

Aus der  
Klinik für Neurologie  
Kommissarische Leitung: Professor Dr. med. R. Dodel  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Neuroprotektive Wirkung von acyliertem und nicht-acyliertem  
Ghrelin in einem in vitro-Modell der Parkinson-Krankheit



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

Johanna Claudia Wagner  
aus München

Marburg, 2015

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 06.07.2015

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr PD Dr. V. Ries

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. F. Czubayko

*Für meine Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>3</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1 Ghrelin</b> .....	<b>5</b>
1.1.1 Entstehung, Freisetzung und Vorkommen des Ghrelins .....	5
1.1.2 Growth-Hormone-Secretagogue Receptor 1a.....	6
1.1.3 Funktionen des Ghrelins .....	7
1.1.4 Ghrelin bei Patienten mit idiopathischem Parkinson-Syndrom.....	8
<b>1.2 Das idiopathische Parkinson-Syndrom</b> .....	<b>9</b>
1.2.1 Epidemiologie und Symptomatik.....	9
1.2.2 Risikofaktoren und Umwelteinflüsse .....	10
1.2.3 Ätiopathogenese des idiopathischen Parkinson-Syndroms .....	10
1.2.3.1 Pathophysiologie und funktionelle Anatomie .....	11
1.2.3.2 Pathologie des idiopathischen Parkinson-Syndroms .....	12
1.2.3.3 Pathogenese der Zelldegeneration .....	13
1.2.4 Diagnosestellung .....	19
1.2.5 Therapie .....	19
1.2.6 Toxinmodelle .....	20
1.2.6.1 MPTP .....	20
1.2.6.2 3-Nitropropionsäure .....	21
<b>1.3 Elektrische Aktivität dopaminerger Neurone</b> .....	<b>22</b>
1.3.1 Autonome Aktivität der dopaminergen Neurone.....	22
1.3.2 Rolle der Kalziumkanäle .....	23
1.3.2.1 Ca <sub>v</sub> 1-Kanäle (L-Typ-Kalziumkanäle).....	24
1.3.2.2 Ca <sub>v</sub> 3-Kanäle (T-Typ-Kalziumkanäle).....	25
1.3.3 Rolle der Kaliumkanäle.....	25
1.3.3.1 Adenosintriphosphat-sensitive Kaliumkanäle (K <sub>ATP</sub> -Kanäle).....	26
1.3.3.2 Weitere Kaliumkanäle.....	27
<b>1.4 Ziele der Arbeit</b> .....	<b>28</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>29</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>29</b>
2.1.1 Chemikalien .....	29
2.1.2 Antikörper.....	30
2.1.3 Glas und Plastikware .....	30
2.1.4 Geräte .....	30
2.1.5 Verwendete Lösungen und deren Herstellung.....	31
<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>32</b>
2.2.1 Zellkultur .....	32

2.2.1.1	Kultivierung primärer mesencephaler Neurone.....	32
2.2.1.2	Vorbereitung der Platten .....	32
2.2.1.3	Herstellung der primären Zellkultur .....	32
2.2.1.4	Kultivierung und Behandlung der Zellen.....	33
2.2.2	Immunhistochemie .....	35
2.2.2.1	Anti-Tyrosinhydroxylase (Anti-TH).....	35
2.2.2.2	Anti-NeuN (Neuronal Nuclei) .....	35
2.2.2.3	Anti-Growthhormone Secreatogue Rezeptor 1a.....	36
2.2.3	Mikroskopische Auswertung .....	36
2.2.3.1	Tyrosinhydroxylase-positive Zellen .....	36
2.2.3.2	Neuronal Nuclei-positive Zellen .....	37
2.2.3.3	GHS-R1a-positive Zellen .....	37
<b>2.3</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Wirkung von Ghrelin auf eine Hemmung des Komplexes I durch MPP<sup>+</sup> .....</b>	<b>38</b>
3.1.1	Acyliertes Ghrelin .....	38
3.1.2	Nicht-acyliertes Ghrelin .....	38
3.1.3	Dosis-Wirkungs-Beziehung und Zellmorphologie .....	39
<b>3.2</b>	<b>Einfluss von Glycerin.....</b>	<b>40</b>
<b>3.3</b>	<b>Wirkung von Ghrelin auf eine Hemmung des Komplexes II durch 3-NP.....</b>	<b>42</b>
3.3.1	TH-positive Zellen .....	42
3.3.2	NeuN-positive Zellen .....	42
<b>3.4</b>	<b>Abhängigkeit der neuroprotektiven Wirkung von Kalziumkanälen.....</b>	<b>44</b>
3.4.1	T-Typ-Kalziumkanäle .....	44
3.4.2	L-Typ-Kalziumkanäle .....	45
<b>3.5</b>	<b>Abhängigkeit der neuroprotektiven Wirkung von K<sub>ATP</sub>-Kanälen.....</b>	<b>47</b>
<b>3.6</b>	<b>Expression des Ghrelinrezeptors GHS-R1a.....</b>	<b>48</b>
<b>3.7</b>	<b>Hemmung der Ghrelinwirkung durch einen Ghrelinrezeptor-Antagonisten .....</b>	<b>50</b>
3.7.1	TH-positive Zellen .....	50
3.7.2	NeuN-positive Zellen .....	51
<b>3.8</b>	<b>GOAT-Inhibitor.....</b>	<b>52</b>
3.8.1	TH-positive Zellen .....	53
3.8.2	NeuN-positive Zellen .....	53
<b>3.9</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse .....</b>	<b>54</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>55</b>
<b>4.1</b>	<b>Diskussion der Methoden .....</b>	<b>55</b>
<b>4.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>56</b>

4.2.1	Wirkung von Ghrelin auf eine Hemmung des Komplexes I durch MPP <sup>+</sup> .....	56
4.2.2	Wirkung von Ghrelin auf eine Hemmung des Komplexes II durch 3-NP .....	58
4.2.3	Abhängigkeit der neuroprotektiven Wirkung von Ghrelin von Ionenkanälen .....	59
4.2.4	Abhängigkeit der Ghrelinwirkung von der UCP2-Expression .....	61
4.2.5	Expression des Ghrelinrezeptors GHS-R1a.....	62
4.2.6	Hemmung der Ghrelinwirkung durch Ghrelinrezeptor-Antagonisten .....	63
4.2.7	GOAT-Inhibitor .....	65
<b>4.3</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>66</b>
<b>ANHANG .....</b>		<b>68</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>		<b>68</b>
<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b>		<b>71</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>		<b>73</b>
<b>Publikationsliste und Publikation .....</b>		<b>88</b>
<b>Verzeichnis der akademischen Lehrer .....</b>		<b>89</b>
<b>Danksagung .....</b>		<b>90</b>

## ZUSAMMENFASSUNG

Ghrelin ist ein Polypeptid, welches eine Reihe unterschiedlicher Funktionen erfüllt, wie z.B. die Regulation der Wachstumshormon-Freisetzung, die Regulation der Nahrungsaufnahme, eine prokinetische Wirkung auf den Gastrointestinaltrakt und die Beeinflussung der endokrinen Pankreasfunktion. Im Zusammenhang mit dem idiopathischen Parkinson-Syndrom (IPS) wurde festgestellt, dass Parkinson-Patienten dysregulierte postprandiale Ghrelinkonzentrationen im Blut haben. Zusätzlich konnten neuroprotektive Eigenschaften von acyliertem Ghrelin im Parkinson-Tiermodell nachgewiesen werden, die aber noch nicht detailliert erforscht sind. Ghrelin wird durch die Ghrelin-O-Acyltransferase (GOAT) von der nicht-acylierten in die acylierte Form umgewandelt. Diese Acylierung ist notwendig für die Bindung an den Ghrelinrezeptor GHS-R1a.

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit war nun, inwiefern Ghrelin neuroprotektiv wirkt und ob dieser mögliche Effekt auf die acylierte Form beschränkt ist. Die Versuche wurden in Zellkulturen primärer, mesencephaler Neurone aus embryonalen Wistar-Ratten mit einem Gestationsalter von 15 Tagen durchgeführt. Wir führten unsere Experimente stets mit der acylierten und nicht-acylierten Ghrelinform durch. So konnten wir zeigen, dass beide Formen gegenüber einer Behandlung mit dem Neurotoxin  $MPP^+$ , einem Hemmstoff des Komplexes I der mitochondrialen Atmungskette, neuroprotektiv auf dopaminerge Neurone wirken. Dabei lag das Wirkmaximum von acyliertem Ghrelin bei 0,1 nM und von der nicht-acylierten Form 10-fach höher, also bei 1 nM. Dieser Unterschied der Wirkmaxima wurde auch schon in Versuchen an Pankreaszellen festgestellt. Auch gegenüber dem Neurotoxin 3-Nitropropionsäure (3-NP), welches den Komplex II der Atmungskette hemmt, wirkten beide Ghrelinformen neuroprotektiv, wieder mit dem Wirkmaximum bei 0,1 bzw. 1 nM. Da die Neurotoxizität der 3-NP sich nicht auf dopaminerge Zellen beschränkt wie die des  $MPP^+$ , untersuchten wir die Wirkung beider Ghrelinformen auf alle weiteren mesencephalen Neurone. Es zeigte sich, dass die Neuroprotektion unabhängig vom neuronalen Phänotyp war.

In der Entstehung des IPS spielen eine Reihe von Pathomechanismen eine Rolle, so auch die elektrische Aktivität der dopaminergen Neurone. So führt z.B. ein massiver

Kalzium- oder Kaliumeinstrom in die Zelle letztendlich zum Untergang dopaminergere Neurone. Die chronische Einnahme von Kalziumkanal-Blockern (L-Typ, Dihydropyridin-Typ) führt in einer Studie zu einer Reduktion des Erkrankungsrisikos. So stellte sich für uns die Frage, ob die neuroprotektive Eigenschaft von Ghrelin im Zusammenhang mit Ionenströmen stehen könnte. Die Hemmung des L-Typ-Kalziumkanals mit Nicardipin verhinderte die Wirkung von acyliertem und nicht-acyliertem Ghrelin in allen mesencephalen Neuronen.

Aus früheren Studien ergab sich die Überlegung, dass die Wirkung von nicht-acyliertem Ghrelin auf einer Umwandlung in die acylierte Form beruht. Dazu haben wir die Wirkung beider Ghrelinformen im Zusammenhang mit dem GHS-R1a-Antagonisten [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 untersucht. Eine Antagonisierung des Rezeptors führte zu einem Wirkverlust von acyliertem Ghrelin, nicht aber der nicht-acylierten Form. Somit liegt nahe, dass die Wirkung von nicht-acyliertem Ghrelin über einen anderen Mechanismus vermittelt wird. Dies wurde bestätigt durch Versuche mit dem GOAT-Hemmer GO-Tat-CoA, der die Wirkung von nicht-acyliertem Ghrelin nicht abschwächte. Daraus lässt sich schließen, dass die neuroprotektive Wirkung der nicht-acylierten Form nicht auf einer Umwandlung in die acylierte Form zurückzuführen war.

