgG-sekundären Antikörper sichtbar gemacht wurden, oder aber dass sich im Plasma der Parkinson-Patienten Autoantikörper befunden haben, die an Protein gebundene Autoantikörper spezifisch binden. Bei 50 kDa würde es sich hier um deren schwere Kette handeln. Um festzustellen, ob es sich in dem Blot sichtbaren Signal der Negativkontrolle nun um ein bereits vorhandenen Antikörper oder aber um einen im Plasma der Parkinson-Patienten vorkommender Antikörper handelt, wurde die Verwendung eines sekundären Antikörpers getestet, der nur die leichte Kette des humanem IgG erkennt.

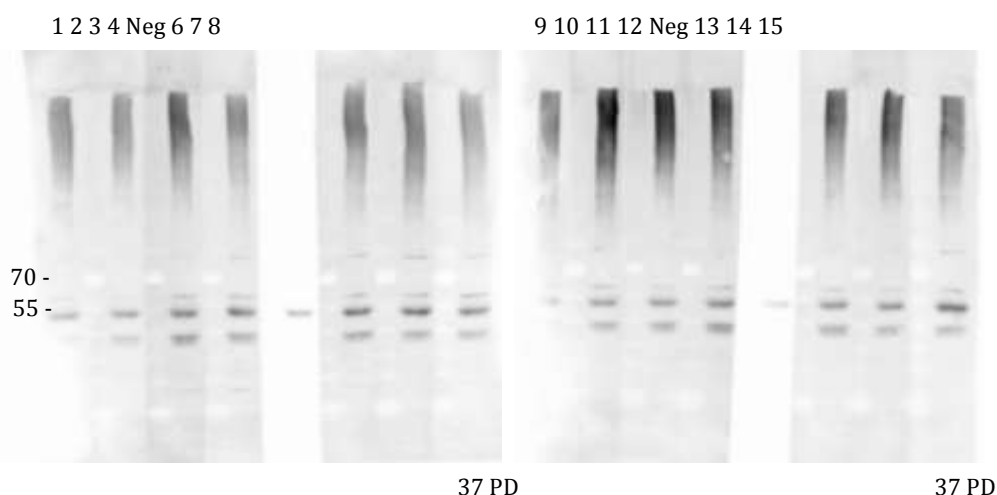


Abbildung 13: Es treten deutliche Schwankungen in der Signalstärke und der Hintergrundfärbung auf.

13 Wiederholungen desselben Versuchs (15 µg LC-Homogenat, PD-Plasma 1:40, Sekundärantikörper anti-IgG 1:50 000) und zwei Negativkontrollen, die ein deutliches Signal bei ca. 50 kDa zeigen.

Die Analyse des intra-assay-Fehlers wurde über die Bestimmung der Signalstärke der Summe der einzelnen Banden mittels ImageJ durchgeführt und mit der jeweils letzten Spur eines Gels normalisiert, um die Signale miteinander vergleichen zu können. Die Signalintensität der Positivkontrollen zeigt eine sehr große Streuung um den Mittelwert (Mittelwert = 0.89, Standardabweichung = 0.38) (Abb. 14).

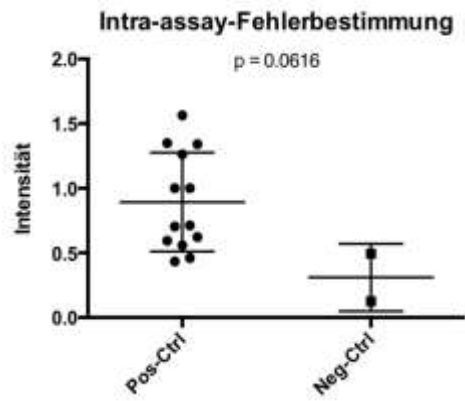


Abbildung 14: Die Signalintensität der Positivkontrollen zeigt eine große Streuung um den Mittelwert.

Die Signalintensitäten wurden mit ImageJ quantifiziert und mit der letzten Spur der Membran normalisiert. Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Positiv- und Negativkontrollen ($p = 0.0616$, unpaired t-test). Die Standardabweichung der Positivkontrollen beträgt 0.38 um einen Mittelwert von 0.89.

Überprüfung des Sekundärantikörpers, Vergleich H&L vs L anti-IgG

Da in der Negativkontrolle eine Bande erkannt wurde, die mit ca. 50 kDa die schwere Kette des humanen IgG-Antikörpers sein könnte, stellt sich die Frage, ob sich bereits im Homogenat Antikörper befunden haben. Diese würden bei dem Hitzeschritt von 92°C ihre Disulfidbrücken lösen, in ihre einzelnen Ketten zerfallen und der Größe nach im SDS-Gel aufgetrennt werden. Mittels Sekundärantikörper würden die Antikörper des Gewebedonors dann gefärbt. Denkbar wäre jedoch auch, dass sich in humanem Plasma Antikörper befinden, die andere Antikörper erkennen und binden. Der bisher verwendete Sekundärantikörper war gegen schwere und leichte Ketten des humanen IgG-Antikörpers gerichtet, wonach sich Signale bei 25 kDa (leichte Kette), 50 kDa (schwere Kette), 75 kDa (eine schwere und eine leichte Kette), 100 kDa (2 schwere Ketten) und 150 kDa (unverdauter kompletter Antikörper) ergeben würden. Diese Signale überlagern sich mit den Autoantikörper-Signalen aus den Plasmen der Patienten, die gegen echte Gehirnproteine gerichtet sind.

Um dieses Problem zu lösen, bzw. die Antikörper des Spender von denen des Patienten unterscheiden zu können, wurde ein Sekundärantikörper getestet, der nur gegen die leichte Kette des IgG-Antikörpers gerichtet ist (Abb. 15). Als Antigen wurde ein Kontrollplasma in unterschiedlichen Verdünnungen aufgetragen, auf einen Erstantikörper wurde verzichtet.

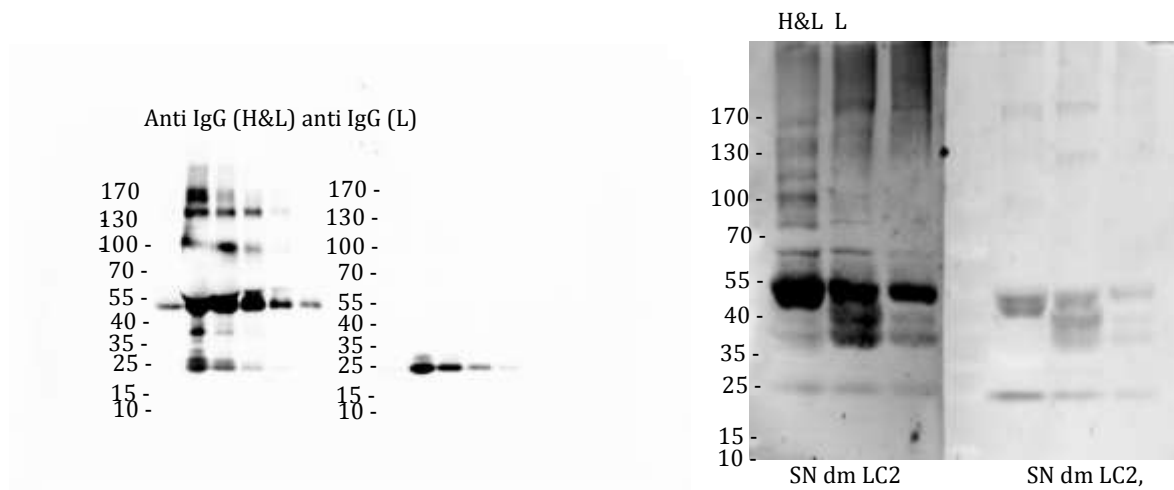


Abbildung 15: Der anti-leichte-Kette-IgG erkennt wie erwartet eine Bande bei 25 kDa, der bisher verwendete anti-schwere und leichte-Kette IgG erkennt alle beschriebenen Varianten der schweren und leichten Ketten des IgG.

Links 15 µg LC und Kontrollplasma-Verdünnung von 10^{-2} , 3×10^{-3} , 10^{-3} wurden als Antigen aufgetragen und mit den beiden Anti-IgG-Antikörpern gefärbt. Rechts Test der Sekundärantikörper mit 15 µg SN, dm und LC2, Primärantikörper PD-Plasma 1:50, Sekundärantikörper 1:50 000 H&L, L-IgG.

Bei der Verwendung des anti-leichte-Kette-IgGs zeigt sich in der Negativkontrolle nur eine Bande auf Höhe der leichten Kette (25 kDa). Der Vergleich der beiden Sekundärantikörper wurde nun in einem Blot mit Gewebehomogenaten als Antigene und humanem Plasma als Erstantikörper wiederholt, was zeigt, dass sich fast dasselbe Bandenmuster ergibt wie mit dem bisherigen Antikörper. Dies führt zur Vermutung, dass sich in humanem Plasma auch Antikörper befinden, die gegen andere Antikörper gerichtet sind.

Die Quantifizierung der Signalintensität der bisherigen Experimente wurde mittels ImageJ durchgeführt, was jedoch für diesen Zweck nur beschränkt machbar war. Sehr starke oder sehr schwache Signale führten zu einer Verzerrung der Intensitäten des gesamten Blots, wodurch wenig verlässliche Angaben entstanden. Gesättigte Signale konnten dabei nicht berücksichtigt werden, was zum einen auf ImageJ und zum anderen auf die hier verwendete DarkBox zur Entwicklung der Blots zurückzuführen war.

Bei den Inkubationen im BSL3-LABOR-Labor wurde festgestellt, dass das Schneiden der Membran mit einem Skalpell zu hohen Signalen am Rand führte und somit zu einem sehr starken Hintergrund beitrug. Eine Schere ist im Umgang mit Nitrocellulosemembranen zu empfehlen. Auch die Fixierung mit Formalin scheint den Hintergrund stark zu erhöhen.

Durch die schlechte Qualität des semi-dry-Verfahrens wurden in den folgenden Versuchen das tankblot System von invitrogen (Surelock®) getestet.

4.2.1.5 Test des tankblot-Verfahrens

Das zum Surelock®-System gehörende tankblot-Modul liefert schönere Signale mit deutlich weniger Hintergrund als das bisher verwendete semi-dry-Verfahren. Beispielhaft sind zwei Blots gezeigt (Abb. 16).

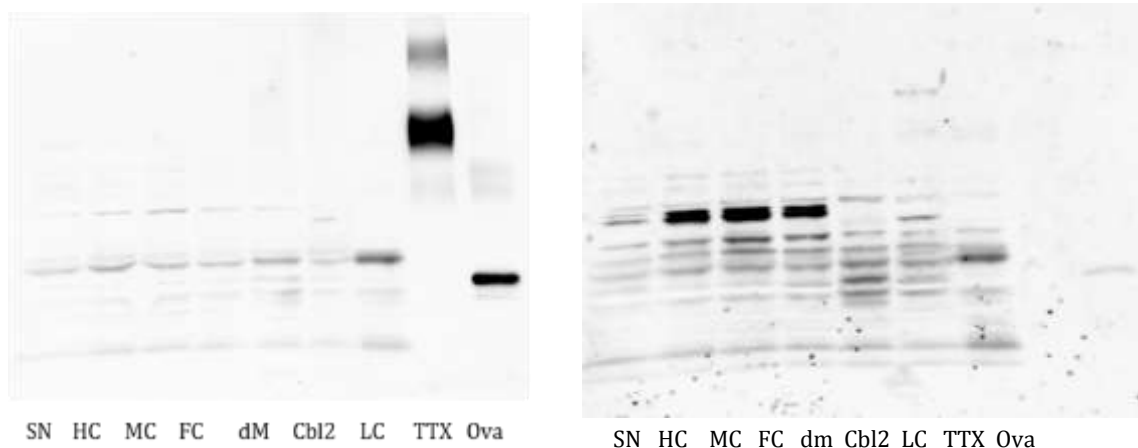


Abbildung 16: Das tankblot-Modul liefert verlässliche Signale mit deutlich verringertem Hintergrund.

Antigene jeweils 15 µg Gewebehomogenat, 0,5 µg TTX, 25 ng Ovalbumin, Erstantikörper Plasma-Verdünnung (1:50), Sekundäntikörper 1:30 000 anti-Leichte-Kette-IgG. Entwicklung mittels Dark Box LAS-3000.

Weiterhin stellt die Quantifizierung von gesättigten Signalen ein Problem für die Quantifizierung mittels ImageJ dar. Außerdem wurde Ovalbumin als Standard in einigen Blots untersucht, wobei die Signalintensität eine große Variabilität aufwies. Eine mögliche Ursache könnte die geringe Stabilität der Ovalbumin-Lösung sein, die sich weder für längere Aufbewahrung bei 4°C, noch für die Lagerung bei -20°C eignete.

4.2.1.6 Anwendung des Li-Cor-Imagers (Odyssey) zur Entwicklung

Das System des Li-Cor Imagers von Odyssey liefert zuverlässige Signale, die keine Sättigung zulässt. Des Weiteren erlaubt die zugehörige Software eine direkte Auswertung der Signalintensität sowie der Anzahl der Banden in einer Spur. Weiterhin wird auf jedem Gel eine Bahn mit humanem Plasma beladen, deren Signale von den anderen Gewebehomogenat-Spuren subtrahiert wird, um lediglich Antikörper gegen Gewebe-Proteine zu färben. Beispielhaft ist ein optimierter Blot in Abb. 17 gezeigt.

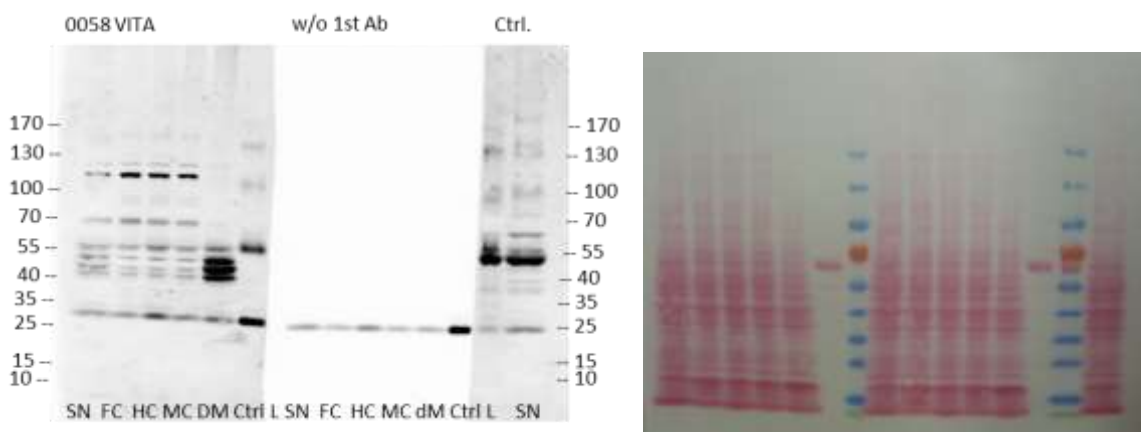


Abbildung 17: Der Li-Cor-Imager von Odyssey liefert verlässliche Signale

(links). Der Erfolg des Blottens wird anhand der Ponceau-Färbung festgestellt (rechts). Aufgetragen sind je 15 µg Gewebehomogenat (verschiedene Braak-Stadien) und Kontrollplasma, gefärbt wird die Membran mit Patientenplasma (1:50, links) und Kontrollplasma (1:50, rechts), Sekundärintikörper: anti-L-IgG (L Ladder).

4.3. Immunoblots zur Detektion von Autoantikörpern gegen Gehirnregionen in Plasmen von Parkinson-Patienten und Kontrollen

Die optimierte Immunoblot-Methode zum Nachweis und zur semiquantitativen Bestimmung von Autoantikörpern gegen verschiedene Hirnregionen bei Parkinson-Patienten und Kontrollen wurde nun auf die Geschlechts- und Alters-gematchte Kohorte von insgesamt 80 Tübinger Plasmen angewendet. Wie in Tab. 7 beschrieben wurden die Gradientengele mit verschiedenen Gewebehomogenaten beladen, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Bei einer positiven Ponceau-S-Färbung erfolgte die Immunfärbung des Blots mit einer Plasma-Verdünnung (1:50) als Primärintikörper. Die Plasma-Immunglobuline wurden mit einem HRP-konjugierten Zweitantikörper (anti-human-IgG leichte Kette, 1:30 000, abcam) detektiert und mit Hilfe des Li-Cor-Imagers von Odyssey

entwickelt. Abbildung 18 zeigt eine repräsentative Immunfärbung mit zugehöriger Ponceau-Färbung.

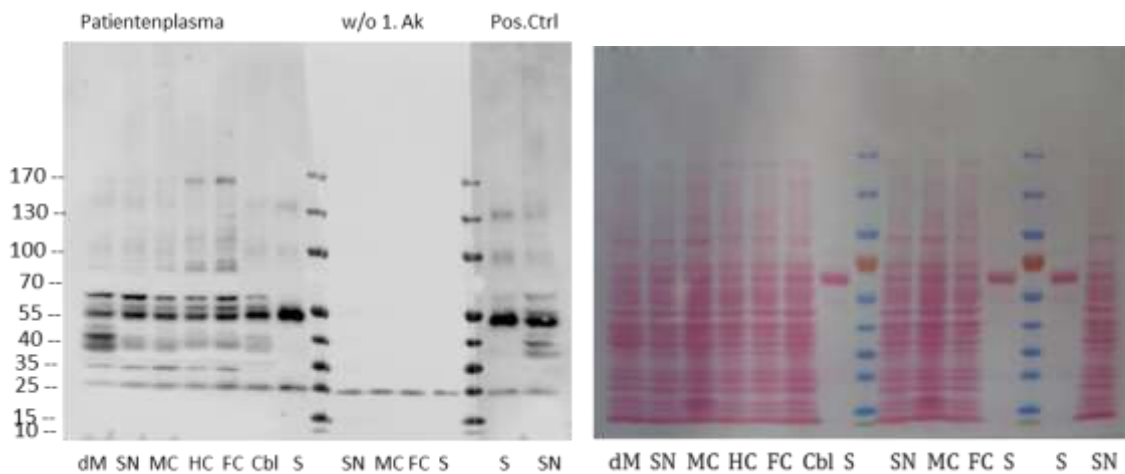


Abbildung 18: Anwendung der optimierten Methode zur Immunfärbung des Western Blots.

Western Blot der Gehirnhomogenate. Bei positiver Ponceau-Färbung (rechts) erfolgte die Immunfärbung mit Plasma (1:50) über Nacht bei 4°C, Färbung mit anti-IgG-leichte-Kette-Ak-HRP für eine Stunde bei RT, Entwicklung für 5' im Li-Cor-Imager (Odyssey) (links). Die linke Seite des Blots zeigt die Immunfärbung mit Patienten-Plasma, die Mitte zwischen den beiden Proteinstandards (PageRulerPlus prestained Protein-Ladder, fermentas) zeigt die Negativkontrolle; rechts ist die Positivkontrolle zu sehen. Bei jeder Färbung wurde eine Serumbande mitgeführt, um nicht-Gehirnspezifische Banden auszuschließen.

Mit Hilfe des Western-Tools der Li-Cor-Software wurde die Anzahl und Intensität der Banden bestimmt. Repräsentativ ist dies in Abb. 16 gezeigt. Für die Normalisierung des Signals wurde für jede Bande der Quotient aus dem Bandensignal und dem 55 kDa-Signal des Serums aus der Positivkontrolle gebildet (rot umrahmt).

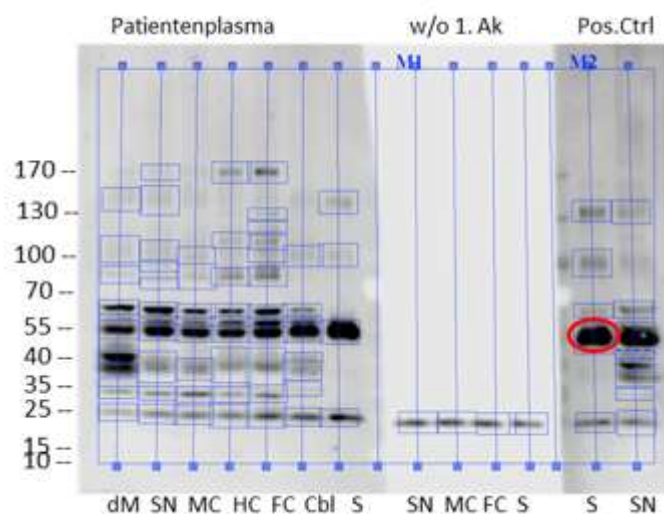


Abbildung 19: Auswertung der Anzahl und der Stärke der Banden pro Homogenat.

Die umrandete Bande wurde zur Normalisierung herangezogen. Die Li-Cor Software erkennt automatisch alle Banden mit immer demselben Sensitivitätsniveau und subtrahiert automatisch den Hintergrund. Das Netto-Signal wird in einer Tabelle ausgegeben und normalisiert.

Bei den Vorversuchen fielen ubiquitär vorkommende Banden auf, die in der Negativkontrolle (Färbung der Membran lediglich mit dem Zweitantikörper – anti-humaner-leichte-Kette-IgG) als Antikörper identifiziert werden konnten. Bei der Immunfärbung mit Plasma wurden exakt die gleichen Banden wieder gezeigt. Dies bietet zwei mögliche Gründe. Zum einen befinden sich in den Homogenaten Antikörper, die bei der Isolierung und Homogenisierung aus der Blutbahn stammen könnten, oder womöglich bereits vor der Isolierung am Gewebe gebunden hatten und durch den SDS-Schritt bei der Probenbereitung dissoziiert und sich nach leichten und schweren Ketten im Gel aufgetrennt haben könnten. Bei dieser Möglichkeit würde das Plasma der Patienten keine zusätzlichen Signale – also keine spezifische Reaktion zwischen Protein und Antikörper – beisteuern. Zum anderen wäre denkbar, dass die sich im Homogenat befindlichen Antikörper durch gegen ebendiese gerichteten Plasma-Antikörper der untersuchten Patienten erkannt werden und sie somit sehr wohl einen Beitrag zur Signalstärke durch das Patienten-Plasma leisten. In keinem Fall jedoch handelt es sich bei dieser Bindung um spezifische, gegen das Gehirn-Homogenat gerichtete Autoantikörperbindung und kann somit nicht als spezifisches Signal gewertet werden. Um diese Ig-Banden zu identifizieren wurde auf jeder Membran eine Serum-Probe als Antigen mitgeführt, die diejenigen Banden zeigte, die aus der Auswertung des Bandenmusters im Gehirnmateriale ausschieden (Abb. 19).

4.3.1 Zusammensetzung der untersuchten Plasma-Proben (Tübingen)

Für die Untersuchung von Autoantikörpern gegen die verschiedenen von Braak charakterisierten und für PD relevanten Gewebekomponenten wurden in Zusammenarbeit mit der Hertie-Gewebe-Bank in Tübingen in Kooperation mit Daniela Berg 39 Proben von Parkinson-Patienten und 38 Proben von altersgematchten Kontrollen untersucht (Tab. 9).

Tabelle 9: Charakterisierung der Tübinger Patienten.

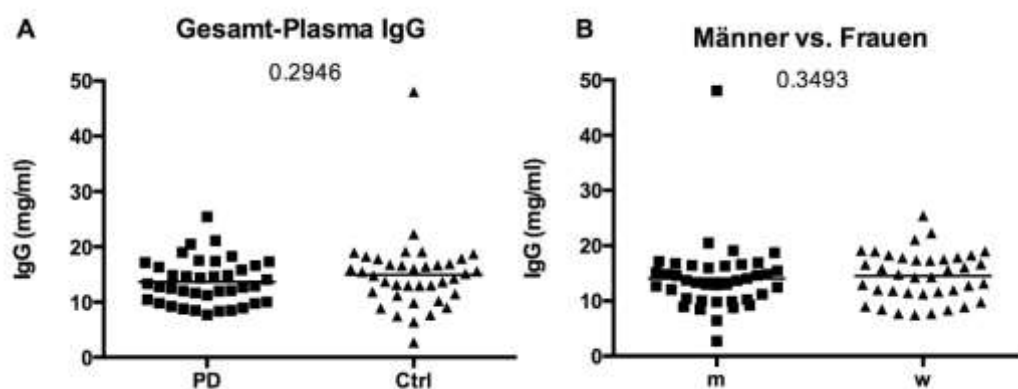
	Tübingen	
	Parkinson	Kontrollen
Anzahl n der Patienten	39	38
Geschlecht	m: 22, w: 18	m 18, w: 20

Alter [Jahre]	65,10 ± 5,41	62,5 ± 4,34
Gesamt - IgG [mg/ml] im Plasma	13,7 ± 4,1	14,9 ± 6,912

Gezeigt wurden die jeweiligen Mittelwerte mit Standardabweichung. Der Wertebereich wurde in Klammern angegeben.

4.3.2 Messung der IgG-Konzentration im Plasma

Da in dieser Arbeit Autoantikörper gegen bestimmte Hirnareale untersucht wurden, wurde vorab mittels ELISA die gesamt-IgG-Konzentration (mg/ml) in der untersuchten Kohorte gemessen, um etwaige generelle Unterschiede in der Menge an IgG-Antikörpern zwischen PD und Kontrollen oder männlichen und weiblichen Spendern festzustellen bzw. auszuschließen. Es wurden keinerlei Unterschiede in der IgG-Konzentration zwischen Parkinson-Patienten und gesunden Kontrollen, ($p = 0.2946$, Mann-Whitney- U -Test, Abb. 20 A), sowie zwischen männlichen und weiblichen Spendern festgestellt ($p = 0.3593$, Mann-Whitney- U -Test, Abb. 20 B). Auch im Vergleich zwischen Männern und Frauen jeweils innerhalb der Parkinson- und Kontrollgruppe wurden keine signifikanten Unterschiede detektiert (Abb. 20 C, D), ebenso zwischen PD und Kontrollen innerhalb der Gruppe der Männer (Abb. 20 E), wie auch innerhalb der Gruppe der Frauen (Abb. 20 F).



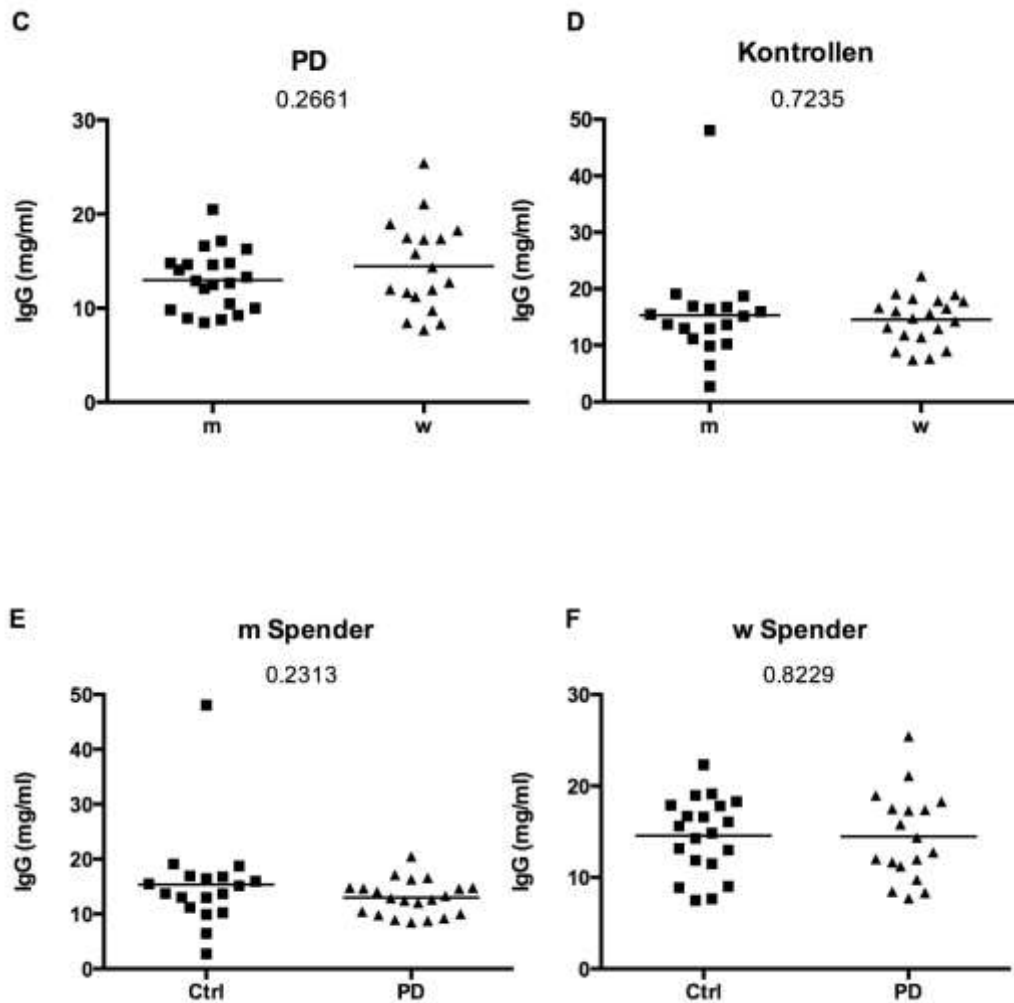


Abbildung 20: Untersuchte Spender zeigen keinen Unterschied im gesamt-IgG-Gehalt im Plasma zwischen PD-Patienten und gesunden Kontrollen.

IgG ELISA mit Plasmen der Tübinger PD- und Kontroll-Probanden nach Anleitung. **A** PD vs Kontrolle (Ctrl) ($p = 0.29$, Mann-Whitney-*U*-Test). **B** Männer (m) vs Frauen (w) ($p = 0.3493$, Mann-Whitney-*U*-Test). **C** Männer (m) vs. Frauen (w) innerhalb der PD-Gruppe ($p = 0.2661$, unpaired t-test). **D** Männer vs. Frauen innerhalb der Kontrollgruppe ($p = 0.7235$, Mann-Whitney-*U*-Test). **E** PD vs Kontrollen innerhalb der Gruppe der männlichen ($p = 0.23$, Mann-Whitney-*U*-Test, n (PD) = 22, n (Ctrl) = 20) und **F** weiblichen Spender ($p = 0.82$, unpaired-t-test, n (PD) = 17, n (Ctrl) = 19).

4.3.3 Messung der Auto-Immunreaktivität gegen verschiedene Gehirnnareale

Um die Autoantikörper-Antwort gegen die Hirnnareale festzustellen, die nach Braak unterschiedlich starke Rollen in der PD-Pathogenese spielen, wurden Western Blot-Analysen mit den oben beschriebenen Gehirnhomogenaten als Antigene und den Plasmen von PD-Patienten und gesunden Kontrollen als Erstantikörper durchgeführt. Die Banden der Autoantikörper wurden über die Software des Li-Cor Imager von Odyssey quantifiziert und mittels der mitgeführten Standard-Bande normalisiert. Alle untersuchten Patienten zeigten eine deutliche Autoreaktivität gegen alle untersuchten Gehirnnareale.

Der Vergleich der Signalintensität gegen die verschiedenen Gehirnareale ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Parkinson-Patienten und gesunden Kontrollen (Abb. 21).

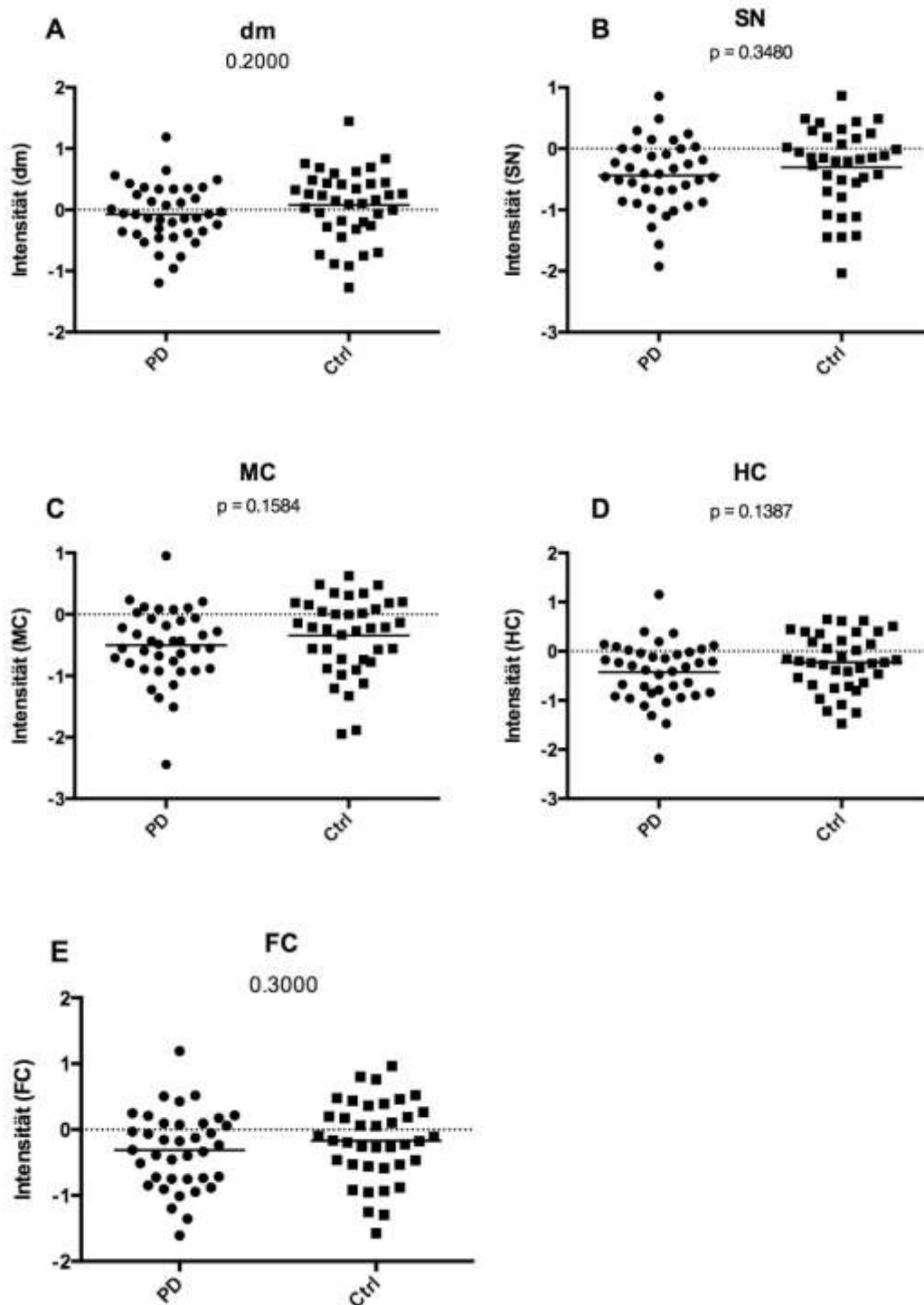


Abbildung 21: PD und Kontrollen zeigen gegen keines der untersuchten Gehirnareale eine unterschiedliche Immunreaktivität.

Western Blot Analyse mittels SDS-PAGE und Immunfärbung der Nitrocellulosemembran mit Patientenplasma (1:50). Gezeigt werden die Mittelwerte der gleichverteilten logarithmierten und normalisierten Intensitäten der relevanten Banden. PD (n = 39) und Ctrl (n = 38) zeigen keinen signifikanten Unterschied gegen die verschiedenen Hirnareale (unpaired t-test bzw. Mann-

Whitney-U bei nicht-normalverteilten Werten (MC). dm = dorsaler Motornucleus des Glossopharyngeal- und Vagusnervs, SN = Substantia nigra, MC = anteromedialer temporaler Mesocortex, HC = high order sensorische Assoziations- und präfrontale Felder, FC = first order sensorische Assoziations- und prämotorische Felder, und primär sensorische und motorische Felder.

Um die spezifische Autoimmunantwort gegen die verschiedenen Gehirnareale zu bestimmen, wurden die jeweiligen Signalintensitäten auf den Gesamt-IgG-Gehalt normalisiert. Auch hier wurden keine signifikant unterschiedlichen Autoimmunantworten gegen Gehirngewebe zwischen PD- und Kontroll-Spendern festgestellt (Abb. 22).