Zusammengefasst konnten wir zeigen, dass nicht nur acyliertes, sondern auch nicht-acyliertes Ghrelin eine neuroprotektive Wirkung auf mesencephale Neurone hat. Diese Protektion ist abhängig von L-Typ-Kalziumkanälen, wird aber bei beiden Ghrelinformen über unterschiedliche Mechanismen vermittelt.



## SUMMARY

Ghrelin is a polypeptide that exerts a wide range of functions, such as the regulation of growth hormone secretion, energy homeostasis, food intake, as well as the exocrine function of the pancreas. In regard to Parkinson's disease (PD), patients who have been diagnosed with PD exhibit reduced levels of circulating ghrelin and a reduced postprandial ghrelin response. Experimental studies revealed neuroprotective effects of acylated ghrelin in different models of PD, which have not been further elucidated to date. There are two major molecular forms of ghrelin, an acylated (AG) and an unacylated (UAG) form. The acylation is catalyzed by the ghrelin-O-acyltransferase (GOAT) and only AG is able to bind to and activate the growth hormone secretagogue receptor 1a (GHS-R1a).

The issue we examined was whether ghrelin would exhibit neuroprotective properties in our cell culture model and if this effect was limited to the acylated form. The study was conducted in primary mesencephalic cultures isolated from rat embryos at a gestational age of 15 days of pregnant Wistar rats. First, we investigated the neuroprotective effects of AG and UAG on dopaminergic neurons after treatment with the complex I inhibitor MPP<sup>+</sup>. Both ghrelin forms were neuroprotective, showing the maximum effect at a concentration of 0.1 nM AG and 1 nM UAG, ten times higher than the necessary concentration of AG. Concurrently, a tenfold higher concentration of UAG was also needed in experiments performed on pancreatic cells. Next, we investigated whether the observed effect was also evident when cells were treated with the complex II inhibitor 3-nitropropionic acid (3-NP). We found that both AG and UAG also protected midbrain neurons against complex II inhibition regardless of their neuronal phenotype, showing a maximum effect with the same concentrations as reported above.

There is a set of pathomechanisms responsible for the development of PD, such as the electrical activity of dopaminergic neurons. A massive influx of calcium or potassium ultimately leads to the loss of dopaminergic neurons. Chronic intake of calcium channel inhibitors (L-type / dihydropyridine-type) lowers the risk for PD. We analyzed whether co-treatment with the L-type channel blocker nifedipine could alter the neuroprotective

effect of ghrelin after 3-NP exposition. Nicardipine abolished the neuroprotective effect of both AG and UAG on all mesencephalic neurons.

Traditionally, AG has been regarded as the only active form of ghrelin due to its receptor binding properties and UAG was thought to exhibit its effect after conversion to AG. To ascertain that the effects of UAG are not due to its *in vitro* acylation into AG, we assessed the effects of UAG in the presence of the GSH-R1a antagonist [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 and the GOAT-inhibitor GO-CoA-Tat. Whereas the effect of AG on mitochondrial impairment required GSH-R1a binding, effects of UAG remained unaffected by treatment with a GSH-R1a antagonist. Importantly, inhibition of ghrelin-O-acyltransferase failed to reduce the activity of UAG.

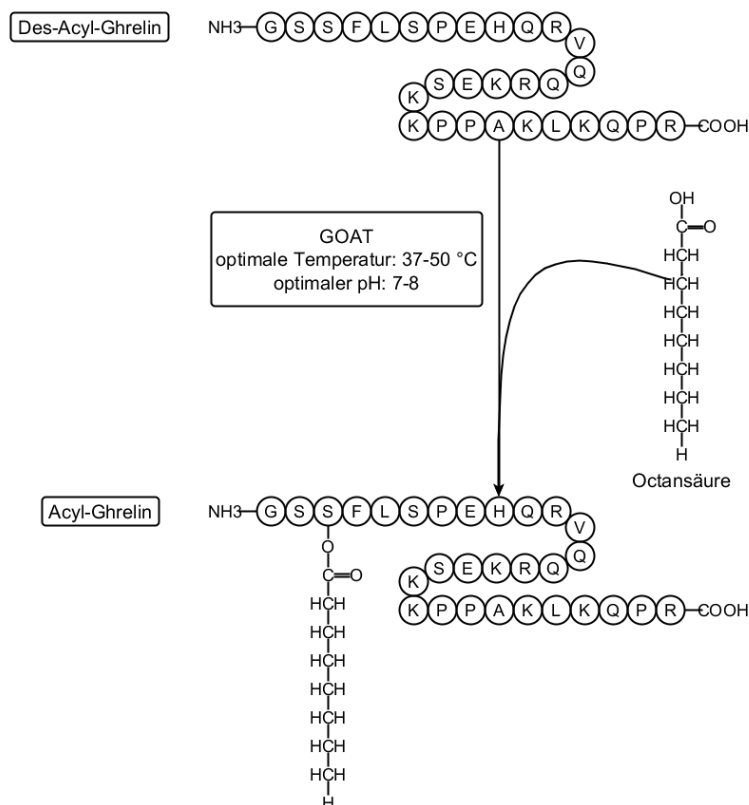
In conclusion, our data suggests that both AG and UAG afford protection to dopaminergic neurons. This protective effect requires the activation of L-type calcium channels, however, it is transmitted through different mechanisms for both molecular forms of ghrelin.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Ghrelin

Ghrelin ist ein Peptid, das aus 28 Aminosäuren besteht und eine für die Funktion wichtige Acetylierung an der dritten Aminosäure (Serin3, Ser3) hat (Kojima et al. 1999). Es wird hauptsächlich von Belegzellen im Magen sezerniert, erfüllt aber eine Reihe von Funktionen, unter anderem die Regulierung der Nahrungsaufnahme und die Freisetzung des Wachstumshormons (growth hormone, GH). Auch eine neuroprotektive Wirkung wurde im MPTP-Mausmodell beschrieben (Andrews et al. 2009). Diese Funktionen werden über eine Bindung an den Growth-Hormone-Secretagogue Receptor 1a (GHS-R1a) vermittelt. Die nicht-acylierte Form (Des-Acyl-Ghrelin / DAG, unacylated ghrelin / UAG) kann nicht an den GHS-R1a binden (Sato et al. 2012).

### 1.1.1 Entstehung, Freisetzung und Vorkommen des Ghrelins



**Abb. 1** Die Entstehung von Acyl-Ghrelin aus Desacyl-Ghrelin mit Hilfe der GOAT (Sato et al. 2012).

Mit Hilfe der Ghrelin-O-Acyltransferase (GOAT) wird dem Pro-Ghrelin an der dritten Aminosäure Serin eine Octansäure angehängt und Ghrelin dadurch acyliert. Die GOAT-mRNA ist in gastrointestinalen Organen zu finden, vor allem im Magen. GOAT ist eine membrangebundene Acyltransferase und modifiziert spezifisch nur Serin an der dritten Stelle (Yang et al. 2008). Das Enzym entfaltet seine optimale Funktion bei 37-50 °C und einem pH von 7-8 (Kojima und Kangawa 2010; Sato et al. 2012).

Die Freisetzung von Ghrelin wird durch das Essverhalten reguliert. Plasma-Ghrelinkonzentrationen steigen beim Fasten an und sinken nach Nahrungseinnahme ab (Cummings et al. 2001). Diese Regulation scheint über die Blutglukosekonzentration vermittelt zu sein (Shiia et al. 2002). Außerdem führt die elektrische Stimulation des zervikalen Vagusnerven zu einer verminderten Konzentration von Ghrelin in Ratten (Murakami et al. 2002). Vagale Stimulation erhöht die jeweiligen Ghrelinreaktionen auf Nahrungsaufnahme. So steigt präprandiales Ghrelin stärker an und postprandial fällt es schneller ab (Heath et al. 2004). Analog dazu stimuliert Ghrelin nach Vagotomie nicht mehr die Nahrungsaufnahme und die Freisetzung des Wachstumshormons (Date et al. 2002).

Ghrelin-mRNA ist in vielen Geweben beim Menschen zu finden, z.B. im Gehirn, im gesamten Gastrointestinaltrakt mit der höchsten Konzentration im Magen und in vielen weiteren peripheren Geweben. Im Gegensatz dazu wurde das Peptid nicht in allen mRNA-positiven Geweben gefunden. Ghrelin wurde im Hypothalamus, der Hypophyse, dem Pankreas, den Ovarien, dem Magen, dem Dünndarm und der Lunge beschrieben (Ueberberg et al. 2009).

### **1.1.2 Growth-Hormone-Secretagogue Receptor 1a**

GHS-R1a-mRNA und Rezeptor wurden im Gehirn entdeckt. Im Gegensatz dazu wurde nur die GHS-R1a-mRNA im Magen und im Dünndarm gefunden und keine Expression des Rezeptors im Gastrointestinaltrakt (Ueberberg et al. 2009). Die Expression des Rezeptors im Gehirn wurde detaillierter untersucht und zeigte eine hohe Anreicherung in der Substantia nigra pars compacta (SNpc) (Guan et al. 1997), die für die Rolle des Ghrelins beim idiopathischen Parkinson-Syndrom (IPS) relevant sein könnte (s. 1.1.3).

Der GSH-R ist ein Rezeptor der G-Protein-Familie und besitzt sieben Transmembrandomänen. Bindung von Ghrelin an den Rezeptor aktiviert ihn und dessen  $G\alpha_{11}$ -Untereinheit und dadurch die Phosphokinase C. Dies führt zur Bildung von

Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Kalzium-Freisetzung (Mau et al. 1995; Howard et al. 1996). Auch in Abwesenheit von Ghrelin gibt der Rezeptor Signale ab und ist zu 50 % aktiv (Holst et al. 2004).

### 1.1.3 Funktionen des Ghrelins

Ghrelin hat eine Reihe von endokrinen und nicht-endokrinen Funktionen. Wie bereits erwähnt, bindet nur die acylierte Form an den GHS-R1a und deswegen wurde bisher vor allem Acyl-Ghrelin (AG) untersucht. AG stimuliert die Freisetzung des Wachstumshormons, des Prolaktins und ACTHs (Adrenokortikotropin) (Broglia et al. 2003). Des Weiteren beeinflusst AG die endokrine Pankreasfunktion durch eine signifikante Erhöhung der Plasmaglukosekonzentration, was interessanterweise eine Reduktion der Insulinsekretion nach sich zieht (Broglia et al. 2001). Unter die nicht-endokrinen Funktionen fällt die große physiologische Rolle, die Ghrelin in der Energiehomöostase spielt. AG ist involviert in der Regulation des Appetits durch seine appetitanregenden Eigenschaften und prokinetische Wirkung auf den Gastrointestinaltrakt (Ejlskjaer et al. 2009). Im Menschen wurde eine umgekehrte Proportionalität zwischen dem AG-Spiegel im Blut und dem Körpergewicht festgestellt. So haben Anorexie-Patienten erhöhte und Patienten mit Übergewicht erniedrigte AG-Spiegel im Blut (Tschop et al. 2001; Soriano-Guillen et al. 2004). Auf die Funktion des Herzens hat AG protektive Eigenschaften. Es verringert den systemischen vaskulären Widerstand, wirkt hypotensiv und erhöht den Herzindex bei gesunden Patienten sowie bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (Nagaya et al. 2001b; Nagaya et al. 2001a). Zudem hat AG eine antiproliferative Wirkung auf manche Tumore, wie zum Beispiel bestimmte Mammakarzinom-Zelllinien, neuroendokrine Karzinome und Adenokarzinome, die den Rezeptor exprimieren (Muccioli et al. 2002; Ghe et al. 2002). Schließlich wirkt AG auch auf höhere Gehirnfunktionen. So setzt es Dopamin im Striatum frei und weist neuroprotektive Wirkungen auf dopaminerge Neurone der SNpc im MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine)-Mausmodell auf (Jiang et al. 2008). So führt genetisch bedingtes Fehlen von AG oder dessen Rezeptor nach Behandlung mit MPTP zu einem gesteigerten Verlust an dopaminergen Zellen in der SNpc und einer geringeren Dopaminkonzentrationen im Striatum (Andrews et al. 2009). AG zeigt eine konzentrationsabhängige protektive Wirkung gegen die Toxizität des MPTP, die durch die Bindung an den GHS-R1a vermittelt wird. Durch die Behandlung mit AG wird das antiapoptotische Protein Bcl-2 erhöht, die Cytochrom C-Freisetzung

und Bildung von freien Radikalen gehemmt sowie die Eisenablagerung in der SNpc verhindert (Jiang et al. 2008). Außerdem inhibiert AG die MPP<sup>+</sup>-induzierte Apoptose, freie Radikalproduktion und NF-κB-Translokation in MES23.5-Zellen (Dong et al. 2009; Liu et al. 2010). AG erhöht signifikant die autonome Signalgebungsfrequenz, die Tyrosinhydroxylase (TH)-mRNA-Expression und die Anzahl der Mitochondrien in dopaminergen Neuronen der SNpc. Darüber hinaus verhindert AG die MPTP-induzierte Aktivierung der Mikroglia in der SNpc und im Striatum sowie die Expression der proinflammatorischen Moleküle TNF-α und IL-1β (Moon et al. 2009).

Aber auch das nicht-acylierte Ghrelin weist biologische Wirkungen auf. In endothelialen Progenitorzellen verhindert UAG den diabetes-induzierten Zellschaden (Togliatto et al. 2010) und in β-Zellen des Pankreas führt UAG zu einer erhöhten Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 und verhindert den Zelluntergang (Granata et al. 2006).

#### **1.1.4 Ghrelin bei Patienten mit idiopathischem Parkinson-Syndrom**

Patienten mit IPS haben oft Motilitätsstörungen des Gastrointestinaltrakts (Unger et al. 2010a) und weisen Lewy-Körperchen im dorsalen Vagus Kern auf. In einer Pilotstudie wurde eine statistisch signifikant gestörte Regulation der Ghrelinkonzentration im Sinne eines erniedrigten Serum-Ghrelin-Profiles in der postprandialen Phase bei Parkinson-Patienten berichtet (Unger et al. 2011). Ghrelin reguliert die Magenmotilität und es besteht ein Zusammenhang zwischen Ghrelinfreisetzung und dem Vagusnerv. Außerdem ist Adipositas ein nachgewiesener Risikofaktor für die Entstehung des IPS. Ab einem BMI von über 23 kg/m<sup>2</sup> steigt das Hazard Ratio auf 2,09 an (Hu et al. 2006; Abbott et al. 2002). Hier stellt sich ein möglicher Zusammenhang zu Ghrelin her. Ghrelin ist als Regulator der Energiehomöostase bei Patienten mit Adipositas im Blut geringer konzentriert im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten (Scerif et al. 2011). Dies lässt vermuten, dass erniedrigte Ghrelinspiegel bei Adipositas zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko beitragen. Zusammengenommen unterstreichen diese Merkmale einen möglichen Zusammenhang zwischen Ghrelin und dem IPS.

## 1.2 Das idiopathische Parkinson-Syndrom

### 1.2.1 Epidemiologie und Symptomatik

Das IPS, auch Parkinson-Krankheit genannt, ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach der Demenz vom Alzheimer-Typ und betrifft weltweit ca. 5 Millionen Menschen. Mit einer durchschnittlichen Prävalenzrate von 100-200/100000 Personen ist das IPS die häufigste neurologische Erkrankung der Basalganglien. Das IPS ist eine chronisch progrediente Erkrankung, die meistens um das 55. Lebensjahr klinisch manifest wird (Dauer und Przedborski 2003). Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen (Chen et al. 2003).

Charakterisiert wird das IPS durch die Kardinalsymptome Bradykinese, Ruhetremor, Rigor und posturale Instabilität. Die Bradykinese ist definiert als eine generelle Verlangsamung bei der Initiierung und Durchführung von willkürlichen Bewegungen und ist das häufigste Symptom bei Parkinson-Patienten. Der Ruhetremor betrifft circa 70 % der Patienten (Louis et al. 1997), beginnt meist unilateral, nimmt mit gezielter Bewegung ab und hat eine Frequenz zwischen 4 und 5 Hz (Findley et al. 1981). Der Rigor ist ein erhöhter Muskeltonus, der zu einem erhöhten Widerstand bei der passiven Bewegung der Gelenke führt. Der Rigor, an dem 90 % der Patienten leiden, beginnt meist auch unilateral, breitet sich dann wie die übrigen Symptome auf die kontralaterale Seite aus. Dabei bleibt die Asymmetrie aber im Verlauf der Erkrankung erhalten (Louis et al. 1997; Scott et al. 1970; Riederer und Sian-Hulsmann 2012). Die posturale Instabilität entsteht durch eine Beeinträchtigung der zentralen Stellreflexe, was zu einer Instabilität und einem erhöhten Sturzrisiko führt (Koller et al. 1989). Zusätzlich zu den motorischen Symptomen leiden fast alle Patienten (97 %) an nicht-motorischen Symptomen (NMS) (Barone et al. 2009), die auch vor den motorischen Symptomen auftreten können (Langston 2006). Zu den NMS gehören u.a. kognitive Dysfunktionen, Demenz, Psychosen, Halluzinationen, Depression, Schlafstörungen, autonome Dysfunktionen und Riechstörungen (Langston 2006).

Abzugrenzen vom IPS sind andere neurodegenerative Formen sowie symptomatische (sekundäre) Parkinson-Syndrome, wobei das IPS mit 75 % den größten Anteil der Parkinson-Syndrome ausmacht. Die Demenz vom Lewy-Körper-Typ (DLB), Multisystematrophie (MSA), progressive supranukleäre Blickparese (PSP) und kortikobasale Degeneration (CBD) zählen zu den atypischen Parkinson-Syndromen, bei

denen die motorische Symptomatik nur ein Teil eines komplexeren neurodegenerativen Syndroms darstellt. Zum sekundären Parkinson-Syndrom kann es nach Intoxikation, Entzündungen (Enzephalitis), intrakraniellen Raumforderungen, Hirntraumen, M. Wilson, vaskulären Ereignissen und Medikamenteneinnahme (v.a. Neuroleptika) kommen (Ahlskog 2000; Tolosa et al. 2006; Oertel et al. 2012).

Die Bewegungsstörungen werden in drei Gruppen eingeteilt: Zur Gruppe der  $\alpha$ -Synukleinopathien zählen die MSA, das IPS und die DLB. Die Gruppe der Tauopathien setzt sich zusammen aus der PSP und der CBD. TDP-43 Proteinopathien stellt die dritte Gruppe dar, zu der die fronto-temporale Demenz und die semantische Demenz gehören (Oertel et al. 2012).

### **1.2.2 Risikofaktoren und Umwelteinflüsse**

Der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung eines IPS ist das Alter. Mit zunehmendem Alter steigt die Prävalenz an: von ca. 1 % bei 60-Jährigen bis auf 4 % bei 80-Jährigen (Lau und Breteler 2006). Im Alter wird das  $\alpha$ -Synuklein im Zusammenhang mit einer alters-bedingten Abnahme der Tyrosinhydroxylase (TH) hochreguliert (Chu und Kordower 2007). Die Proteasomen-Aktivität (Zeng et al. 2005) sowie die Leistung des Autophagie-Systems (Cuervo et al. 2005) nehmen mit dem Alter ab. Zusätzlich nimmt der oxidative Stress zu (Andersen 2004).

Das Risiko für die Entstehung eines IPS sinkt mit der Menge an gerauchten Zigaretten (Ritz et al. 2007; Hellenbrand et al. 1997). Hohe sportliche Aktivität (Chen et al. 2005a), Koffein (Liu et al. 2012) sowie die Einnahme von nicht steroidalen Antiphlogistika (Chen et al. 2003) senken ebenfalls das Erkrankungsrisiko. Ein erhöhtes Körpergewicht hat dagegen eine Risikozunahme zur Folge (Hu et al. 2006). Umwelteinflüsse wie Pestizide und Schwermetalle sind mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert. So führen u.a. Aluminium, Eisen, Kupfer und Mangan zu einer vermehrten  $\alpha$ -Synuklein-Fibrillisation und wirken – zumindest experimentell – neurotoxisch (Uversky et al. 2001).

### **1.2.3 Ätiopathogenese des idiopathischen Parkinson-Syndroms**

Kennzeichnend für das IPS ist der Untergang der dopaminergen Neurone in der SNpc, was zu einem Dopaminmangel im Striatum führt. Bei einem Zellverlust von ca. 60 % der dopaminergen Zellen der SNpc und einem daraus resultierendem Abfall der



Dopaminkonzentration im Striatum von ca. 80 % kommt es zu den typischen motorischen Kardinalsymptomen (Dauer und Przedborski 2003; Alberio et al. 2012).