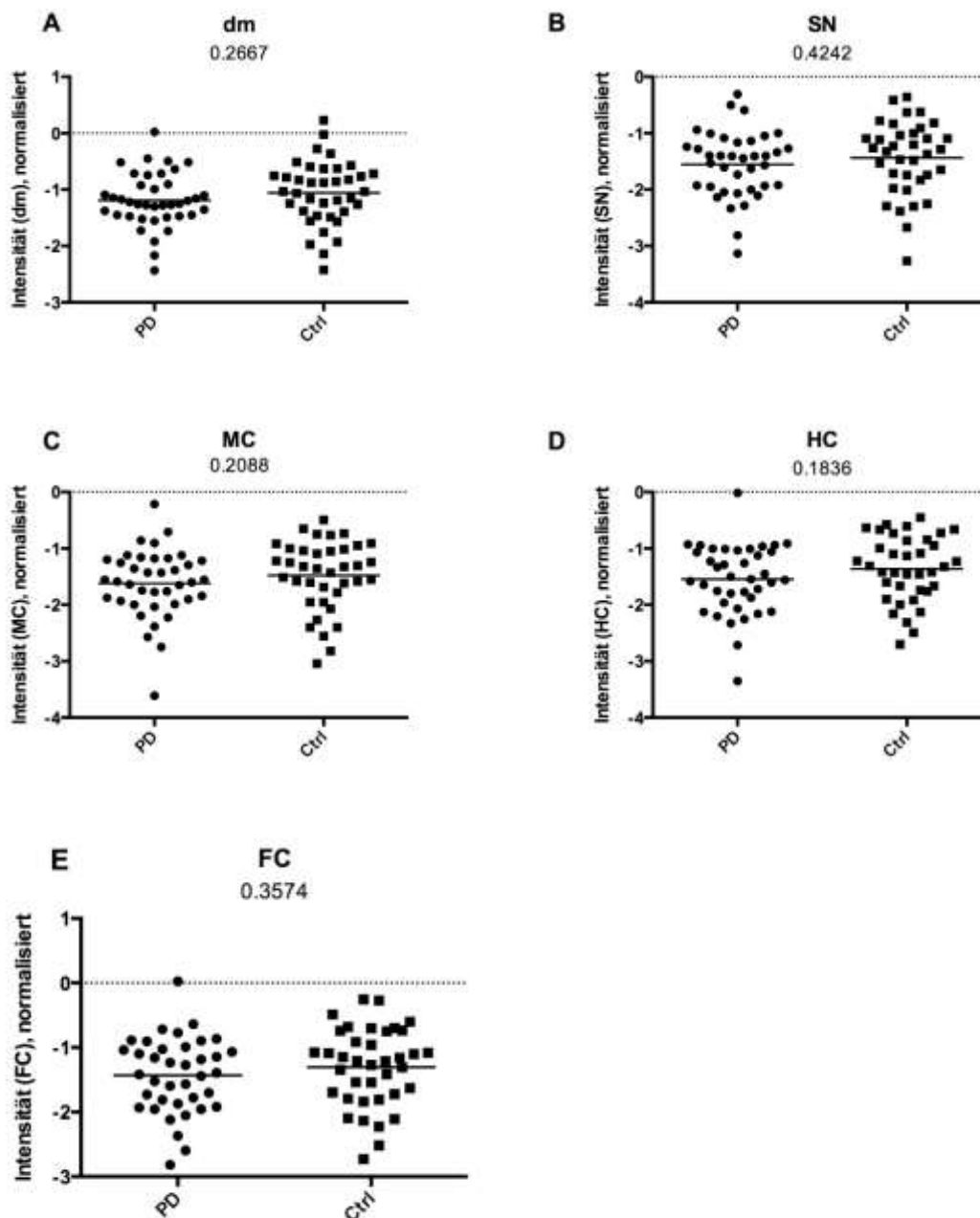
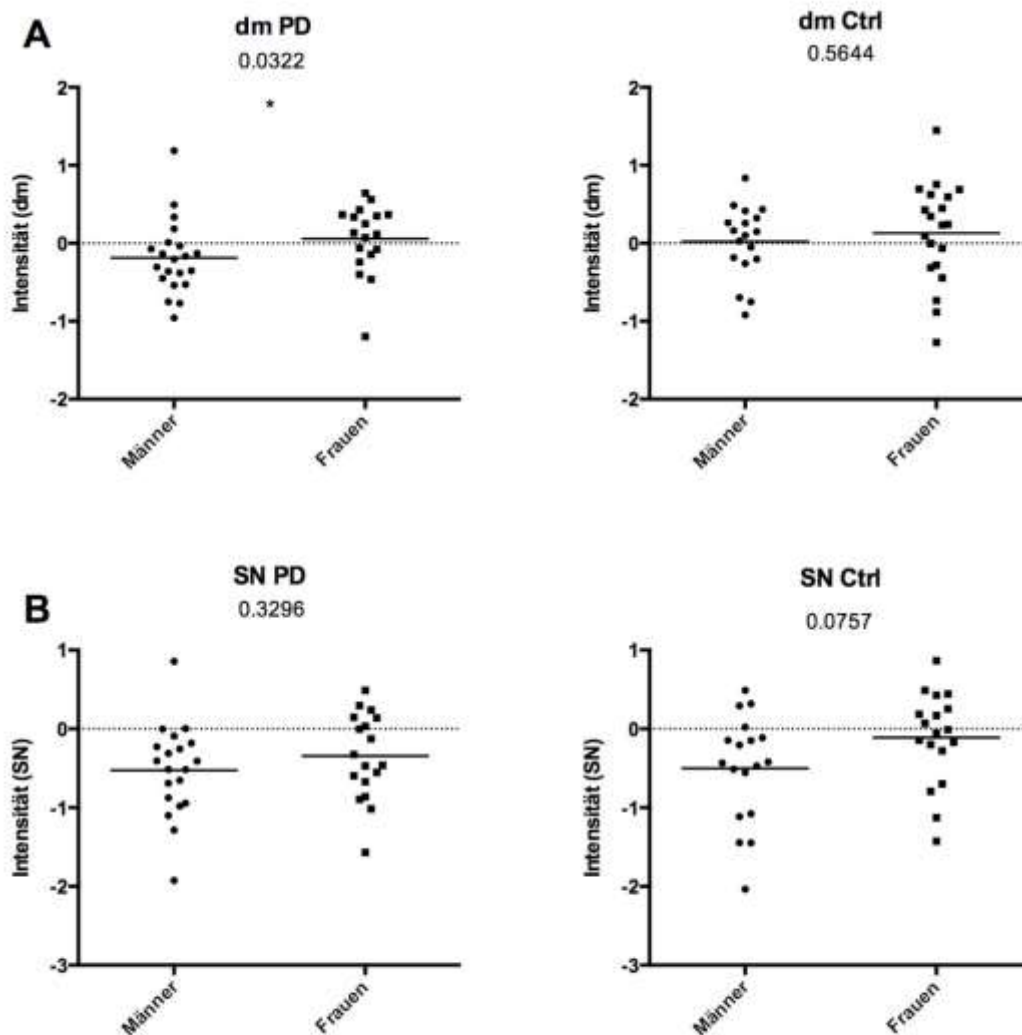


Abbildung 22: PD- und Kontrollplasmen zeigen keine signifikante spezifische Immunreaktivität gegen eines der Hirnareale.

Western Blot Analyse mittels SDS-PAGE und Immunfärbung der Nitrocellulosemembran mit Patientenplasma (1:50). Gezeigt werden die Mittelwerte der gleichverteilten logarithmierten und auf den gesamt-IgG-Gehalt normalisierten Intensitäten der relevanten Banden. PD (n = 39) und Ctrl (n = 38) zeigen keinen signifikanten Unterschied gegen die verschiedenen Hirnareale (unpaired t-test bzw. Mann-Whitney-U bei nicht-normalverteilten Werten (MC)). dm = dorsaler Motornucleus des Glossopharyngeal- und Vagusnervs, SN = Substantia nigra, MC = anteromedialer temporaler Mesocortex, HC = high order sensorische Assoziations- und präfrontale Felder, FC = first order sensorische Assoziations- und prämotorische Felder, und primär sensorische und motorische Felder.

Die Immunreaktivität wurde für jedes Gehirnareal auch bzgl. des Geschlechts und der Zugehörigkeit zur PD- und Kontrollgruppe untersucht. Weibliche Parkinson-Patienten zeigen eine signifikant höhere Immunreaktion gegen den olfaktorischen dm als männliche ($p = 0.0322$, Mann-Whitney-U-Test, Abb. 23 A). Bei allen übrigen Gehirnarealen ist kein Unterschied zwischen Männern und Frauen weder in der PD- noch in der Kontrollgruppe feststellbar, allerdings zeigen die Kontrollen einen Trend zu einer stärkeren Immunantwort der Frauen als bei den Männern gegen SN (0.075, unpaired t-test, Abb. 23 B).



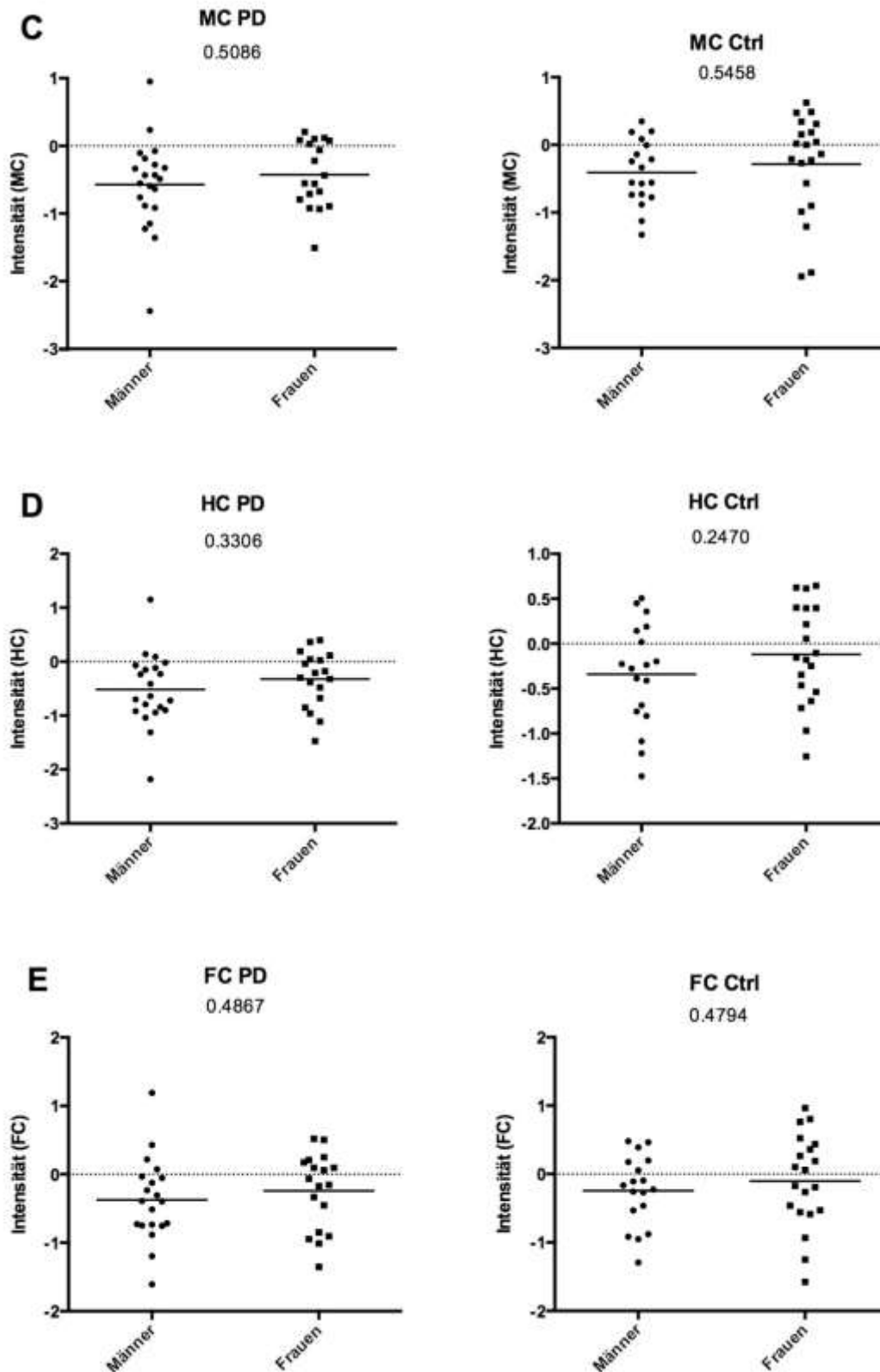
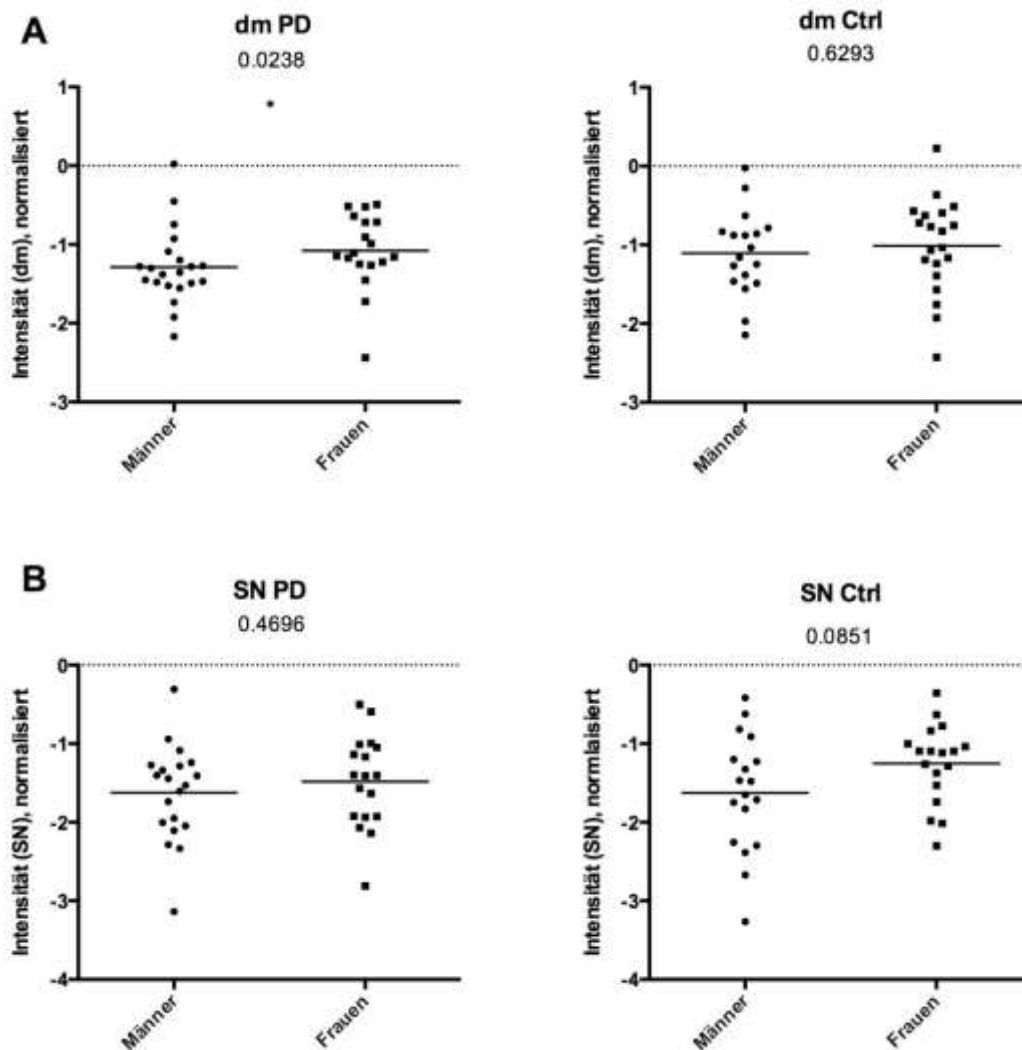


Abbildung 23: Weibliche PD-Patienten zeigen eine signifikant stärkere Autoantikörperantwort gegen dm als männliche

($p = 0,0322$, Mann-Whitney- U -Test). Signalintensität der Autoantikörper-Antwort gegen die restlichen Gehirnareale unterscheidet sich nicht zwischen Männern und Frauen in der jeweiligen PD- und Kontroll-Gruppe. Western-Blot und Immunfärbung mit Patienten-Plasma (1:50). Gezeigt werden jeweils die Mittelwerte (unpaired-t-test bei gleichverteilten Werten, Mann-Whitney- U -Test bei nicht-gleichverteilten Werten). dm = dorsaler Motornucleus des Glossopharyngeal- und

Vagusnerv, SN = Substantia nigra, MC = anteromedialer temporaler Mesocortex, HC = high order sensorische Assoziations- und präfrontale Felder, FC = first order sensorische Assoziations- und prämotorische Felder, und primär sensorische und motorische Felder.

Um auszuschließen, dass die signifikant stärkere Autoimmunantwort bei Frauen gegen den dm innerhalb der Parkinson-Gruppe auf einen generell höheren Immunglobulin-Gehalt zurück zu führen ist, wurde die Signalintensität auch hier mit dem gesamt-IgG-Gehalt normalisiert. Die signifikant intensivere Autoimmunität gegen dm der Frauen innerhalb der PD-Gruppe bleibt erhalten ($p = 0.0238$, Mann-Whitney- U -Test, Abb. 24).



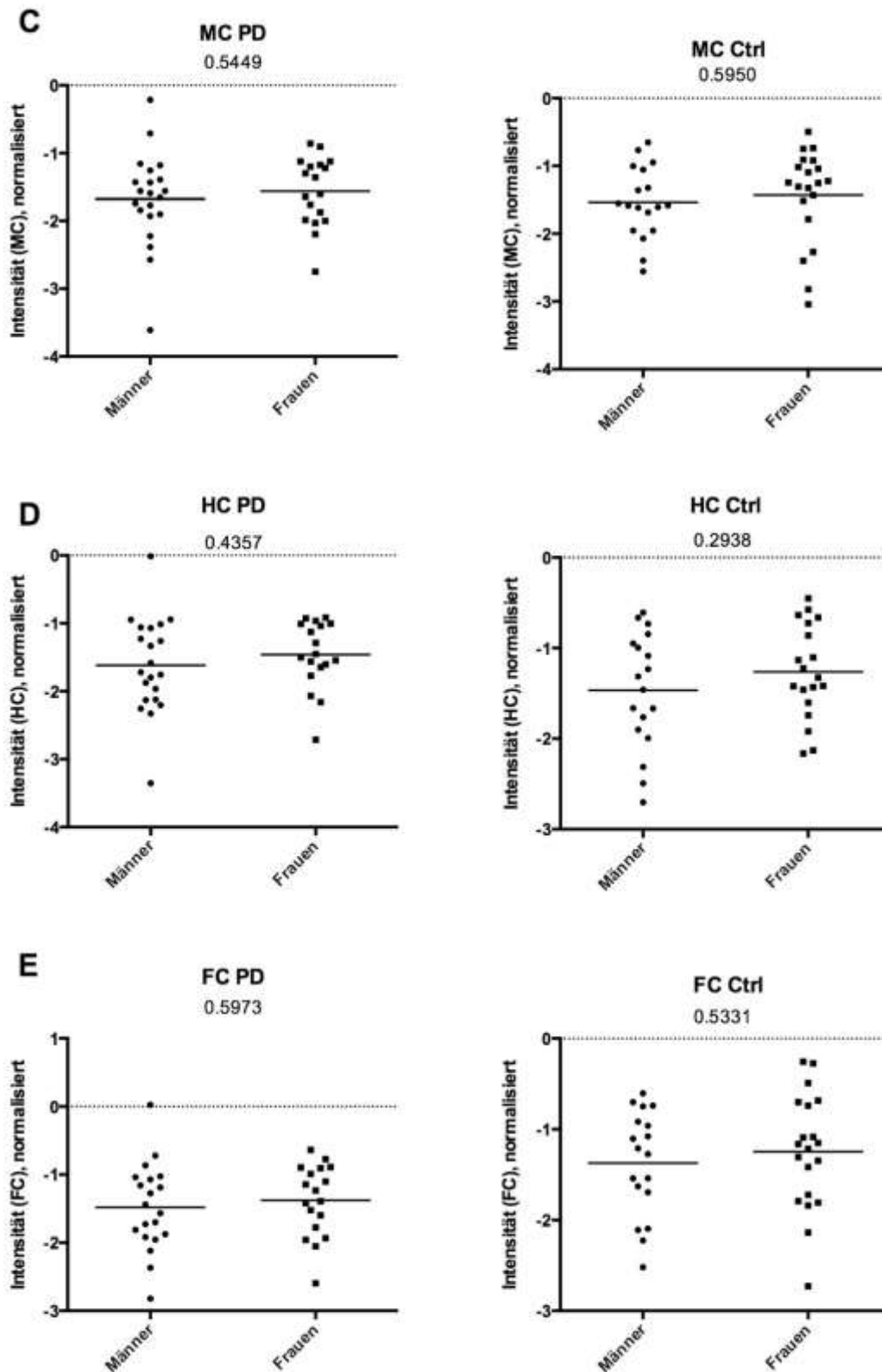


Abbildung 24: Weibliche PD-Patienten zeigen eine signifikant stärkere spezifische Autoimmunreaktion gegen dm als männliche.

A Frauen vs Männer, PD-Gruppe ($p = 0.0238$, Mann-Whitney- U -Test). Die auf gesamt-IgG-Gehalt normalisierte Signalintensität der Autoantikörper-Antwort gegen die restlichen Gehirnareale unterscheidet sich nicht zwischen Männern und Frauen in der jeweiligen PD- und Kontroll-Gruppe. Western Blot und Immunfärbung mit Patienten-Plasma (1:50). Gezeigt werden jeweils die Mittelwerte (unpaired-t-test bei gleichverteilten Werten, Mann-Whitney- U -Test bei nicht-gleichverteilten Werten). dm = dorsaler Motornucleus des Glossopharyngeal- und Vagusnerv, SN = Substantia nigra, MC = anteromedialer

temporalen Mesocortex, HC = high order sensorische Assoziations- und präfrontale Felder, FC = first order sensorische Assoziations- und prämotorische Felder, und primär sensorische und motorische Felder.

Die Analyse von PD und Kontrollen nach Geschlecht für jedes Gehirnareal ergab keine signifikanten Unterschiede in der Immunreaktivität (Daten nicht gezeigt).

Alle Patienten zeigen eine hochsignifikant höhere Immunreaktivität gegen das olfaktorische Gehirnareal dm als gegen alle anderen Gehirnareale ($p < 0.0001$ im Friedman-ANOVA Test für gepaarte, nicht-normalverteilte Werte, Abb. 25 A). Auch innerhalb der PD-Gruppe ($p < 0.0001$, Abb. 25 B), sowie innerhalb der Kontrollgruppe ($p < 0.0001$, Abb. 25 C) wird der dm hochsignifikant stärker erkannt als die kortikalen Regionen MC, HC und FC.

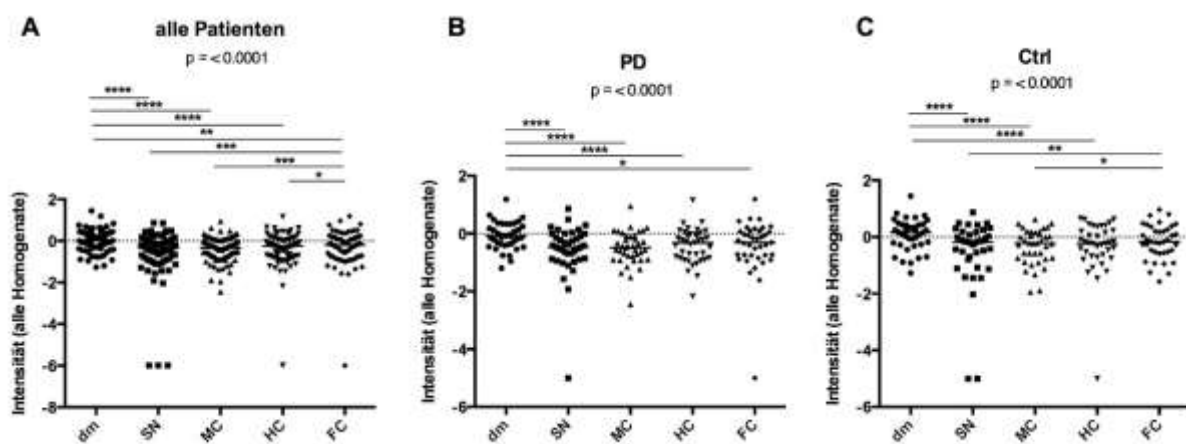


Abbildung 25: Das olfaktorische Areal dm wird deutlich stärker erkannt als die übrigen Hirngewebe.

Vergleich der Signalintensitäten der Plasma-Autoantikörper gegen unterschiedlichen Hirnareale. (A) Aller Patienten ($n = 77$, Friedman ANOVA $p < 0.0001$). dm wird signifikant häufiger erkannt als SN, MC, HC und FC. SN, MC und HC werden ebenfalls signifikant weniger erkannt als FC. (B) PD-Patienten ($n = 39$, Friedman ANOVA $p < 0.0001$). dm wird signifikant häufiger erkannt als SN, MC, HC und FC. (C) Kontrollen ($n = 38$, Friedman ANOVA $p < 0.0001$). dm wird ebenfalls signifikant häufiger erkannt als SN, MC, HC und FC, SN und MC werden signifikant weniger erkannt als FC. dm = dorsaler Motornucleus des Glossopharyngeal- und Vagusnervs, SN = Substantia nigra, MC = anteromedialer temporaler Mesocortex, HC = high order sensorische Assoziations- und präfrontale Felder, FC = first order sensorische Assoziations- und prämotorische Felder, und primär sensorische und motorische Felder.

Auch hier wurden die Ergebnisse auf den gesamt-IgG-Gehalt normalisiert, die hochsignifikant stärkere Immunreaktivität gegen dm bleibt in allen Gruppen erhalten ($p < 0.0001$, Friedman-ANOVA-Test für gepaarte, nicht normalverteilte Werte, Abb. 26).

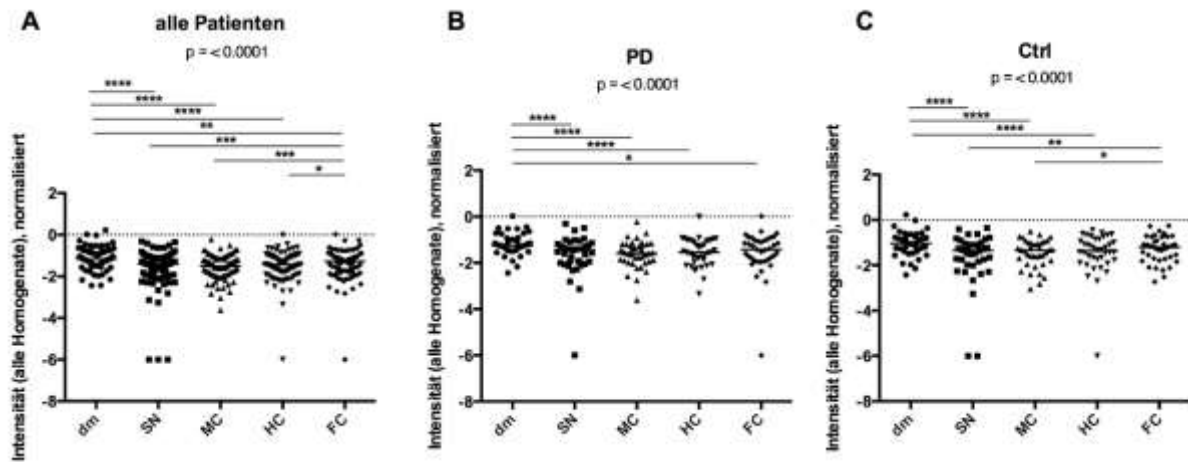
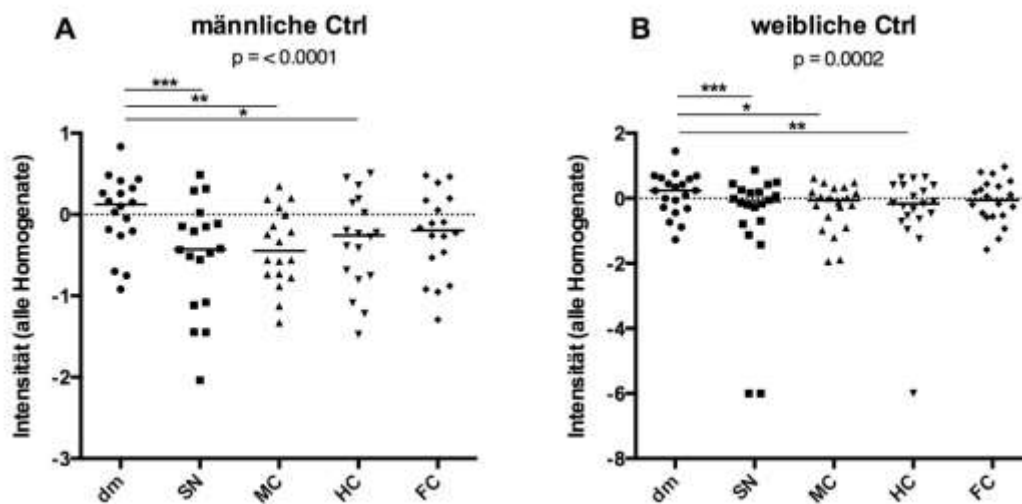


Abbildung 26: Das olfaktorische Areal dm wird deutlich stärker spezifisch erkannt als die übrigen Gehirngewebe.

Die Normalisierung der Signalintensitäten auf den gesamt-IgG-Gehalt ergab signifikante Unterschiede in der Stärke der Plasma-Autoantikörper gegen unterschiedlichen Hirnareale. (A) Aller Patienten ($n = 77$, Friedman ANOVA $p < 0.0001$). dm wird signifikant häufiger erkannt als SN, MC, HC und FC. SN, MC und HC werden ebenfalls signifikant weniger erkannt als FC. (B) PD-Patienten ($n = 39$, Friedman ANOVA $p < 0.0001$). dm wird signifikant häufiger erkannt als SN, MC, HC und FC. (C) Kontrollen ($n = 38$, Friedman ANOVA $p < 0.0001$). dm wird ebenfalls signifikant häufiger erkannt als SN, MC, HC und FC, SN und MC werden signifikant weniger erkannt als FC. dm = dorsaler Motornucleus des Glossopharyngeal- und Vagusnervs, SN = Substantia nigra, MC = anteromedialer temporaler Mesocortex, HC = high order sensorische Assoziations- und präfrontale Felder, FC = first order sensorische Assoziations- und prämotorische Felder, und primär sensorische und motorische Felder.

Der Vergleich zwischen weiblichen und männlichen Kontrollen und PD-Patienten zeigt ebenfalls eine signifikant stärkere Immunreaktivität gegen dm als gegen die restlichen Gehirnareale ($p < 0,0001$, Abb. 27).



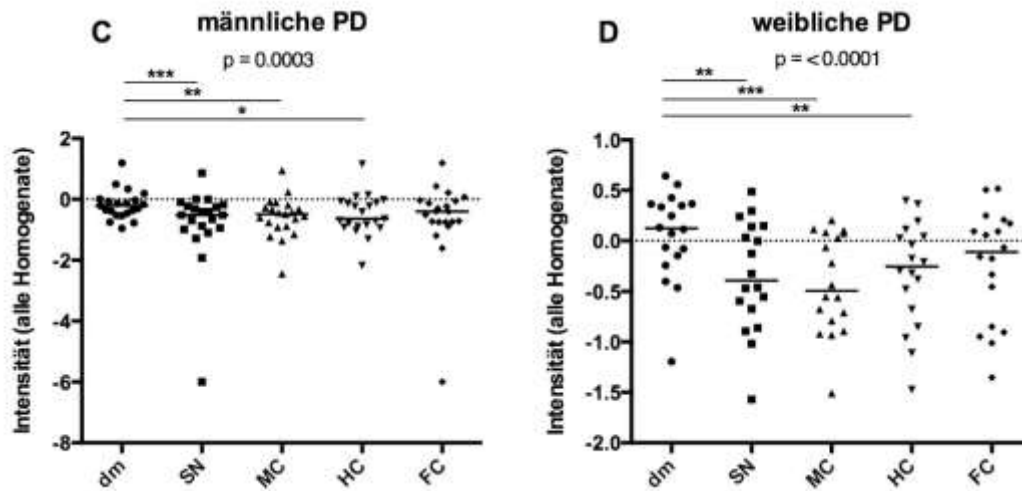
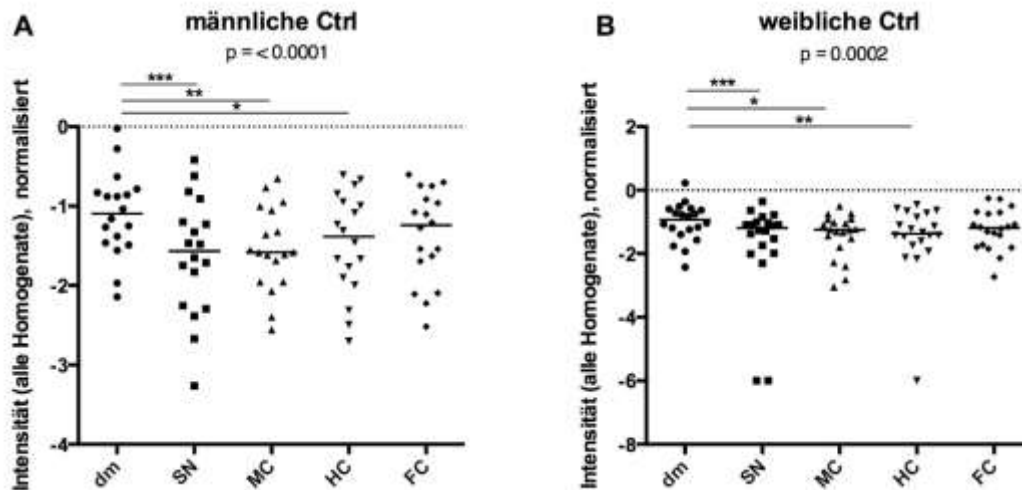


Abbildung 27: Die signifikant stärkere Signalintensität gegen dm ist nicht vom Geschlecht abhängig.

Vergleich der Signalintensitäten gegen verschiedene Hirnareale in männlichen und weiblichen Kontrollen und Parkinson-Patienten. (A) männliche Kontrollen (n = 18, RM-one-way-ANOVA $p < 0.0001$). (B) weibliche Kontrollen (n = 20, Friedman-ANOVA $p = 0.0002$). (C) männliche PD-Patienten (n = 21, Friedman ANOVA $p = 0.0003$), (D) weibliche PD-Patienten (n = 18, Friedman ANOVA $p < 0.0001$). In allen Gruppen wird dm signifikant bis hochsignifikant häufiger erkannt als SN, MC und HC. dm = dorsaler Motornucleus des Glossopharyngeal- und Vagusnervs, SN = Substantia nigra, MC = anteromedialer temporaler Mesocortex, HC = high order sensorische Assoziations- und präfrontale Felder, FC = first order sensorische Assoziations- und prämotorische Felder, und primär sensorische und motorische Felder.

Die auf den gesamt-IgG-bezogenen Autoimmunreaktionen zeigen den gleichen Trend wie die nicht-normalisierten Immunreaktivitäten (Abb. 28).



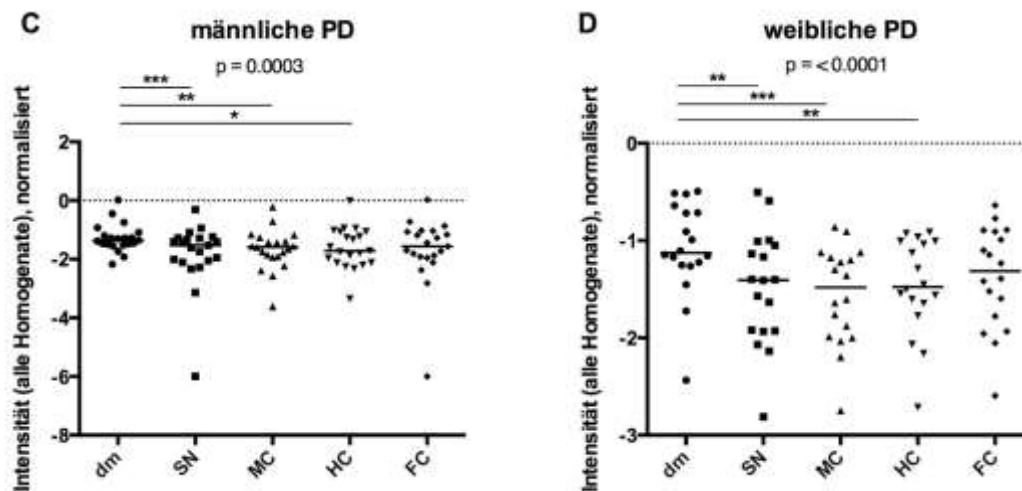


Abbildung 28: Die signifikant stärkere spezifische Signalintensität gegen dm ist nicht vom Geschlecht abhängig. Vergleich der auf den gesamt-IgG-Gehalt normalisierten Signalintensitäten gegen verschiedene Hirnareale in männlichen und weiblichen Kontrollen und Parkinson-Patienten. **A** männliche Kontrollen (n = 18, RM-one-way-ANOVA $p < 0.0001$). **B** weibliche Kontrollen (n = 20, Friedman-ANOVA $p = 0.0002$). **C** männliche PD-Patienten (n = 21, Friedman ANOVA $p = 0.0003$), **D** weibliche PD-Patienten (n = 18, Friedman ANOVA $p < 0.0001$). In allen Gruppen wird dm signifikant bis hochsignifikant häufiger erkannt als SN, MC und HC. dm = dorsaler Motornucleus des Glossopharyngeal- und Vagusnervs, SN = Substantia nigra, MC = anteromedialer temporaler Mesocortex, HC = high order sensorische Assoziations- und präfrontale Felder, FC = first order sensorische Assoziations- und prämotorische Felder, und primär sensorische und motorische Felder.

4.3.4 Messung der Autoreaktivität gegen Proteine mit ca. 37, 40 und 45 kDa

Bei der Western Blot-Analyse fiel auf, dass einige Banden besonders prominent erkannt wurden. Bei der augenscheinlichen Betrachtung lag der Verdacht nahe, dass drei Banden zwischen 35 und 45 kDa im olfaktorischen Hirnareal dm und je eine Bande bei ca. 160 kDa in den kortikalen Regionen MC, HC und FC besonders erkannt werden. Um den Verdacht zu überprüfen, wurden sie quantifiziert, normalisiert und mit Hilfe statistischer Analysen mittels GraphPad Prism ausgewertet.

Die Analyse zeigt für jede der Gruppen eine signifikant stärkere Immunreaktion gegen die jeweilige Bande im dm verglichen mit den anderen Gehirnarealen. Bei der 45 kDa-Bande ist der Effekt noch am geringsten; in der Gruppe der PD und Kontrollen wird dieses Protein nur im dm signifikant stärker als in der SN erkannt. Die anderen Gehirnareale zeigen keinen signifikanten Unterschied (Abb. 29 A). Das 40 kDa-Protein wird hingegen hochsignifikant häufiger im dm erkannt als in der SN, im MC, im HC und im FC (Abb. 22 B, $p < 0.001$, Friedman-ANOVA für gepaarte, nicht-parametrische Werte). Dies gilt für alle untersuchten Gruppen. Bei PD Patienten wird dieses Protein außerdem im SN hochsignifikant häufiger erkannt als in den kortikalen Regionen HC und FC. Das 37 kDa-

Protein wird ebenfalls im dm hochsignifikant stärker erkannt als in der SN, im MC, HC und FC ($p < 0.0001$, Friedman-ANOVA für gepaarte, nicht-parametrische Werte), was hier ebenfalls für alle drei analysierten Gruppen gilt (Abb. 29 C).