Doch trotz der frühen Beschreibung der Erkrankung im Jahr 1817 durch James Parkinson und der langjährigen Forschung sind die zu Grunde liegenden Mechanismen der Pathogenese noch nicht vollkommen geklärt.

### **1.2.3.1 Pathophysiologie und funktionelle Anatomie**

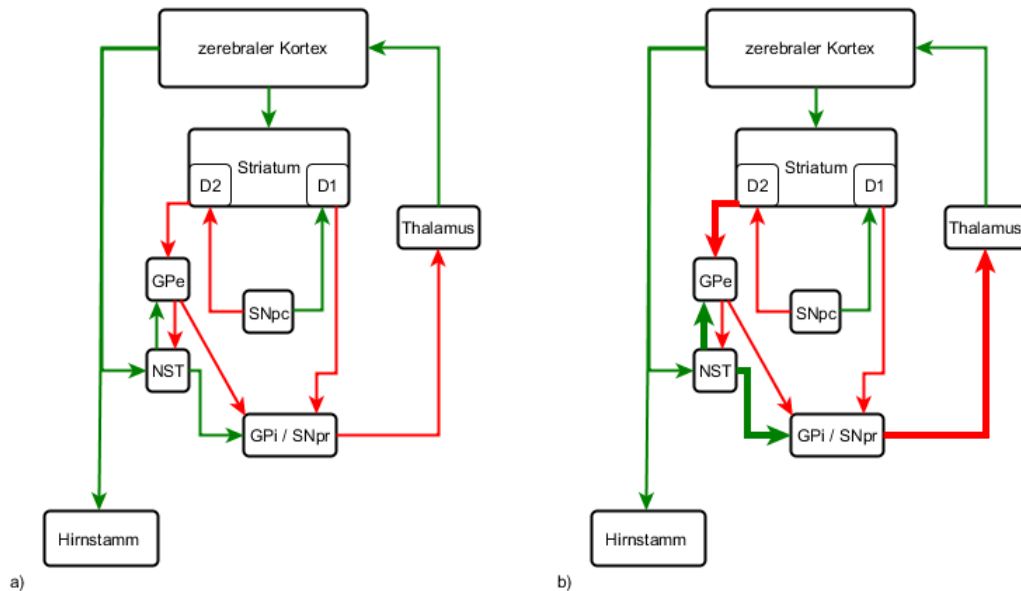
Die motorische Basalganglienschleife stellt das extrapyramidale System dar und besteht aus Substantia nigra, Striatum, Globus pallidus, Nucleus subthalamicus und Thalamus. Die Basalganglienschleife ist an der Bewegungsinitiation und -modulation sowie an der Regulierung des Muskeltonus beteiligt.

Für die normale Kontrolle der Motorik sind zwei verschiedene striato-thalamische Projektionswege von Bedeutung. Bei dem direkten Projektionsweg hemmen GABAerge Neurone des Striatums direkt den Globus pallidus internus (GPi) und die Substantia nigra pars reticulata (SNpr), was zur Enthemmung des Thalamus (Nucleus ventralis lateralis) führt. Dadurch kann nun der Kortex über die glutamaterg thalamo-kortikale Projektion aktiviert werden und fördert so Bewegungen (Oertel und Mugnaini 1984).

Im Gegensatz dazu wirkt der indirekte Projektionsweg hemmend auf die Motorik. Das Striatum inhibiert über GABAerge Neurone den Globus pallidus externus (GPe), wodurch der Nucleus subthalamicus (NST) desinhibiert wird. So wird der ventrolaterale Thalamus durch den GPi und die SNpr über GABAerge Neurone vermehrt gehemmt und der exzitatorische Einfluss auf den Motorkortex herabgesetzt (siehe Abb. 2a).

Dopamin aus der SNpc ist für das Gleichgewicht zwischen den beiden Projektionswegen zuständig. Dopamin wirkt über D1-Rezeptoren im Striatum exzitatorisch auf den direkten Weg und über D2-Rezeptoren im Striatum inhibitorisch auf den indirekten Weg. Dem Dopamin kommt so insgesamt eine motorikfördernde Wirkung zu.

Beim IPS nimmt die Anzahl der dopaminergen Neurone ab, was zu einer Dopamindepletion im Striatum führt. Dadurch kommt es zu einer relativen Überaktivität des indirekten Weges mit einer funktionellen Enthemmung des NST und einer Inhibition des direkten Weges mit einer daraus resultierenden geringeren Aktivierung des Motorkortexes (siehe Abb. 2b).



**Abb. 2 Motorische Basalganglienschleife a) physiologisch b) bei Parkinson-Patienten:** Hier herrscht eine relative Überaktivität des indirekten Weges mit einer funktionellen Enthemmung des NST und eine Inhibition des direkten Weges, was zusammen zu einer vermehrten Inhibition des Motorkortexes führt (Lozano et al. 1998), grüne Pfeile = exzitatorisch, rote Pfeile = inhibitorisch.

### 1.2.3.2 Pathologie des idiopathischen Parkinson-Syndroms

Vor allem in der SNpc und im pontinen Locus ceruleus wird bei Patienten mit IPS eine Depigmentation, ein neuronaler Zelluntergang und eine Gliose festgestellt. Ein neuronaler Zelluntergang wird auch im dorsalen Vaguskern, in der Medulla und anderen Hirnstammkernen gesehen (Dauer und Przedborski 2003). Histopathologisch kennzeichnend für das IPS sind die Lewy-Körperchen, die bei mehr als 90 % der Patienten – mit Ausnahme von einigen genetischen Formen – vorhanden sind (Marras und Lang 2008). Lewy-Körperchen sind runde, eosinophile, zytoplasmatische Einschlusskörperchen im Kern von Neuronen. Sie setzen sich aus einer Reihe verschiedener Substrate zusammen:  $\alpha$ -Synuklein, Ubiquitin, Calbindin, Komplementproteine, Mikrofamentuntereinheiten, Tubulin, Mikrotubulin assoziiertes Protein 1 und 2 sowie Parkinsubstratprotein Pael-R (Murakami et al. 2004; Dauer und Przedborski 2003).

Braak et al. beschrieb sechs neuropathologische Stadien, die die Entwicklung und das Fortschreiten der Erkrankung kennzeichnen. Es gibt drei präsymptomatische Phasen: Im Stadium 1 kommt es zum Auftreten von Lewy Körperchen im dorsalen Vaguskern, im Stadium 2 in den Raphekernen, in der Formatio reticularis und im Locus ceruleus, und im Stadium 3 in der SNpc. Die drei symptomatischen Stadien zeigen Lewy-

Körperchen im Thalamus (Stadium 4) und im Neokortex (Stadium 5 und 6) (Braak et al. 2004; Braak et al. 2003).

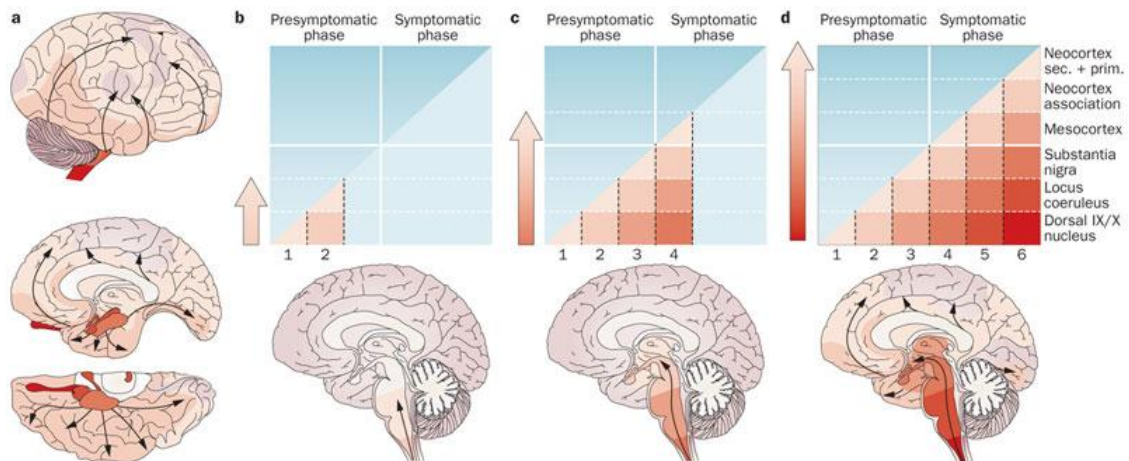


Abb. 3 Braak Stadien, übernommen von Goedert et al. 2012.

### 1.2.3.3 Pathogenese der Zelldegeneration

Obwohl die genaue Ätiologie der Zelldegeneration noch nicht bekannt ist, so gibt es doch einige Pathomechanismen, die zum neuronalen Zelluntergang bei Patienten mit IPS beitragen, wie das Modell in Abb. 4 zeigt.

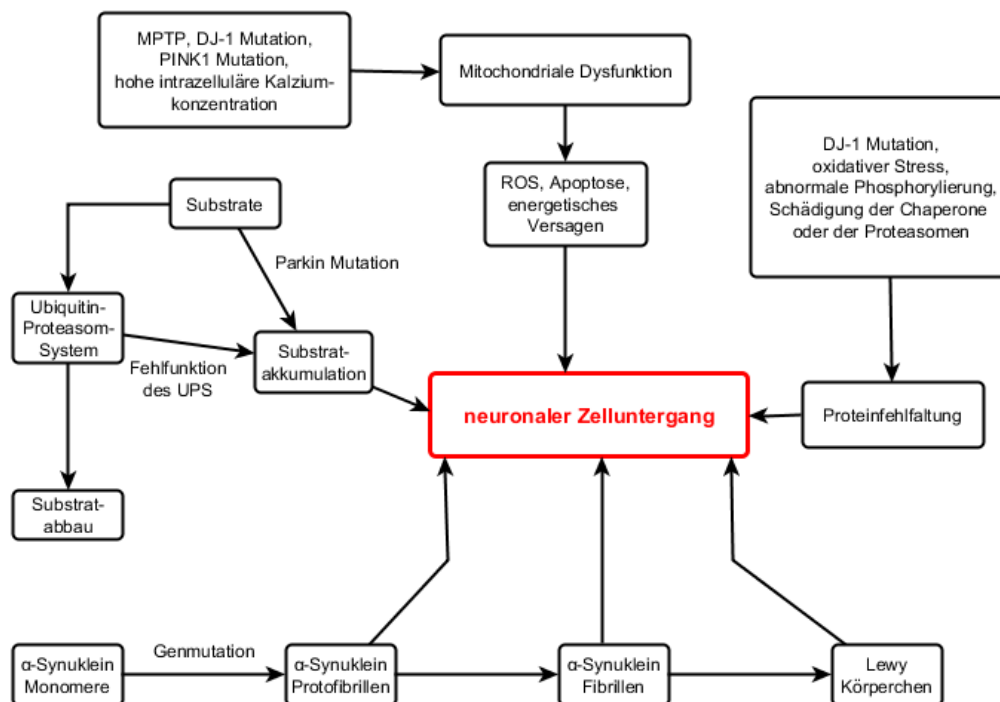


Abb. 4 Übersicht über die wesentlichen Pathomechanismen, die zum neuronalen Zelluntergang bei IPS führen. ROS = reaktive Sauerstoff Spezies, UPS = Ubiquitin-Proteasom-System; modifiziert nach Savitt et al. 2006.