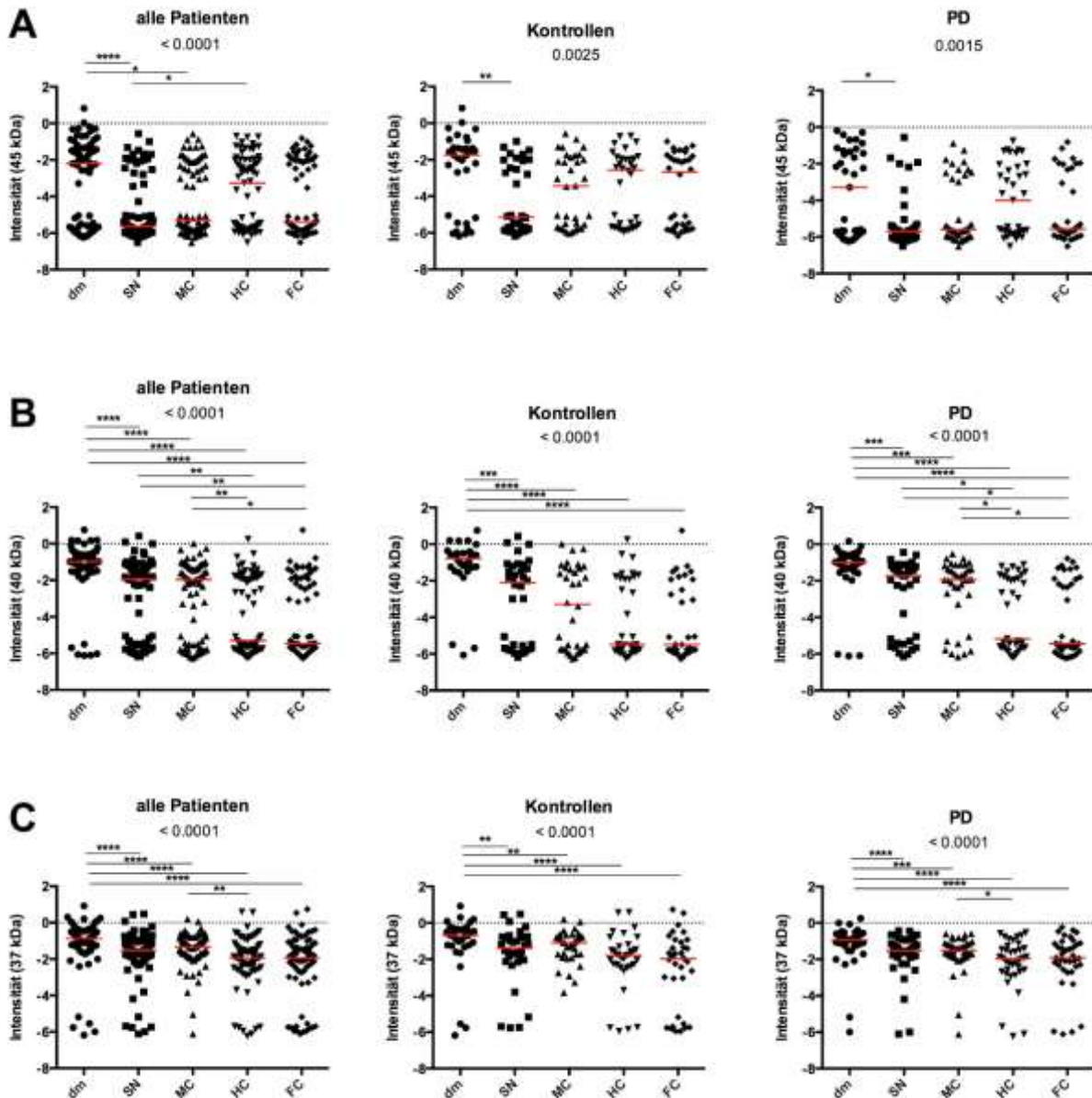
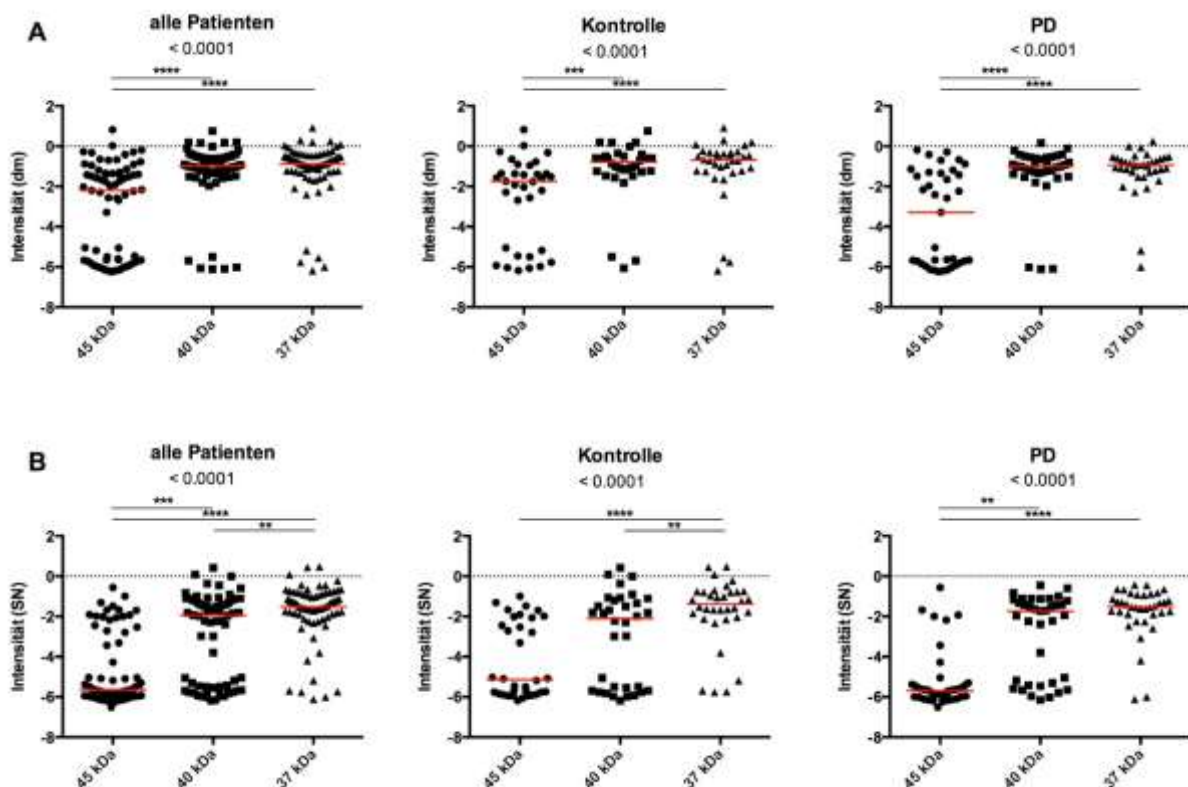


Abbildung 29: Intensität der Autoimmunreaktion gegen drei prominente Proteine in unterschiedlichen Gehirnbereichen.

Western-Blot-Analyse mit anschließender Immunfärbung mit Patientenplasma (1:50). Darstellung der Auswertung für jeweils alle Patienten, gesunde Kontrollen und PD-Patienten. **A** Analyse der Immunreaktion gegen die 45 kDa-Bande. Bei allen Patienten wurde ein hochsignifikant stärkeres Signal gegen das Protein im dm als im SN und MC gezeigt ($p < 0.0001$, ****). Das Protein wird im HC signifikant stärker erkannt als im SN (*). Bei der Analyse der Kontrollen und PD-Patienten wird das 45 kDa-Protein signifikant häufiger lediglich im dm vs. SN erkannt ($p = 0,0023$, *). **B** Analyse der Immunreaktion gegen das 40 kDa-Protein. In allen Patienten wurde es im dm hochsignifikant stärker erkannt als in allen anderen Gehirnbereichen ($p < 0.0001$, ****). Des Weiteren wurde das Protein im SN und MC jeweils signifikant häufiger erkannt als im HC und FC (**). In den Kontrollen wurde das Protein jedoch nur im dm hochsignifikant häufiger erkannt als in allen anderen Gehirnbereichen ($p < 0.0001$, ****). Innerhalb der Gruppe der PD-Patienten wurde die Bande bei 40 kDa ebenfalls signifikant häufiger erkannt als in den übrigen Gehirnbereichen ($p < 0.0001$, ****). Außerdem wurde das Protein im SN signifikant häufiger erkannt als im HC und FC (*), im MC signifikant häufiger als im FC. **C** Analyse der Intensität der Autoimmunreaktion gegen das 37 kDa-Protein. In allen Patienten wurde es im dm hochsignifikant häufiger als in den übrigen Arealen ($p < 0.0001$, ****), und im MC

signifikant häufiger als im HC-Areal erkannt (**). Innerhalb der Kontrollen und PD Patienten wurde das Protein bei 37 kDa nur im dm hochsignifikant häufiger als in allen anderen Gehirnarealen erkannt ($p < 0.0001$, ****). Für alle gezeigten Analysen wurde die Friedman-ANOVA für nicht-normalverteilte, abhängige Werte verwendet. Dargestellt sind jeweils die Mediane. dm = dorsaler Motornucleus des Glossopharyngeal- und Vagusnervs, SN = Substantia nigra, MC = anteromedialer temporaler Mesocortex, HC = high order sensorische Assoziations- und präfrontale Felder, FC = first order sensorische Assoziations- und prämotorische Felder, und primär sensorische und motorische Felder.

In den Gewebehomogenaten dm, SN, MC und HC wird das Protein mit dem Molekulargewicht 37 kDa in allen untersuchten Gruppen jeweils signifikant stärker erkannt als das 45 kDa-Protein. Das 40 kDa-Protein wird ebenfalls signifikant häufiger als das 45 kDa-Protein erkannt. Ausnahmen bilden hier jeweils die Kontrollgruppen des SN, MC und HC. Des Weiteren wird das 37 kDa-Protein signifikant häufiger erkannt als das 40 kDa-Protein, wovon jedoch der dm ausgenommen ist. (Abb. 23 A, B, C, D, $p < 0.0001$, ****, Friedman-ANOVA für gepaarte, nicht-parametrische Werte). Im kortikalen Gehirnareal FC scheint sich die Immunreaktivität umgekehrt zu verhalten, hier wurde die 45 kDa-Bande in der Gesamt- und der Kontrollgruppe signifikant stärker erkannt als die 40 kDa-Bande (Abb. 30 E). Die PD-Gruppe verhält sich wiederum wie die übrigen.



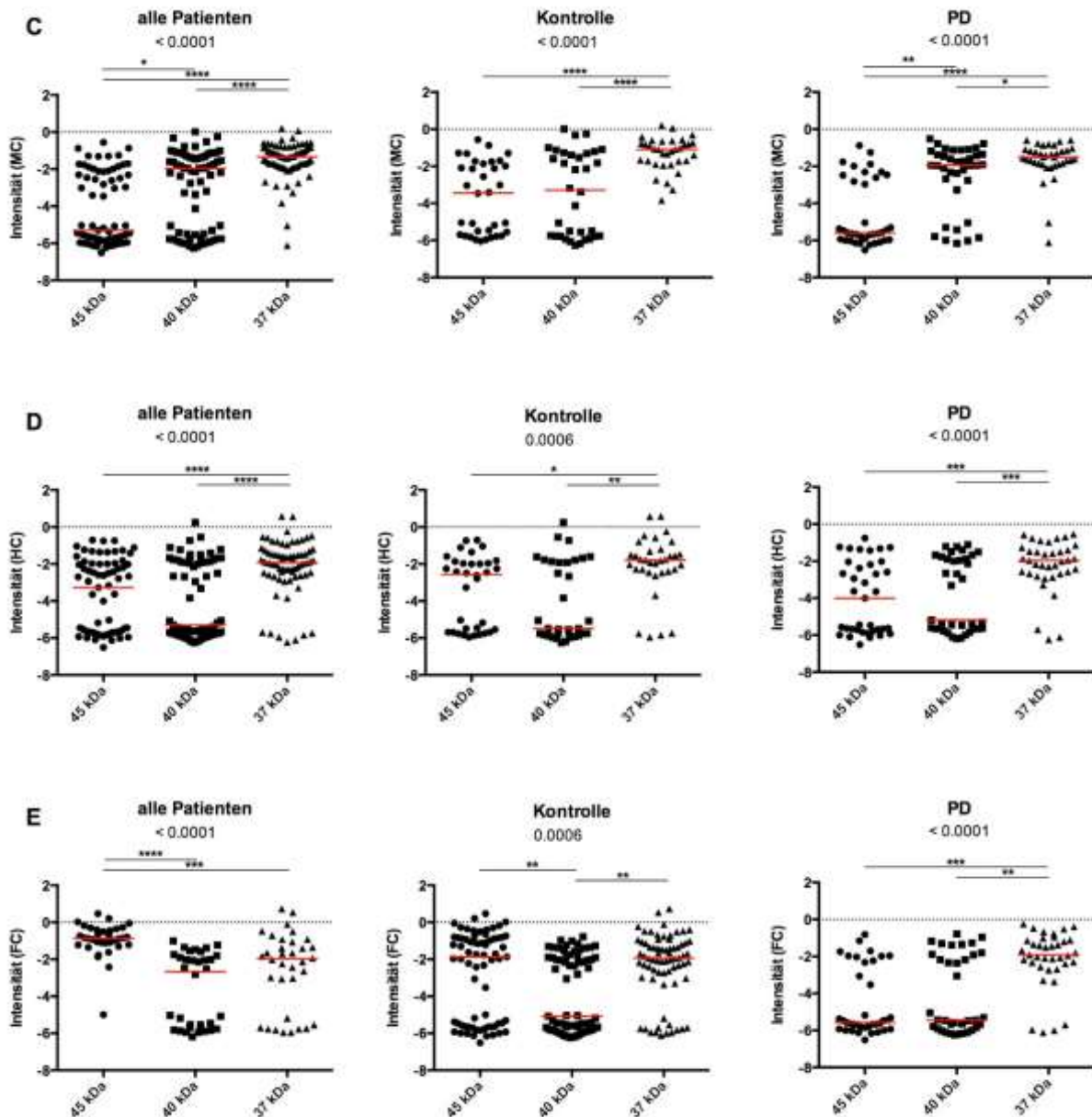
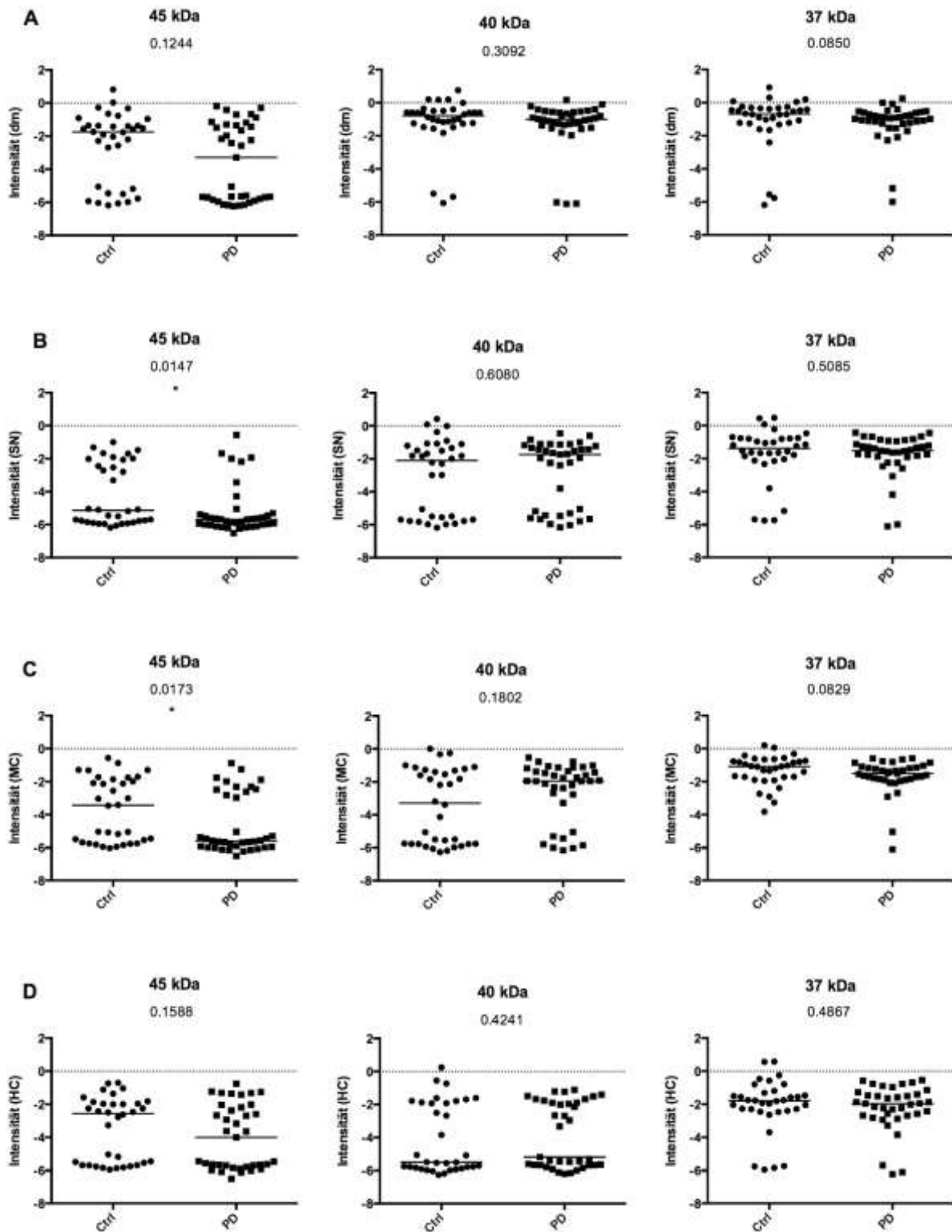


Abbildung 30: In den Gehirnbereichen dm, SN, MC und FC wird das 45 kDa-Protein von PD-Patienten signifikant weniger erkannt.

Vergleich der Intensität der Autoreaktivität gegen die 45, 40 und 37 kDa-Bande für jedes Gehirnbereich. Western Blot-Analyse und Immunfärbung mit Patientenplasma (1:50). **A** dm: In allen Gruppen werden die 40- und 37 kDa-Banden hochsignifikant stärker erkannt als die 45 kDa-Bande ($p < 0.0001$, Friedman-ANOVA). **B** SN: In der Kontrollgruppe wird die 37 kDa-Bande stärker erkannt als die anderen beiden, in der PD-Gruppe sind die 40 und 37 kDa-Banden signifikant stärker gefärbt als die 45 kDa-Bande. **C** MC: in der Kontrollgruppe ist die 37 kDa-Bande intensiver als die anderen beiden Banden erkannt worden, in der PD-Gruppe ist die 40 kDa-Bande stärker als die 45 kDa-Bande, und die 37 kDa-Bande stärker als die 45 und 40 kDa-Banden erkannt worden. **D** HC: beide Gruppen zeigen eine signifikant stärkere Immunreaktivität gegen 37 kDa als gegen die 45 und 40 kDa-Banden. **E** FC: die Kontrollgruppe zeigt eine signifikant höhere Immunreaktivität gegen die 45 und 37 kDa-Banden als gegen die 40 kDa-Bande. In der PD-Gruppe wird lediglich die 37 kDa-Bande signifikant stärker erkannt als die anderen beiden. Gezeigt werden die Mediane. dm = dorsaler Motornucleus des Glossopharyngeal- und Vagusnervs, SN = Substantia nigra, MC = anteromedialer temporaler Mesocortex, HC = high order sensorische Assoziations- und präfrontale Felder, FC = first order sensorische Assoziations- und prämotorische Felder, und primär sensorische und motorische Felder.

Für jedes Gehirnbereich wurde die Signalintensität zwischen Parkinson-Patienten und Kontrollen miteinander verglichen. Die Kontrollgruppe zeigt eine signifikant höhere

Immunreaktivität gegen die 45 kDa-Bande der SN und des MC und tendiert auch im FC zu signifikanten Unterschieden (Abb. 31 B, C, E). Bei den übrigen Gehirnarealen und Banden gibt es keinen Unterschied zwischen Parkinson-Patienten und gesunden Kontrollen.



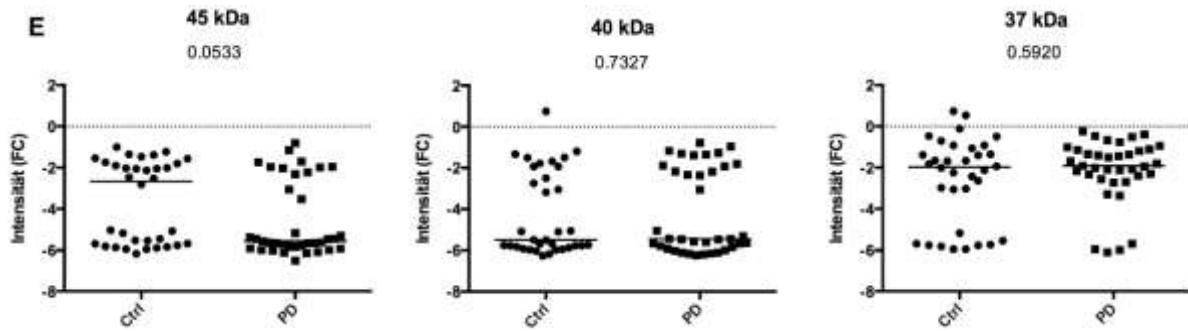
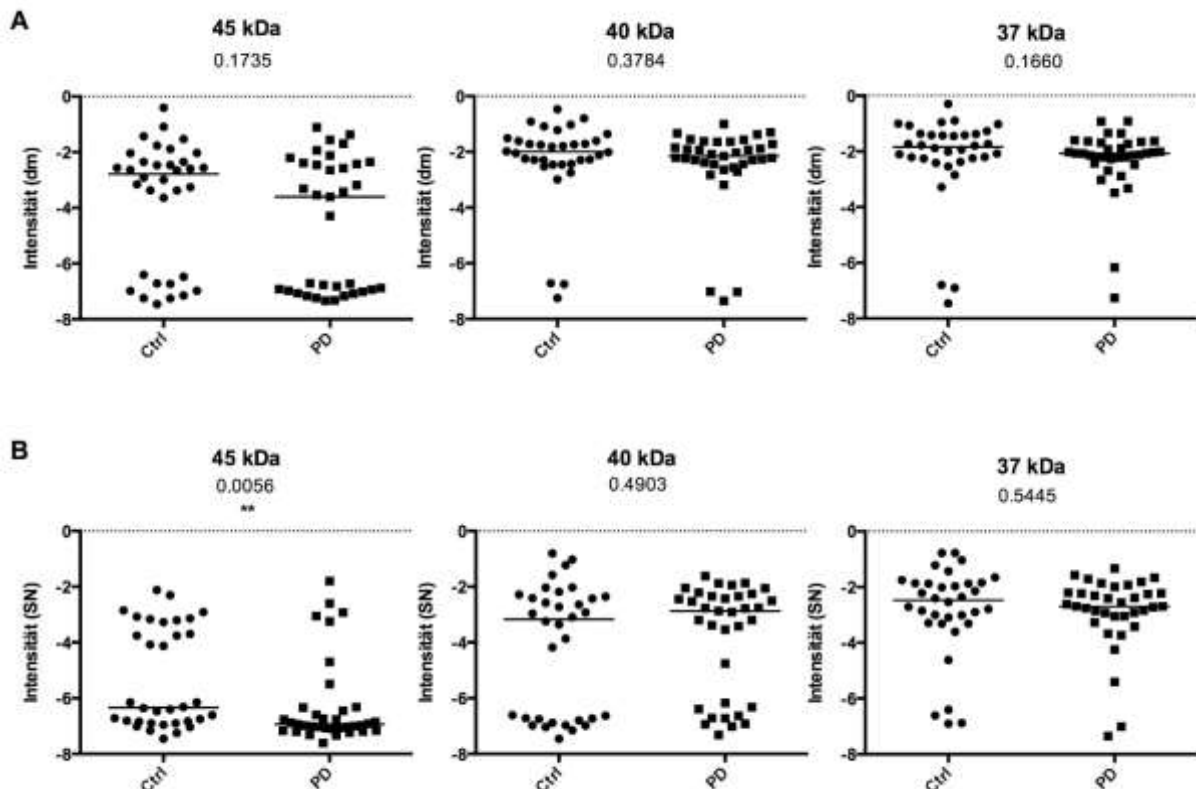


Abbildung 31: Kontrollen zeigen eine signifikant stärkere Immunreaktivität gegen das 45 kDa-Protein in der SN und im MC als PD-Patienten.

Vergleich der Autoantikörper-Intensität gegen verschiedene Proteine in Kontrollen vs. PD-Patienten. Western Blot-Analyse mit Patientenplasma (1:50). Für SN und MC zeigt jeweils die Kontrollgruppe eine signifikant stärkere Immunreaktivität gegen das 45 kDa-Protein als die Parkinson-Gruppe (Mann-Whitney-U-Test). Keine der restlichen Gruppen zeigt eine unterschiedliche Immunreaktion zwischen PD-Patienten und Kontrollen (Mann-Whitney-U-Test). Darstellung der Mediane. dm = dorsaler Motornucleus des Glossopharyngeal- und Vagusnervs, SN = Substantia nigra, MC = anteromedialer temporaler Mesocortex, HC = high order sensorische Assoziations- und präfrontale Felder, FC = first order sensorische Assoziations- und prämotorische Felder, und primär sensorische und motorische Felder.

Die spezifische Autoimmunantwort wurde durch das Normalisieren auf den gesamt-IgG-Gehalt der Plasma-Spender untersucht. Auch hier zeigt sich eine signifikant stärkere Autoreaktivität gegen das 45 kDa-Protein der Gehirnareale SN ($p = 0.0056$, Abb. 32 B) und MC ($p = 0.0277$, Abb. 32 C), zusätzlich wird FC ($p = 0.0188$, Abb. 32 D) signifikant stärker erkannt.



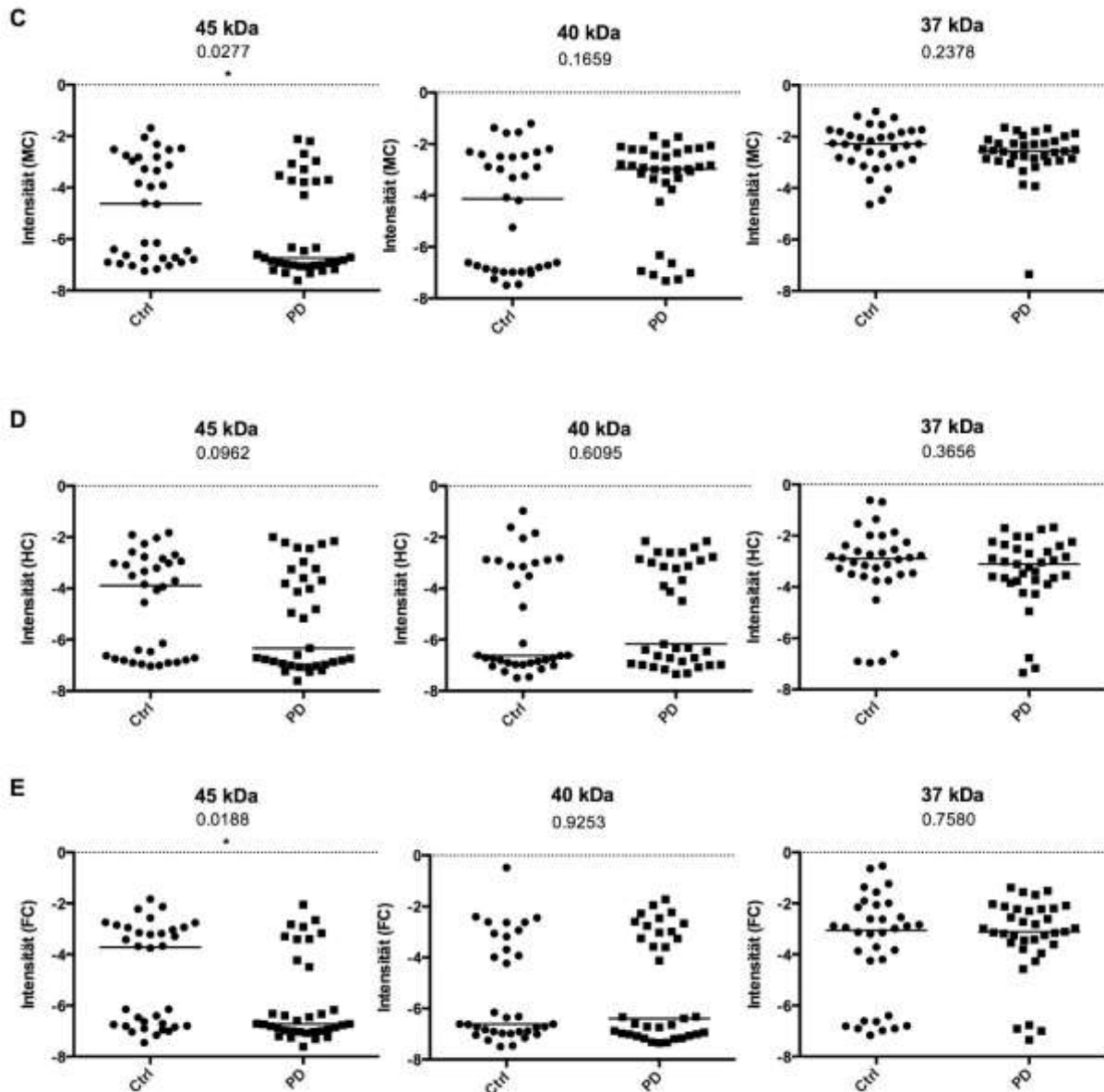


Abbildung 32: PD-Patienten zeigen eine signifikant geringere spezifische Autoimmunreaktivität gegen ein 45 kDa Protein im SN, MC und HC als Kontrollen.

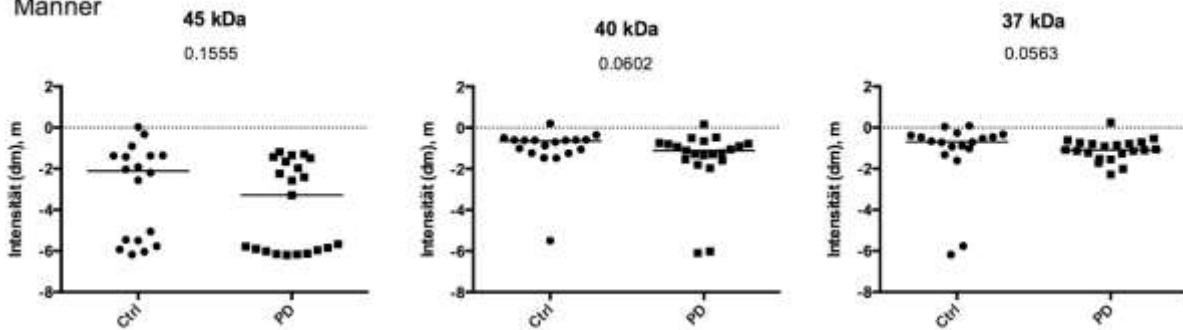
Vergleich der auf den gesamt-IgG-Gehalt normalisierten Autoantikörper-Intensität gegen verschiedene Proteine in Kontrollen vs. PD-Patienten. Western Blot Analyse mit Patientenplasma (1:50), Normalisierung mit der Kontrollbande für den Vergleich verschiedener Membranen, Normalisierung auf den gesamt-IgG-Gehalt jedes Plasmas zur Analyse der spezifischen Immunantworten. Für SN (B), MC (C) und FC (D) zeigt jeweils die PD-Gruppe eine signifikant schwächere Immunreaktivität gegen das 45 kDa-Protein als die Kontroll-Gruppe. Keine der restlichen Gruppen zeigt eine unterschiedliche Immunreaktion zwischen PD-Patienten und Kontrollen (Mann-Whitney-U-Test). Darstellung der Mediane. dm = dorsaler Motornucleus des Glossopharyngeal- und Vagusnervs, SN = Substantia nigra, MC = anteromedialer temporaler Mesocortex, HC = high order sensorische Assoziations- und präfrontale Felder, FC = first order sensorische Assoziations- und prämotorische Felder, und primär sensorische und motorische Felder.

Männliche Kontrollen zeigen eine hochsignifikant stärkere spezifische Autoimmunantwort gegen das 45 kDa-Protein im SN ($p < 0.0001$, Abb. 33 B), MC ($p = 0.0042$, Abb. 33 C) und FC ($p = 0.0088$, Abb. 33 E) als männliche PD-Patienten. Die Autoimmunsignale gegen das 40- und

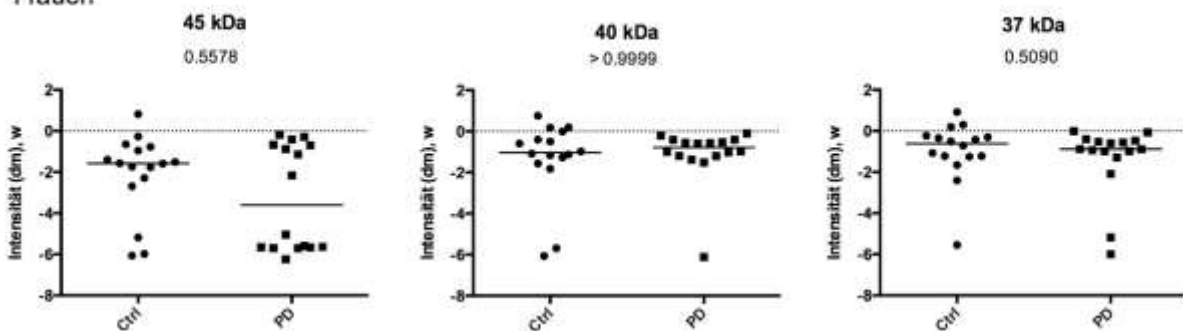
37 kDa-Protein bei den männlichen sowie innerhalb der Gruppe der weiblichen Spender zeigten keine Unterschiede.