## **Proteinfehlfaltung und -aggregation**

Die Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen in neuronalen Zellen ist häufig in altersabhängigen neurodegenerativen Erkrankungen zu sehen, wie auch beim IPS. Fehlgfaltete Proteine können direkt durch schädigende Mechanismen an den Proteinen selbst oder indirekt durch Schäden an Chaperonen oder Proteasomen entstehen. Das Ubiquitin-Proteasomen-System (UPS) ist für den Abbau zellulärer Proteine zuständig, die von ihrer ursprünglichen Struktur abweichen. Die fehlerhaften Proteine werden ubiquitiniert und durch das Proteasom abgebaut. Eine Beeinträchtigung des UPS spielt eine wesentliche Rolle in der Pathogenese des IPS. Zusätzlich kann oxidativer Stress auch eine Ursache für den dysfunktionalen Proteinmetabolismus sein. Mutationen im  $\alpha$ -Synuklein-Gen führen zu einer Veränderung in der sekundären Proteinstruktur und durch Aggregation zu Protofibrillen und dann zu Fibrillen. Aggregiertes, hyperphosphoryliertes und ubiquitiniertes  $\alpha$ -Synuklein ist ein Hauptbestandteil in den Lewy-Körperchen (Savitt et al. 2006). Fehlgfaltete oder akkumulierte Proteine wirken nachgewiesenermaßen neurotoxisch und führen dadurch zum programmierten Zelltod der neuronalen Zellen (Muchowski 2002). So führen kleine  $\alpha$ -Synuklein-Oligomere zu einer Kalziumdysregulation in der Zelle, wodurch die Kalziumkonzentration intrazellulär und in den Mitochondrien ansteigt. Dadurch wird die Energiehomöostase gestört und der nekrotische Zelltod eingeleitet (Celsi et al. 2009).

## **Genetische Varianten des Parkinson-Syndroms**

Familiäre Formen machen ca. 3-5 % der Patienten mit Parkinson-Syndrom (PS) aus und zeigen oft atypische Merkmale wie frühes Erkrankungsalter, Dystonien sowie Fehlen der typischen Lewy-Körperchen Pathologie (Kumar et al. 2011; Shulman et al. 2011; Alberio et al. 2012). Autosomal rezessiv vererbtes Parkinson-Syndrom ist meist mit einer Mutation in den Parkin-, PINK1- und DJ-1-Genen verbunden. Die Parkin-Genmutation ist die häufigste familiäre Form des PS und führt zu einer vermehrten Ansammlung toxischer Substanzen durch eine Fehlfunktion der Ubiquitinproteine. Die unmutierte Variante des Parkin wirkt neuroprotektiv, indem sie die normale Mitochondrienfunktion durch Regulation der Cytochrom C-Freisetzung kontrolliert (Berger et al. 2009). Die Funktionen des Parkins und PINK1 sind aneinander gekoppelt. Erhöhter oxidativer Stress und dadurch entstehende geschädigte Mitochondrien in der Zelle aktivieren das Signal der Mitophagie, ein Mitochondrien-spezifischer Autophagieprozess. Dieser Prozess wird induziert durch die Interaktion des Parkins mit

dem Mitochondrium-assoziierten PINK1. PINK1 übermittelt die Information des geschädigten Mitochondriums und Parkin leitet die lysosomale Degradation des geschädigten Mitochondriums ein (Matsuda et al. 2010; Mounsey und Teismann 2010). Durch die PINK1-Mutation kommt es zu einer Ansammlung defekter Mitochondrien und somit zu einem Anstieg des zellulären Stresses und proapoptotischer Proteine. Auch DJ-1 interagiert mit Parkin/PINK1. DJ-1 hemmt die Entstehung freier Radikale bei erhöhtem oxidativem Stress. Die Hochregulation von DJ-1 bei oxidativem Stress wird bei Parkin und PINK1-Defizienz beeinträchtigt (Joselin et al. 2012). Die DJ-1-Mutation führt damit zu einer erhöhten Produktion von freien Radikalen und zur mitochondrialen Dysfunktion und schließlich zum dopaminergen Zelltod (Kumar et al. 2011; Schapira 2008). Punktmutationen und Genduplikationen sowie -triplikationen des  $\alpha$ -Synuklein-Gens (PARK1/PARK4) sind mit dem Auftreten eines typischen Parkinson-Syndroms verbunden. In Folge dieser Erkenntnis konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ -Synuklein der Hauptbestandteil der Lewy-Körperchen ist (Hardy et al. 2009). Dies zeigt, dass die Mechanismen, die bei den genetischen Varianten des PS zum dopaminergen Zelluntergang führen, als Anhaltspunkt für die Forschung der Ätiopathogenese des IPS dienen.

**Tabelle 1 Genetische Parkinsonsyndrome.** AD = autosomal dominant, AR = autosomal rezessiv; modifiziert nach Houlden und Singleton 2012 und Alberio et al. 2012.

Genort	Gen	Proteinfunktion/Vorkommen	Vererbungsmodus
PARK1/PARK4	$\alpha$ -Synuklein	Lewy Körperchen Bestandteil, präsynaptisches Protein	AD
PARK2	Parkin	Ubiquitin-E3-Ligase	AR
PARK5	UCHL1	Ubiquitin Hydrolase	AD
PARK6	PINK1	Proteinkinase	AR
PARK7	DJ-1	Chaperon, Antioxidant	AR
PARK8	LRRK2	Proteinkinase	AD
PARK9	ATP13A2	ATPase	AR
PARK11	GIGYF2	Regulation von Tyrosinkinase-Rezeptorsignalwegen	AD
PARK13	HTRA2	Serin-Protease	unbekannt
PARK14	PLA2G6	Phospholipase A2	AR
PARK15	FBXO7	F-Box Protein	AR
PARK17	VPS35	VPS-assoziiertes Protein	AD
PARK18	EIF4G1	Translationsinitiationsfaktor	AD

### Mitochondriale Dysfunktion

Die mitochondriale Dysfunktion wurde erstmals in den Zusammenhang mit dem IPS gesetzt, als entdeckt wurde, dass das Neurotoxin 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette hemmt und dadurch zu einem spezifischen und irreversiblen Schaden an den dopaminergen

Neuronen der SNpc führt (Langston et al. 1983; Heikkila et al. 1984; Vyas et al. 1986), was die typischen motorischen Symptome des IPS zur Folge hat. Des Weiteren wurde eine Verminderung der Komplex I-Aktivität in der SNpc (Schapira et al. 1989) sowie in den Blutplättchen (Swerdlow et al. 1996) bei Parkinson-Patienten festgestellt.

Das Mitochondrium ist für die Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) mit Hilfe der oxidativen Phosphorylierung (Atmungskette) zuständig und generiert dadurch über 90 % der benötigten Energie für die Zelle (Mounsey und Teismann 2010). Es ist beteiligt an der Regulation der Kalziumkonzentration, Fettsäureoxidation und der Kontrolle der Apoptose (Mattson et al. 2008; Schapira 2010).

Die mitochondriale Atmungskette besteht aus den Komplexen I bis V, wobei Komplex V der ATP-Synthase entspricht. Der Komplex I (NADH-Dehydrogenase oder Ubichinon-Oxidoreduktase) ist das erste Enzym der Atmungskette und spielt eine wichtige Rolle bei der Synthese von ATP. Die meisten mitochondrialen Dysfunktionen basieren auf einer Schädigung dieses Komplexes (Mounsey und Teismann 2010).

Das Komplex I-Defizit bei Parkinson-Patienten führt zum Absinken der ATP-Konzentration und dadurch zur vermehrten Bildung von freien Radikalen. Dadurch sinkt die Apoptoseschwelle und die Zelle reagiert sensitiver auf das proapoptische Protein Bax (Perier et al. 2005). Höhere Konzentrationen an freien Radikalen haben eine gesteigerte Konzentration an fehlgefalteten Proteinen zur Folge, was wiederum zu einem erhöhten Bedarf des UPS führt. Das entstehende Energiedefizit führt außerdem zu einer gestörten Speicherung von Dopamin, somit zu einem Anstieg an freiem Dopamin und letztendlich wieder zu einer erhöhten Konzentration an freien Radikalen. Humane SNpc enthält Schäden in der mitochondrialen DNA (mtDNA), die durch freie Radikale entstanden sind. Diese Schäden wurden vermehrt bei Parkinson-Patienten festgestellt (Schapira 2008). Durch das Komplex I-Defizit entsteht in der Zelle oxidativer Stress, dem der Zelltod folgt (Dauer und Przedborski 2003).

### **Oxidativer Stress**

Eine weitere wichtige Rolle in der Pathogenese des IPS spielt die Entstehung von oxidativem Stress (Yoshikawa 1993). Bei dem Metabolismus von Sauerstoff entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die für die Zellen sehr toxisch sind. ROS sind definiert als Moleküle, die aufgrund ihrer Reaktivität mit anderen zellulären Komponenten reagieren und dadurch deren Funktion einschränken. Zu den ROS gehören freie Radikale, wie Superoxidanionen ( $O_2^{\cdot-}$ ), Stickstoffmonoxid ( $NO^{\cdot}$ ) und

Hydroxylradikale ( $\text{OH}\cdot$ ) sowie andere Moleküle, wie Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und Peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ). Diese Moleküle wirken als starke Oxidationsmittel auf umliegende zelluläre Komponenten. Oxidierte Modifikation von Proteinen kann die Aktivität von Enzymen oder die Proteinstruktur beeinflussen. Fettsäureoxidation führt zur Entstehung von Lipidperoxid, was sich in einer Kettenreaktion über die Lipidmembranen ausbreiten kann und zum Zerfall von Zellorganellen führt. Die DNA kann auch oxidiert werden, wodurch Mutationen entstehen, die die Replikation der DNA beeinflussen können (Andersen 2004).