A dm

Männer

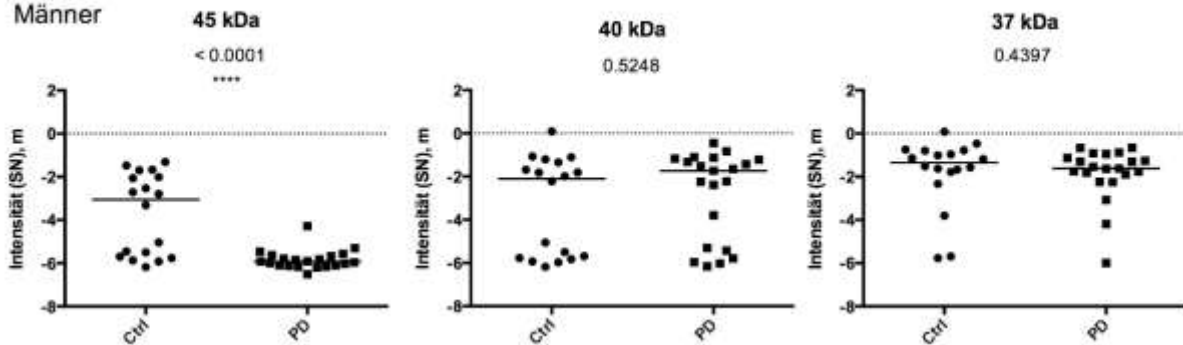


Frauen

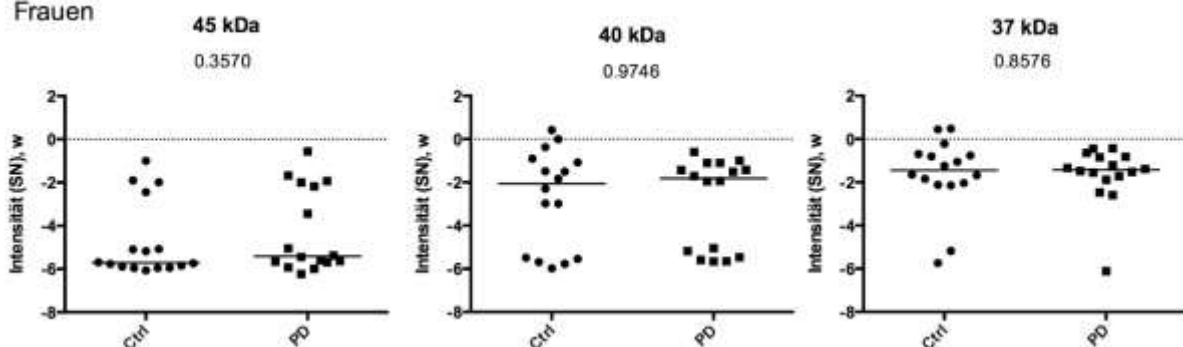


B SN

Männer

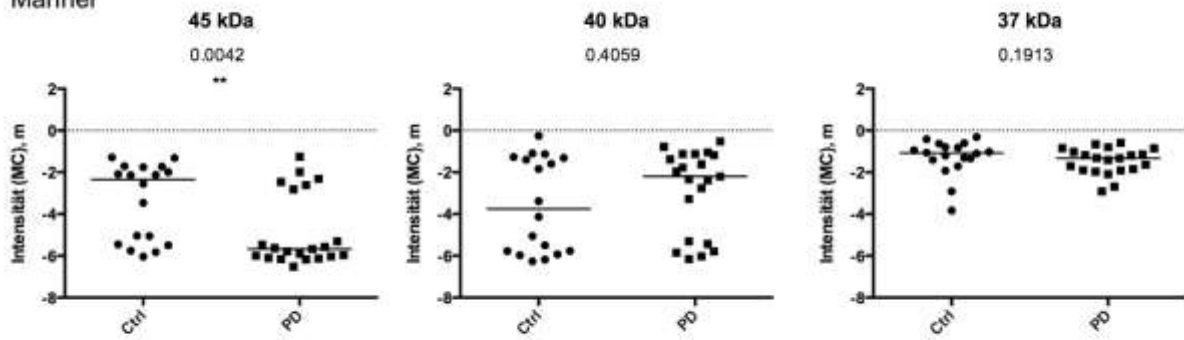


Frauen

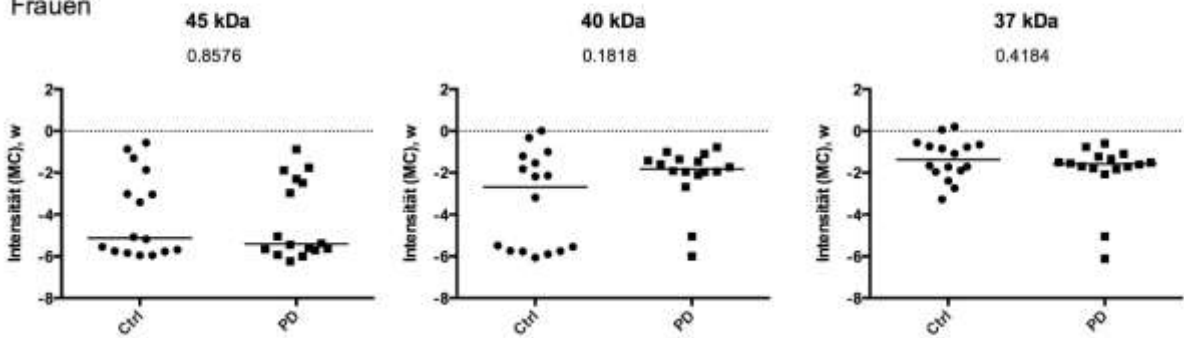


C MC

Männer

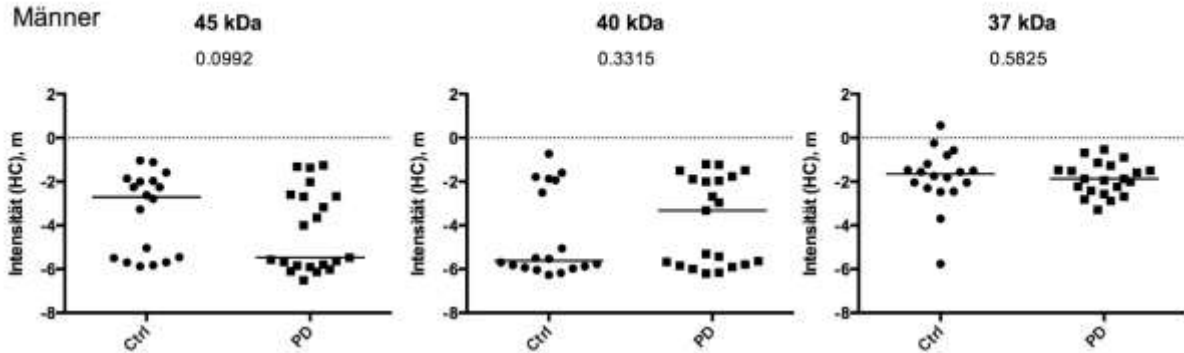


Frauen

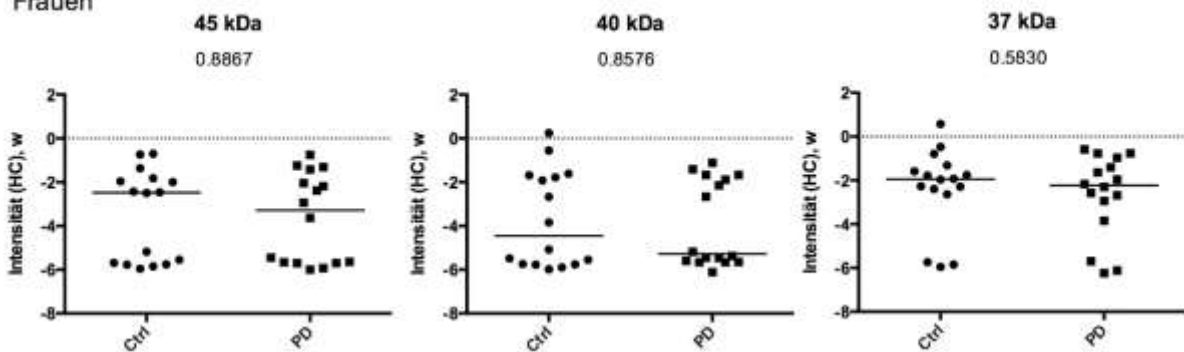


D HC

Männer



Frauen



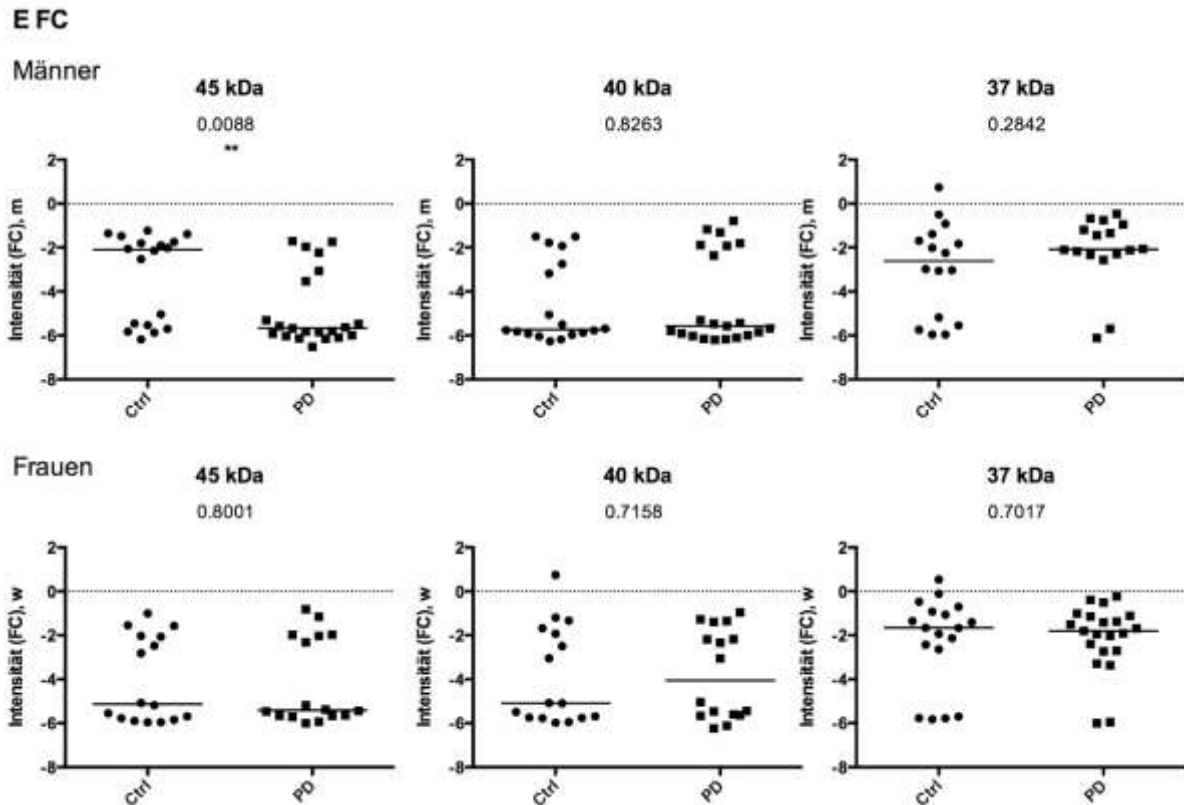


Abbildung 33: Männliche PD-Patienten zeigen eine signifikant geringere Immunreaktivität gegen das 45 kDa-Protein in der SN, MC und FC als männliche Kontrollen.

Vergleich der auf den gesamt-IgG-Gehalt normalisierten Autoantikörper-Intensität gegen verschiedene Proteine in Kontrollen vs. PD-Patienten. Western Blot Analyse mit Patientenplasma (1:50). Für SN (**B******), MC (**C****) und FC (**E****) zeigen männliche PD-Patienten hochsignifikant geringere Signalintensitäten gegen das 45 kDa-Protein als Plasmen von männliche Kontrollen. Plasmen von weiblichen Kontrollen zeigen keine Unterschiede in der Autoimmunität (Mann-Whitney-U-Test). Darstellung der Mediane. dm = dorsaler Motornucleus des Glossopharyngeal- und Vagusnerv, SN = Substantia nigra, MC = anteromedialer temporaler Mesocortex, HC = high order sensorische Assoziations- und präfrontale Felder, FC = first order sensorische Assoziations- und prämotorische Felder, und primär sensorische und motorische Felder.

Aus den oben gezeigten Daten lässt sich dem Merkmal einer bestehenden Autoimmunität gegen ein bestimmtes Antigen eine Wahrscheinlichkeit zuordnen, mit der eine Person erkrankt oder gesund ist.

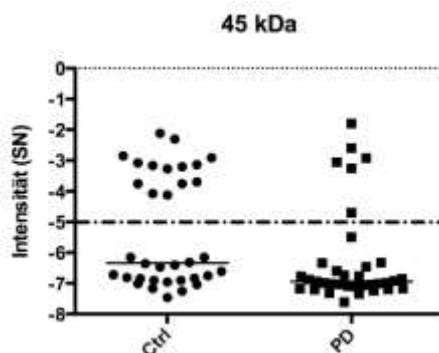


Abbildung 34: Exemplarische Darstellung des Cutoffs von log-5.

Der Fisher's exact Test ergibt eine Wahrscheinlichkeit von $p = 0.028$ *. Demnach zeigen Kontrollen die Bande gegen das 45 kDa Protein im SN, wohingegen die Signalintensitäten bei PD-Patienten unter dem Cutoff von \log_5 liegen.

Bei einem Cutoff von \log_5 (Abb. 34) ergibt sich z.B. für Männer, die keine Western Blot-Bande gegen das 45 kDa-Protein der SN haben, eines Odds Ratio für das Merkmal Parkinson von 53.12 (95 % CI 2.79 – 1012, $p < 0.0001$ ***) (Abb. 35). Bei Frauen hingegen ergibt sich kein erhöhtes PD-Risiko bei Fehlen der Bande (Odds Ratio 0.44, 95 % CI 0.094-2.09). Die Sensitivität dieses Tests liegt für die Gruppe der Männer bei 1 (d.h., in 100 % der Fälle wird eine bestehende PD-Erkrankung richtig nachgewiesen), die Spezifität liegt bei 0.56 (d.h. 56 % der gesunden werden korrekt als gesund erkannt, in 44 % der Fälle wird eine PD-Erkrankung irrtümlich diagnostiziert, das Ergebnis ist also falsch-positiv). Um zu beurteilen, ob der Nachweis der Autoantikörper-Bande gegen das 45 kDa-Protein aus SN, MC oder FC dazu geeignet ist, um die Wahrscheinlichkeit einer Parkinson-Erkrankung in der Bevölkerung vorherzusagen, werden die positiv und negativ prädiktiven Werte (PPV, NPV) auf der zugrunde gelegten PD-Prävalenz von 0.5 % errechnet. Damit ergibt sich für Personen, die keine Bande gegen das 45 kDa-Protein der SN zeigen, nur eine 0.7 % ige Wahrscheinlichkeit, an PD erkrankt zu sein (PPV = 0.7 %), demnach ist das Ergebnis zu 99.3 % falsch-positiv. Wenn eine Person wiederum eine Bande gegen das 45 kDa-Protein zeigt, besteht eine Wahrscheinlichkeit von 99.79 % (NPV), dass der Patient keine Erkrankung hat. Nur 0.21 % sind in diesem Fall falsch-negativ. Bei keiner der untersuchten Gruppen liegt der NPV unter 99.15 %. Eine Zusammenstellung der Odds Ratio, Sensitivitäten, Spezifitäten, PPV und NPV ist in Tab. 10 gezeigt.

Tabelle 10: Zusammenfassung der Odds Ratio, Sensitivität und Spezifität, sowie der PPV und NPV

	Odds Ratio	p-Wert		Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
SN, alle	3.38 (1.11 - 10.30)	0.028	*	0.83 (0.66 - 0.93)	0.41 (0.25 - 0.59)	0.70 %	99.79 %
SN, males	53.12 (2.79 - 1012)	< 0.0001	***	1 (0.84 - 1.00)	0.56 (0.31 - 0.78)	1.12%	100%
SN, females	0.44 (0.09 - 2.09)	0.300	ns	0.57 (0.29 - 0.82)	0.25 (0.07 - 0.52)	0.38 %	99.15 %
MC, alle	2.16 (0.82 - 5.69)	0.118	ns	0.66 (0.48 - 0.81)	0.53 (0.35 - 0.70)	0.697 %	99.68 %
MC, males	3.93	0.041	*	0.71	0.61	0.91 %	99.77 %

	(1.03 - 15.00)			(0.48 - 0.89)	(0.36 - 0.83)		
MC, females	1.04 (0.24 - 4.41)	0.961	ns	0.57 (0.29 - 0.82)	0.44 (0.20 - 0.70)	0.51 %	99.51 %
FC, alle	2.81 (1.04 - 7.61)	0.039	*	0.71 (0.54 - 0.85)	0.5294 (0.35 - 0.70)	0.76 %	99.73 %
FC, males	3.93 (1.03 - 15.00)	0.041	*	0.71 (0.48 - 0.89)	0.61 (0.36 - 0.83)	0.91 %	99.77 %
FC, females	1.94 (0.42 - 8.92)	0.389	ns	0.71 (0.42 - 0.92)	0.44 (0.20 - 0.71)	0.63 %	99.67 %

Die Tabelle zeigt die Odds Ratio, den p-Wert des Fisher's exact Test, die Sensitivität und Spezifität für den Zusammenhang zwischen der Abwesenheit der Autoimmunbande gegen das 45 kDa-Protein in SN, MC und FC und der PD-Erkrankung in unterschiedlichen Gruppen an. Für die positiv und negativ prädiktiven Werte (PPV, NPV) wurde eine PD-Prävalenz von 0.5 % zugrunde gelegt. In Klammern ist jeweils das 95 % Konfidenzintervall angegeben.

Die Odds Ratios der verschiedenen Gruppen sind in Abbildung 35 gezeigt. Männliche PD-Patienten, denen die Autoimmunbande gegen das 45 kDa-Protein in der SN fehlt, haben demnach ein 53.12 fach höheres Risiko, an PD erkrankt zu sein, als Kontrollen. Frauen haben bei der Abwesenheit der Autoimmunbande jedoch kein erhöhtes Risiko.

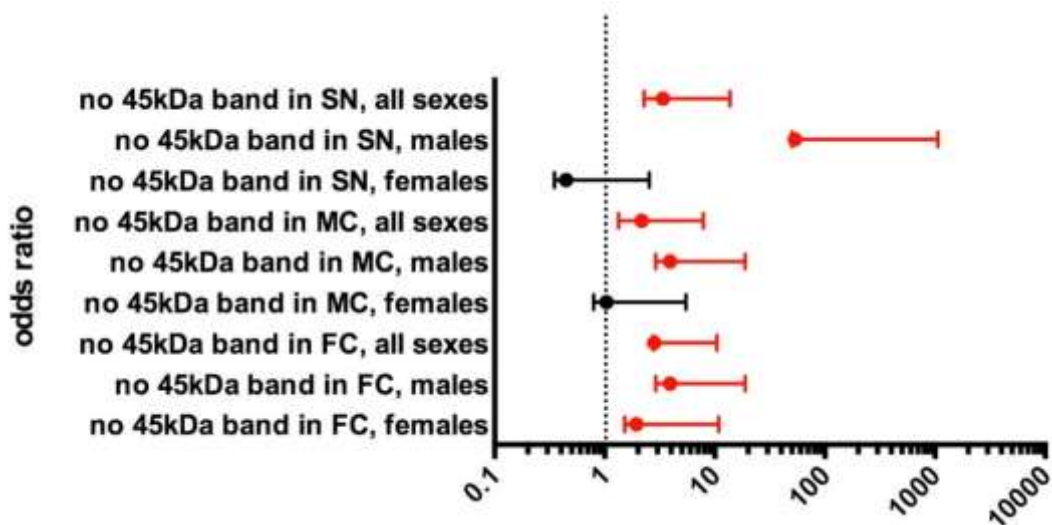


Abbildung 35: Odds Ratios in den untersuchten Gruppen.

Männliche PD Patienten haben ein 53.12 fach höheres Risiko, an PD zu leiden, wenn sie keine Bande gegen das 45 kDa-Protein des SN besitzen. In den übrigen Gruppen besitzen Männer ebenfalls ein leicht erhöhtes Risiko für die PD-Krankheit, wenn das 45 kDa-Protein im MC und FC nicht erkannt wird (Odds Ratio für MC und FC jeweils 3.93). Frauen, die keine Autoimmunität gegen das Protein im FC zeigen, haben ein um 1.9 fach höheres Risiko, an PD zu leiden, wohingegen die Abwesenheit der Bande in SN und MC keine Verbindung zu PD ergibt (Odds Ratio in SN 0.44, MC 1.04).

4.3.5 Autoreaktivität gegen das Protein mit ca. 160 kDa

Bei der Betrachtung fiel neben der Autoreaktivität gegen die niedermolekularen Proteine zwischen 37 und 45 kDa auch eine besonders starke Immunfärbung eines Proteins mit der Größe von ca. 160 kDa auf, das in den kortikalen Regionen entlang der Braak-Stadien zuzunehmen scheint. Daher wurden diese Banden ebenfalls quantifiziert und normalisiert.

In den kortikalen Gehirnareale HC und FC ist in allen untersuchten Gruppen eine signifikant höhere Immunreaktivität gegen das 160 kDa-Protein als in dm, SN und MC festzustellen (Abb. 36 A, B, C)

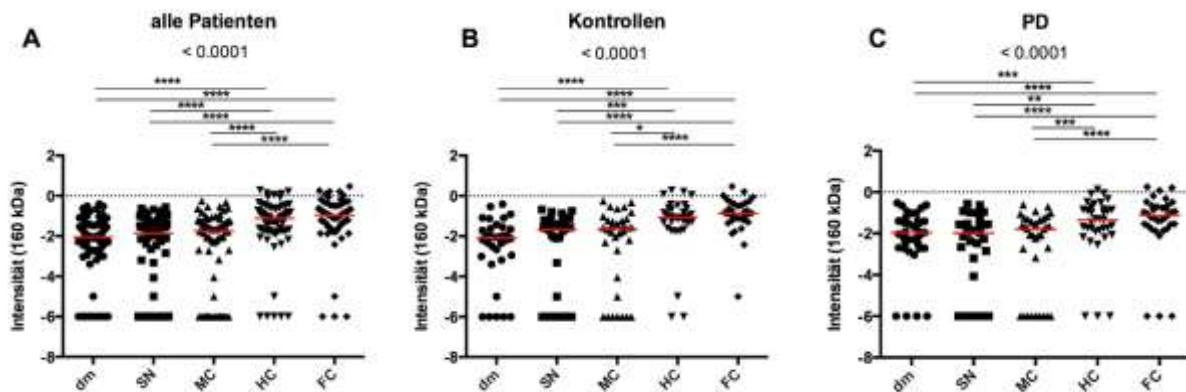


Abbildung 36: Das 160 kDa Protein wird in allen untersuchten Gruppen signifikant stärker in den kortikalen Regionen HC und FC als in den subkortikalen dm und SN erkannt.

Western Blot der Braak-Gehirnareale und Immunfärbung mit Plasma (1:50) bei 4°C ü Nacht. Färbung mit Zweitantikörper anti-L-IgG 1:30 000 1 h RT. Alle drei Gruppen zeigen eine stärkere Immunreaktivität gegen das 160 kDa-Protein in HC und FC als in den übrigen Arealen. ($p < 0.0001$, Friedman-ANOVA, gezeigt werden die Mediane). dm = dorsaler Motornucleus des Glossopharyngeal- und Vagusnervs, SN = Substantia nigra, MC = anteromedialer temporaler Mesocortex, HC = high order sensorische Assoziations- und präfrontale Felder, FC = first order sensorische Assoziations- und prämotorische Felder, und primär sensorische und motorische Felder.

Parkinson-Patienten und Kontrollen zeigen in keinem Gehirnareal signifikante Unterschiede in der Immunreaktivität gegen das Protein bei 160 kDa (Abb. 37)

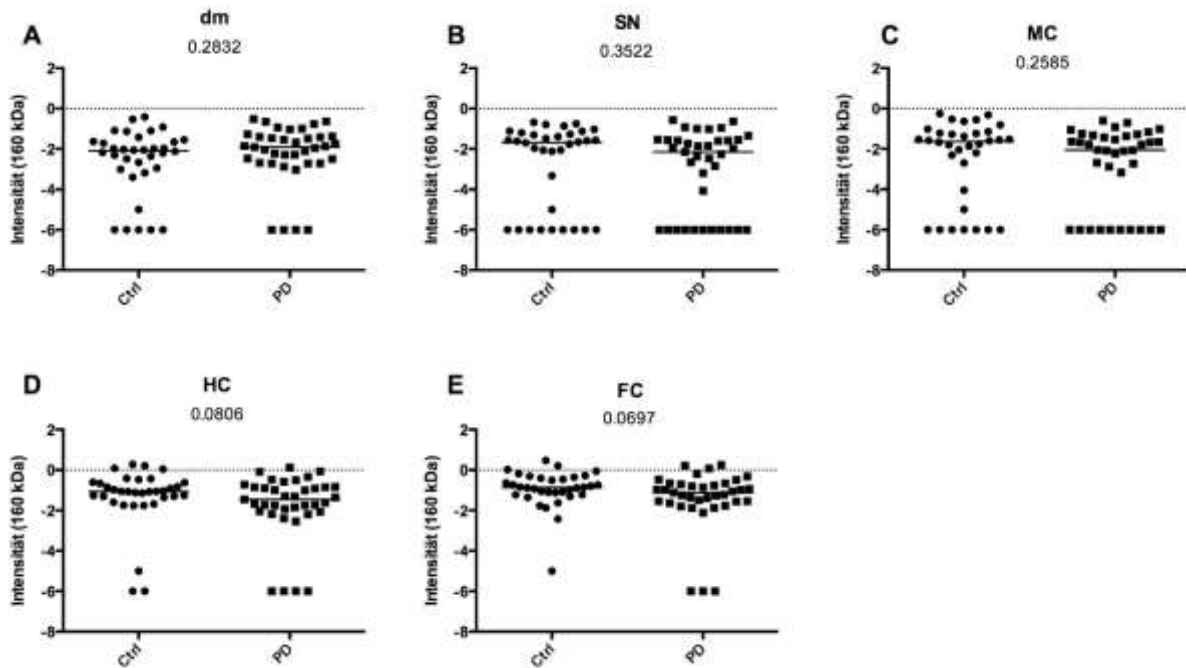


Abbildung 37: Signalintensität gegen ein 160 kDa-Protein unterscheidet sich für keines der Gehirnnareale in PD und Kontrollen.

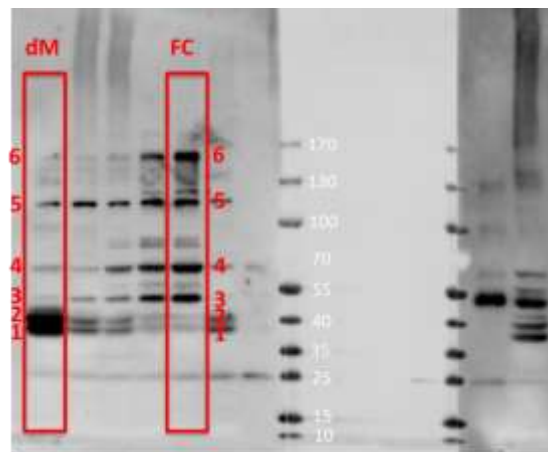
Western Blot der Braak-Gehirnnareale und Immunfärbung mit Plasma (1:50) bei 4°C ü Nacht. Färbung mit Zweitantikörper (anti-L-IgG 1:30 000) 1 h RT (Mann-Whitney-U-Test, gezeigt sind die Mediane). dm = dorsaler Motornucleus des Glossopharyngeal- und Vagusnervs, SN = Substantia nigra, MC = anteromedialer temporaler Mesocortex, HC = high order sensorische Assoziations- und präfrontale Felder, FC = first order sensorische Assoziations- und prämotorische Felder, und primär sensorische und motorische Felder.

Die Analyse nach Geschlecht und Normalisierung zeigte keine Unterschiede (Daten nicht gezeigt).

4.3.6 Identifikation der erkannten Banden

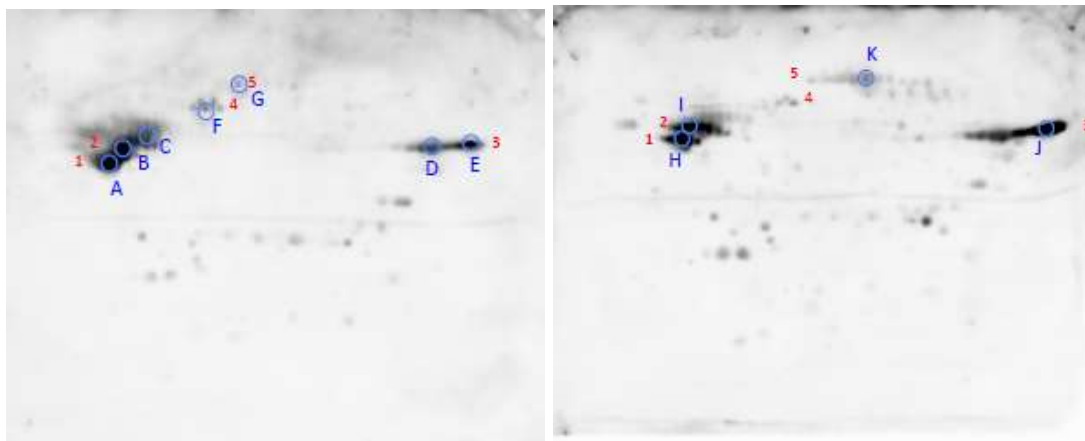
Die in Abb. 38 A rot umrandeten und bezifferten Banden aus den Homogenaten dm und FC wurden von der Proteome Factory AG identifiziert. Dabei wurde ein 2D-Gel angefertigt und geblottet. Die Membran wurde mit einem Patientenserum inkubiert und entwickelt (Abb. 38B). Des Weiteren wurde eine Silberfärbung eines identischen Gels mit denselben Antigenen und Erstantikörpern (Abb. 38C) verglichen, um die richtigen Spots zu isolieren und über nanoHPLC zu identifizieren.

A



B dm

FC



C dm

FC

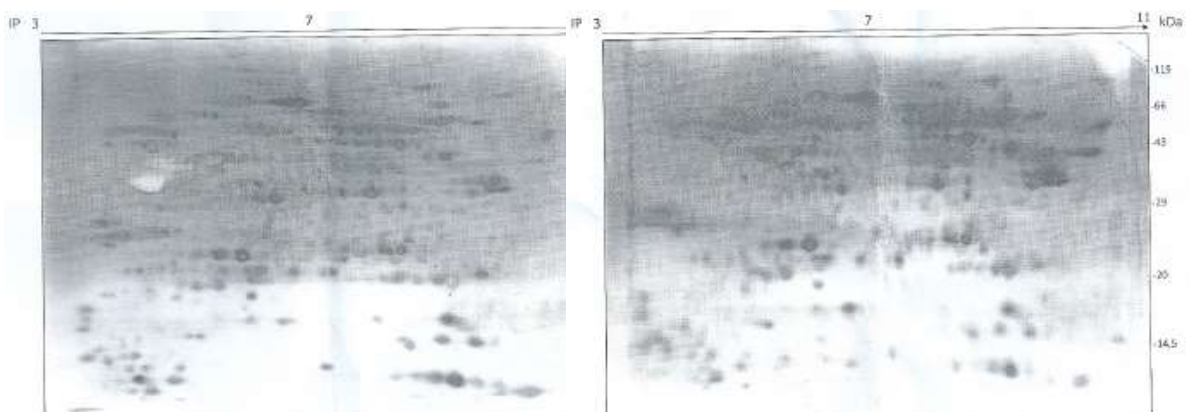


Abbildung 38: 2D Gele mit den Spots, die zur Proteinidentifikation herangezogen wurden.

A 1D Western Blot zeigt die Banden (1 bis 5), die jeweils im dm und FC identifiziert werden sollen. **B** 2D Gel von jeweils dm und FC als Antigen, entwickelt mit Patientenplasma (1:50) und gefärbt mit dem Sekundärantikörper (anti-hu-(L)-IgG 1:30 000). Die umrandeten Spots wurden von Proteome Factory AG identifiziert (Senkrecht: nach Molekulargewicht, waagrecht: nach dem isoelektrischen Punkt aufgetrennt). **C** Silberfärbung des 2D-Gels zur Visualisierung der enthaltenen Proteine. dm und FC enthalten eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine.

Die wahrscheinlichsten Proteine aus der Identifikation sind in Tabelle 11 angegeben. Dabei handelt es sich um verschiedene Proteine des Zytoskeletts von Neuronen und Gliazellen, sowie um ubiquitäre Stoffwechselproteine.

Tabelle 11: nanoHPLC-Identifizierung der im 2D-Gel immungefärbten Banden

Bande	kDa	Spot	Protein	Score	Sequ. Cov.
1	37	A	GFAP Isoform 1	2726	63%
2	40	B	GFAP Isoform 2	2077	57%
	40	C	GFAP Isoform 1	2001	70%
3	45	D	Fructose-Bisphosphate aldolase A Isoform 1	1044	49%
3	45	E	Aspartat-Aminotransferase, mitochondriale isoform 1 Vorläufer	673	24%
4	70	F	Cytosolische nicht-spezifische Dipeptidase, Isoform 1	577	18%
5	160	G	Dihydropyrimidinase-related Protein 2, Isoform 1	1074	34%
1	37	H	GFAP Isoform 1	903	39%
2	40	I	GFAP Isoform 1	1168	42%
3	45	J	Aspartat-Aminotransferase, mitochondriale Isoform 1	1046	39%
5		K	Dihydropyrimidinase-related Protein 2, Isoform 1	1382	50%

Die Banden 1 (37 kDa), 2 (40 kDa) und 3 (45 kDa) des dm (1D Western Blot) entsprechen den Spots A, B & C und D in den 2D Gelen. Die identifizierten Aminosäuresequenzen wurden mit der human Proteindatenbank abgeglichen, die prozentuale Übereinstimmung wurde als Sequence covering angegeben und daraus der score für das Ranking der verschiedenen in Betracht kommenden Proteine berechnet.

Für die 37 und 40 kDa Bande des dm, sowie des FC wurde das Protein als *GFAP* (glial fibrillary acidic protein) identifiziert. Dabei handelt es sich um den Hauptbestandteil der Intermediärfilamente im Zytoplasma von Gliazellen (v.a. Astrozyten im ZNS, aber auch in Schwann-Zellen der peripheren Nervenzellen). Es kommt in humanem ZNS in verschiedenen Isoformen vor und umfasst Molekulargewichte zwischen 35 und 45 kDa.

Das 45 kDa-Protein im dm wurde als *Fructose-Bisphosphate-Aldolase A*, Isoform 1 bezeichnet. Es spielt eine Rolle bei der Glykolyse und kommt ebenfalls in drei Formen vor. Die hier identifizierte Isoform A findet man in Muskelgewebe, B in Erythrozyten und C im Gehirn. Obwohl dieses Protein in der Analyse noch den höchsten Score erreichte (1044), stimmt die Aminosäuresequenz nur zu 49 % mit der von *Fructose-Bisphosphat-Aldolase A* überein, ob es sich dabei also wirklich um dieses Protein handelt, ist fraglich und muss durch weitere Analysen abgeklärt werden.

Mit einem Score von 673 und nur 24 % Übereinstimmung der Aminosäuresequenz lieferte *Aspartat-Aminotransferase* (mitochondriale Isoform 1 Vorläufer) das beste Ergebnis für ein

zweites Protein, das ebenfalls ein Molekulargewicht von 45 kDa hat und damit nur im 2D Western Blot von der *Fructose-Bisphosphat-Aldolase A* zu unterscheiden war. Es ist am Kohlenhydratstoffwechsel beteiligt und somit unabdingbar für alle Eukaryonten.

Beim 160 kDa Protein des dm handelt es sich am wahrscheinlichsten um das *Dihydropyrimidinase-related Protein 2, Isoform 1*, das bei der neuronalen Entwicklung und Polarität, sowie dem Axon-Wachstum und der Bildung des Zytoskeletts eine Rolle spielt. Mit 34 % übereinstimmender Aminosäuresequenz ist jedoch auch hier eine weitere Überprüfung der Richtigkeit vonnöten.

Bei einem weiteren Protein, das im Western Blot ein Molekulargewicht von ca. 70 kDa zeigte, handelt es sich laut nanoHPLC-Analyse um die *Cytosolische nicht-spezifische Dipeptidase, Isoform 1*, das bei der Hydrolyse von Dipeptiden beteiligt ist. Bei einer Sequence covering von nur 18 % ist jedoch zu bezweifeln, ob es sich tatsächlich um dieses ubiquitär vorkommende Protein handelt.

Tabelle 10 zeigt für jeden identifizierten Spot nur das am besten passende Protein. Es kamen jedoch für die einzelnen Banden verschiedene andere Proteine in Betracht, die nach ihrem Score und Sequence covering in absteigender Reihenfolge im Appendix aufgeführt werden. Zu erwähnen wäre allerdings, dass es sich dabei entweder um Bestandteile des Zytoskeletts, wie Intermediärfilamente (*Neurofilament light polypeptide, Synemin, Alpha-Internexin, Ezrin, Neuromodulin, Aktin-β*) handelt, oder aber grundlegende Bestandteile des eukaryontischen Organismus darstellen (*γ-Enolase* in Neuronen und Glia mit neurotropher Funktion, *Paralemmin-1* für axonale und dendritische Filopodienausbildung, *Enophilin A1* als neuronales Protein zur Clathrin-vermittelten Endozytose oder *L1 Protein* als neuronales Zelladhäsionsmolekül und *Haptoglobin* als akut-phase-Glykoprotein, das zirkulierendes Hämoglobin bindet (Beschreibung der einzelnen Antigene bei R&D).

4.3.7 Anzahl der Autoantikörper-Banden

Die Autoreaktivität wurde des Weiteren nach der Anzahl der gezählten Autoantikörper pro Gewebehomogenat analysiert. Dies geschah mit Hilfe des Western tools der Software des Li-Cor-Imagers, bei dem automatisch alle Banden gezählt wurden, die über eine bestimmte Signalstärke hinausging.

In keinem der Gehirnnareale ist ein Unterschied in der Bandenzahl zwischen Parkinson-Patienten und gesunden Kontrollen feststellbar (Abb. 39).

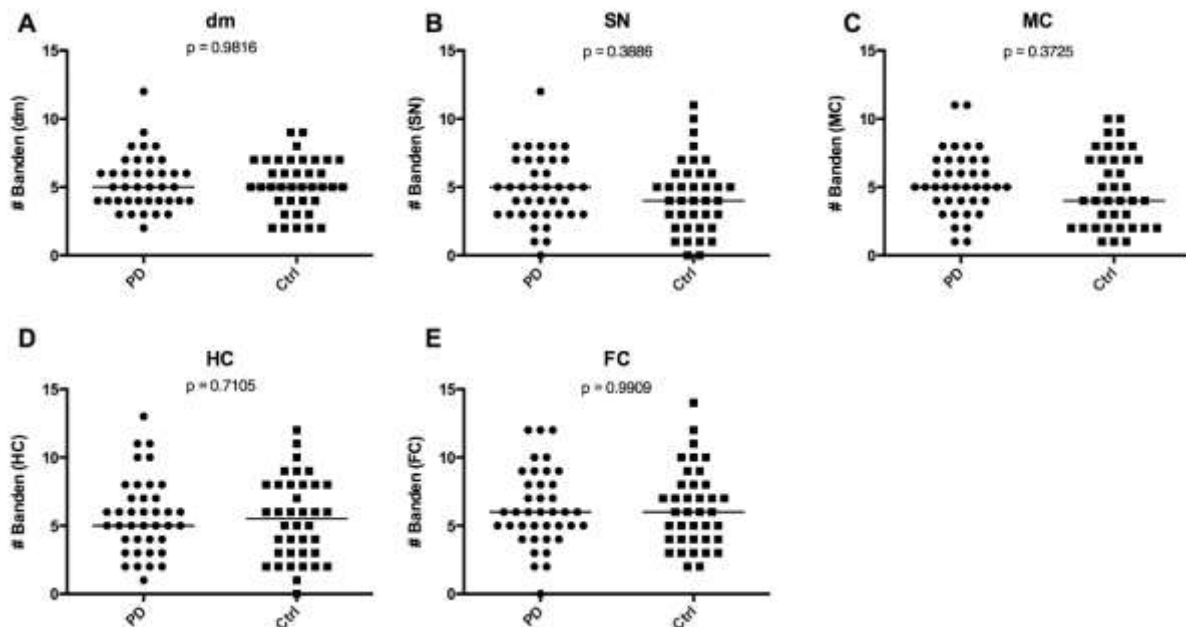


Abbildung 39: Die Anzahl der Autoantikörper-Banden gegen verschiedene Gehirnnareale unterscheidet sich nicht in PD und Kontrollen.