In post-mortem Gehirnschnitten von Patienten mit IPS wurden erhöhte zelluläre ROS-Marker (z.B. 4-Hydroxynonenal als Marker für Lipidperoxidation) in der SNpc festgestellt. Durch die Nitrierung von Tyrosinresten akkumuliert  $\alpha$ -Synuklein vermehrt in den Lewy-Körperchen (Giasson et al. 2000). Somit kann eine Dysfunktion in den zellulären Mechanismen der Antioxidation oder die Überproduktion von ROS das Auftreten sowie die Progression von neurodegenerativen Synukleinopathien beeinflussen. Das Enzym Glutathion (GSH) ist ein Reparaturmechanismus bei oxidativem Stress. Der IPS ist charakterisiert durch eine Reduktion dieses Enzymes in der SNpc und in den dopaminergen Neuronen der SNpc. GSH ist ein wichtiges natürliches Antioxidans und eine verminderte Konzentration kann die betroffene Gehirnregion anfälliger auf oxidativen Stress machen und somit vermehrt zum Zelltod führen (Perry et al. 1982).

Bei dem enzymatischen Metabolismus von Dopamin mit Hilfe der Monoaminoxidase B (MAO-B) entsteht als Nebenprodukt  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Maker et al. 1981). Auch bei dem autooxidativem Abbau von Dopamin entstehen Radikale, wie Semichinonradikale ( $\text{SQ}\cdot$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{O}_2^-$ . In Anwesenheit von Eisenionen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) kann das entstandene  $\text{H}_2\text{O}_2$  über die Fenton-Reaktion in  $\text{OH}\cdot$  umgewandelt werden. So entstehen weitere freie Radikale, die zusätzlichen oxidativen Stress erzeugen. In der SNpc von Parkinson-Patienten wurden um 50 % erhöhte Eisenkonzentrationen festgestellt (Dexter et al. 1991; Oakley et al. 2007), was bei der Entstehung von oxidativem Stress und neuronalem Zelltod eine Rolle spielt (Sian-Hulsmann et al. 2011). Dieser erhöhte Eisengehalt kann auf verschiedene Mechanismen zurückgeführt werden. Zum einen resultiert er aus einer erhöhten Eisenaufnahme über eine geschädigte Blut-Hirn-Schranke (Oestreicher et al. 1994), zum anderen wurden niedrigere Konzentrationen des Eisenspeicherproteins Ferritin festgestellt (Dexter et al. 1991). Nachgewiesen ist, dass durch Eisen entstandener oxidativer Stress zur Neurodegeneration führt. Aber es ist weiterhin

Gegenstand der Forschung, ob die Eisenakkumulation den Krankheitsprogress vorantreibt oder direkt eine Rolle in der Pathogenese des IPS spielt (Sian-Hulsmann et al. 2011).

Außerdem interagiert Kalzium mit den Prozessen des oxidativen Stresses und der Entstehung von ROS. Erhöhter oxidativer Stress setzt die Fähigkeit der Mitochondrien, Kalzium zu puffern, herab. Die dadurch entstehende erhöhte Kalziumkonzentration in den Mitochondrien führt zu einer erhöhten Produktion an ROS (Gleichmann und Mattson 2011). ROS aktivieren wiederum Kalziumkanäle, was zum Kalziueinstrom in die Zelle führt und schließlich im apoptotischen Zelluntergang der Zelle endet (Wang und Michaelis 2010). In der SNpc sind die dopaminergen Neurone besonders anfällig für ROS, bedingt durch eine Kalzium-Dysregulation und einer verminderten Konzentration an Calbindin, eines Kalziumbindenden Proteins, welches beides zu einer erhöhten Kalziumkonzentration in der Zelle führt (Wang und Michaelis 2010; Yamada et al. 1990).

### **Inflammatorische Prozesse und Apoptose**

Im Zentralnervensystem (ZNS) gibt es drei verschiedene Gliazellarten: Mikroglia, Astrozyten und Oligodendrozyten. Mikroglia sind im Gehirnparenchym ansässige Makrophagen und unter physiologischen Bedingungen inaktiv. Verschiedene Aktivatoren, u.a. Lipopolysaccharide (LPS), Interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) und verschiedene Zytokine, regen sie zur Sezernierung von vielen Faktoren, wie z.B. Zytokinen, Chemokinen, Radikalen etc. an (Wojtera et al. 2005; Nakamura 2002). Manchmal ist die Mikroglia geringfügig aktiv, um die Homöostase im ZNS aufrechtzuerhalten, indem sie überschüssige Neurotoxine und tote Zellreste entfernt, sowie trophische Faktoren freisetzt (z.B. brain-derived neurotrophic factor BDNF), die das axonale Wachstum der dopaminergen Zellen stimulieren (Nakamura 2002). Astrozyten beeinflussen auch die Homöostase im ZNS durch die Regulation der Glutamataufnahme (Tilleux und Hermans 2007). Die Aktivierung der Oligodendrozyten resultiert in einer Sekretion von inflammatorischen Molekülen, wie NO, Zytokine, Prostaglandine und vor allem Chondroitinsulfat Proteoglykan (CSPG), was die axonale Regeneration verhindert (Rhodes et al. 2006; Tansey et al. 2007). Somit ist zu erkennen, dass Veränderung in der Aktivität der Gliazellen zum Progress der neurodegenerativen Erkrankung führt (Tilleux und Hermans 2007).



Unterstützt wird diese Hypothese durch Studien, bei denen festgestellt wurde, dass nach langjähriger Einnahme von nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAID) die Inzidenz des IPS im Vergleich zur Kontrollgruppe um 46 % geringer ist. NSAIDs wirken Inzidenzsenkend über eine Hemmung der COX-vermittelten Dopaminoxidation und der Produktion toxischer Substanzen durch Mikroglia (Chen et al. 2003; Chen et al. 2005b).

Des Weiteren wurden in post-mortem Analysen von Parkinson-Patienten erhöhte Konzentrationen von Zytokinen, z.B. Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ), transformierende Wachstumsfaktoren (TGF)- $\alpha$ , - $\beta$ 1, - $\beta$ 2 und Interleukine (IL)-1 $\beta$ , -2, -4, -6, und erniedrigte Konzentrationen von Neurotrophinen, wie den Wachstumsfaktoren BDNF und NGF in der SNpc festgestellt (Nagatsu et al. 2000). In der SNpc von Parkinson-Patienten ist eine erhöhte Konzentration des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) vorhanden. ROS und TNF- $\alpha$  aktivieren NF- $\kappa$ B über eine Signalkaskade was somit zur Neurodegeneration führt (Hunot et al. 1997). Dies untermauert den Einfluss von inflammatorischen und immunologischen Prozessen auf die Pathogenese des IPS.

#### **1.2.4 Diagnosestellung**

Die Diagnosestellung beim IPS geschieht anhand klinischer Kriterien. Für die Diagnose des IPS muss eine Bradykinese und mindestens ein weiteres Kardinalsymptom (Rigor, Tremor oder posturale Instabilität) vorliegen. Außerdem müssen anhand Anamnese, körperlicher Untersuchung und bildgebenden Verfahren die häufigsten Differentialdiagnosen ausgeschlossen werden, wie z.B. sekundäre und atypische Parkinson-Syndrome. Mit Hilfe einer ausführlichen Familienanamnese ist auch zu prüfen, ob eine familiäre Form des IPS vorliegt. Wichtig ist der L-Dopa Test, der untersucht, ob ein Symptom L-Dopa-sensitiv ist und daher auf die nigrostriatale Funktionsstörung zurückzuführen ist. Ein positives Testergebnis unterstützt das Vorliegen eines IPS (Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie; 5. überarbeitete Auflage, ISBN 978-3-13-132415-5; Georg Thieme Verlag Stuttgart).

#### **1.2.5 Therapie**

Obwohl zahlreiche therapeutische Möglichkeiten momentan zur Verfügung stehen, wirken sie nur symptomatisch, verhindern aber nicht den Krankheitsprogress. L-Dopa war das erste Medikament, das beim IPS zum Ausgleich des Dopaminmangels im Striatum eingesetzt wurde. Es ist auch heute noch die wirksamste Substanz.

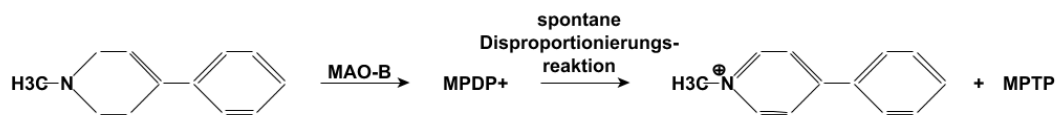
Problematisch sind die Langzeitwirkungen von L-Dopa, da nach einigen Jahren Therapie ein sog. wearing-off-Phänomen mit Dyskinesien und Dystonie eintritt. Dies führt oft zum verzögerten Einsatz des Medikaments. Daneben gibt es momentan zehn in Deutschland zugelassene Dopaminagonisten, das sind synthetische Moleküle, die direkt die Dopaminrezeptoren stimulieren. Diese werden vor allem bei Patienten unter 70 Jahren zur Initialbehandlung eingesetzt. Aufgrund des Nebenwirkungsprofils gelten allerdings nur die fünf Non-Ergot-Derivate als Dopaminagonisten erster Wahl. In der medikamentösen Therapie kommen auch zum Einsatz COMT-Inhibitoren (Catechol-O-Methyltransferase), MAO-B-Hemmer, NMDA-Antagonisten (N-Methyl-D-Aspartat) und selten Anticholinergika. Bei nicht ausreichender Wirkung der medikamentösen Therapie und bei fortgeschrittenem Krankheitsstadium stellt die tiefe Hirnstimulation, ein operatives Verfahren, eine Alternative dar. Hierbei werden Elektroden stereotaktisch implantiert, die reversibel und individuell angepasst über einen implantierten Stimulator elektrisch stimulieren. Stimulationsort ist meist der Nucleus subthalamicus, in Ausnahmefällen auch der GPi oder der Thalamus (Nucleus ventralis intermedius). Die Kardinalsymptome können von dieser Therapie positiv beeinflusst werden, was zu einer deutlichen Verbesserung der Lebensqualität führt (Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie; 5. überarbeitete Auflage, ISBN 978-3-13-132415-5; Georg Thieme Verlag Stuttgart 2012).