Western Blot der Braak-Gehirnnareale und Immunfärbung mit Plasma (1:50) bei 4°C ü Nacht. Färbung mit Zweitantikörper anti-L-IgG 1:30 000 1 h RT. Mann-Whitney-*U*-Test für nicht normalverteilte Werte, gezeigt wird jeweils der Median. dm = dorsaler Motornucleus des Glossopharyngeal- und Vagusnervs, SN = Substantia nigra, MC = anteromedialer temporaler Mesocortex, HC = high order sensorische Assoziations- und präfrontale Felder, FC = first order sensorische Assoziations- und prämotorische Felder, und primär sensorische und motorische Felder.

Im Vergleich der Anzahl der Autoantikörperbanden in den verschiedenen Gehirnnarealen zeigt die Gruppe der PD-Patienten lediglich eine signifikant höhere Bandenzahl gegen das Areal FC als gegen die SN (Abb. 40 B, $p = 0.0006$, one-way-ANOVA). In der Gruppe der Kontrollen zeigt sich ebenfalls eine höhere Bandenzahl gegen FC als gegen SN und MC, sowie gegen HC als gegen die SN (Abb. 40 C, $p < 0.0001$, one-way-ANOVA). Bei der Gesamtheit der untersuchten Plasmen wurde ebenfalls FC signifikant öfter erkannt als die übrigen Gehirnnareale, des Weiteren zeigt dm mehr Autoantikörperbanden als SN (Abb. 40 A, $p < 0.0001$).

In der Gruppe der Männer ist die Autoantikörper-Anzahl gegen FC signifikant höher als die gegen die übrigen Gehirnnareale, des Weiteren ist die Bandenzahl gegen HC höher als gegen SN (Abb. 40 D, $p < 0.0001$). Bei der Gruppe der Frauen ist die Bandenzahl gegen HC

und FC jeweils signifikant höher als gegen SN, weiterhin zeigen Frauen gegen dm eine signifikant höhere Autoantikörper-Reaktion als SN (Abb. 40 E, $p = 0.0001$).

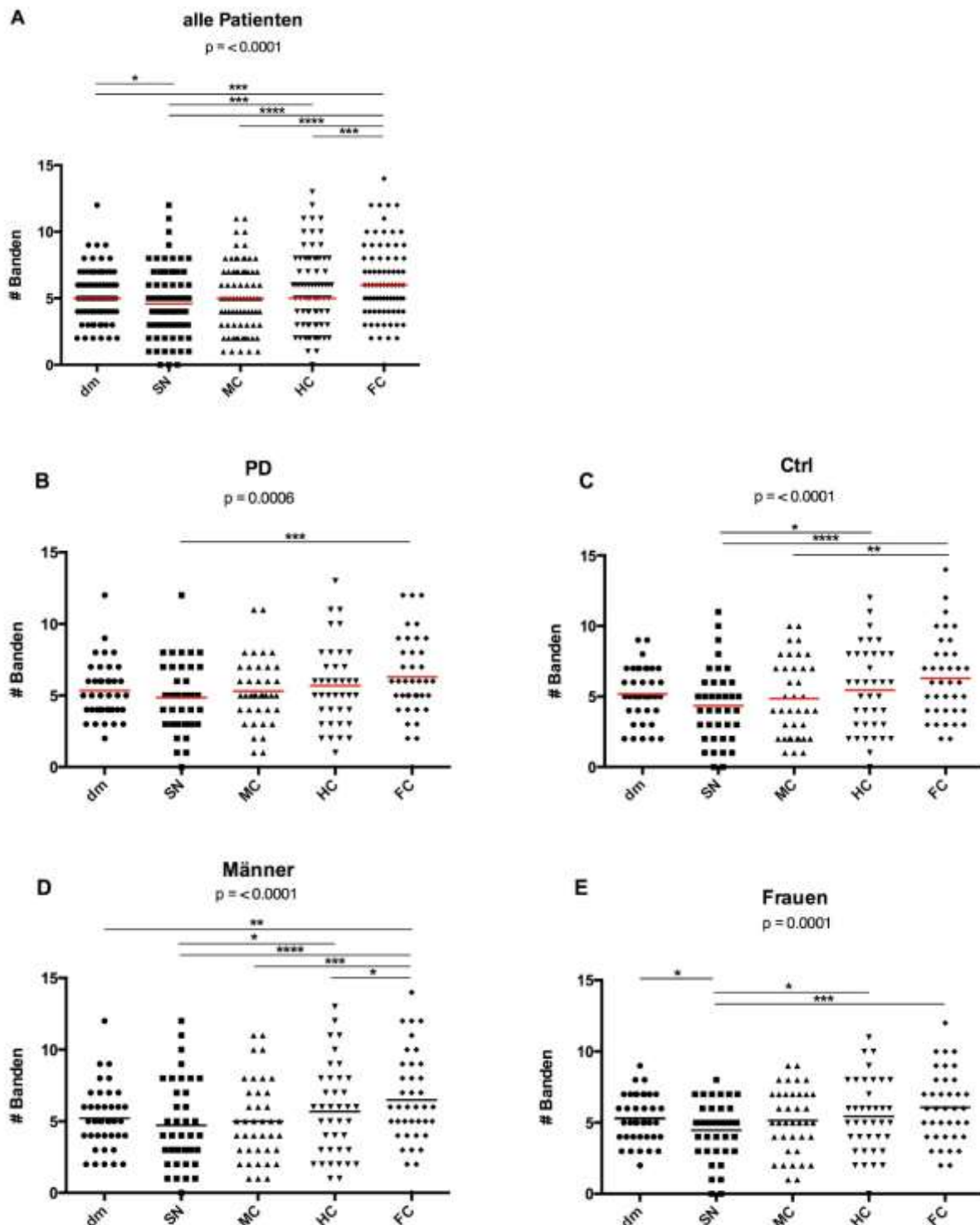
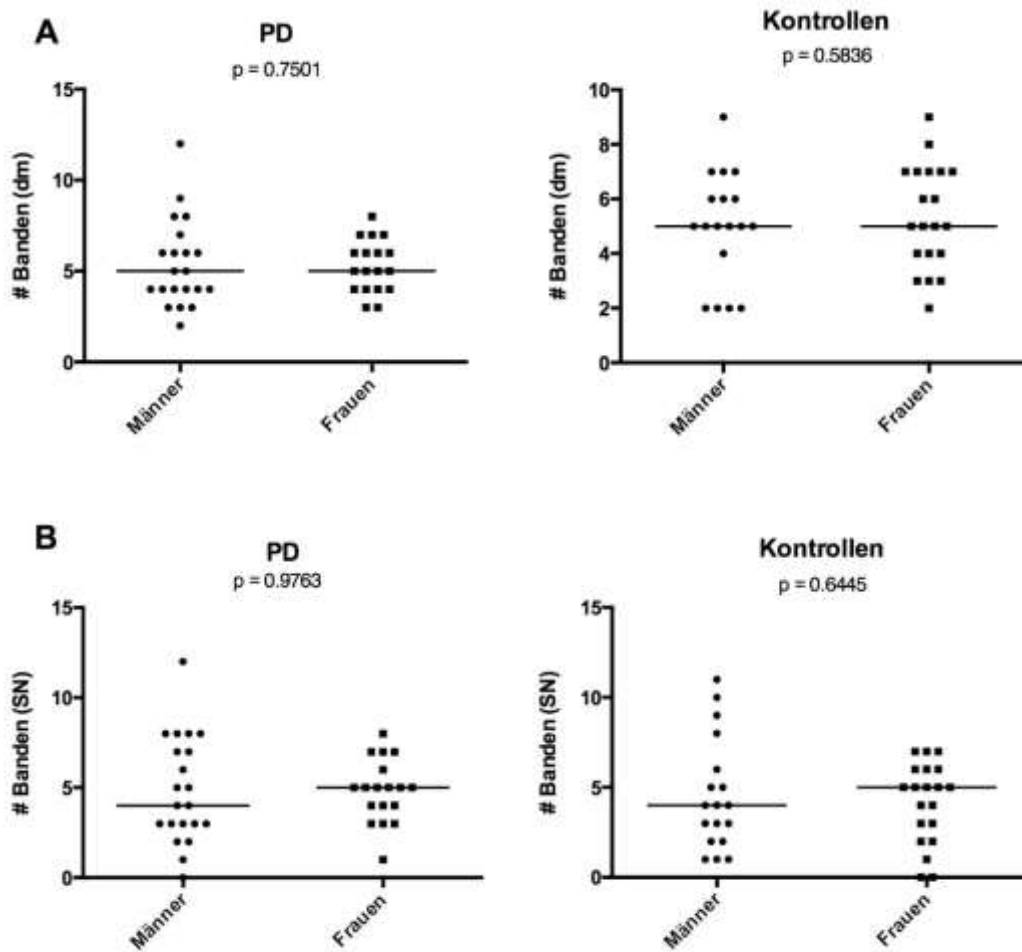


Abbildung 40: Gegen FC zeigen alle Gruppen die höchste Autoantikörperanzahl.

Western Blot der Braak-Gehirnareale und Immunfärbung mit Plasma (1:50) bei 4°C ü.N. Färbung mit Zweitantikörper anti-L-IgG 1:30 000 1 h RT. **A** Bei Betrachtung aller Patienten werden im dm signifikant mehr Proteine erkannt als in SN, jedoch signifikant weniger als im FC. Dieser zeigt signifikant mehr Autoantikörperbanden als SN, MC und HC. ($p = < 0.0001$, Friedman-ANOVA). **B** und **C** Innerhalb der PD-Gruppe zeigt lediglich der FC signifikant mehr Autoantikörperbanden als SN. In der Kontrollgruppe zeigen sowohl HC als auch FC signifikant mehr Autoantikörperbanden als SN, zusätzlich werden im FC signifikant mehr Banden als im MC erkannt ($p = < 0.0001$, Friedman-ANOVA). **D** und **E** Die Gruppe der Männer zeigen gegen

FC signifikant mehr Autoantikörperbanden als gegen dm, SN, MC und HC, zusätzlich werden im HC signifikant mehr Banden erkannt als in der SN ($p \leq 0.0001$, Friedman ANOVA). In der Gruppe der Frauen werden sowohl im dm und HC als auch im FC mehr Autoantikörperbanden als in der SN erkannt ($p \leq 0.0001$, Friedman-ANOVA). dm = dorsaler Motornucleus des Glossopharyngeal- und Vagusnervs, SN = Substantia nigra, MC = anteromedialer temporaler Mesocortex, HC = high order sensorische Assoziations- und präfrontale Felder, FC = first order sensorische Assoziations- und prämotorische Felder, und primär sensorische und motorische Felder.

Der Vergleich zwischen Männern und Frauen in PD- und Kontrollgruppe ergab für keines der untersuchten Gehirnareale einen signifikanten Unterschied in der Autoantikörper-Anzahl (Abb. 41).



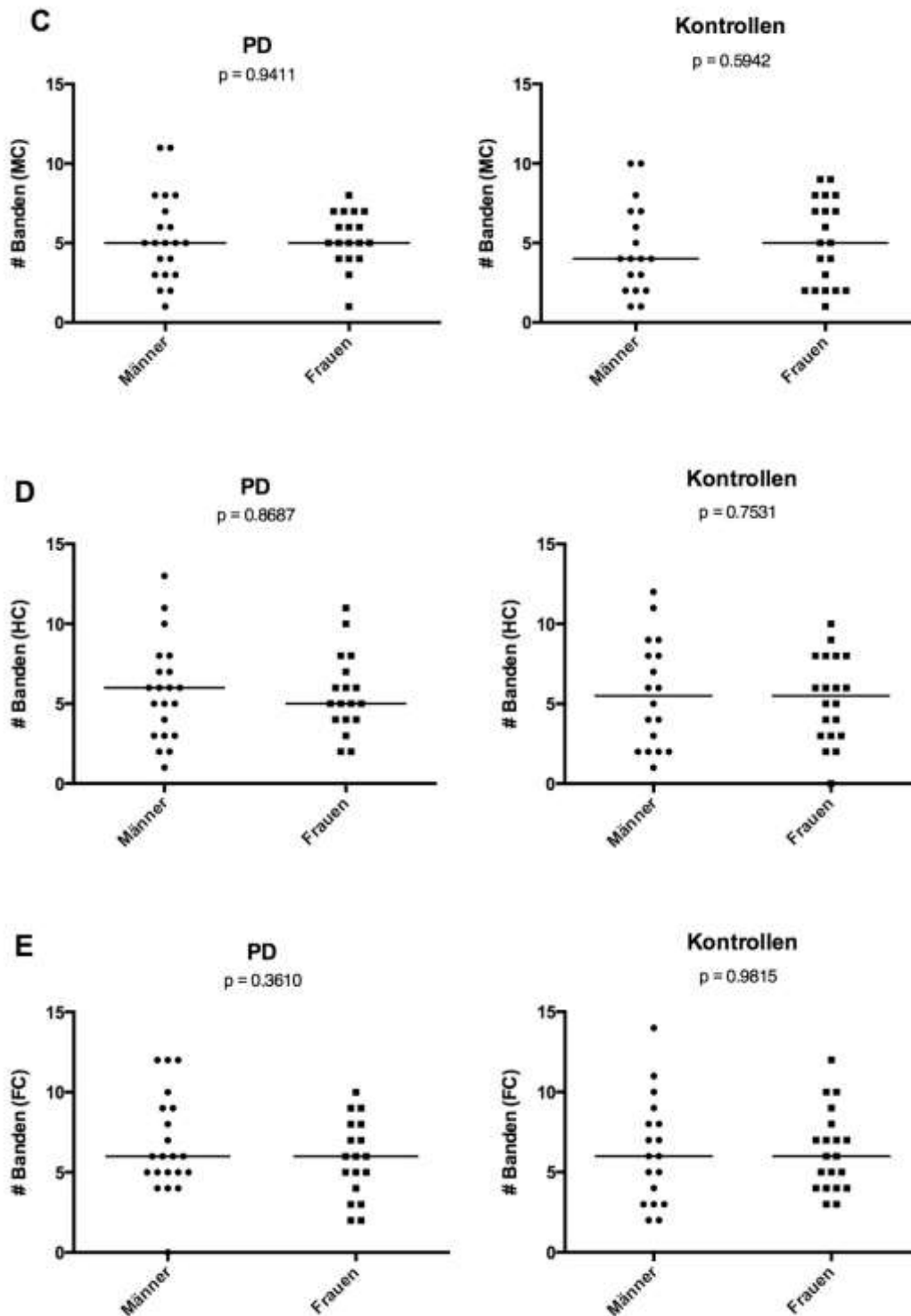


Abbildung 41: Anzahl der Autoantikörperbanden unterscheidet sich nicht zwischen Männern und Frauen innerhalb der PD und Kontrollgruppe.

Western Blot der Braak-Gehirnareale und Immunfärbung mit Plasma (1:50) bei 4°C ü.N. Färbung mit Zweitantikörper anti-L-IgG 1:30 000 1 h RT. In keiner der untersuchten Gruppen und Homogenate zeigen Männer und Frauen eine unterschiedliche Zahl an Autoantikörperbanden (Mann-Whitney-U-Test, gezeigt wird jeweils der Median). dm = dorsaler Motornucleus des Glossopharyngeal- und Vagusnervs, SN = Substantia nigra, MC = anteromedialer temporaler Mesocortex, HC = high order sensorische Assoziations- und präfrontale Felder, FC = first order sensorische Assoziations- und prämotorische Felder, und primär sensorische und motorische Felder.

Auch der Vergleich der Anzahl der Autoantikörperbanden gegen die unterschiedlichen Gehirnareale in männlichen und weiblichen PD- und Kontrollgruppen ergab keine signifikanten Unterschiede (Abb. 42).

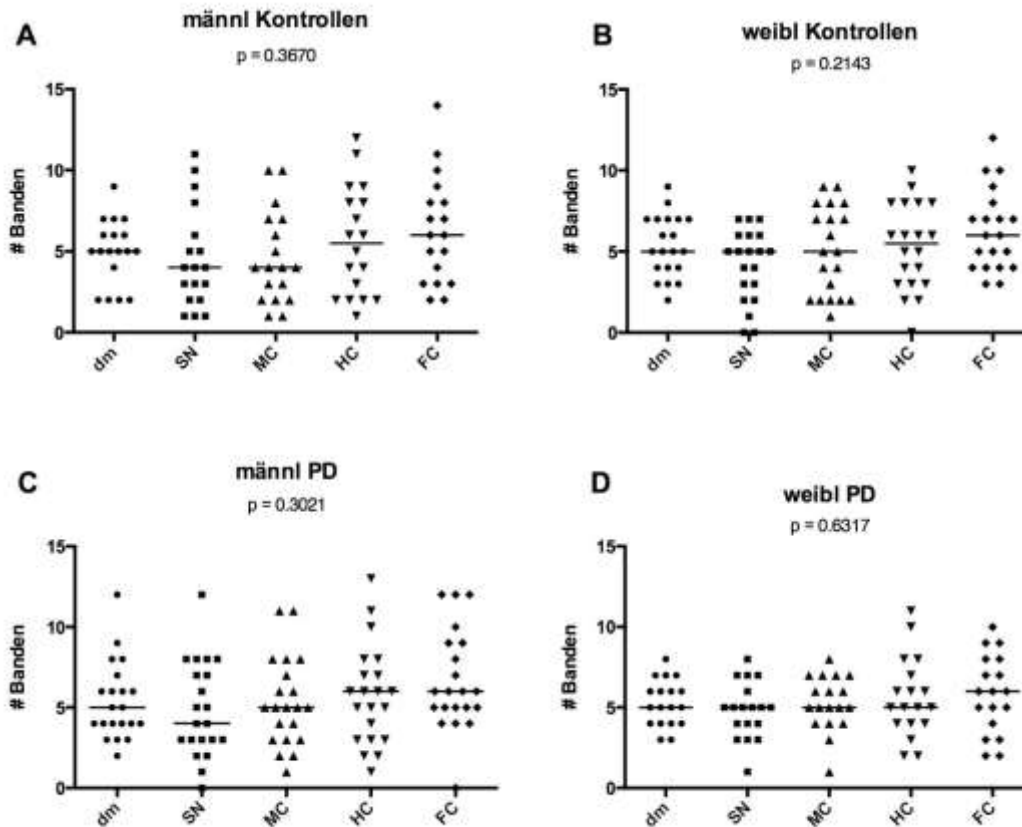


Abbildung 42: Weder männliche, noch weibliche Kontrollen und SN und PD-Patienten zeigen eine signifikant unterschiedliche Anzahl an Autoantikörperbanden gegen die untersuchten Gehirnareale.

Western Blot der Braak-Gehirnareale und Immunfärbung mit Plasma (1:50) bei 4°C ü.N. Färbung mit Zweitantikörper anti-L-IgG 1:30 000 1 h RT. (Friedman-ANOVA, gezeigt ist jeweils der Median). dm = dorsaler Motornucleus des Glossopharyngeal- und Vagusnervs, SN = Substantia nigra, MC = anteromedialer temporaler Mesocortex, HC = high order sensorische Assoziations- und präfrontale Felder, FC = first order sensorische Assoziations- und prämotorische Felder, und primär sensorische und motorische Felder.

4.3.8 HERV-K-RNA Bestimmung der Tübinger Plasma-Proben

Die Isolierung der RNA bzw. DNA aus den Plasmen der Tübinger Kohorte wurde mit dem MiniElute Virus Spin Kit (57704) durchgeführt. Da dieses sowohl RNA als auch DNA isoliert, wurde das HERV-K-Signal mit dem quantiNova-DNA-Kit, das nur RNA vervielfältigt, wie auch mit dem rt-SYBR-Green Kit, das beides RNA und DNA amplifiziert, quantifiziert und die Signale voneinander subtrahiert, um das Netto-RNA-Signal zu erhalten.

Berechnung des HERV-K-DNA/RNA-Gehalts

Die Berechnung der HERV-K-RNA/DNA-Kopienzahl pro ml Plasma wird hier beispielhaft am DNA-Signal gezeigt. Die Amplifikationskurven der Tübinger-Proben (Abb. 43) zeigen die Standardkurven (blau), die Kontrollen und PD-Patienten (grün und pink). Die c_t -Werte liegen zwischen 20 und 32, die 4 Negativkontrollen zeigen keinerlei Signal.

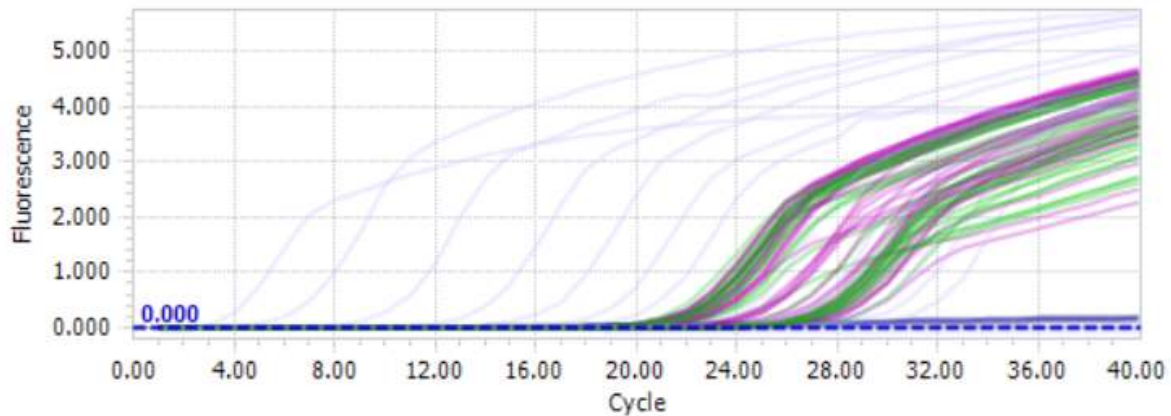


Abbildung 43: Amplifikationskurven der DNA-qPCR.

Der Standard ist in blau eingezeichnet. Die c_t -Werte liegen zwischen 20 und 32, die Negativkontrollen lagen unter der Nachweisgrenze.

Die Schmelzkurvenanalyse (Abb. 44) zeigt, dass alle Produkte die erwartete Schmelztemperatur von 84°C besitzen.

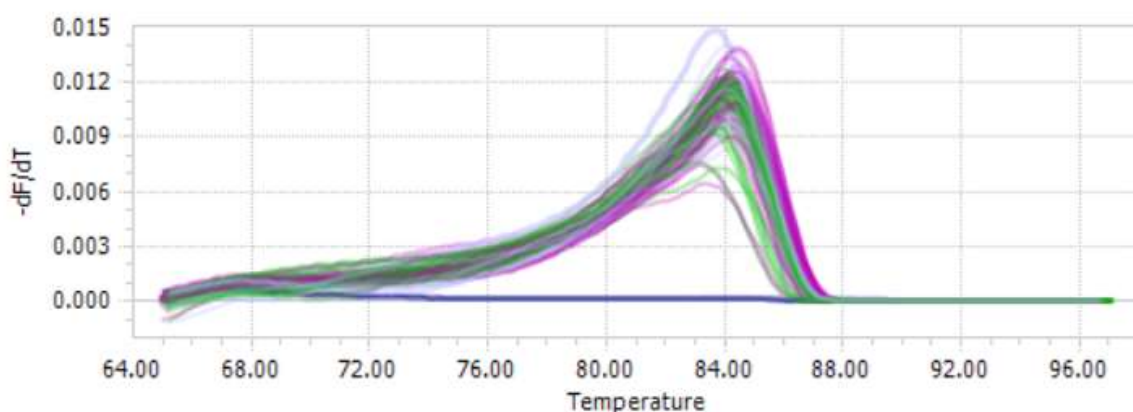


Abbildung 44: Schmelzkurvenanalyse der DNA-qPCR-Produkte.

Alle Produkte besitzen die erwartete Schmelztemperatur von 84°C, bei der Amplifikation handelt es sich demnach um das spezifische HERV-K-Produkt. Die no-template-controls verblieben negativ.

Um die Kopienzahl berechnen zu können, wurde auf die Platte eine Verdünnungsreihe des bekannten A3.01 gDNA-Standards aufgetragen, wodurch eine Interpolation über die

entstehende Standardgerade ermöglicht wird. Außerdem gibt sie das Bestimmtheitsmaß r^2 an, das Aussagen über die Genauigkeit des Standards zulässt ($r^2 = 1$).

Die c_t -Werten und die in Tab. 11 errechneten Kopien an HERV-K (Tab. 12) der Standard-Verdünnungsreihe wurden gegeneinander aufgetragen, um mit der so erzielten Ausgleichsgerade die DNA-Kopienzahl der untersuchten Tübinger Patienten zu extrapolieren. Für die Berechnung der Kopienzahl des 214 bp langen HERV-K gag Produkts wurde ein online tool benutzt (<http://cels.uri.edu/gsc/resources/cndna.html>).

Tabelle 12: Verdünnung des Standards und errechnete HERV-K-DNA-Kopienzahl.

Verdünnung	Konz. (ng/μl)	ng eingesetzt	Kopienzahl	c_t - Werte
10 ⁻²	5.7	14.25	6.17E+10	3.81
10 ⁻³	5.70E-01	1.43E+00	6.19E+09	6.14
10 ⁻⁴	5.70E-02	1.43E-01	6.19E+08	9.83
10 ⁻⁵	5.70E-03	1.43E-02	6.19E+07	13.32
10 ⁻⁶	5.70E-04	1.43E-03	6.19E+06	15.99
3 x 10 ⁻⁷	1.71E-04	4.28E-04	1.85E+06	18.35
10 ⁻⁷	5.70E-05	1.43E-04	6.19E+05	19.91
3 x 10 ⁻⁸	1.71E-05	4.28E-05	1.85E+05	22.37
10 ⁻⁸	5.70E-06	1.43E-05	6.19E+04	23.74
3 x 10 ⁻⁹	1.71E-06	4.28E-06	1.85E+04	26.26
10 ⁻⁹	5.70E-07	1.43E-06	6.19E+04	27.11
3 x 10 ⁻¹⁰	1.71E-07	4.28E-07	1.85E+03	28.8
10 ⁻¹⁰	5.70E-08	1.43E-07	6.19E+02	29.66
3 x 10 ⁻¹¹	1.71E-08	4.28E-08	1.85E+02	31.04
10 ⁻¹¹	5.70E-09	1.43E-08	6.19E+02	-
3 x 10 ⁻¹²	1.71E-09	4.28E-09	1.85E+01	-

In der Tabelle sind die Verdünnungsreihe, die Konzentration, die eingesetzte Konzentration, sowie die in der qPCR erreichten c_t -Werte angegeben. Die Kopienzahl wurde wie oben beschrieben berechnet.

PD-Patienten und Kontrollen zeigen keine unterschiedliche HERV-K Expression (DNA und RNA) (Abb. 45).

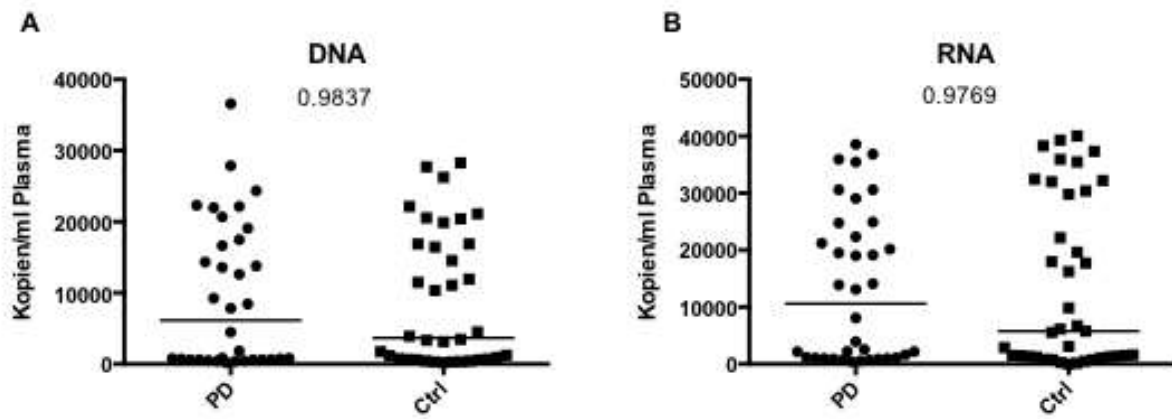


Abbildung 45: PD-Patienten zeigen keine höhere HERV-K DNA- und RNA- Expression als gesunde Kontrollen. **A** DNA-Signal ($p = 0.9837$, Mann-Whitney-U-Test, gezeigt ist der Median). **B** RNA-Signal ($p = 0.9769$, Mann-Whitney-U-Test, gezeigt ist der Median).

V Diskussion

5.1 Auto-Ak gegen Gehirnareale sind ubiquitär präsent in humanem Plasma

In dieser Arbeit wurde die generelle Existenz von Autoantikörpern gegen unterschiedliche Gehirnareale in humanem Blutplasma gezeigt. Auch der Gesamt-IgG-Gehalt (Erwachsene: 7-16 mg/ml <http://www.laborlexikon.de/Lexikon/Infoframe/i/IgG.htm>) unterschied sich weder zwischen PD-Patienten und Gesunden, noch zwischen Männern und Frauen. Die Literatur zu Autoimmunprozessen und der Involvierung von Autoantikörpern in der Pathogenese von PD ist widersprüchlich. Viele bisher erzielte Ergebnisse haben eine Häufung spezifischer Autoantikörper mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen, so auch PD, in Verbindung gebracht, wie im Review von Diamond beschrieben wird (Diamond et al., 2009). So wurden in PD-post-mortem-Gehirnen gehäuft Neuronen-bindende IgGs im Vergleich zu gesunden Gehirnen gefunden (Depboylu et al., 2011). Weiterhin wurden signifikant mehr Autoantikörper gegen alpha-Synuklein in genetischem PD (Papachroni et al., 2007), dsDNA, Neuronen und Gehirn-Homogenate (Benkler et al., 2012) und gegen von Glia-Zellen abstammende Proteine (Papuc et al., 2014) entdeckt.

In dieser Arbeit wurde zunächst keine unterschiedliche Autoreaktivität gegen verschiedene Gehirnareale zwischen PD und Kontrollen gefunden. Wir konnten zeigen, dass Autoantikörper in allen Individuen vorkommen, wobei weder die Anzahl der erkannten Proteine im Gewebe noch die Summe der Intensitäten der Autoantikörperbindungen innerhalb der unterschiedlichen Hirnareale mit PD korrelierte. Das Vorkommen von natürlichen auto-IgMs ist schon seit längerem bekannt (Haurly et al., 1997; Hooijkaas, Benner, Pleasants, & Wostmann, 1984; Merbl, Zucker-Toledano, Quintana, & Cohen, 2007), sie wurden auch in humanen Seren gefunden (Levin et al., 2010; Madi et al., 2009; Mouthon et al., 1995). Das Auftreten von auto-IgGs wurde jedoch lange Zeit mit pathologischen Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht, die – wie man annahm - durch den Zusammenbruch der Selbsttoleranz entsteht (Baumgarth, 2011).

Bei der Untersuchung der Signalintensität gegen die verschiedenen Hirnareale getrennt nach Geschlechtern stellten wir fest, dass weibliche PD-Patienten signifikant stärker den olfaktorischen dm erkennen als männliche Patienten (Abb. 24). Bei den übrigen Gehirnarealen ist jedoch kein Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Spenderplasmen vorhanden.

Ob dieses Ergebnis eine Rolle bei der Entwicklung oder Progression von PD spielt, ist nicht geklärt. In der Vergangenheit wurde schon häufiger gezeigt, dass Frauen signifikant höhere Autoantikörper-Level besitzen als Männer (E. P. Nagele et al., 2013) und öfter an autoimmunologischen Fehlregulationen leiden (Shoenfeld, Tincani, & Gershwin, 2012). Fest steht jedoch, dass alle Individuen gegen Selbstantigene gerichtete (Auto-) Antikörper im Plasma besitzen. In neueren Arbeiten wurde gezeigt, dass auto-IgGs auch in gesunden Seren vorkommen (Han, Nagele, DeMarshall, Acharya, & Nagele, 2012; R. G. Nagele et al., 2011). Weitere Ergebnisse aus verschiedenen Studien über den immunologischen Hintergrund von neurodegenerativen Erkrankungen bestätigen dies. So untersuchte Dahm et al. 2014 die Seroprävalenz von Autoantikörpern gegen gefrorene Gehirnsektionen in Kontrollen und verschiedenen Krankheitsgruppen, u. a. auch PD, und stellte keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollen und erkrankten Personen fest (Dahm et al., 2014). Maetzler hat 2013 verschiedene Antigene als potentiell Ziel von Autoantikörpern mittels ELISA untersucht und kam zu keinem signifikanten Ergebnis (Maetzler et al., 2014). Des Weiteren wurde die Präsenz von Autoantikörpern gegen bestimmte Membranproteine aus Gehirnhomogenaten von verschiedenen Spezies gezeigt (human, Schwein, Ratte) (Levin et al., 2010). Selbst in nicht-autoimmunologischen Erkrankungen wie Krebs und neurologischen Dysfunktionen wurden Auto-IgGs entdeckt (Bournia & Vlachoyiannopoulos, 2012; Pisetsky, 2012; Sokolove et al., 2012; Tsonis, Avrameas, & Moutsopoulos, 2007). Dies gibt Hinweise darauf, dass die Pathogenese von PD nicht wie bisher angenommen mit einem erhöhte Autoantikörperlevel im Blutplasma einhergeht; es wurde sogar gezeigt, dass manche Krankheiten, darunter PD, AD und MS mit einem signifikant niedrigeren Autoantikörperlevel korrelieren als in gesunden Kontrollen (E. P. Nagele et al., 2013). Welchen Zweck die Autoantikörper erfüllen und ob sie ausschlaggebend für die Pathogenese von autoimmunologischen Prozessen sind, wurde diskutiert. Nagele und Mitarbeiter schlagen eine Art Beseitigungsmechanismus vor, der den menschlichen Körper von alten und nicht mehr benötigten Proteinen und Peptiden befreit (E. P. Nagele et al., 2013).

5.2 Hypothese eines Beseitigungsmechanismus durch Auto-Ak im Gehirn

Insbesondere 3 Banden (bei 45, 40 und 37 kDa) wurden in nahezu jedem Gehirnareal erkannt, wobei PD-Patienten eine signifikant schwächere Immunreaktivität gegen das 45 kDa-Protein

in den Gehirnarealen SN, MC und FC als gesunde Kontrollen zeigten. Bei der Untersuchung nach dem Geschlecht stellten wir sogar fest, dass lediglich männliche PD-Patienten ein hochsignifikant schwächeres Auto-IgG-Signal gegen dieses Protein zeigen als männliche Kontrollen, wohingegen zwischen weiblichen PD-Patienten und Kontrollen kein Unterschied festzustellen war. Diese Ergebnisse unterstützen bisherige Studien, die PD, AD und MS mit geringeren Auto-IgG-Konzentrationen assoziierten (E. P. Nagele et al., 2013).

Die Proteinidentifizierung legt nahe, dass es sich bei den Proteinen mit 38, 40 und 45 kDa um verschiedene Isoformen des GFAP (glial fibrillary acidic protein) handeln könnte, einem Intermediärfilament, das v.a. in Astrozyten exprimiert wird und eine Rolle bei der Versorgung von benachbarten Neuronen und bei der Bildung der Blut-Hirn-Schranke eine Rolle spielt (Eng 2000). Bisher wurden 10 verschiedene Isoformen und weitere Splice-Varianten, sowie unterschiedliche Abbauprodukte des Proteins in humanem Gewebe und CSF gefunden (Reeves 2005). Wie im Review von Yang und seinen Mitarbeitern beschrieben (Z. Yang & Wang, 2015) korreliert die GFAP-Expression mit verschiedenen Krankheiten wie AD (Kamphuis 2014, Hol2003) und anderen neurologischen Erkrankungen (Zhang 2000), wobei posttranslationale Modifikationen und unterschiedliche Abbauprodukte im Blut oder CSF der Patienten als Biomarker für fortschreitende Neurodegeneration fungieren könnten (Plog 2015). Unsere Ergebnisse zeigen, dass die vermuteten GFAP-Proteine in den untersuchten Gehirnarealen unterschiedlich stark erkannt werden, was auf ein unterschiedliches Expressionsmuster verschiedener Isoformen hindeuten könnte. Auch könnten unterschiedliche posttranslationale Modifikationen dafür sorgen, dass das Protein ein neues Erscheinungsbild für das Immunsystem erhält und so unterschiedlich erkannt wird. So hat man nach einer experimentellen Ischämie in Schweinegehirnen eine vermehrte Expression von phosphoryliertem GFAP festgestellt (Sullivan et al., 2012), acetylierte Lysinreste findet man v.a. bei amyotropher Lateralsklerose (ALS) (D. Liu et al., 2013). Eine wichtige Rolle spielt die Desaminierung von Arginin-Resten zu Citrullin (Jin et al., 2013), das im Verdacht steht, eine Autoimmunantwort hervorrufen zu können (Gyorgy, Toth, Tarcsa, Falus, & Buzas, 2006; Romero et al., 2013), und als Antigen in bestimmten neurologischen Erkrankungen erkannt wurde (Z. Zhang et al., 2014). Yang und seine Mitarbeiter stellen die Hypothese auf, dass durch Hirntraumata der Prozess der Astroglieose in Gang gesetzt wird, bei dem die Astrozyten vermehrt GFAP exprimieren und infolgedessen hypertrophieren (Tzeng, Hsiao, & Mak, 2005;

F. Yang et al., 2014), wie es nach traumatischer Gehirnschädigung und auch für Parkinson-Patienten beschrieben wurde (Czlonkowska & Kurkowska-Jastrzebska, 2011; Lopategui Cabezas, Herrera Batista, & Penton Rol, 2014; Sofroniew, 2009; Yu et al., 2010; Z. Zhang et al., 2014). Vorstellbar wäre dabei, dass GFAP in unterschiedlichen Isoformen oder deren Abbauprodukte das Gehirn über das Ventrikelsystem oder die Blut-Hirn-Schranke verlässt und in der Peripherie als Autoantigen die Bildung von anti-GFAP-Autoantikörpern induzieren könnte (Z. Yang & Wang, 2015), was unsere Funde bei allen untersuchten Probanden erklären würde. So wurde in mehreren Studien gezeigt, dass GFAP in verschiedenen neurodegenerativen Prozessen, aber auch bei Autismus und bei chronischer zerebralen vaskulären Erkrankungen als Autoantigen wirken kann (Ishida et al., 1997; Moneim, Shamy, el-Gazzar, & el-Fawal, 1999; Poletaev, Morozov, Gnedenko, Zlunikin, & Korzhenevsky, 2000). In wie weit die gebildeten Autoantikörper gegen GFAP eine Rolle bei der Auslösung neurodegenerativer Prozesse eine Rolle spielt, ist nicht geklärt. Evtl. spielt eine strikte Balance zwischen Verletzungen neuronaler Strukturen und der Bildung von Autoantikörpern eine wichtige Rolle bei der Homöostase der neuronalen Funktionalität. In der Tat wurde beschrieben, dass der Ausprägungsgrad der Gliose über die Regeneration der betroffenen Hirnstrukturen entscheidet. So wirkt sich eine leichte Gliose nach Traumata positiv aus, während eine starke Gliose mit anschließenden entzündlichen Prozessen negative Folgen auf die funktionelle und strukturelle neuronale Regeneration hat (Sofroniew, 2009).

Die Präsenz von Autoantikörpern in humanem Serum auch in gesunden Personen wurde generell diskutiert. Sie könnte durch infektiöse Agentien oder Hypermutation hervorgerufen werden (E. P. Nagele et al., 2013), allerdings spricht die Fülle an Auto-Ak nicht für einen pathogenen Mechanismus. Vielmehr liegt laut Nagele und Mitarbeitern der Verdacht einer physiologischen Schlüsselfunktion nahe, bei der Auto-Ak beschädigte Zellbestandteile und zellulären Debris unter pathologischen Bedingungen beseitigen (Acharya et al., 2012; Koval et al., 2011; R. G. Nagele et al., 2011) und so zur Homöostase im gesamten Körper beitragen (Avrameas, 1991; Avrameas, Ternynck, Tsonis, & Lymberi, 2007). Eine verminderte Konzentration an Autoantikörpern gegen neuronale Strukturen könnte so eine Erklärung dafür sein, dass in PD-Patienten weniger Proteine durch Autoantikörper detektiert wurden, als in Gesunden. Die Hypothese einer Korrelation von einem verminderten Auto-Ak-Level mit unterschiedlichen Krankheiten wird durch weitere Studien gestützt. So wurde gezeigt, dass

gegen Myelin gerichtete Auto-Ak im ZNS nach Nervenverletzungen die axonale Regeneration positiv beeinflussen können (Vargas, Watanabe, Singh, Robinson, & Barres, 2010), wodurch die Regeneration des Gehirns nach neuronaler Verletzung vorangetrieben werden würde. In autistischen Kindern wurden signifikant weniger IgG- und IgM-Level festgestellt, als in gesunden gleichaltrigen Kindern, die ferner mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelierte (Heuer et al., 2008).

In der Tat ergab die Proteinidentifikation der 37, 40 und 45 kDa-, sowie der 160 kDa Bande keine für eines der Hirnareale oder dopaminerge Zellen spezifischen Proteine. Bei allen in Betracht kommenden Proteine handelt es sich entweder um Intermediärfilamente, die am Zytoskelett neuronaler Zellen oder Astrozyten (*GFAP*) beteiligt sind, oder um ubiquitär vorkommende Proteine des Metabolismus von Eukaryonten. Diese Funde deuten darauf hin, dass es sich bei PD nicht um eine Autoimmunerkrankung im eigentlichen Sinne handelt, bei der ein spezifisches Protein im Gehirn erkannt und zerstört wird. Vielmehr geben unsere Ergebnisse in Übereinstimmung mit bisherigen veröffentlichten Studien Anlass zur Vermutung, dass PD eine Erkrankung ist, die mit einer verminderten Debris-Beseitigung und damit einhergehenden Ablagerungen im Gehirn korreliert. Es wäre denkbar, dass nach Traumata oder neuronalen Verletzungen Zellen des ZNS absterben und die neuronale Regeneration durch verringerte Bildung von Autoantikörpern nur noch vermindert oder nicht mehr stattfinden kann.

Denkbar wäre auch, dass die sich mit der Zeit anhäufenden Zellbestandteile zur Entwicklung von autoimmunologischen Prozessen führen könnten. So haben wir festgestellt, dass in allen untersuchten Gruppen alle drei Proteine (37, 40, 45 kDa) signifikant stärker im dm als in den anderen Homogenaten erkannt werden (alle, PD und Kontrollen). Von diesen drei Banden zeigte jeweils das 37 kDa-Protein in jedem Areal und für jede untersuchte Gruppe eine signifikant stärkere Autoreaktivität als die beiden übrigen Banden. Ob es sich bei diesem Protein tatsächlich um *GFAP* handelt, und wenn ja, welche Isoform oder Modifikation zur Bildung von Autoantikörpern führt, muss in weiteren Experimenten geklärt werden. Ein weiteres häufig erkanntes Protein mit der Größe von ca. 160 kDa wurde interessanterweise nicht - wie die niedermolekularen Proteine zwischen 45 und 37 kDa in den subkortikalen Arealen dm, SN und MC besonders stark gebunden, es zeigt vielmehr eine signifikant stärkere Immunreaktivität gegen die kortikalen Regionen HC und FC. Es wäre zu vermuten, dass dieses

Protein eher für kortikale Demenzen eine Rolle spielen könnte. Durchaus wurden Autoantikörper wie beispielsweise gegen den Angiotensin-Rezeptor in Alzheimer-Patienten identifiziert (Giil et al., 2015).

Mit diesen Proteinbanden wurden evtl. die für die starke Immunreaktion verantwortlichen Autoantigene in den jeweiligen Gehirngeweben entdeckt, die bei einer Infiltration des Gehirns mit den im Blut vorhandenen Autoantikörpern erkannt und zerstört werden. Die unterschiedliche Verteilung der Immunreaktivität mit dem als stärkstes erkanntes Gebiet lässt womöglich auf die stärkere Expression des Proteins und damit mehr Angriffsfläche für autoimmunologische Prozesse schließen.

5.3 Gehirn als immunprivilegiertes Areal – Blut-Hirn-Schranke

Die Tatsache, dass Autoantikörper gegen Gehirnproteine in allen Individuen vorhanden sind zeigt, dass die PD-Pathogenese nicht in erster Linie mit der Bildung von Autoantikörpern in Zusammenhang steht. Vielmehr verhindert eine intakte Blut-Hirn-Schranke den Durchtritt von löslichen Proteinen mit einem Molekulargewicht von mehr als 400 kDa (Pardridge, 2007) (Ohtsuki & Terasaki, 2007), und Lipiden von mehr als 180 Da, wodurch der passive Durchtritt von Antigenen, Antikörpern und anderen Immunzellen nicht möglich ist. Während der Entwicklung des Immunsystems wird die Ausbildung der peripheren Toleranz somit nicht gewährleistet. Bei der Bildung der zentralen Toleranz im Thymus ist zudem fraglich, wie viele Peptide aus dem Gehirn und anderen immunprivilegierten Bereichen über das Protein AIRE exprimiert und damit als körpereigen gespeichert werden. Die Tatsache, dass wir und andere Arbeitsgruppen generell Autoantikörper in humanem Plasma gefunden haben, zeigt dessen Potenzial, eine Autoimmunerkrankung oder zumindest autoimmunologische Prozesse auszulösen, falls diese mit ihrem spezifischen Antigen in Kontakt geraten. Bei PD könnte demnach nicht die Präsenz von Autoantikörpern sondern der Zusammenbruch bzw. die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke das ausschlaggebende Ereignis darstellen, wodurch die Autoimmun-IgG und andere Immunzellen Zugang zum Gehirn erlangen, ihre spezifischen Strukturen binden und so zum Abbau markieren. Früher wurde die Blut-Hirn-Schranke als feste Struktur mit undurchdringlicher Barrierefunktion betrachtet. Heute ist deren Bild jedoch das einer dynamischen Struktur (wie im Review von Keaney dargestellt (Keaney & Campbell,

2015)), die durch verschiedene Transporter den Durchtritt von Nährstoffen und anderen Molekülen erlaubt (Abbott, Patabendige, Dolman, Yusof, & Begley, 2010). Die Durchlässigkeit ist ebenso keinesfalls immer gleich, sondern kann sich im Verlauf des Lebens aufgrund unterschiedlicher Einflüsse verändern. So wurde eine erhöhte Durchlässigkeit nach einem ischämischen Schlaganfall gezeigt (Khatri, McKinney, Swenson, & Janardhan, 2012). Weiterhin können Gehirnverletzungen zu einer erhöhten Permeabilität führen (Lampron, Elali, & Rivest, 2013). Die an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligten Endothelzellen sezernieren dabei TNF- α und IL-1 β , was zur Expression von ICAM-1 und vCAM-1, und damit zur transendothelialen Migration von Lymphozyten (Greenwood, Wang, & Calder, 1995) und zur Umbildung des Zytoskeletts und der tight junctions der Blut-Hirn-Schranke führt (Montagne et al., 2015; Sagar et al., 2012). Auch der Einfluss von Pathogenen könnte die Durchlässigkeit erhöhen. So wurde gezeigt, dass Streptokokken Endothelzellen infizieren und damit tight junctions dysregulieren (B. J. Kim et al., 2015). Auch unter den Viren gibt es mit dem West-Nil-Virus einen Vertreter, der eine Enzephalitis auslöst und damit die tight junctions ebenfalls durchlässig werden lässt (Roe et al., 2012). Bei einer peripheren Entzündungsreaktion im Körper und damit verbundenen erhöhten Zytokin-Leveln ist die Blut-Hirn-Schranke funktionell gestört (Keaney & Campbell, 2015; Rochfort, Collins, Murphy, & Cummins, 2014). Damit könnte die Blut-Hirn-Schranke eine zentrale Rolle in der Pathogenese von PD spielen. Im Moment gibt es nur sehr wenige Daten über deren Funktion während des PD-Krankheitsverlaufs, allerdings ist nicht zu vergessen, dass erste PD-Symptome erst dann auftreten, wenn bereits 60 % der DA-Neuronen im Gehirn degeneriert sind (Bernheimer et al., 1973). Das bedeutet, dass der Auslöser von PD bereits Jahre bis Jahrzehnte vor der Diagnose Parkinson aufgetreten sein kann. Demnach wäre es nicht verwunderlich, zum Zeitpunkt der Diagnose oder danach eine intakte Blut-Hirn-Schranke vorzufinden.

Wir haben für jedes Gehirnareal die Intensität der Immunreaktivität auch im Bezug auf die Geschlechtszugehörigkeit untersucht. Dabei zeigten weibliche PD-Patientinnen eine signifikant stärkere Immunantwort gegen das olfaktorische Gehirnareal dm als männliche. In den Kontrollen und in allen anderen Gehirnarealen war dagegen kein signifikanter Unterschied festzustellen. Männer leiden häufiger an PD als Frauen (Van Den Eeden et al., 2003). Wenn man die Einflussfaktoren auf die Blut-Hirn-Schranke berücksichtigt, so stellt man fest, dass das weibliche Geschlechtshormon Östrogen eine schützende Rolle in

neuroinflammatorischen Prozessen spielt und sich damit positiv auf die Integrität der Blut-Hirn-Schranke auswirkt. So hat Östrogen eine anti-inflammatorische Wirkung (Czlonkowska, Ciesielska, Gromadzka, & Kurkowska-Jastrzebska, 2005) z. B. durch das Herabregulieren von iNOS (inducible Nitrogen Oxide Synthase), einem Entzündungsmarker (Cignarella et al., 2009). Da das initiale Ereignis eine Schwächung der Blut-Hirn-Schranke und damit den Beginn der autoimmunologischen Prozesse bei der Pathogenese von PD darstellen könnte, und möglicherweise bereits Jahrzehnte vor dessen Ausbruch auftritt, was dementsprechend vor dem weiblichen Klimakterium läge, so wären Frauen trotz höherer Autoantikörperreaktivität gegen dm besser vor einem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke und damit neurodegenerativen Prozessen im Gehirn geschützt.

5.4 dm wird stärker erkrankt als alle anderen Gehirnbereiche

Jedes Patienten-Plasma wurde auf die Autoantikörperreaktivität gegen die verschiedenen Gehirnareale getestet, die laut Braak zu den unterschiedlichen Stufen der PD-Pathogenese zählen. Er postulierte die Hypothese, dass die PD-Pathogenese nicht in der Substantia nigra beginnt, wo Neurodegeneration zum Ausbleichen der Struktur aufgrund des Verlusts der Neuromelanin-haltigen Zellen führt und damit die bekannten motorischen PD-Symptome nach sich zieht. Vielmehr konnte er zeigen, dass die ersten Läsionen bereits im Hirnstamm auftreten, besonders in den olfaktorischen Gehirnarealen und dem dorsalen Motornukleus des Glossopharynx- und des Vagusnervs dm. Läsionen in diesem Areal kennzeichnet Stufe 1 der PD-Pathogenese, die lange vor der Diagnose auftritt und für die der Verlust oder die Einschränkung des Geruchssinns beschrieben ist (Braak, Del Tredici, et al., 2003; Braak, Ghebremedhin, Rub, Bratzke, & Del Tredici, 2004; Geisler & Murphy, 2000; Hawkes, Shephard, & Daniel, 1997, 1999; Meshulam, Moberg, Mahr, & Doty, 1998). Laut Braak pflanzen sich die Läsionen entlang des retrograden axonalen Transports über lange, wenig myelinisierte Projektionsneuronen in die damit verbundenen Gehirnareale fort, wodurch die weiteren Stufen 2 bis 5 definiert werden (2: Locus coeruleus, 3: SN, 4: temporaler Mesocortex, 5: Neocortex, hoch-sensorische Assoziations- und präfrontale Felder), bis sie als letztes in Stufe 6 auch den FC (first-order sensory association areas, Prämotorischen Felder) erreicht haben (Braak, Del Tredici, et al., 2003).

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass für jede der untersuchten Gruppen (alle Patienten, PD und Kontrollen) das olfaktorische Gehirnareal dm signifikant stärker von Autoantikörpern erkannt wird als die übrigen Areale SN, MC, HC und FC. Dies bedeutet, dass im Blutplasma eines jeden Individuums signifikant mehr Autoantikörper gegen die olfaktorischen Areale des Gehirns gebildet werden, als gegen die restlichen für die Braak-Stufen relevanten. Braak deutete seine Ergebnisse als eine chronologische Abfolge der „Infektion“ der betroffenen Areale. In Betracht kam ein Mechanismus, der Prionen-ähnlich zur Fehlfaltung von alpha-Synuklein und damit zur Bildung der in PD vorkommenden pathologischen Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten führt (Braak, Rub, et al., 2003; Gelb, Oliver, & Gilman, 1999; Lewy, 1912; Liautard, 1991). Das aggregierte alpha-Synuklein, so Braak, könnte sich über die Projektionsneuronen in alle anderen Gehirnareale ausbreiten und so die unterschiedlichen Braak-Stufen kennzeichnen. Eine andere Hypothese ist die von neurotrophen Viren, die zunächst das enterische Nervensystem befallen und sich dann ebenfalls über die wenig myelinisierten Axone der Projektsneuronen ausbreiten und so Läsionen im Gehirn betroffener Personen bewirken (Braak, Rub, et al., 2003; P. Brown, 2001).

Unsere Daten deuten jedoch nicht auf eine zeitliche Abfolge der Neurodegeneration in PD-Gehirnen hin. Vielmehr lässt die Tatsache, dass in humanem Plasma deutlich mehr Autoantikörper gegen dm als gegen die anderen Gehirnareale vorhanden sind, vermuten, dass dieser Bereich des Gehirns bei einer vorübergehenden Permeabilisierung der Blut-Hirn-Schranke viel mehr den negativen Folgen der Opsonisierung und Aktivierung der Mikroglia ausgesetzt ist. Die Tatsache, dass Braak die ersten Läsionen im dm entdeckt, könnte das Ungleichgewicht der zirkulierenden Autoantikörper widerspiegeln. So würden die Braak-Stadien der PD-Pathogenese nicht die zeitliche Abfolge des Krankheitsverlaufs, sondern eine unwiderrufliche Folge der Öffnung der Blut-Hirn-Schranke, und damit dem Eintritt der schädigenden Autoantikörper kennzeichnen, bei dem die Überzahl an anti-dm-Ak in diesem Bereich einen deutlich höheren Schaden, jedoch in der gleichen Zeitspanne, anrichtet als in den anderen Bereichen.

5.5 Bedeutung des entwickelten Verfahrens als diagnostischer Test für Morbus Parkinson

Der in dieser Arbeit entwickelte Test (Nachweis der 45 kDa-Bande aus SN-Gewebe) hat eine Sensitivität von 82.9 %, wonach 82.9 von 100 erkrankten Personen keine Bande gegen das 45 kDa Protein zeigen. Die Spezifität liegt bei 41.2 %; 58.8 % der gesunden Personen zeigen keine Autoimmun-Bande gegen das 45 kDa-Protein in der SN und werden demnach fälschlicherweise als krank erkannt. Als Bestätigungstest ist dieses Verfahren folglich nicht geeignet, da durch die geringe Spezifität eine hohe Rate an falsch-positiven Ergebnissen zu erwarten wäre. Als Suchtest wäre dieses Verfahren eher denkbar, weil die Sensitivität mit 82.9 % deutlich höher ist als die Spezifität. Dennoch wäre in 17.1 % der Fälle ein falsch-negatives Ergebnis zu erwarten, was bedeutet, dass 17 von 100 PD-Patienten nicht erkannt würden. Um den Test auf die Bevölkerung anwenden zu können, ist es nötig, die PD-Prävalenz (0.5 %) mit einzubeziehen. Demnach ergibt sich ein positiv prädiktiver Wert (PPV) von 0.70 %, was bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit, dass eine Person an PD leidet, die keine Bande gegen das 45 kDa-Protein in der SN zeigt, nur bei 0.70 % liegt. Andererseits leiden Personen, die eine Autoreaktivität gegen das 45 kDa-Protein der SN zeigen, zu 99.79 % (negativ prädiktiver Wert, NPV) an PD und in nur 0.21 % liegt ein falsch negatives Ergebnis vor.

In der Gruppe der Männer liegt die Sensitivität sogar bei 100 %, alle untersuchten PD-Patienten werden demnach als positiv erkannt. Gesunde werden jedoch mit einer Spezifität von nur 55.56 % als gesund erkannt. Der Nachweis der Autoantikörper-Bande in SN-Gewebe ist aufgrund seiner hohen Sensitivität sehr gut als Suchtest geeignet, da er alle erkrankten Personen erkennt. Als Bestätigungstest ist er jedoch ungeeignet, da durch die relativ niedrige Spezifität eine sehr hohe falsch-positive Rate zu erwarten ist, und dadurch 44.44 % der Gesunden fälschlicherweise als erkrankt erkannt werden. Für Männer ergibt sich ein positiv prädiktiver Wert von 1.12 %, d.h. wenn im Test keine Bande gegen das 45 kDa-Protein vorhanden ist, liegt der Test nur in 1.12 % der Fälle richtig und es liegt tatsächlich eine PD vor. Andererseits bedeutet die Präsenz der Autoimmun-Bande in 100 % (NPV) der Fälle, dass die untersuchte Person gesund ist.

Auch die Autoimmun-Banden gegen das 45 kDa Protein in den übrigen Geweben MC und FC, sowie in allen untersuchten Gruppen (Männer, Frauen, alle) zeigen NPVs zwischen 99.15 und 100 %. Selbstverständlich liegt der Methode eine sehr geringe Stichprobenzahl zugrunde, die

noch einmal in größerem Maßstab überprüft werden sollte. Jedoch könnte dieser Test eine einfache und schnelle Untersuchungsmöglichkeit für eine vorliegende PD-Erkrankung darstellen.

Die in diesem Projekt untersuchten Patienten zeigten bereits eine klinisch manifeste Parkinson-Symptomatik. Ob der hier entwickelte Test die Möglichkeit bietet, PD auch im Frühstadium zu erkennen, muss noch untersucht werden. Wenn man jedoch bedenkt, dass sich die Pathogenese der Erkrankung über Jahre erstrecken kann, wäre zu vermuten, dass PD-Patienten ihre Autoimmun-Bande gegen das 45 kDa-Protein im Lauf der Zeit verlieren (und die Signalintensität beim manifesten PD unter den Cutoff von log-5 fällt). Anhand longitudinaler Studien könnte sich zeigen, ob das Verschwinden der Autoimmunbande mit einer PD-Progression korreliert.

5.6 HERV-RNA-Expression hat keine Pathogenese-Indikation

Wie im Review von Weiss dargestellt, kann HERV-K abhängig vom Gesundheitszustand in eine aktive Form übergehen (Weiss, 2006) und in verschiedenen Geweben und im Blut der betroffenen Personen nachgewiesen werden. Besonders mit autoimmunologischen Erkrankungen wie Rheumatoider Arthritis (Freimanis et al., 2010; Reynier et al., 2009) und Amyotropher Lateralersklerose (Douville, Liu, Rothstein, & Nath, 2011) wurde eine erhöhte HERV-K-Expression in Verbindung gebracht. Bei einer möglichen Beteiligung des Immunsystems bei der Pathogenese von PD wurde in dieser Arbeit die HERV-K-Expression in Tübinger Patientenplasmen untersucht. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied in der RNA- und DNA-Expression von HERV-K im Plasma von PD festgestellt werden. Damit eignet sich eine Plasma-Analyse von PD-Patienten nicht als Indikator oder gar Biomarker für den Krankheitsverlauf. Um jedoch jeden Zweifel zu beseitigen wäre es sinnvoll, zusätzlich zum Plasma auch post-mortem-Gehirne und PBMCs auf eine HERV-K-Expression zu untersuchen. Studien mit HIV-Patienten-Material haben gezeigt, dass auch in diesen Arealen eine HERV-Expression gemessen werden konnte. So wurde eine erhöhte HERV-K-pol-Expression in Gehirnen mit neuroinflammatorischen Erkrankungen wie Multipler Sklerose und HIV festgestellt (Johnston et al., 2001). Des Weiteren zeigte die Gruppe von Bhardway 2014 eine erhöhte HERV-K-Expression in PBMCs von HIV-Patienten, wohingegen die Plasma-Level keinen

Unterschied zwischen Kontrollen und Patienten ergaben (Bhardwaj, Maldarelli, Mellors, & Coffin, 2014). Widersprüchliche Ergebnisse zu Blutuntersuchungen lassen die Existenz von HERV-K-Transkripten zweifelhaft erscheinen, so konnte Contreras-Galindo 2012 eine signifikant höhere HERV-K-Expression im Blut von HIV- und AIDS- Patienten feststellen (Contreras-Galindo et al., 2012), wohingegen Vincendeau keine Korrelation zwischen HIV-1-Leveln und einer HERV-Aktivierung zeigen konnte (Vincendeau et al., 2015). Um die Rolle der HERV-K-RNA als möglichen Indikator oder gar Biomarker in der Pathogenese von Parkinson benennen zu können, sind weitere Untersuchungen einer größeren Kohorte und in unterschiedlichem Patientenmaterial vonnöten.

Literaturverzeichnis

- Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*, *37*(1), 13-25. doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.030
- Acharya, N. K., Nagele, E. P., Han, M., Coretti, N. J., DeMarshall, C., Kosciuk, M. C., . . . Nagele, R. G. (2012). Neuronal PAD4 expression and protein citrullination: possible role in production of autoantibodies associated with neurodegenerative disease. *J Autoimmun*, *38*(4), 369-380. doi: 10.1016/j.jaut.2012.03.004
- Adler, A. J., Marsh, D. W., Yochum, G. S., Guzzo, J. L., Nigam, A., Nelson, W. G., & Pardoll, D. M. (1998). CD4+ T cell tolerance to parenchymal self-antigens requires presentation by bone marrow-derived antigen-presenting cells. *J Exp Med*, *187*(10), 1555-1564.
- Akkaraju, S., Ho, W. Y., Leong, D., Canaan, K., Davis, M. M., & Goodnow, C. C. (1997). A range of CD4 T cell tolerance: partial inactivation to organ-specific antigen allows nondestructive thyroiditis or insulinitis. *Immunity*, *7*(2), 255-271.
- Albert, M. L., Feldman, R. G., & Willis, A. L. (1974). The 'subcortical dementia' of progressive supranuclear palsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *37*(2), 121-130.
- Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*, *12*(10), 366-375.
- Alexander, G. E., & Crutcher, M. D. (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci*, *13*(7), 266-271.
- Aloisi, F. (2001). Immune function of microglia. *Glia*, *36*(2), 165-179.
- Andersson, A. C., Venables, P. J., Tonjes, R. R., Scherer, J., Eriksson, L., & Larsson, E. (2002). Developmental expression of HERV-R (ERV3) and HERV-K in human tissue. *Virology*, *297*(2), 220-225.
- Angulo, J. A., & McEwen, B. S. (1994). Molecular aspects of neuropeptide regulation and function in the corpus striatum and nucleus accumbens. *Brain Res Brain Res Rev*, *19*(1), 1-28.
- Antony, J. M., Deslauriers, A. M., Bhat, R. K., Ellestad, K. K., & Power, C. (2011). Human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: innocent bystanders or disease determinants? *Biochim Biophys Acta*, *1812*(2), 162-176. doi: 10.1016/j.bbadis.2010.07.016
- Arango-Lasprilla, J. C., Rogers, H., Lengenfelder, J., Deluca, J., Moreno, S., & Lopera, F. (2006). Cortical and subcortical diseases: do true neuropsychological differences exist? *Arch Clin Neuropsychol*, *21*(1), 29-40. doi: 10.1016/j.acn.2005.07.004
- Arendt, G., Hefter, H., Elsing, C., Strohmeyer, G., & Freund, H. J. (1990). Motor dysfunction in HIV-infected patients without clinically detectable central-nervous deficit. *J Neurol*, *237*(6), 362-368.
- Arendt, G., Maecker, H. P., Purrmann, J., & Homberg, V. (1994). Control of posture in patients with neurologically asymptomatic HIV infection and patients with beginning HIV-1-related encephalopathy. *Arch Neurol*, *51*(12), 1232-1235.
- Avrameas, S. (1991). Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunol Today*, *12*(5), 154-159. doi: 10.1016/s0167-5699(05)80045-3
- Avrameas, S., Ternynck, T., Tsonis, I. A., & Lymberi, P. (2007). Naturally occurring B-cell autoreactivity: a critical overview. *J Autoimmun*, *29*(4), 213-218. doi: 10.1016/j.jaut.2007.07.010
- Bach, J. F. (2005). Infections and autoimmune diseases. *J Autoimmun*, *25 Suppl*, 74-80. doi: 10.1016/j.jaut.2005.09.024
- Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, *392*(6673), 245-252. doi: 10.1038/32588
- Baumgarth, N. (2011). The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol*, *11*(1), 34-46. doi: 10.1038/nri2901

- Ben-Shachar, D., Riederer, P., & Youdim, M. B. (1991). Iron-melanin interaction and lipid peroxidation: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem*, *57*(5), 1609-1614.
- Ben-Shlomo, Y., Wenning, G. K., Tison, F., & Quinn, N. P. (1997). Survival of patients with pathologically proven multiple system atrophy: a meta-analysis. *Neurology*, *48*(2), 384-393.
- Benkler, M., Agmon-Levin, N., Hassin-Baer, S., Cohen, O. S., Ortega-Hernandez, O. D., Levy, A., . . . Shoenfeld, Y. (2012). Immunology, autoimmunity, and autoantibodies in Parkinson's disease. *Clin Rev Allergy Immunol*, *42*(2), 164-171. doi: 10.1007/s12016-010-8242-y
- Benkler, M., Agmon-Levin, N., & Shoenfeld, Y. (2009). Parkinson's disease, autoimmunity, and olfaction. *Int J Neurosci*, *119*(12), 2133-2143. doi: 10.3109/00207450903178786
- Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K., & Seitelberger, F. (1973). Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci*, *20*(4), 415-455.
- Bhardwaj, N., Maldarelli, F., Mellors, J., & Coffin, J. M. (2014). HIV-1 infection leads to increased transcription of human endogenous retrovirus HERV-K (HML-2) proviruses in vivo but not to increased virion production. *J Virol*, *88*(19), 11108-11120. doi: 10.1128/jvi.01623-14
- Bianchi, F. B., Muratori, P., Granito, A., Pappas, G., Ferri, S., & Muratori, L. (2007). Hepatitis C and autoreactivity. *Dig Liver Dis*, *39 Suppl 1*, S22-24.
- Bieda, K., Hoffmann, A., & Boller, K. (2001). Phenotypic heterogeneity of human endogenous retrovirus particles produced by teratocarcinoma cell lines. *J Gen Virol*, *82*(Pt 3), 591-596. doi: 10.1099/0022-1317-82-3-591
- Bock, M., & Stoye, J. P. (2000). Endogenous retroviruses and the human germline. *Curr Opin Genet Dev*, *10*(6), 651-655.
- Boeke, J. D., & Stoye, J. P. (1997). Retrotransposons, Endogenous Retroviruses, and the Evolution of Retroelements. In J. M. Coffin, S. H. Hughes & H. E. Varmus (Eds.), *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bolam, J. P., Hanley, J. J., Booth, P. A., & Bevan, M. D. (2000). Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat*, *196 (Pt 4)*, 527-542.
- Bolam, J. P., & Smith, Y. (1992). The striatum and the globus pallidus send convergent synaptic inputs onto single cells in the entopeduncular nucleus of the rat: a double anterograde labelling study combined with postembedding immunocytochemistry for GABA. *J Comp Neurol*, *321*(3), 456-476. doi: 10.1002/cne.903210312
- Boller, K., Konig, H., Sauter, M., Mueller-Lantzsch, N., Lower, R., Lower, J., & Kurth, R. (1993). Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for the human teratocarcinoma-derived retrovirus HTDV. *Virology*, *196*(1), 349-353. doi: 10.1006/viro.1993.1487
- Boller, K., Schonfeld, K., Lischer, S., Fischer, N., Hoffmann, A., Kurth, R., & Tonjes, R. R. (2008). Human endogenous retrovirus HERV-K113 is capable of producing intact viral particles. *J Gen Virol*, *89*(Pt 2), 567-572. doi: 10.1099/vir.0.83534-0
- Bournia, V. K., & Vlachoyiannopoulos, P. G. (2012). Subgroups of Sjogren syndrome patients according to serological profiles. *J Autoimmun*, *39*(1-2), 15-26. doi: 10.1016/j.jaut.2012.03.001
- Braak, H., & Del Tredici, K. (2009). Neuroanatomy and pathology of sporadic Parkinson's disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, *201*, 1-119.
- Braak, H., Del Tredici, K., Bratzke, H., Hamm-Clement, J., Sandmann-Keil, D., & Rub, U. (2002). Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *J Neurol*, *249 Suppl 3*, Iii/1-5.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R. A., Jansen Steur, E. N., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, *24*(2), 197-211.

- Braak, H., Ghebremedhin, E., Rub, U., Bratzke, H., & Del Tredici, K. (2004). Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res*, *318*(1), 121-134. doi: 10.1007/s00441-004-0956-9
- Braak, H., Rub, U., Gai, W. P., & Del Tredici, K. (2003). Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm (Vienna)*, *110*(5), 517-536. doi: 10.1007/s00702-002-0808-2
- Brew, B. J., Rosenblum, M., Cronin, K., & Price, R. W. (1995). AIDS dementia complex and HIV-1 brain infection: clinical-virological correlations. *Ann Neurol*, *38*(4), 563-570. doi: 10.1002/ana.410380404
- Brown, L. L., Schneider, J. S., & Lidsky, T. I. (1997). Sensory and cognitive functions of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol*, *7*(2), 157-163.
- Brown, P. (2001). The pathogenesis of transmissible spongiform encephalopathy: routes to the brain and the erection of therapeutic barricades. *Cell Mol Life Sci*, *58*(2), 259-265.
- Brown, R. G., & Marsden, C. D. (1988). 'Subcortical dementia': the neuropsychological evidence. *Neuroscience*, *25*(2), 363-387.
- Buscher, K., Hahn, S., Hofmann, M., Trefzer, U., Ozel, M., Sterry, W., . . . Denner, J. (2006). Expression of the human endogenous retrovirus-K transmembrane envelope, Rec and Np9 proteins in melanomas and melanoma cell lines. *Melanoma Res*, *16*(3), 223-234. doi: 10.1097/01.cmr.0000215031.07941.ca
- Buscher, K., Trefzer, U., Hofmann, M., Sterry, W., Kurth, R., & Denner, J. (2005). Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. *Cancer Res*, *65*(10), 4172-4180. doi: 10.1158/0008-5472.can-04-2983
- Cabin, D. E., Shimazu, K., Murphy, D., Cole, N. B., Gottschalk, W., McIlwain, K. L., . . . Nussbaum, R. L. (2002). Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-Synuklein. *J Neurosci*, *22*(20), 8797-8807.
- Chandra, S., Fornai, F., Kwon, H. B., Yazdani, U., Atasoy, D., Liu, X., . . . Sudhof, T. C. (2004). Double-knockout mice for alpha- and beta-Synukleins: effect on synaptic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(41), 14966-14971. doi: 10.1073/pnas.0406283101
- Chang, R. C., Hudson, P., Wilson, B., Haddon, L., & Hong, J. S. (2000). Influence of neurons on lipopolysaccharide-stimulated production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha by cultured glia. *Brain Res*, *853*(2), 236-244.
- Chang, R. C., Hudson, P., Wilson, B., Liu, B., Abel, H., Hemperly, J., & Hong, J. S. (2000). Immune modulatory effects of neural cell adhesion molecules on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by cultured glia. *Brain Res Mol Brain Res*, *81*(1-2), 197-201.
- Chao, C. C., Hu, S., Molitor, T. W., Shaskan, E. G., & Peterson, P. K. (1992). Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol*, *149*(8), 2736-2741.
- Chao, C. C., Hu, S., & Peterson, P. K. (1995). Modulation of human microglial cell superoxide production by cytokines. *J Leukoc Biol*, *58*(1), 65-70.
- Charlett, A., Dobbs, R. J., Dobbs, S. M., Weller, C., Brady, P., & Peterson, D. W. (1999). Parkinsonism: siblings share Helicobacter pylori seropositivity and facets of syndrome. *Acta Neurol Scand*, *99*(1), 26-35.
- Chastain, E. M., & Miller, S. D. (2012). Molecular mimicry as an inducing trigger for CNS autoimmune demyelinating disease. *Immunol Rev*, *245*(1), 227-238. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01076.x
- Chen, H., Jacobs, E., Schwarzschild, M. A., McCullough, M. L., Calle, E. E., Thun, M. J., & Ascherio, A. (2005). Nonsteroidal antiinflammatory drug use and the risk for Parkinson's disease. *Ann Neurol*, *58*(6), 963-967. doi: 10.1002/ana.20682
- Chen, H., Zhang, S. M., Hernan, M. A., Schwarzschild, M. A., Willett, W. C., Colditz, G. A., . . . Ascherio, A. (2003). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. *Arch Neurol*, *60*(8), 1059-1064. doi: 10.1001/archneur.60.8.1059

- Chen, S., Le, W. D., Xie, W. J., Alexianu, M. E., Engelhardt, J. I., Siklos, L., & Appel, S. H. (1998). Experimental destruction of substantia nigra initiated by Parkinson disease immunoglobulins. *Arch Neurol*, *55*(8), 1075-1080.
- Chen, Z., & Freedman, M. S. (2011). gammadelta T cells and multiple sclerosis: Friends, foes, or both? *Autoimmun Rev*, *10*(6), 364-367. doi: 10.1016/j.autrev.2010.12.005
- Chervonsky, A. V. (2010). Influence of microbial environment on autoimmunity. *Nat Immunol*, *11*(1), 28-35. doi: 10.1038/ni.1801
- Cignarella, A., Bolego, C., Pelosi, V., Meda, C., Krust, A., Pinna, C., . . . Maggi, A. (2009). Distinct roles of estrogen receptor-alpha and beta in the modulation of vascular inducible nitric-oxide synthase in diabetes. *J Pharmacol Exp Ther*, *328*(1), 174-182. doi: 10.1124/jpet.108.143511
- Cleeter, M. W., Cooper, J. M., & Schapira, A. H. (1992). Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: evidence for free radical involvement. *J Neurochem*, *58*(2), 786-789.
- Contreras-Galindo, R., Kaplan, M. H., Contreras-Galindo, A. C., Gonzalez-Hernandez, M. J., Ferlenghi, I., Giusti, F., . . . Markovitz, D. M. (2012). Characterization of human endogenous retroviral elements in the blood of HIV-1-infected individuals. *J Virol*, *86*(1), 262-276. doi: 10.1128/jvi.00602-11
- Cordingley, G. E., & Weight, F. F. (1986). Non-cholinergic synaptic excitation in neostriatum: pharmacological evidence for mediation by a glutamate-like transmitter. *Br J Pharmacol*, *88*(4), 847-856.
- Cornford, M. E., Holden, J. K., Boyd, M. C., Berry, K., & Vinters, H. V. (1992). Neuropathology of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS): report of 39 autopsies from Vancouver, British Columbia. *Can J Neurol Sci*, *19*(4), 442-452.
- Crossman, A. R. (2000). Functional anatomy of movement disorders. *J Anat*, *196* (Pt 4), 519-525.
- Cummings, J. L. (1986). Subcortical dementia. Neuropsychology, neuropsychiatry, and pathophysiology. *Br J Psychiatry*, *149*, 682-697.
- Cummings, J. L., & Benson, D. F. (1988). Psychological dysfunction accompanying subcortical dementias. *Annu Rev Med*, *39*, 53-61. doi: 10.1146/annurev.me.39.020188.000413
- Czlonkowska, A., Ciesielska, A., Gromadzka, G., & Kurkowska-Jastrzebska, I. (2005). Estrogen and cytokines production - the possible cause of gender differences in neurological diseases. *Curr Pharm Des*, *11*(8), 1017-1030.
- Czlonkowska, A., & Kurkowska-Jastrzebska, I. (2011). Inflammation and gliosis in neurological diseases--clinical implications. *J Neuroimmunol*, *231*(1-2), 78-85. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.09.020
- Dahm, L., Ott, C., Steiner, J., Stepniak, B., Teegen, B., Saschenbrecker, S., . . . Ehrenreich, H. (2014). Seroprevalence of autoantibodies against brain antigens in health and disease. *Ann Neurol*, *76*(1), 82-94. doi: 10.1002/ana.24189
- Dale, R. C., Church, A. J., Surtees, R. A., Lees, A. J., Adcock, J. E., Harding, B., . . . Giovannoni, G. (2004). Encephalitis lethargica syndrome: 20 new cases and evidence of basal ganglia autoimmunity. *Brain*, *127*(Pt 1), 21-33. doi: 10.1093/brain/awh008
- Darvesh, S., & Freedman, M. (1996). Subcortical dementia: a neurobehavioral approach. *Brain Cogn*, *31*(2), 230-249. doi: 10.1006/brcg.1996.0043
- de Parseval, N., Lazar, V., Casella, J. F., Benit, L., & Heidmann, T. (2003). Survey of human genes of retroviral origin: identification and transcriptome of the genes with coding capacity for complete envelope proteins. *J Virol*, *77*(19), 10414-10422.
- de Vos, A. F., van Meurs, M., Brok, H. P., Boven, L. A., Hintzen, R. Q., van der Valk, P., . . . Laman, J. D. (2002). Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs. *J Immunol*, *169*(10), 5415-5423.
- Delogu, L. G., Deidda, S., Delitala, G., & Manetti, R. (2011). Infectious diseases and autoimmunity. *J Infect Dev Ctries*, *5*(10), 679-687.
- DeLong, M. (2000). Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, *7*(5), 559-560. doi: 10.1006/nbdi.2000.0355