## **1.2.6 Toxinmodelle**

### **1.2.6.1 MPTP**

MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine) wurde erstmals entdeckt, als sich eine Gruppe Drogenabhängiger eine mit MPTP-verunreinigte Substanz injiziert hatte und Parkinson-ähnliche Symptome entwickelte (Langston et al. 1983; Heikkila et al. 1984). MPTP ist sehr lipophil und kann nach systemischer Gabe die Blut-Hirn-Schranke (BHS) leicht überqueren (Markey et al. 1984). Dort reagiert MPTP über eine Zwei-Elektronen-Oxidation durch das Enzym MAO-B zu MPDP<sup>+</sup> (1-Methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridine) (Chiba et al. 1984). MPDP<sup>+</sup> ist ein sehr instabiles Molekül, was zu einer sofortigen spontanen Disproportionierungsreaktion führt, wodurch MPP<sup>+</sup>, der eigentlich aktive Metabolit, und MPTP entstehen (Chiba et al. 1985; Peterson et al. 1985). MPP<sup>+</sup> wird durch den Dopamintransporter (DAT) in die dopaminergen Neurone aufgenommen (Bezard et al. 1999). In den Neuronen konzentriert sich MPP<sup>+</sup> in den Mitochondrien (Ramsay et al. 1986), in die es passiv anhand des mitochondrialen

Membranpotentialgradienten gelangt (Davey et al. 1992). Dort hemmt es die oxidative Phosphorylierung durch die Inhibition des Komplexes I der Atmungskette in einer dosis- und zeitabhängigen Beziehung (Ramsay et al. 1987; Nicklas et al. 1985). Dadurch sistiert der Elektronenfluss über die Mitochondrienmembran, was eine beeinträchtigte ATP-Synthese, eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration und eine erhöhte Ansammlung an freien Radikalen zur Folge hat (Chan et al. 1991; Andreassen et al. 2001; Chiueh et al. 1993).



**Abb. 5** Reaktion von MPTP zu MPP<sup>+</sup> mit Hilfe der Monoaminoxidase B (MAO-B). Modifiziert nach Blandini und Armentero 2012.

Im MPTP-Modell fehlen jedoch zwei typische neuropathologische Eigenschaften des IPS. Zum einen können die für das IPS typischen Lewy-Körperchen nicht nachgewiesen werden, mit der Ausnahme von intraneuralen Einschlüssen bei MPTP-behandelten Affen, die den Lewy-Körperchen ähneln (Forno et al. 1986). Dies konnte in anderen Studien jedoch nicht bestätigt werden (Alvarez-Fischer et al. 2008). Zum anderen werden andere monoaminerge Kerngebiete, die beim IPS auch betroffen sind, z.B. der Locus ceruleus, nicht durch MPP<sup>+</sup> beeinflusst (Forno et al. 1986). Trotzdem ist das MPTP-Modell das einzige Modell, das nachgewiesenermaßen in Menschen zum Parkinson-Syndrom führt. Es ist deshalb das meist geforschte Parkinson-Modell. Da das MPTP-Modell einem Dopamin-Defizit-Modell entspricht, eignet es sich vor allem für neuropharmakologische Studien mit dopamimemischen Substanzen.

### 1.2.6.2 3-Nitropropionsäure

3-Nitropropionsäure (3-NP) ist ebenfalls ein mitochondriales Toxin, das bei Anwendung beim Menschen zu einer Neurodegeneration im Putamen und im Nucleus caudatus führt, was ernste neurologische Symptome zur Folge hat. 3-NP hemmt die Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase (Succinat-Dehydrogenase), den Komplex II der mitochondrialen Atmungskette (Alston et al. 1977; Ludolph et al. 1991; Huang et al. 2006). Schon eine Hemmung des Komplexes II von 50-60 % reicht aus, um eine striatale Degeneration zu induzieren (Brouillet et al. 1998). Die Behandlung mit 3-NP führt zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration und der zellulären ROS-Produktion sowie zu einer Depolarisation der Mitochondrienmembran. Durch die

Hemmung der ROS-Produktion können der Kalzium-Einstrom und 70 % des apoptotischen Zelltods verhindert werden. Auch eine Hemmung der Caspase-Aktivierung schwächt den Kalzium-Einstrom ab. MK-801 ((+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imin hydrogen maleat), ein NMDA-Antagonist, verhindert den 3-NP-induzierten zellulären Kalzium-Anstieg, die Caspase-3-Aktivierung, die mitochondriale Depolarisation und den neuronalen Zelltod (Lee et al. 2002). Dopamin hat auch eine Wirkung auf die 3-NP-induzierte Toxizität. Studien haben gezeigt, dass nach 3-NP Behandlung die extrazelluläre Dopaminkonzentration ansteigt (Nishino et al. 1997). Dopaminmangel schützt vor der 3-NP-Wirkung, was darauf hinweist, dass Dopamin die Toxizität von 3-NP potenziert (Fernagut et al. 2002).

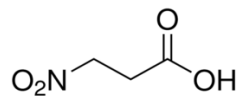


Abb. 6 Strukturformel von 3-NP.

### 1.3 Elektrische Aktivität dopaminerger Neurone

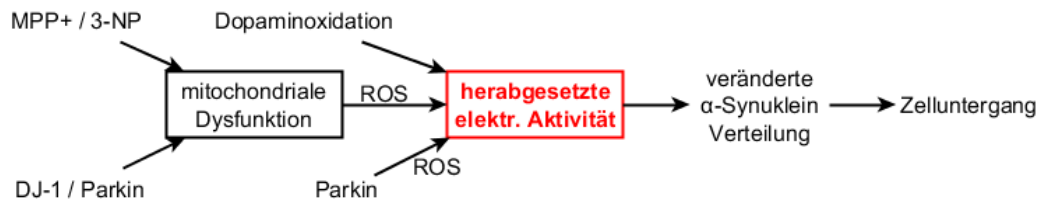
Nigrostriatale dopaminerge Neurone gehen beim IPS zugrunde und führen zu den typischen motorischen Kardinalsymptomen. So ist es von zentralem Interesse, diesen Zelluntergang zu vermeiden, um kurative Therapiemöglichkeiten zu entwickeln. In diesem Zusammenhang spielt die elektrische Aktivität der Neurone eine wichtige Rolle, da chronische Depolarisierung ihr Überleben unterstützt (Murer et al. 1999; Michel und Agid 1996).

#### 1.3.1 Autonome Aktivität der dopaminergen Neurone

Dopaminerge Neurone der SNpc des Erwachsenen sind autonom aktiv und generieren elektrische Signale in einer Frequenz von 2-4 Hz ohne vorher einen synaptischen Input zu erhalten (Grace und Bunney 1983; Grace 1988). Diese autonome Aktivität ist wichtig, um die Dopaminkonzentration, vor allem im Striatum, aufrechtzuerhalten (Gonon und Buda 1985).

Des Weiteren moduliert elektrische Aktivität die Lokalisation von einigen synaptisch gelegenen Proteinen, so auch des  $\alpha$ -Synukleins. Depolarisationen mit hohen Kaliumkonzentrationen resultieren in einem Verlust von  $\alpha$ -Synuklein in den Synapsen. Nach ca. 600 Aktionspotentialen verringert sich die  $\alpha$ -Synuklein-Konzentration um

20 %, sie steigt auch nach Beenden der elektrischen Aktivität nur geringfügig wieder an (Fortin et al. 2005). Außerdem ist bekannt, dass  $\alpha$ -Synuklein sich stark an Lipidmembranen bindet und in diesem Zustand nicht aggregiert (Narayanan und Scarlata 2001). Nach elektrischer Aktivität dissoziiert  $\alpha$ -Synuklein von der Membran, was zu einer vermehrten Aggregation und erhöhten Toxizität führt, und somit zur Pathogenese des IPS beitragen kann.



**Abb. 7 Zusammenhang zwischen elektrischer Aktivität dopaminerger Neurone und deren Zelluntergang** (Michel et al. 2007).

### 1.3.2 Rolle der Kalziumkanäle

Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) spielt eine wichtige Rolle bei der physiologischen Funktion von Neuronen und ist an vielen zellulären Prozessen beteiligt, unter anderem bei mitochondrialen und proteasomalen Funktionen, bei oxidativem Stress, bei der elektrischen Aktivität, bei der synaptischen Plastizität und der Apoptose (Berridge 1998; Bueler 2010). Erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration führt zur Zelldysfunktion und zum Zelltod (Wang und Michaelis 2010).

Kalzium hat auch einen Einfluss auf die Neuroinflammation, die einen Pathomechanismus in der Entstehung des IPS darstellt. Das Vorkommen aktivierter Mikroglia und Astrozyten sowie die Lymphozyteninfiltration in post-mortem Untersuchungen von Parkinson-Patienten ist bekannt (Hirsch et al. 2005). Die Hemmung von  $\text{Ca}_v1$ -Kanälen kann in vitro die Aktivierung der T-Zellen, Mastzellen und Makrophagen verhindern (Bacon et al. 1989). Dies lässt eine immunsuppressive Wirkung vermuten.

Die spannungsabhängigen Kalziumkanäle ( $\text{Ca}_v$ -Kanäle) öffnen sich bei Membrandepolarisation und lassen Kalzium entlang seines Konzentrationsgradienten in die Zelle strömen. Das Kalzium wird dann über die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher in den Extrazellulärraum oder in die Zellorganellen transportiert. Durch das große transmembranöse Konzentrationsgefälle von Kalzium wird viel ATP nach der Depolarisation benötigt, um die Konzentrationen intra- und extrazellulär

wieder herzustellen (Surmeier et al. 2010).  $\text{Ca}_v$ -Kanäle werden in drei Subtypen unterteilt:  $\text{Ca}_v1$  (L-Typ),  $\text{Ca}_v2$  (P-, N-, und R-Typ) und  $\text{Ca}_v3$  (T-Typ).

### 1.3.2.1 $\text{Ca}_v1$ -Kanäle (L-Typ-Kalziumkanäle)

In den vulnerablen dopaminergen Neuronen der SNpc sind an der Depolarisation auch L-Typ- $\text{Ca}^{2+}_v$ -Kanäle (spannungsabhängige L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle) vom  $\text{Ca}_v1.3$ -Subtyp beteiligt (Chan et al. 2007). Die robusteren Neurone der VTA, die beim IPS weniger betroffen sind, benutzen Natriumkanäle bei der Depolarisation und sparen somit Energie, da der Konzentrationsgradient von Natrium 100-fach geringer ist im Vergleich zu Kalzium (Chan et al. 2009). Somit haben dopaminerge Neurone der SNpc einen besonders hohen Energieverbrauch, was zu einer gesteigerten Produktion von freien Radikalen führt und somit zu ihrem vulnerablen Zustand beiträgt.