- Delves, P. J., & Roitt, I. M. (2000a). The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*, *343*(1), 37-49. doi: 10.1056/nejm200007063430107
- Delves, P. J., & Roitt, I. M. (2000b). The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med*, *343*(2), 108-117. doi: 10.1056/nejm200007133430207
- Depboylu, C., Schafer, M. K., Arias-Carrion, O., Oertel, W. H., Weihe, E., & Hoglinger, G. U. (2011). Possible involvement of complement factor C1q in the clearance of extracellular neuromelanin from the substantia nigra in Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, *70*(2), 125-132. doi: 10.1097/NEN.0b013e31820805b9
- Dexter, D. T., Carayon, A., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Wells, F. R., Daniel, S. E., . . . Marsden, C. D. (1991). Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain*, *114* (Pt 4), 1953-1975.
- Di Rosa, G., Puzzo, D., Sant'Angelo, A., Trinchese, F., & Arancio, O. (2003). Alpha-Synuklein: between synaptic function and dysfunction. *Histol Histopathol*, *18*(4), 1257-1266.
- Diamond, B., Huerta, P. T., Mina-Osorio, P., Kowal, C., & Volpe, B. T. (2009). Losing your nerves? Maybe it's the antibodies. *Nat Rev Immunol*, *9*(6), 449-456. doi: 10.1038/nri2529
- Dickman, M. S. (2001). von Economo encephalitis. *Arch Neurol*, *58*(10), 1696-1698.
- Dobbs, R. J., Charlett, A., Dobbs, S. M., Weller, C., & Peterson, D. W. (2000). Parkinsonism: differential age-trend in *Helicobacter pylori* antibody. *Aliment Pharmacol Ther*, *14*(9), 1199-1205.
- Double, K. L. (2012). Neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, *18* Suppl 1, S52-54. doi: 10.1016/s1353-8020(11)70018-9
- Double, K. L., Halliday, G. M., Henderson, J., Griffiths, F. M., Heinemann, T., Riederer, P., & Gerlach, M. (2003). The dopamine receptor agonist lisuride attenuates iron-mediated dopaminergic neurodegeneration. *Exp Neurol*, *184*(1), 530-535.
- Double, K. L., Rowe, D. B., Carew-Jones, F. M., Hayes, M., Chan, D. K., Blackie, J., . . . Halliday, G. M. (2009). Anti-melanin antibodies are increased in sera in Parkinson's disease. *Exp Neurol*, *217*(2), 297-301. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.03.002
- Dourmashkin, R. R. (1997). What caused the 1918-30 epidemic of encephalitis lethargica? *J R Soc Med*, *90*(9), 515-520.
- Douville, R., Liu, J., Rothstein, J., & Nath, A. (2011). Identification of active loci of a human endogenous retrovirus in neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, *69*(1), 141-151. doi: 10.1002/ana.22149
- Downen, M., Amaral, T. D., Hua, L. L., Zhao, M. L., & Lee, S. C. (1999). Neuronal death in cytokine-activated primary human brain cell culture: role of tumor necrosis factor-alpha. *Glia*, *28*(2), 114-127.
- Dubois, B., & Pillon, B. (1997). Cognitive deficits in Parkinson's disease. *J Neurol*, *244*(1), 2-8.
- Dunne, F. J. (1993). Subcortical dementia. *Bmj*, *307*(6895), 1-2.
- Earley, F. G., & Ragan, C. I. (1984). Photoaffinity labelling of mitochondrial NADH dehydrogenase with arylazidoamorphigenin, an analogue of rotenone. *Biochem J*, *224*(2), 525-534.
- Ehringer H., H. O. (1960). Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems. *Klinische Wochenschrift*, *24*, 1236 - 1239.
- El-Agnaf, O. M., Salem, S. A., Paleologou, K. E., Curran, M. D., Gibson, M. J., Court, J. A., . . . Allsop, D. (2006). Detection of oligomeric forms of alpha-Synuklein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *Faseb j*, *20*(3), 419-425. doi: 10.1096/fj.03-1449com
- Elbaz, A., Bower, J. H., Maraganore, D. M., McDonnell, S. K., Peterson, B. J., Ahlskog, J. E., . . . Rocca, W. A. (2002). Risk tables for parkinsonism and Parkinson's disease. *J Clin Epidemiol*, *55*(1), 25-31.
- Elbaz, A., Bower, J. H., Peterson, B. J., Maraganore, D. M., McDonnell, S. K., Ahlskog, J. E., . . . Rocca, W. A. (2003). Survival study of Parkinson disease in Olmsted County, Minnesota. *Arch Neurol*, *60*(1), 91-96.

- Elizan, T. S., & Casals, J. (1991). Astrogliosis in von Economo's and postencephalitic Parkinson's diseases supports probable viral etiology. *J Neurol Sci*, *105*(2), 131-134.
- Engel, L. S., Checkoway, H., Keifer, M. C., Seixas, N. S., Longstreth, W. T., Jr., Scott, K. C., . . . Camicioli, R. (2001). Parkinsonism and occupational exposure to pesticides. *Occup Environ Med*, *58*(9), 582-589.
- Factor, S. A., Sanchez-Ramos, J., & Weiner, W. J. (1988). Trauma as an etiology of parkinsonism: a historical review of the concept. *Mov Disord*, *3*(1), 30-36. doi: 10.1002/mds.870030105
- Fahn, S. (2003). Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, *991*, 1-14.
- Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L. M., Buck, C., Chaisson, R. E., . . . Siliciano, R. F. (1997). Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*, *278*(5341), 1295-1300.
- Fiszer, U., Mix, E., Fredrikson, S., Kostulas, V., Olsson, T., & Link, H. (1994). gamma delta+ T cells are increased in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, *121*(1), 39-45.
- Forno, L. S. (1996). Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, *55*(3), 259-272.
- Foster, J. B. (1986). Subcortical dementia. *Br Med J (Clin Res Ed)*, *292*(6527), 1035-1036.
- Freimanis, G., Hooley, P., Ejtehadi, H. D., Ali, H. A., Veitch, A., Rylance, P. B., . . . Nelson, P. N. (2010). A role for human endogenous retrovirus-K (HML-2) in rheumatoid arthritis: investigating mechanisms of pathogenesis. *Clin Exp Immunol*, *160*(3), 340-347. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04110.x
- Fukushima, T., Tawara, T., Isobe, A., Hojo, N., Shiwaku, K., & Yamane, Y. (1995). Radical formation site of cerebral complex I and Parkinson's disease. *J Neurosci Res*, *42*(3), 385-390. doi: 10.1002/jnr.490420313
- Gabuzda, D., & Wang, J. (1999). Chemokine receptors and virus entry in the central nervous system. *J Neurovirol*, *5*(6), 643-658.
- Gao, H. M., Hong, J. S., Zhang, W., & Liu, B. (2002). Distinct role for microglia in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurosci*, *22*(3), 782-790.
- Gao, H. M., Jiang, J., Wilson, B., Zhang, W., Hong, J. S., & Liu, B. (2002). Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem*, *81*(6), 1285-1297.
- Gayle, D. A., Ling, Z., Tong, C., Landers, T., Lipton, J. W., & Carvey, P. M. (2002). Lipopolysaccharide (LPS)-induced dopamine cell loss in culture: roles of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and nitric oxide. *Brain Res Dev Brain Res*, *133*(1), 27-35.
- Geisler, M. W., & Murphy, C. (2000). Event-related brain potentials to attended and ignored olfactory and trigeminal stimuli. *Int J Psychophysiol*, *37*(3), 309-315.
- Gelb, D. J., Oliver, E., & Gilman, S. (1999). Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol*, *56*(1), 33-39.
- Gerfen, C. R. a. C. J. W. (1996). The basal ganglia. *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, *12: Integrated Systems of the CNS, Part III*, New York: Elsevier Science Publishers. L. W. Swanson, A. Björklund and T. Hokfelt (eds.). 371-468.
- Giil, L. M., Kristoffersen, E. K., Vedeler, C. A., Aarsland, D., Nordrehaug, J. E., Winblad, B., . . . Reksten, T. R. (2015). Autoantibodies Toward the Angiotensin 2 Type 1 Receptor: A Novel Autoantibody in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, *47*(2), 523-529. doi: 10.3233/jad-150053
- Giulian, D., & Ingeman, J. E. (1988). Colony-stimulating factors as promoters of ameboid microglia. *J Neurosci*, *8*(12), 4707-4717.
- Giulian, D., Johnson, B., Krebs, J. F., George, J. K., & Tapscott, M. (1991). Microglial mitogens are produced in the developing and injured mammalian brain. *J Cell Biol*, *112*(2), 323-333.
- Goodnow, C. C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T. B., Smith-Gill, S. J., Brink, R. A., . . . Basten, A. (2009). Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *J Immunol*, *183*(9), 5442-5448.

- Gorell, J. M., Johnson, C. C., Rybicki, B. A., Peterson, E. L., & Richardson, R. J. (1998). The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology*, *50*(5), 1346-1350.
- Gosal, D., Ross, O. A., & Toft, M. (2006). Parkinson's disease: the genetics of a heterogeneous disorder. *Eur J Neurol*, *13*(6), 616-627. doi: 10.1111/j.1468-1331.2006.01336.x
- Graeber, M. B., Streit, W. J., & Kreutzberg, G. W. (1988). Axotomy of the rat facial nerve leads to increased CR3 complement receptor expression by activated microglial cells. *J Neurosci Res*, *21*(1), 18-24. doi: 10.1002/jnr.490210104
- Graybiel, A. M. (1990). Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci*, *13*(7), 244-254.
- Graybiel, A. M., & Ragsdale, C. W., Jr. (1979). Fiber connections of the basal ganglia. *Prog Brain Res*, *51*, 237-283.
- Greenwood, J., Wang, Y., & Calder, V. L. (1995). Lymphocyte adhesion and transendothelial migration in the central nervous system: the role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1. *Immunology*, *86*(3), 408-415.
- Gyorgy, B., Toth, E., Tarcsa, E., Falus, A., & Buzas, E. I. (2006). Citrullination: a posttranslational modification in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*, *38*(10), 1662-1677. doi: 10.1016/j.biocel.2006.03.008
- Haas, R. H., Nasirian, F., Nakano, K., Ward, D., Pay, M., Hill, R., & Shults, C. W. (1995). Low platelet mitochondrial complex I and complex II/III activity in early untreated Parkinson's disease. *Ann Neurol*, *37*(6), 714-722. doi: 10.1002/ana.410370604
- Han, M., Nagele, E., DeMarshall, C., Acharya, N., & Nagele, R. (2012). Diagnosis of Parkinson's disease based on disease-specific autoantibody profiles in human sera. *PLoS One*, *7*(2), e32383. doi: 10.1371/journal.pone.0032383
- Harouse, J. M., Wroblewska, Z., Laughlin, M. A., Hickey, W. F., Schonwetter, B. S., & Gonzalez-Scarano, F. (1989). Human choroid plexus cells can be latently infected with human immunodeficiency virus. *Ann Neurol*, *25*(4), 406-411. doi: 10.1002/ana.410250414
- Hassin-Baer, S., Levy, Y., Langevitz, P., Nakar, S., & Ehrenfeld, M. (2007). Anti-beta2-glycoprotein I in Sjogren's syndrome is associated with parkinsonism. *Clin Rheumatol*, *26*(5), 743-747. doi: 10.1007/s10067-006-0398-8
- Hauray, M., Sundblad, A., Grandien, A., Barreau, C., Coutinho, A., & Nobrega, A. (1997). The repertoire of serum IgM in normal mice is largely independent of external antigenic contact. *Eur J Immunol*, *27*(6), 1557-1563. doi: 10.1002/eji.1830270635
- Hawkes, C. H., Shephard, B. C., & Daniel, S. E. (1997). Olfactory dysfunction in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *62*(5), 436-446.
- Hawkes, C. H., Shephard, B. C., & Daniel, S. E. (1999). Is Parkinson's disease a primary olfactory disorder? *Qjm*, *92*(8), 473-480.
- Hawkins, B. T., & Davis, T. P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev*, *57*(2), 173-185. doi: 10.1124/pr.57.2.4
- Hazrati, L. N., & Parent, A. (1993). Striatal and subthalamic afferents to the primate pallidum: interactions between two opposite chemospecific neuronal systems. *Prog Brain Res*, *99*, 89-104.
- Heppner, F. L., Skutella, T., Hailer, N. P., Haas, D., & Nitsch, R. (1998). Activated microglial cells migrate towards sites of excitotoxic neuronal injury inside organotypic hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci*, *10*(10), 3284-3290.
- Herbst, H., Sauter, M., & Mueller-Lantsch, N. (1996). Expression of human endogenous retrovirus K elements in germ cell and trophoblastic tumors. *Am J Pathol*, *149*(5), 1727-1735.
- Heuer, L., Ashwood, P., Schauer, J., Goines, P., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., . . . Van de Water, J. (2008). Reduced levels of immunoglobulin in children with autism correlates with behavioral symptoms. *Autism Res*, *1*(5), 275-283. doi: 10.1002/aur.42

- Hirsch, E., Graybiel, A. M., & Agid, Y. A. (1988). Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature*, *334*(6180), 345-348. doi: 10.1038/334345a0
- Hirsch, E. C., & Faucheux, B. A. (1998). Iron metabolism and Parkinson's disease. *Mov Disord*, *13 Suppl 1*, 39-45.
- Hochmeister, S., Zeitelhofer, M., Bauer, J., Nicolussi, E. M., Fischer, M. T., Heinke, B., . . . Bradl, M. (2008). After injection into the striatum, in vitro-differentiated microglia- and bone marrow-derived dendritic cells can leave the central nervous system via the blood stream. *Am J Pathol*, *173*(6), 1669-1681. doi: 10.2353/ajpath.2008.080234
- Holdorff, B. (2002). Friedrich Heinrich Lewy (1885-1950) and his work. *J Hist Neurosci*, *11*(1), 19-28. doi: 10.1076/jhin.11.1.19.9106
- Hooijkaas, H., Benner, R., Pleasants, J. R., & Wostmann, B. S. (1984). Isotypes and specificities of immunoglobulins produced by germ-free mice fed chemically defined ultrafiltered "antigen-free" diet. *Eur J Immunol*, *14*(12), 1127-1130. doi: 10.1002/eji.1830141212
- Hubble, J. P., Cao, T., Kjelstrom, J. A., Koller, W. C., & Beaman, B. L. (1995). Nocardia species as an etiologic agent in Parkinson's disease: serological testing in a case-control study. *J Clin Microbiol*, *33*(10), 2768-2769.
- Huber, S. J., & Paulson, G. W. (1985). The concept of subcortical dementia. *Am J Psychiatry*, *142*(11), 1312-1317. doi: 10.1176/ajp.142.11.1312
- Ishida, K., Kaneko, K., Kubota, T., Itoh, Y., Miyatake, T., Matsushita, M., & Yamada, M. (1997). Identification and characterization of an anti-glia fibrillary acidic protein antibody with a unique specificity in a demented patient with an autoimmune disorder. *J Neurol Sci*, *151*(1), 41-48.
- Itoh, K., Mehraein, P., & Weis, S. (2000). Neuronal damage of the substantia nigra in HIV-1 infected brains. *Acta Neuropathol*, *99*(4), 376-384.
- Janssen, R. S., Saykin, A. J., Cannon, L., Campbell, J., Pinsky, P. F., Hessol, N. A., . . . et al. (1989). Neurological and neuropsychological manifestations of HIV-1 infection: association with AIDS-related complex but not asymptomatic HIV-1 infection. *Ann Neurol*, *26*(5), 592-600. doi: 10.1002/ana.410260503
- Javitch, J. A., D'Amato, R. J., Strittmatter, S. M., & Snyder, S. H. (1985). Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *82*(7), 2173-2177.
- Jeohn, G. H., Kim, W. G., & Hong, J. S. (2000). Time dependency of the action of nitric oxide in lipopolysaccharide-interferon-gamma-induced neuronal cell death in murine primary neuron-glia co-cultures. *Brain Res*, *880*(1-2), 173-177.
- Jeohn, G. H., Kong, L. Y., Wilson, B., Hudson, P., & Hong, J. S. (1998). Synergistic neurotoxic effects of combined treatments with cytokines in murine primary mixed neuron/glia cultures. *J Neuroimmunol*, *85*(1), 1-10.
- Jin, Z., Fu, Z., Yang, J., Troncosco, J., Everett, A. D., & Van Eyk, J. E. (2013). Identification and characterization of citrulline-modified brain proteins by combining HCD and CID fragmentation. *Proteomics*, *13*(17), 2682-2691. doi: 10.1002/pmic.201300064
- Johnston, J. B., Silva, C., Holden, J., Warren, K. G., Clark, A. W., & Power, C. (2001). Monocyte activation and differentiation augment human endogenous retrovirus expression: implications for inflammatory brain diseases. *Ann Neurol*, *50*(4), 434-442.
- Kamradt, T., & Mitchison, N. A. (2001). Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med*, *344*(9), 655-664. doi: 10.1056/nejm200103013440907
- Karman, J., Ling, C., Sandor, M., & Fabry, Z. (2004). Initiation of immune responses in brain is promoted by local dendritic cells. *J Immunol*, *173*(4), 2353-2361.
- Kastner, A., Hirsch, E. C., Lejeune, O., Javoy-Agid, F., Rascol, O., & Agid, Y. (1992). Is the vulnerability of neurons in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease related to their neuromelanin content? *J Neurochem*, *59*(3), 1080-1089.

- Keaney, J., & Campbell, M. (2015). The dynamic blood-brain barrier. *Febs j*, *282*(21), 4067-4079. doi: 10.1111/febs.13412
- Khatiri, R., McKinney, A. M., Swenson, B., & Janardhan, V. (2012). Blood-brain barrier, reperfusion injury, and hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Neurology*, *79*(13 Suppl 1), S52-57. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182697e70
- Kim, B. J., Hancock, B. M., Bermudez, A., Del Cid, N., Reyes, E., van Sorge, N. M., . . . Doran, K. S. (2015). Bacterial induction of Snail1 contributes to blood-brain barrier disruption. *J Clin Invest*, *125*(6), 2473-2483. doi: 10.1172/jci74159
- Kim, W. G., Mohney, R. P., Wilson, B., Jeohn, G. H., Liu, B., & Hong, J. S. (2000). Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci*, *20*(16), 6309-6316.
- Kish, S. J., Morito, C., & Hornykiewicz, O. (1985). Glutathione peroxidase activity in Parkinson's disease brain. *Neurosci Lett*, *58*(3), 343-346.
- Kitazawa, M., Anantharam, V., & Kanthasamy, A. G. (2001). Dieldrin-induced oxidative stress and neurochemical changes contribute to apoptotic cell death in dopaminergic cells. *Free Radic Biol Med*, *31*(11), 1473-1485.
- Kivisakk, P., Mahad, D. J., Callahan, M. K., Sikora, K., Trebst, C., Tucky, B., . . . Ransohoff, R. M. (2004). Expression of CCR7 in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. *Ann Neurol*, *55*(5), 627-638. doi: 10.1002/ana.20049
- Klein, L., & Kyewski, B. (2000). "Promiscuous" expression of tissue antigens in the thymus: a key to T-cell tolerance and autoimmunity? *J Mol Med (Berl)*, *78*(9), 483-494.
- Kohbata, S., & Beaman, B. L. (1991). L-dopa-responsive movement disorder caused by *Nocardia asteroides* localized in the brains of mice. *Infect Immun*, *59*(1), 181-191.
- Korganow, A. S., Ji, H., Mangialaio, S., Duchatelle, V., Pelanda, R., Martin, T., . . . Mathis, D. (1999). From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity*, *10*(4), 451-461.
- Koutsilieri, E., Lutz, M. B., & Scheller, C. (2013). Autoimmunity, dendritic cells and relevance for Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*, *120*(1), 75-81. doi: 10.1007/s00702-012-0842-7
- Koval, L., Lykhmus, O., Kalashnyk, O., Bachinskaya, N., Kravtsova, G., Soldatkina, M., . . . Skok, M. (2011). The presence and origin of autoantibodies against alpha4 and alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the human blood: possible relevance to Alzheimer's pathology. *J Alzheimers Dis*, *25*(4), 747-761. doi: 10.3233/jad-2011-101845
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, *19*(8), 312-318.
- Krige, D., Carroll, M. T., Cooper, J. M., Marsden, C. D., & Schapira, A. H. (1992). Platelet mitochondrial function in Parkinson's disease. The Royal Kings and Queens Parkinson Disease Research Group. *Ann Neurol*, *32*(6), 782-788. doi: 10.1002/ana.410320612
- Kure, K., Weidenheim, K. M., Lyman, W. D., & Dickson, D. W. (1990). Morphology and distribution of HIV-1 gp41-positive microglia in subacute AIDS encephalitis. Pattern of involvement resembling a multisystem degeneration. *Acta Neuropathol*, *80*(4), 393-400.
- Kurth, R., & Bannert, N. (2010). Beneficial and detrimental effects of human endogenous retroviruses. *Int J Cancer*, *126*(2), 306-314. doi: 10.1002/ijc.24902
- Kurts, C., Kosaka, H., Carbone, F. R., Miller, J. F., & Heath, W. R. (1997). Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med*, *186*(2), 239-245.
- Lampron, A., Elali, A., & Rivest, S. (2013). Innate immunity in the CNS: redefining the relationship between the CNS and its environment. *Neuron*, *78*(2), 214-232. doi: 10.1016/j.neuron.2013.04.005
- Lang, A. E., & Lozano, A. M. (1998a). Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med*, *339*(15), 1044-1053. doi: 10.1056/nejm199810083391506

- Lang, A. E., & Lozano, A. M. (1998b). Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med*, *339*(16), 1130-1143. doi: 10.1056/nejm199810153391607
- Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P., & Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, *39*(1), 151-170.
- Lehmann, P. V., Forsthuber, T., Miller, A., & Sercarz, E. E. (1992). Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature*, *358*(6382), 155-157. doi: 10.1038/358155a0
- Lerner, A., & Bagic, A. (2008). Olfactory pathogenesis of idiopathic Parkinson disease revisited. *Mov Disord*, *23*(8), 1076-1084. doi: 10.1002/mds.22066
- Lesage, S., & Brice, A. (2012). Role of mendelian genes in "sporadic" Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, *18 Suppl 1*, S66-70. doi: 10.1016/s1353-8020(11)70022-0
- Levin, E. C., Acharya, N. K., Han, M., Zavareh, S. B., Sedeyn, J. C., Venkataraman, V., & Nagele, R. G. (2010). Brain-reactive autoantibodies are nearly ubiquitous in human sera and may be linked to pathology in the context of blood-brain barrier breakdown. *Brain Res*, *1345*, 221-232. doi: 10.1016/j.brainres.2010.05.038
- Lewy, F. (1912). Paralysis agitans, Part I: Pathologische Anatomie. *Lewandowsky M (ed) Handbuch der Neurologie. Springer, Berlin, III, spez. Neurol. II*, 920-933.
- Liautard, J. P. (1991). Are prions misfolded molecular chaperones? *FEBS Lett*, *294*(3), 155-157.
- Liu, B., Du, L., & Hong, J. S. (2000). Naloxone protects rat dopaminergic neurons against inflammatory damage through inhibition of microglia activation and superoxide generation. *J Pharmacol Exp Ther*, *293*(2), 607-617.
- Liu, B., & Hong, J. S. (2003). Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J Pharmacol Exp Ther*, *304*(1), 1-7. doi: 10.1124/jpet.102.035048
- Liu, D., Liu, C., Li, J., Azadzi, K., Yang, Y., Fei, Z., . . . Yang, J. H. (2013). Proteomic analysis reveals differentially regulated protein acetylation in human amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *PLoS One*, *8*(12), e80779. doi: 10.1371/journal.pone.0080779
- Liu, K., Iyoda, T., Saturnus, M., Kimura, Y., Inaba, K., & Steinman, R. M. (2002). Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. *J Exp Med*, *196*(8), 1091-1097.
- Liu, N. Q., Lossinsky, A. S., Popik, W., Li, X., Gujuluva, C., Kriederman, B., . . . Fiala, M. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 enters brain microvascular endothelia by macropinocytosis dependent on lipid rafts and the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Virol*, *76*(13), 6689-6700.
- Liu, S., Ninan, I., Antonova, I., Battaglia, F., Trinchese, F., Narasanna, A., . . . Arancio, O. (2004). alpha-Synuclein produces a long-lasting increase in neurotransmitter release. *Embo j*, *23*(22), 4506-4516. doi: 10.1038/sj.emboj.7600451
- Lopategui Cabezas, I., Herrera Batista, A., & Penton Rol, G. (2014). The role of glial cells in Alzheimer disease: potential therapeutic implications. *Neurologia*, *29*(5), 305-309. doi: 10.1016/j.nrl.2012.10.006
- Lotharius, J., & Brundin, P. (2002). Impaired dopamine storage resulting from alpha-Synuclein mutations may contribute to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, *11*(20), 2395-2407.
- Lundvig, D., Lindersson, E., & Jensen, P. H. (2005). Pathogenic effects of alpha-Synuclein aggregation. *Brain Res Mol Brain Res*, *134*(1), 3-17. doi: 10.1016/j.molbrainres.2004.09.001
- Ma, X. C., Gottschall, P. E., Chen, L. T., Wiranowska, M., & Phelps, C. P. (2002). Role and mechanisms of interleukin-1 in the modulation of neurotoxicity. *Neuroimmunomodulation*, *10*(4), 199-207. doi: 68322
- Madi, A., Hecht, I., Bransburg-Zabary, S., Merbl, Y., Pick, A., Zucker-Toledano, M., . . . Ben-Jacob, E. (2009). Organization of the autoantibody repertoire in healthy newborns and adults revealed by system level informatics of antigen microarray data. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(34), 14484-14489. doi: 10.1073/pnas.0901528106
- Maetzler, W., Apel, A., Langkamp, M., Deuschle, C., Dilger, S. S., Stirnkorb, J. G., . . . Berg, D. (2014). Comparable autoantibody serum levels against amyloid- and inflammation-associated

- proteins in Parkinson's disease patients and controls. *PLoS One*, 9(2), e88604. doi: 10.1371/journal.pone.0088604
- Malenka, R. C., & Kocsis, J. D. (1988). Presynaptic actions of carbachol and adenosine on corticostriatal synaptic transmission studied in vitro. *J Neurosci*, 8(10), 3750-3756.
- Mann, V. M., Cooper, J. M., Krige, D., Daniel, S. E., Schapira, A. H., & Marsden, C. D. (1992). Brain, skeletal muscle and platelet homogenate mitochondrial function in Parkinson's disease. *Brain*, 115 (Pt 2), 333-342.
- Martin, J., Herniou, E., Cook, J., Waugh O'Neill, R., & Tristem, M. (1997). Human endogenous retrovirus type I-related viruses have an apparently widespread distribution within vertebrates. *J Virol*, 71(1), 437-443.
- McArthur, J. C. (2004). HIV dementia: an evolving disease. *J Neuroimmunol*, 157(1-2), 3-10. doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.08.042
- McCann, S. J., LeCouteur, D. G., Green, A. C., Brayne, C., Johnson, A. G., Chan, D., . . . Pond, S. M. (1998). The epidemiology of Parkinson's disease in an Australian population. *Neuroepidemiology*, 17(6), 310-317.
- McGeer, P. L., Itagaki, S., Boyes, B. E., & McGeer, E. G. (1988). Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*, 38(8), 1285-1291.
- McGeorge, A. J., & Faull, R. L. (1989). The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience*, 29(3), 503-537.
- McGuire, S. O., Ling, Z. D., Lipton, J. W., Sortwell, C. E., Collier, T. J., & Carvey, P. M. (2001). Tumor necrosis factor alpha is toxic to embryonic mesencephalic dopamine neurons. *Exp Neurol*, 169(2), 219-230. doi: 10.1006/exnr.2001.7688
- McHaffie, J. G., Stanford, T. R., Stein, B. E., Coizet, V., & Redgrave, P. (2005). Subcortical loops through the basal ganglia. *Trends Neurosci*, 28(8), 401-407. doi: 10.1016/j.tins.2005.06.006
- McMahon, E. J., Bailey, S. L., & Miller, S. D. (2006). CNS dendritic cells: critical participants in CNS inflammation? *Neurochem Int*, 49(2), 195-203. doi: 10.1016/j.neuint.2006.04.004
- McMenamin, P. G. (1999). Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholemount preparations. *J Comp Neurol*, 405(4), 553-562.
- Merbl, Y., Zucker-Toledano, M., Quintana, F. J., & Cohen, I. R. (2007). Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen microarray informatics. *J Clin Invest*, 117(3), 712-718. doi: 10.1172/jci29943
- Meshulam, R. I., Moberg, P. J., Mahr, R. N., & Doty, R. L. (1998). Olfaction in neurodegenerative disease: a meta-analysis of olfactory functioning in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Arch Neurol*, 55(1), 84-90.
- Miller, W. C., & DeLong, M. R. (1988). Parkinsonian symptomatology. An anatomical and physiological analysis. *Ann N Y Acad Sci*, 515, 287-302.
- Mirsattari, S. M., Power, C., & Nath, A. (1998). Parkinsonism with HIV infection. *Mov Disord*, 13(4), 684-689. doi: 10.1002/mds.870130413
- Mitchell, I. J., Jackson, A., Sambrook, M. A., & Crossman, A. R. (1989). The role of the subthalamic nucleus in experimental chorea. Evidence from 2-deoxyglucose metabolic mapping and horseradish peroxidase tracing studies. *Brain*, 112 (Pt 6), 1533-1548.
- Mizuno, Y., Hattori, N., Mori, H., Suzuki, T., & Tanaka, K. (2001). Parkin and Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*, 14(4), 477-482.
- Moalem, G., Leibowitz-Amit, R., Yoles, E., Mor, F., Cohen, I. R., & Schwartz, M. (1999). Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med*, 5(1), 49-55. doi: 10.1038/4734
- Moneim, I. A., Shamy, M. Y., el-Gazzar, R. M., & el-Fawal, H. A. (1999). Autoantibodies to neurofilaments (NF), glial fibrillary acidic protein (GFAP) and myelin basic protein (MBP) in workers exposed to lead. *J Egypt Public Health Assoc*, 74(1-2), 121-138.

- Montagne, A., Barnes, S. R., Sweeney, M. D., Halliday, M. R., Sagare, A. P., Zhao, Z., . . . Zlokovic, B. V. (2015). Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron*, *85*(2), 296-302. doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.032
- Mor, F., & Cohen, I. R. (2006). How special is a pathogenic CNS autoantigen? Immunization to many CNS self-antigens does not induce autoimmune disease. *J Neuroimmunol*, *174*(1-2), 3-11. doi: 10.1016/j.jneuroim.2005.12.003
- Morelli, A. E., & Thomson, A. W. (2007). Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol*, *7*(8), 610-621. doi: 10.1038/nri2132
- Moscavitch, S. D., Szyper-Kravitz, M., & Shoenfeld, Y. (2009). Autoimmune pathology accounts for common manifestations in a wide range of neuro-psychiatric disorders: the olfactory and immune system interrelationship. *Clin Immunol*, *130*(3), 235-243. doi: 10.1016/j.clim.2008.10.010
- Mouthon, L., Nobrega, A., Nicolas, N., Kaveri, S. V., Barreau, C., Coutinho, A., & Kazatchkine, M. D. (1995). Invariance and restriction toward a limited set of self-antigens characterize neonatal IgM antibody repertoires and prevail in autoreactive repertoires of healthy adults. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(9), 3839-3843.
- Munz, C., Lunemann, J. D., Getts, M. T., & Miller, S. D. (2009). Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nat Rev Immunol*, *9*(4), 246-258. doi: 10.1038/nri2527
- Murphy, D. D., Rueter, S. M., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2000). Synucleins are developmentally expressed, and alpha-Synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J Neurosci*, *20*(9), 3214-3220.
- Nagele, E. P., Han, M., Acharya, N. K., DeMarshall, C., Kosciuk, M. C., & Nagele, R. G. (2013). Natural IgG autoantibodies are abundant and ubiquitous in human sera, and their number is influenced by age, gender, and disease. *PLoS One*, *8*(4), e60726. doi: 10.1371/journal.pone.0060726
- Nagele, R. G., Clifford, P. M., Siu, G., Levin, E. C., Acharya, N. K., Han, M., . . . Levitas, A. (2011). Brain-reactive autoantibodies prevalent in human sera increase intraneuronal amyloid-beta(1-42) deposition. *J Alzheimers Dis*, *25*(4), 605-622. doi: 10.3233/jad-2011-110098
- Naparstek, Y., & Plotz, P. H. (1993). The role of autoantibodies in autoimmune disease. *Annu Rev Immunol*, *11*, 79-104. doi: 10.1146/annurev.iy.11.040193.000455
- Navia, B. A., Cho, E. S., Petito, C. K., & Price, R. W. (1986). The AIDS dementia complex: II. Neuropathology. *Ann Neurol*, *19*(6), 525-535. doi: 10.1002/ana.410190603
- Navia, B. A., Jordan, B. D., & Price, R. W. (1986). The AIDS dementia complex: I. Clinical features. *Ann Neurol*, *19*(6), 517-524. doi: 10.1002/ana.410190602
- Nemazee, D. (2000). Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, *18*, 19-51. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.19
- Nemazee, D. A., & Burki, K. (1989). Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature*, *337*(6207), 562-566. doi: 10.1038/337562a0
- Nussbaum, R. L., & Ellis, C. E. (2003). Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med*, *348*(14), 1356-1364. doi: 10.1056/NEJM2003ra020003
- Oberlander, U., Pletinckx, K., Dohler, A., Muller, N., Lutz, M. B., Arzberger, T., . . . Scheller, C. (2011). Neuromelanin is an immune stimulator for dendritic cells in vitro. *BMC Neurosci*, *12*, 116. doi: 10.1186/1471-2202-12-116
- Ohtsuki, S., & Terasaki, T. (2007). Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development. *Pharm Res*, *24*(9), 1745-1758. doi: 10.1007/s11095-007-9374-5
- Olanow, C. W. (1990). Oxidation reactions in Parkinson's disease. *Neurology*, *40*(10 Suppl 3), suppl 32-37; discussion 37-39.
- Orr, C. F., Rowe, D. B., Mizuno, Y., Mori, H., & Halliday, G. M. (2005). A possible role for humoral immunity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Brain*, *128*(Pt 11), 2665-2674. doi: 10.1093/brain/awh625

- Papachroni, K. K., Ninkina, N., Papapanagiotou, A., Hadjigeorgiou, G. M., Xiromerisiou, G., Papadimitriou, A., . . . Buchman, V. L. (2007). Autoantibodies to alpha-Synuklein in inherited Parkinson's disease. *J Neurochem*, *101*(3), 749-756. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04365.x
- Papuc, E., Kurzepa, J., Kurys-Denis, E., Grabarska, A., Krupski, W., & Rejdak, K. (2014). Humoral response against glial derived antigens in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, *566*, 77-81. doi: 10.1016/j.neulet.2014.02.043
- Pardridge, W. M. (2007). Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov Today*, *12*(1-2), 54-61. doi: 10.1016/j.drudis.2006.10.013
- Parkinson, J. (2002). An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, *14*(2), 223-236; discussion 222. doi: 10.1176/jnp.14.2.223
- Pearson, R. C., Esiri, M. M., Hiorns, R. W., Wilcock, G. K., & Powell, T. P. (1985). Anatomical correlates of the distribution of the pathological changes in the neocortex in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *82*(13), 4531-4534.
- Peluso, R., Haase, A., Stowring, L., Edwards, M., & Ventura, P. (1985). A Trojan Horse mechanism for the spread of visna virus in monocytes. *Virology*, *147*(1), 231-236.
- Penney, J. B., Jr., & Young, A. B. (1986). Striatal inhomogeneities and basal ganglia function. *Mov Disord*, *1*(1), 3-15. doi: 10.1002/mds.870010102
- Petrovitch, H., Ross, G. W., Abbott, R. D., Sanderson, W. T., Sharp, D. S., Tanner, C. M., . . . White, L. R. (2002). Plantation work and risk of Parkinson disease in a population-based longitudinal study. *Arch Neurol*, *59*(11), 1787-1792.
- Pisetsky, D. S. (2012). Antinuclear antibodies in rheumatic disease: a proposal for a function-based classification. *Scand J Immunol*, *76*(3), 223-228. doi: 10.1111/j.1365-3083.2012.02728.x
- Plassman, B. L., Havlik, R. J., Steffens, D. C., Helms, M. J., Newman, T. N., Drosdick, D., . . . Breitner, J. C. (2000). Documented head injury in early adulthood and risk of Alzheimer's disease and other dementias. *Neurology*, *55*(8), 1158-1166.
- Poletaev, A. B., Morozov, S. G., Gnedenko, B. B., Zlunikin, V. M., & Korzhenevsky, D. A. (2000). Serum anti-S100b, anti-GFAP and anti-NGF autoantibodies of IgG class in healthy persons and patients with mental and neurological disorders. *Autoimmunity*, *32*(1), 33-38.
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., . . . Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the alpha-Synuklein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, *276*(5321), 2045-2047.
- Price, R. W. (1996). Neurological complications of HIV infection. *Lancet*, *348*(9025), 445-452. doi: 10.1016/s0140-6736(95)11035-6
- Price, R. W., Brew, B., Sidtis, J., Rosenblum, M., Scheck, A. C., & Cleary, P. (1988). The brain in AIDS: central nervous system HIV-1 infection and AIDS dementia complex. *Science*, *239*(4840), 586-592.
- Pugliese, A., Zeller, M., Fernandez, A., Jr., Zalberg, L. J., Bartlett, R. J., Ricordi, C., . . . Patel, D. D. (1997). The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat Genet*, *15*(3), 293-297. doi: 10.1038/ng0397-293
- Qin, L., Liu, Y., Cooper, C., Liu, B., Wilson, B., & Hong, J. S. (2002). Microglia enhance beta-amyloid peptide-induced toxicity in cortical and mesencephalic neurons by producing reactive oxygen species. *J Neurochem*, *83*(4), 973-983.
- Raivich, G., Bohatschek, M., Kloss, C. U., Werner, A., Jones, L. L., & Kreutzberg, G. W. (1999). Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev*, *30*(1), 77-105.
- Rao, K. S., Hegde, M. L., Anitha, S., Musicco, M., Zucca, F. A., Turro, N. J., & Zecca, L. (2006). Amyloid beta and neuromelanin--toxic or protective molecules? The cellular context makes the difference. *Prog Neurobiol*, *78*(6), 364-373. doi: 10.1016/j.pneurobio.2006.03.004
- Rathmell, J. C., Townsend, S. E., Xu, J. C., Flavell, R. A., & Goodnow, C. C. (1996). Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for CD40- and Fas (CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell*, *87*(2), 319-329.

- Reid, A. H., Janczewski, T. A., Lourens, R. M., Elliot, A. J., Daniels, R. S., Berry, C. L., . . . Taubenberger, J. K. (2003). 1918 influenza pandemic caused by highly conserved viruses with two receptor-binding variants. *Emerg Infect Dis*, *9*(10), 1249-1253. doi: 10.3201/eid0910.020789
- Reyes, M. G., Faraldi, F., Senseng, C. S., Flowers, C., & Fariello, R. (1991). Nigral degeneration in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Acta Neuropathol*, *82*(1), 39-44.
- Reynier, F., Verjat, T., Turrel, F., Imbert, P. E., Marotte, H., Mouglin, B., & Miossec, P. (2009). Increase in human endogenous retrovirus HERV-K (HML-2) viral load in active rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol*, *70*(3), 295-299. doi: 10.1111/j.1365-3083.2009.02271.x
- Riederer, P., Sofic, E., Rausch, W. D., Schmidt, B., Reynolds, G. P., Jellinger, K., & Youdim, M. B. (1989). Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. *J Neurochem*, *52*(2), 515-520.
- Riederer, P., & Wuketich, S. (1976). Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. *J Neural Transm*, *38*(3-4), 277-301.
- Ritz, B., & Yu, F. (2000). Parkinson's disease mortality and pesticide exposure in California 1984-1994. *Int J Epidemiol*, *29*(2), 323-329.
- Rochfort, K. D., Collins, L. E., Murphy, R. P., & Cummins, P. M. (2014). Downregulation of blood-brain barrier phenotype by proinflammatory cytokines involves NADPH oxidase-dependent ROS generation: consequences for interendothelial adherens and tight junctions. *PLoS One*, *9*(7), e101815. doi: 10.1371/journal.pone.0101815
- Roe, K., Kumar, M., Lum, S., Orillo, B., Nerurkar, V. R., & Verma, S. (2012). West Nile virus-induced disruption of the blood-brain barrier in mice is characterized by the degradation of the junctional complex proteins and increase in multiple matrix metalloproteinases. *J Gen Virol*, *93*(Pt 6), 1193-1203. doi: 10.1099/vir.0.040899-0
- Rogers, J., & Morrison, J. H. (1985). Quantitative morphology and regional and laminar distributions of senile plaques in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, *5*(10), 2801-2808.
- Romero, V., Fert-Bober, J., Nigrovic, P. A., Darrah, E., Haque, U. J., Lee, D. M., . . . Andrade, F. (2013). Immune-mediated pore-forming pathways induce cellular hypercitrullination and generate citrullinated autoantigens in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*, *5*(209), 209ra150. doi: 10.1126/scitranslmed.3006869
- Root-Bernstein, R., Vonck, J., & Podufaly, A. (2009). Antigenic complementarity between coxsackie virus and streptococcus in the induction of rheumatic heart disease and autoimmune myocarditis. *Autoimmunity*, *42*(1), 1-16. doi: 10.1080/08916930802208540
- Roselli, F., Russo, I., Fraddosio, A., Aniello, M. S., De Mari, M., Lamberti, P., . . . Defazio, G. (2006). Reversible Parkinsonian syndrome associated with anti-neuronal antibodies in acute EBV encephalitis: a case report. *Parkinsonism Relat Disord*, *12*(4), 257-260. doi: 10.1016/j.parkreldis.2005.11.004
- Rosner, S., Giladi, N., & Orr-Urtreger, A. (2008). Advances in the genetics of Parkinson's disease. *Acta Pharmacol Sin*, *29*(1), 21-34. doi: 10.1111/j.1745-7254.2008.00731.x
- Sagar, D., Lamontagne, A., Foss, C. A., Khan, Z. K., Pomper, M. G., & Jain, P. (2012). Dendritic cell CNS recruitment correlates with disease severity in EAE via CCL2 chemotaxis at the blood-brain barrier through paracellular transmigration and ERK activation. *J Neuroinflammation*, *9*, 245. doi: 10.1186/1742-2094-9-245
- Saphire, A. C., Bobardt, M. D., & Gallay, P. A. (2000). Human immunodeficiency virus type 1 hijacks host cyclophilin A for its attachment to target cells. *Immunol Res*, *21*(2-3), 211-217. doi: 10.1385/ir:21:2-3:211
- Sardar, A. M., Czudek, C., & Reynolds, G. P. (1996). Dopamine deficits in the brain: the neurochemical basis of parkinsonian symptoms in AIDS. *Neuroreport*, *7*(4), 910-912.
- Sauter, B., Albert, M. L., Francisco, L., Larsson, M., Somersan, S., & Bhardwaj, N. (2000). Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med*, *191*(3), 423-434.

- Schiller, F. (2000). Fritz Lewy and his bodies. *J Hist Neurosci*, *9*(2), 148-151. doi: 10.1076/0964-704x(200008)9:2;1-y;ft148
- Schwartz, J., & Elizan, T. S. (1979). Search for viral particles and virus-specific products in idiopathic Parkinson disease brain material. *Ann Neurol*, *6*(3), 261-263. doi: 10.1002/ana.410060314
- Schwartz, M., & Baruch, K. (2014). Breaking peripheral immune tolerance to CNS antigens in neurodegenerative diseases: boosting autoimmunity to fight-off chronic neuroinflammation. *J Autoimmun*, *54*, 8-14. doi: 10.1016/j.jaut.2014.08.002
- Seidler, A., Hellenbrand, W., Robra, B. P., Vieregge, P., Nischan, P., Joerg, J., . . . Schneider, E. (1996). Possible environmental, occupational, and other etiologic factors for Parkinson's disease: a case-control study in Germany. *Neurology*, *46*(5), 1275-1284.
- Shavali, S., Combs, C. K., & Ebadi, M. (2006). Reactive macrophages increase oxidative stress and alpha-Synuklein nitration during death of dopaminergic neuronal cells in co-culture: relevance to Parkinson's disease. *Neurochem Res*, *31*(1), 85-94. doi: 10.1007/s11064-005-9233-x
- Sherer, T. B., Kim, J. H., Betarbet, R., & Greenamyre, J. T. (2003). Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-Synuklein aggregation. *Exp Neurol*, *179*(1), 9-16.
- Shoenfeld, Y., Tincani, A., & Gershwin, M. E. (2012). Sex gender and autoimmunity. *J Autoimmun*, *38*(2-3), J71-73. doi: 10.1016/j.jaut.2011.12.007
- Shohami, E., Gallily, R., Mechoulam, R., Bass, R., & Ben-Hur, T. (1997). Cytokine production in the brain following closed head injury: dexanabinol (HU-211) is a novel TNF-alpha inhibitor and an effective neuroprotectant. *J Neuroimmunol*, *72*(2), 169-177.
- Simpson, G. R., Patience, C., Lower, R., Tonjes, R. R., Moore, H. D., Weiss, R. A., & Boyd, M. T. (1996). Endogenous D-type (HERV-K) related sequences are packaged into retroviral particles in the placenta and possess open reading frames for reverse transcriptase. *Virology*, *222*(2), 451-456. doi: 10.1006/viro.1996.0443
- Singer, T. P., Castagnoli, N., Jr., Ramsay, R. R., & Trevor, A. J. (1987). Biochemical events in the development of parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J Neurochem*, *49*(1), 1-8.
- Singleton, A. B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., . . . Gwinn-Hardy, K. (2003). alpha-Synuklein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*, *302*(5646), 841. doi: 10.1126/science.1090278
- Snider, W. D., Simpson, D. M., Nielsen, S., Gold, J. W., Metroka, C. E., & Posner, J. B. (1983). Neurological complications of acquired immune deficiency syndrome: analysis of 50 patients. *Ann Neurol*, *14*(4), 403-418. doi: 10.1002/ana.410140404
- Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*, *32*(12), 638-647. doi: 10.1016/j.tins.2009.08.002
- Sokolove, J., Bromberg, R., Deane, K. D., Lahey, L. J., Derber, L. A., Chandra, P. E., . . . Robinson, W. H. (2012). Autoantibody epitope spreading in the pre-clinical phase predicts progression to rheumatoid arthritis. *PLoS One*, *7*(5), e35296. doi: 10.1371/journal.pone.0035296
- Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M., & Goedert, M. (1998). alpha-Synuklein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(11), 6469-6473.
- Spina, M. B., & Cohen, G. (1989). Dopamine turnover and glutathione oxidation: implications for Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *86*(4), 1398-1400.
- Steinman, R. M., & Nussenzweig, M. C. (2002). Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(1), 351-358. doi: 10.1073/pnas.231606698
- Sullivan, S. M., Sullivan, R. K., Miller, S. M., Ireland, Z., Bjorkman, S. T., Pow, D. V., & Colditz, P. B. (2012). Phosphorylation of GFAP is associated with injury in the neonatal pig hypoxic-ischemic brain. *Neurochem Res*, *37*(11), 2364-2378. doi: 10.1007/s11064-012-0774-5

- Swerdlow, R. H., Parks, J. K., Miller, S. W., Tuttle, J. B., Trimmer, P. A., Sheehan, J. P., . . . Parker, W. D., Jr. (1996). Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, *40*(4), 663-671. doi: 10.1002/ana.410400417
- Tam, S., Barry, D. P., Beaman, L., & Beaman, B. L. (2002). Neuroinvasive *Nocardia asteroides* GUH-2 induces apoptosis in the substantia nigra in vivo and dopaminergic cells in vitro. *Exp Neurol*, *177*(2), 453-460.
- Tan, J. K., & O'Neill, H. C. (2005). Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. *J Leukoc Biol*, *78*(2), 319-324. doi: 10.1189/jlb.1104664
- Tan, P. H., Yates, J. B., Xue, S. A., Chan, C., Jordan, W. J., Harper, J. E., . . . George, A. J. (2005). Creation of tolerogenic human dendritic cells via intracellular CTLA4: a novel strategy with potential in clinical immunosuppression. *Blood*, *106*(9), 2936-2943. doi: 10.1182/blood-2005-05-1826
- Tanner, C. M., & Goldman, S. M. (1996). Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin*, *14*(2), 317-335.
- Tanner, C. M., Ottman, R., Goldman, S. M., Ellenberg, J., Chan, P., Mayeux, R., & Langston, J. W. (1999). Parkinson disease in twins: an etiologic study. *Jama*, *281*(4), 341-346.
- Taubenberger, J. K. (2006). The origin and virulence of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Proc Am Philos Soc*, *150*(1), 86-112.
- Tompkins, M. M., & Hill, W. D. (1997). Contribution of somal Lewy bodies to neuronal death. *Brain Res*, *775*(1-2), 24-29.
- Toovey, S., Jick, S. S., & Meier, C. R. (2011). Parkinson's disease or Parkinson symptoms following seasonal influenza. *Influenza Other Respir Viruses*, *5*(5), 328-333. doi: 10.1111/j.1750-2659.2011.00232.x
- Tselis, A. (2011). Evidence for viral etiology of multiple sclerosis. *Semin Neurol*, *31*(3), 307-316. doi: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1287656>
- 10.1055/s-0031-1287656
- Tsonis, I. A., Avrameas, S., & Moutsopoulos, H. M. (2007). Autoimmunity and pathophysiology. *J Autoimmun*, *29*(4), 203-205. doi: 10.1016/j.jaut.2007.07.009
- Turner, M. A., Moran, N. F., & Kopelman, M. D. (2002). Subcortical dementia. *Br J Psychiatry*, *180*, 148-151.
- Tzeng, S. F., Hsiao, H. Y., & Mak, O. T. (2005). Prostaglandins and cyclooxygenases in glial cells during brain inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, *4*(3), 335-340.
- Uversky, V. N., Li, J., & Fink, A. L. (2001). Pesticides directly accelerate the rate of alpha-Synuklein fibril formation: a possible factor in Parkinson's disease. *FEBS Lett*, *500*(3), 105-108.
- Van Den Eeden, S. K., Tanner, C. M., Bernstein, A. L., Fross, R. D., Leimpeter, A., Bloch, D. A., & Nelson, L. M. (2003). Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol*, *157*(11), 1015-1022.
- Vargas, M. E., Watanabe, J., Singh, S. J., Robinson, W. H., & Barres, B. A. (2010). Endogenous antibodies promote rapid myelin clearance and effective axon regeneration after nerve injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(26), 11993-11998. doi: 10.1073/pnas.1001948107
- Verhasselt, V., Vosters, O., Beuneu, C., Nicaise, C., Stordeur, P., & Goldman, M. (2004). Induction of FOXP3-expressing regulatory CD4pos T cells by human mature autologous dendritic cells. *Eur J Immunol*, *34*(3), 762-772. doi: 10.1002/eji.200324552
- Villesen, P., Aagaard, L., Wiuf, C., & Pedersen, F. S. (2004). Identification of endogenous retroviral reading frames in the human genome. *Retrovirology*, *1*, 32. doi: 10.1186/1742-4690-1-32
- Vincendeau, M., Gottesdorfer, I., Schreml, J. M., Wetie, A. G., Mayer, J., Greenwood, A. D., . . . Leib-Mosch, C. (2015). Modulation of human endogenous retrovirus (HERV) transcription during persistent and de novo HIV-1 infection. *Retrovirology*, *12*, 27. doi: 10.1186/s12977-015-0156-6

- Wang-Johanning, F., Liu, J., Rycaj, K., Huang, M., Tsai, K., Rosen, D. G., . . . Johanning, G. L. (2007). Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins in ovarian cancer. *Int J Cancer*, *120*(1), 81-90. doi: 10.1002/ijc.22256
- Weiss, R. A. (2006). The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology*, *3*, 67. doi: 10.1186/1742-4690-3-67
- Whitehouse, P. J. (1986). The concept of subcortical and cortical dementia: another look. *Ann Neurol*, *19*(1), 1-6. doi: 10.1002/ana.410190102
- Wilhelm, K. R., Yanamandra, K., Gruden, M. A., Zamotin, V., Malisaukas, M., Casaitė, V., . . . Morozova-Roche, L. A. (2007). Immune reactivity towards insulin, its amyloid and protein S100B in blood sera of Parkinson's disease patients. *Eur J Neurol*, *14*(3), 327-334. doi: 10.1111/j.1468-1331.2006.01667.x
- Williams, D. B., Annegers, J. F., Kokmen, E., O'Brien, P. C., & Kurland, L. T. (1991). Brain injury and neurologic sequelae: a cohort study of dementia, parkinsonism, and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, *41*(10), 1554-1557.
- Wilms, H., Rosenstiel, P., Sievers, J., Deuschl, G., Zecca, L., & Lucius, R. (2003). Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease. *Faseb j*, *17*(3), 500-502. doi: 10.1096/fj.02-0314fje
- Wu, D. C., Jackson-Lewis, V., Vila, M., Tieu, K., Teismann, P., Vadseth, C., . . . Przedborski, S. (2002). Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J Neurosci*, *22*(5), 1763-1771.
- Xie, Z., Wei, M., Morgan, T. E., Fabrizio, P., Han, D., Finch, C. E., & Longo, V. D. (2002). Peroxynitrite mediates neurotoxicity of amyloid beta-peptide1-42- and lipopolysaccharide-activated microglia. *J Neurosci*, *22*(9), 3484-3492. doi: 20026340
- Yamada, T., McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (1992). Lewy bodies in Parkinson's disease are recognized by antibodies to complement proteins. *Acta Neuropathol*, *84*(1), 100-104.
- Yang, F., Liu, Y., Tu, J., Wan, J., Zhang, J., Wu, B., . . . Wang, L. (2014). Activated astrocytes enhance the dopaminergic differentiation of stem cells and promote brain repair through bFGF. *Nat Commun*, *5*, 5627. doi: 10.1038/ncomms6627
- Yang, Z., & Wang, K. K. (2015). Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci*, *38*(6), 364-374. doi: 10.1016/j.tins.2015.04.003
- Yavich, L., Tanila, H., Vepsäläinen, S., & Jakala, P. (2004). Role of alpha-Synuclein in presynaptic dopamine recruitment. *J Neurosci*, *24*(49), 11165-11170. doi: 10.1523/jneurosci.2559-04.2004
- Yu, I., Inaji, M., Maeda, J., Okauchi, T., Nariai, T., Ohno, K., . . . Sahara, T. (2010). Glial cell-mediated deterioration and repair of the nervous system after traumatic brain injury in a rat model as assessed by positron emission tomography. *J Neurotrauma*, *27*(8), 1463-1475. doi: 10.1089/neu.2009.1196
- Yumino, K., Kawakami, I., Tamura, M., Hayashi, T., & Nakamura, M. (2002). Paraquat- and diquat-induced oxygen radical generation and lipid peroxidation in rat brain microsomes. *J Biochem*, *131*(4), 565-570.
- Zecca, L., Gallorini, M., Schunemann, V., Trautwein, A. X., Gerlach, M., Riederer, P., . . . Tampellini, D. (2001). Iron, neuromelanin and ferritin content in the substantia nigra of normal subjects at different ages: consequences for iron storage and neurodegenerative processes. *J Neurochem*, *76*(6), 1766-1773.
- Zecca, L., Stroppolo, A., Gatti, A., Tampellini, D., Toscani, M., Gallorini, M., . . . Zucca, F. A. (2004). The role of iron and copper molecules in the neuronal vulnerability of locus coeruleus and substantia nigra during aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(26), 9843-9848. doi: 10.1073/pnas.0403495101
- Zecca, L., Wilms, H., Geick, S., Claasen, J. H., Brandenburg, L. O., Holzknecht, C., . . . Lucius, R. (2008). Human neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat

- substantia nigra: implications for Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*, 116(1), 47-55. doi: 10.1007/s00401-008-0361-7
- Zecca, L., Zucca, F. A., Wilms, H., & Sulzer, D. (2003). Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics. *Trends Neurosci*, 26(11), 578-580. doi: 10.1016/j.tins.2003.08.009
- Zhang, J., Fitsanakis, V. A., Gu, G., Jing, D., Ao, M., Amarnath, V., & Montine, T. J. (2003). Manganese ethylene-bis-dithiocarbamate and selective dopaminergic neurodegeneration in rat: a link through mitochondrial dysfunction. *J Neurochem*, 84(2), 336-346.
- Zhang, W., Phillips, K., Wielgus, A. R., Liu, J., Albertini, A., Zucca, F. A., . . . Zecca, L. (2011). Neuromelanin activates microglia and induces degeneration of dopaminergic neurons: implications for progression of Parkinson's disease. *Neurotox Res*, 19(1), 63-72. doi: 10.1007/s12640-009-9140-z
- Zhang, W., Wang, T., Pei, Z., Miller, D. S., Wu, X., Block, M. L., . . . Zhang, J. (2005). Aggregated alpha-Synuklein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *Faseb j*, 19(6), 533-542. doi: 10.1096/fj.04-2751com
- Zhang, Z., Zoltewicz, J. S., Mondello, S., Newsom, K. J., Yang, Z., Yang, B., . . . Wang, K. K. (2014). Human traumatic brain injury induces autoantibody response against glial fibrillary acidic protein and its breakdown products. *PLoS One*, 9(3), e92698. doi: 10.1371/journal.pone.0092698

Eigene Publikationen:

- Kasang, C., Kalluvya, S., Majinge, C., Kongola, G., Mlewa, M., Massawe, I., Kabyemera, R., Magambo, K., Ulmer, A., Klinker, H., Gschmack, E., Horn, A., Koutsilieri, E., Preiser, W., Hofmann, D., Hain, J., Muller, A., Dolken, L., Weissbrich, B., Rethwilm, A., Stich, A., Scheller, C. (2016). Effects of Prednisolone on Disease Progression in Antiretroviral-Untreated HIV Infection: A 2-Year Randomized, Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial. *PLoS One*, 11(1), e0146678
- Plochmann, K., Horn, A., Gschmack, E., Armbruster, N., Krieg, J., Wiktorowicz, T., Weber, C., Stirrnagel, K., Lindemann, D., Rethwilm, A., Scheller, C. (2012). Heparan sulfate is an attachment factor for foamy virus entry. *J Virol*, 86(18), pp. 10028-35

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Basalganglien mit deren funktionellen Verschaltungen.	14
Abbildung 2: Verschaltung der D1 und D2-Dopaminrezeptoren zwischen SNc und Striatum mit Auswirkungen auf die Basalganglien und den zerebralen Kortex bei PD.	17
Abbildung 3: Neuroinflammation und -degeneration bei der Pathogenese von PD.	29
Abbildung 4: Toxischer Einfluss des Homogenisierungspuffers TEVP auf die Detektion von spezifischen T-Zellen in PBMCs.	68
Abbildung 5: Bei der Autoantikörperreaktion handelt es sich um eine länger bestehende Immunität.	70
Abbildung 6: Titration des Sekundärantikörpers anti-IgG.	71
Abbildung 7: Test von GAPDH und Ovalbumin als Standard im Western Blot.	72
Abbildung 8: Semi-dry Western Blot Verfahren zeigt ein hohes Hintergrundsignal sowie unzureichende Bandenqualität.	73
Abbildung 9: Anzahl der Autoantikörperbanden gegen SN und NM in PD-Patienten und Kontrollen gegen verschiedene Hirnareale im semi-dry-Western Blot Verfahren.	73
Abbildung 10: PD-Patienten zeigen eine signifikant höhere IgG-Konzentration (mg/ml) als Kontrollen.	74
Abbildung 11: Vergleich des Autoantikörpersignals gegen Striatum von 6 verschiedenen südafrikanischen HIV-Patienten.	75
Abbildung 12: Unterschiedliche Blottingzeiten.	76
Abbildung 13: Es treten deutliche Schwankungen in der Signalstärke und der Hintergrundfärbung auf.	77
Abbildung 14: Die Signalintensität der Positivkontrollen zeigt eine große Streuung um den Mittelwert.	78
Abbildung 15: Der anti-leichte-Kette-IgG erkennt wie erwartet eine Bande bei 25 kDa, der bisher verwendete anti-schwere und leichte-Kette IgG erkennt alle beschriebenen Varianten der schweren und leichten Ketten des IgG.	79
Abbildung 16: Das tankblot-Modul liefert verlässliche Signale mit deutlich verringertem Hintergrund.	80
Abbildung 17: Der Li-Cor-Imager von Odyssey liefert verlässliche Signale.	81

Abbildung 18: Anwendung der optimierten Methode zur Immunfärbung des Western Blots.....	82
Abbildung 19: Auswertung der Anzahl und der Stärke der Banden pro Homogenat.	82
Abbildung 20: Untersuchte Spender zeigen keinen Unterschied im gesamt-IgG-Gehalt im Plasma zwischen PD-Patienten und gesunden Kontrollen.....	85
Abbildung 21: PD und Kontrollen zeigen gegen keines der untersuchten Gehirnareale eine unterschiedliche Immunreaktivität.....	86
Abbildung 22: PD- und Kontrollplasmen zeigen keine signifikante spezifische Immunreaktivität gegen eines der Hirnareale.	87
Abbildung 23: Weibliche PD-Patienten zeigen eine signifikant stärkere Autoantikörperantwort gegen dm als männliche	89
Abbildung 24: Weibliche PD-Patienten zeigen eine signifikant stärkere spezifische Autoimmunreaktion gegen dm als männliche.....	91
Abbildung 25: Das olfaktorische Areal dm wird deutlich stärker erkannt als die übrigen Gehirngewebe.....	92
Abbildung 26: Das olfaktorische Areal dm wird deutlich stärker spezifisch erkannt als die übrigen Gehirngewebe.....	93
Abbildung 27: Die signifikant stärkere Signalintensität gegen dm ist nicht vom Geschlecht abhängig.....	94
Abbildung 28: Die signifikant stärkere spezifische Signalintensität gegen dm ist nicht vom Geschlecht abhängig.	95
Abbildung 29: Intensität der Autoimmunreaktion gegen drei prominente Proteine in unterschiedlichen Gehirnarealen.....	96
Abbildung 30: In den Gehirnarealen dm, SN, MC und FC wird das 45 kDa-Protein von PD-Patienten signifikant weniger erkannt.....	98
Abbildung 31: Kontrollen zeigen eine signifikant stärkere Immunreaktivität gegen das 45 kDa-Protein in der SN und im MC als PD-Patienten.....	100
Abbildung 32: PD-Patienten zeigen eine signifikant geringere spezifische Autoimmunreaktivität gegen ein 45 kDa Protein im SN, MC und HC als Kontrollen.....	101
Abbildung 33: Männliche PD-Patienten zeigen eine signifikant geringere Immunreaktivität gegen das 45 kDa-Protein in der SN, MC und FC als männliche Kontrollen.	104
Abbildung 34: Exemplarische Darstellung des Cutoffs von log-5.....	104

Abbildung 35: Odds Ratios in den untersuchten Gruppen.	106
Abbildung 36: Das 160 kDa Protein wird in allen untersuchten Gruppen signifikant stärker in den kortikalen Regionen HC und FC als in den subkortikalen dm und SN erkannt.	107
Abbildung 37: Signalintensität gegen ein 160 kDa-Protein unterscheidet sich für keines der Gehirnareale in PD und Kontrollen.	108
Abbildung 38: 2D Gele mit den Spots, die zur Proteinidentifikation herangezogen wurden.	109
Abbildung 39: Die Anzahl der Autoantikörper-Banden gegen verschiedene Gehirnareale unterscheidet sich nicht in PD und Kontrollen.....	112
Abbildung 40: Gegen FC zeigen alle Gruppen die höchste Autoantikörperanzahl.	113
Abbildung 41: Anzahl der Autoantikörperbanden unterscheidet sich nicht zwischen Männern und Frauen innerhalb der PD und Kontrollgruppe.....	115
Abbildung 42: Weder männliche, noch weibliche Kontrollen und PD-Patienten zeigen eine signifikant unterschiedliche Anzahl an Autoantikörperbanden gegen die untersuchten Gehirnareale.....	116
Abbildung 43: Amplifikationskurven der DNA-qPCR.....	117
Abbildung 44: Schmelzkurvenanalyse der DNA-qPCR-Produkte.....	117
Abbildung 45: PD-Patienten zeigen keine höhere HERV-K DNA-und RNA- Expression als gesunde Kontrollen.	119

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Patienten-Charakterisierung der Studiengruppe 1.	46
Tabelle 2: Charakterisierung der Studiengruppe 2	47
Tabelle 3: Angaben für die Herstellung von Gewebemogenaten.....	51
Tabelle 4: Angaben für die Proteinmengen, die als Antigene auf das SDS-Gel in der Studiengruppe 1 aufgetragen wurden.....	55
Tabelle 5: Angaben für die Proteinmengen, die als Antigene auf das SDS-Gel für die Studiengruppe 2 aufgetragen wurden.....	55
Tabelle 6: Angaben für die Proteinmengen, die als Antigene auf das SDS-Gel für die Optimierung der Methode aufgetragen wurden.....	55
Tabelle 7: Angaben für die Proteinmengen, die als Antigene auf das SDS-Gel für das Tübingen-Projekt aufgetragen wurden.....	56
Tabelle 8: Anwendung der statistischen Tests bei unterschiedlichen Stichproben mittels GraphPad Prism®	67
Tabelle 9: Charakterisierung der Tübinger Patienten.	83
Tabelle 10: Zusammenfassung der Odds Ratio, Sensitivität und Spezifität, sowie der PPV und NPV	105
Tabelle 11: nanoHPLC-Identifizierung der im 2D-Gel immungefärbten Banden	110
Tabelle 12: Verdünnung des Standards und errechnete HERV-K-DNA-Kopienzahl.	118

Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
Auto-Ak	Autoantikörper
BG	Basalganglien
Cbl2	Cerebellum, Kleinhirn (2: zweite Scheibe)
CI	Konfidenzintervall (confidence interval)
CSF	cerebrospinal fluid, Liquor
c_t	threshold cycle
DA	Dopamin
DAerg	dopaminerg
DAT	Dopamintransporter
dM	dorsaler Motornucleus (des Vagusnervs) (Braak-Stadium 1)
DNS/DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISpot	enzyme-linked immuno
FC	Assoziationsfelder, Prämotorcortex, sowie primäre sensorische und motorische Felder (Braak-Stadium 6)
g	Gramm
GABA	γ -Aminobuttersäure (γ -aminobutryc-acid)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3 phophat Dehydrogenase
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GPe	Globus pallidus externa
GPI	Globus pallidus interna
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie (highly activ antretroviral therapy)
HAD	HIV-associated dementia
HAND	HIV-associated neurocognitive disorders
HC	Neocorte, high order sensory association areas and prefrontal fields (Braak-Stadium 5)
HERV	human endogenous retrovirus
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horse-raddish peroxidase)
ICD-10	International statistical classification of diseases and related helth problems, 2012
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF- γ	Interferon-gamma

kD	Kilo-Dalton
l	Liter
LC	Locus coeruleus (Braak-stage 2)
M	Molar
mA	Miliampere
Maneb	Manganethylen-1,2-bis-dithiocarbamat
MAO-B	Monoaminoxidase B
MC	(anteromedial temporal) Mesocortex (Braak-Stadium 4)
min	Minute
ml	Mililiter
mM	Mili-Molar
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3-tetrahydropyridin
MPP ⁺	1-methyl-4-phenylpyridinium
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaVO ₃	Natriumorthovanadat
ng	Nanogramm
NM	Neuromelanin
nm	Nanometer
NPV	negative predictive value
OD	Optische Dichte
OS	Oxidativer Stress
Ova	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamid-gelelektrophorese
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	engl.: phosphate buffered saline
PD	Parkinson's Disease, Morbus Parkinson
pH	negative dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Protonen-Konzentration
PPV	Positive predictive value
PSP	progressive supranuclear palsy, dt.: progressive supranukleäre Blickparese
qPCR	quantitative real-time-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
rpm	rounds per minute
RPMI	Rosswell Park Memorial Institute Medium

RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SN	Substantia nigra (Braak-Stadium 3)
SNc	Substantia nigra pars compacta
SNr	Substantia nigra pars reticulata
STN	Nucleus subthalamicus
α -Syn	alpha-Synuklein
TE	Tris-EDTA
TTX	Tetanus-Toxoid
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt

Appendix

Bande (kDa)	Spot	Nr	Protein	Score
37	A	1	GFAP Isoform 1	2726
		2	Neurofilament light polypeptide	77
		3	Synemin Isoform 1	65
		4	L1 Prtoein	56
		5	Dynein schwere Kett 2, axonemal	47
		6	DNA packaging tegument protein UL25	46
		7	terminase small subunit	
40	B	1	GFAP Isoform 2	2077
		2	Endophilin A1	238
		3	Serine-threonine kinase receptor-assoc. Protein	115
		4	neurofilament medium polypeptide isororm 1	100
		5	Dynein-schwere Kette 2	72
		6	Neurofilament light polypeptide	54
		7	protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1	44
	C	1	GFAP Isoform 1	2001
		2	Aktin, zytoplasmic 1	474
		3	alpha-internexin	203
		4	Tubulin alpha-3C/D Kette	85
		5	Haptoglobin Isoform 1 Preproprotein	80
		6	Tropomodulin-2 Isoform a	59
		7	Hypothetical protein	47
45	D	1	Fructose-Bisphosphate aldolase A Isoform 1	1044
			Aspartate aminotransferase, mitochondrial isoform 1 precursor	570
		2		
		3	GFAP Isoform 1	294
		4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Isoform 1	165
		5	Ezrin	154
		6	3-ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal isoform a	116
	7	Keratin, Type I cytoskeletal 10	60	
	E	1	Aspartate aminotransferase, mitochondrial isoform 1 precursor	673
		2	GFAP isoform 1	358
		3	Fructose-Bisphosphate aldolase A isoform 1	263
		4	Keratin Type 1 Cytoskeletal 10	108
		5	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	68
		6	head-tail adaptor protein	45
7		hypoth prot	43	

70?	F	1	Cytosolic non-specific dipeptidase isoform 1	577
		2	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial isoform 1 precursor	554
		3	V-type proton ATPase subunit B, brain Isoform	514
		4	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	371
		5	dihydropyrimidinase-related protein 2 isoform1	332
		6	GFAP isoform 1	311
		7	pyruvate dehydrogenase protein X component, mitochondrial isoform 1 precursor	268
160	G	1	Dihydropyrimidinase-related protein 2 isoform 1	1074
		2	T-complex protein 1 subunit alpha isoform a	521
		3	NADP-dependent malic enzyme	408
		4	Keratin Type II cytoskeletal 1	229
		5	Keratin, type I cytoskeletal 9	131
		6	heat shock 70 kDa protein 4	96
		7	serum albumin preproprotein	94
37	H	1	GFAP Isoform 1	903
		2	Gamma-Enolase	335
		3	Neurofilament light polypeptide	192
		4	Paralemmin-1 Isoform 2	184
		5	Actin, alpha skeletal muscle	180
		6	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme	143
		7	Neuromodulin Isoform 2	141
		8	Protein NDRG2 Isoform b	110
40	I	1	GFAP Isoform 1	1168
		2	Aktin, cytoplasmic 1	473
		3	Gamma-Enolase	276
		4	Keratin, Type II cytoskeletal 1	2772
		5	Keratin, Type I cytoskeletal 10	242
		6	Keratin, Type I cytoskeletal 9	240
		7	nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinase substrate 1	174
45	J	1	Aspartate Aminotransferase, mitochondrial isoform 1	1046
		2	Keratin type I cytoskeletal 10	479
		3	keratin, type II cytoskeletal 1	348
		4	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	317
		5	fructose-bisphosphate aldolase A isoform 1	218
		6	synapsin-1 isoform 1b	91
		7	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial isoform a precursor	79
	K	1	Dihydropyrimidinase-related protein 2 isoform 1	1382
		2	keratin, type II cytoskeletal 1	807

3	phosphoglucomutase-1 isoform 1	593
4	stress-induced-phosphoprotein 1 isoform b	535
5	T-complex protein 1 subunit gamma isoform a	473
6	dihydropyrimidinase-related protein 2 isoform 2	466
7	keratin, type I cytoskeletal 9	456

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Carsten Scheller für die Überlassung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit, für die freundliche Unterstützung während der experimentellen Phase, die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Übernahme des Erstgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Dandekar danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei meiner Kollegin Dr. Anne Horn bedanke ich mich herzlich für das tolle Arbeitsklima und die stets freundliche Hilfsbereitschaft.

Für die Bereitstellung von humanem Material möchte ich mich bei verschiedenen Kooperationspartnern vielmals bedanken.

Herrn Dr. Tatschner aus der Rechtsmedizin der Universität Würzburg für die Isolierung von Substantia nigra aus humanem Gewebe, bei Andrea Berg für die Kooperation und Bereitstellen der Tübinger Patienten- und Kontrollplasmen, bei Frau Dr. Camelia Monoranu der Neuropathologie, Institut für Pathologie der Universität Würzburg für die Isolierung und Anfertigung der Kryoschnitte verschiedener Gehirnnareale und weiterhin bei Herrn Dr. Steigerwald, Leiter der Kopfklinik, Neurochirurgische Polyklinik der Universität Würzburg für das Rekrutieren von Parkinson-Patienten.

Mein besonderer Dank gilt auch allen Plasma-Spendern für die Teilnahme an klinischen Studien, ohne die Arbeiten wie diese nicht möglich wären.

Nicht zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie für die Unterstützung während dieser Zeit bedanken.