$\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle haben die besondere Eigenschaft, dass sie sich schon bei einem Membranpotential von ca. -60 mV öffnen und zu einem Einstrom von Kalzium in die Zelle führen. Deshalb sind diese Ionenkanäle ausschlaggebend für die autonome elektrische Aktivität der Zellen. Dieser Mechanismus führt zu einem massiven Einstrom von Kalzium, davon ca. 20 % bei der langsamen spontanen Depolarisation und ca. 80 % während der Spitze des Aktionspotentials. Hemmung des Kalziumflusses in den Neuronen führt zu keiner Veränderung in der Signalgebung der Zelle, was zeigt, dass es ein robuster Mechanismus ist, der von mehreren Ionenkanälen abhängig ist. Nur der kombinierte Antagonismus von HCN- (hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channel) und  $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen hemmt die autonome Aktivität der dopaminergen Neurone (Guzman et al. 2009).

Aggregiertes  $\alpha$ -Synuklein und zytosolisches Dopamin haben beide neurotoxische Wirkungen, die durch die zelluläre Kalziumkonzentration beeinflusst werden. Hemmung der  $\text{Ca}_v1$ -Kanäle reduziert den durch zytosolisches Dopamin entstehenden oxidativen Stress. Überexpression von  $\alpha$ -Synuklein führt zu erhöhten Kalziumkonzentrationen in SH-SY5Y-Zellen (humane Neuroblastomzellen) durch  $\text{Ca}_v1$ -Kanäle (Hettiarachchi et al. 2009). Umgekehrt begünstigen erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentrationen die Aggregation von  $\alpha$ -Synuklein (Nath et al. 2011).

Außerdem wurde *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen, dass eine Hemmung der  $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle mit Isradipin den MPTP-induzierten Zellverlust im Mausmodell halbiert und die Entstehung der motorischen Symptome verhindert. Ähnliche Ergebnisse

wurden in den Rotenon- und 6-OHDA (6-Hydroxydopamin)-Parkinson-Tiermodellen erzielt (Chan et al. 2007).

Neue klinische epidemiologische Studien unterstützen die Hypothese einer neuroprotektiven Wirkung durch die Hemmung der  $Ca_v1$ -Kanäle. Chronische Einnahme von Kalziumkanalblockern reduziert signifikant das Risiko für das IPS von einer odds ratio von 1 auf 0,78 (Becker et al. 2008). Eine weitere Studie kam auf eine Risikoreduktion von 27 % (Ritz et al. 2010).

### **1.3.2.2 $Ca_v3$ -Kanäle (T-Typ-Kalziumkanäle)**

Wie auch die  $Ca_v1$ -Kanäle werden  $Ca_v3$ -Kanäle nur im Soma und in Dendriten der Neurone exprimiert. Im Gegensatz zu den anderen beiden Subtypen öffnet sich dieser Kanal bei geringerer Depolarisationsspannung und ist u.a. verantwortlich für einen transienten Kalziumstrom über die Membran (Hurley und Dexter 2012).

Erhöhte Aktivität des NST in der Basalganglienschleife trägt zu den typischen motorischen Symptomen bei Parkinson-Patienten bei (Lozano et al. 1998). Für die Impuls-Signalgebung im NST werden T-Typ-Kalziumkanäle benötigt. Eine Blockade dieser Kanäle hemmt die Impulse des NST und mildert somit die motorische Symptomatik bei Ratten im Parkinson-Tiermodell mit 6-OHDA ab (Tai et al. 2011).

Die Bedeutung der T-Typ-Kalziumkanäle in der Pathogenese des IPS wird dadurch bestätigt, dass die Hemmung dieser Kanäle mit Zonisamid eine günstige Auswirkung auf die Symptomatik von Parkinson-Patienten hat (Murata et al. 2007). Das anti-krampflösende Medikament Zonisamid hemmt spannungsabhängige Natriumkanäle und die MAO-B und reduziert den Kalziumstrom selektiv an T-Typ-Kalziumkanäle ohne L-Typ-Kalziumkanäle zu beeinflussen (Leppik 2004). Am MPTP-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Zonisamid den durch  $MPP^+$ -induzierten Verlust dopaminerger Neurone abmildern kann (Yano et al. 2009). Die neuroprotektive Wirkung von Zonisamid lässt sich nicht allein auf die Hemmung der MAO-B zurückführen, aber es wird noch diskutiert, inwieweit die antioxidative Wirkung von Zonisamid für die Neuroprotektion verantwortlich ist (Murata 2010; Yano et al. 2009).

### **1.3.3 Rolle der Kaliumkanäle**

Auf den dopaminergen Neuronen der SNpc sind verschiedene Kaliumkanäle ( $K^+$ ) vorhanden, die auf das Überleben der Zellen Einfluss nehmen. Hohe extrazelluläre

Konzentrationen an Kalium depolarisieren die Zelle und führen zu einem Kalium-abhängigen sekundären oxidativen Stress durch die Freisetzung von Glutamat (Douhou et al. 2001). In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Kaliumkanäle näher erläutert.

### 1.3.3.1 Adenosintri-phosphat-sensitive Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ -Kanäle)

$K_{ATP}$ -Kanäle öffnen sich, wenn intrazellulär ein ATP-Mangel herrscht. Der Kanal besteht aus der porenformenden Einheit (im Gehirn Kir6.2) und der regulativen Sulfonylharnstoffrezeptor-1-Einheit (SUR1), sogenannte „metabolische Sensoren“, da sie bei Energiemangel aktiv werden (Liss et al. 1999). Das führt zum Kalium-Einstrom und somit zur Hyperpolarisation der Zelle.

Hemmung des Komplexes I der Atmungskette, ATP-Mangel sowie erhöhter oxidativer Stress führen zur Öffnung der  $K_{ATP}$ -Kanäle (Liu und Gutterman 2002; Liss et al. 1999; Avshalumov et al. 2005). So können geöffnete  $K_{ATP}$ -Kanäle zur Vulnerabilität der dopaminergen Neurone in der SNpc beitragen. Behandlung mit  $MPP^+$  führt zur tonischen Hyperpolarisation und zum Sistieren der autonomen Spontanaktivität der mesostriatalen dopaminergen Neurone in der SNpc von adulten Mäusen (Liss et al. 2005). Diese induzierte Hyperpolarisation wurde durch die Superoxid-Dismutase (SOD), ein Enzym, das Superoxid-Anionen in  $H_2O_2$  umwandelt, verhindert. Dies deutet darauf hin, dass ROS die Aktivierung von  $K_{ATP}$ -Kanälen auslösen. So wurde auch gezeigt, dass mitochondriale ROS  $K_{ATP}$ -Kanäle öffnen können, auch wenn die ATP-Konzentration nur leicht gesunken ist (Bao et al. 2005; Michel et al. 2007).

Im Gegensatz dazu waren die dopaminergen Neurone des ventralen Tegmentums (VTA) nicht von einer Komplex I-Inhibition durch  $MPP^+$  betroffen, obwohl sie die gleichen  $K_{ATP}$ -Kanäle besitzen (Liss et al. 2005). Die geringere Vulnerabilität der VTA-Neurone ist auch ein Merkmal des IPS. Milde Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung durch das entkoppelnde Protein (Uncoupling Protein 2, UCP2) reduziert die Menge der ROS und behindert nicht die ATP-Produktion. Bei starker Aktivität des Ionenkanals wird die Energie, die über die Atmungskette produziert wird, nicht in ATP, sondern in Wärme umgewandelt. In den dopaminergen Neuronen der SNpc schützt eine milde Entkopplung vor der Komplex I-Hemmung. Im Gegensatz dazu weisen die dopaminergen Neurone des VTA an sich schon eine leichte Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung auf und reduzieren so die Produktion an ROS, was die Aktivierung der  $K_{ATP}$ -Kanäle nach Komplex I-Hemmung verhindert (Liss



et al. 2005). Eine Überexpression von UCP2 in Neuronen erwies sich als neuroprotektiv gegenüber einer Behandlung mit MPTP (Conti et al. 2005).

Eine Hemmung des  $K_{ATP}$ -Kanals mit Glibenclamid erwies sich als neuroprotektiv. So wurde das Überleben der dopaminergen Neurone nach MPTP- und Glibenclamidgabe deutlich verbessert im Vergleich zur alleinigen MPTP-Gabe. Diese Wirkung wird aber indirekt erreicht durch eine Hemmung des Gliazellen-Neuronen Signalweges, der in einer Störung der zellulären Kalziumhomöostase endet (Toulorge et al. 2010).

### 1.3.3.2 Weitere Kaliumkanäle

Kalzium-aktivierte Kaliumkanäle (SK-Kanäle) spielen eine große Rolle in der Spontanaktivität der dopaminergen Neurone, indem sie die Hyperpolarisation kontrollieren (Ji et al. 2009). Deren Hemmung wirkt neuroprotektiv auf dopaminerge Neurone und verhindert das spontane Sterben der Neurone in Kultur (Salthun-Lassalle et al. 2004). SK-Kanäle öffnen sich durch eine Bindung von Kalzium an Calmodulin. Eine Veränderung der Affinität von Kalzium an den SK-Kanal verändert die Frequenz der autonomen Aktivität und lässt vermuten, dass diese Kanäle an der synaptischen Plastizität beteiligt sein können (Ji et al. 2009).

A-Typ  $K^+$ -Kanäle werden durch GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) gehemmt. GDNF wirkt neuroprotektiv auf dopaminerge Neurone nach Behandlung mit dem Neurotoxin 6-OHDA (Choi-Lundberg et al. 1997). Die neuroprotektive Wirkung lässt sich zum einen auf die erhöhte Erregbarkeit der Neurone durch GDNF zurückführen (Yang et al. 2001), die durch die Hemmung der A-Typ  $K^+$ -Kanäle entsteht. Zum anderen wird der schützende Effekt von GDNF über einen alternativen NF- $\kappa$ B Signalweg vermittelt (Sun et al. 2012).

Der Kir3.2-Kanal (G protein-gated inwardly rectifying  $K^+$  channel 2, GIRK2) reguliert die Erregbarkeit der Membran durch einen Kaliumausstrom im Ruhepotential (Wickman und Clapham 1995). Die weaver-Mutation stört die normale Funktion des Kanals und führt zur Degeneration der dopaminergen Neurone in der SNpc (Patil et al. 1995). Ca. 25 % dieser Neurone können in der weaver-Maus durch eine Inaktivierung des  $K_{ATP}$ -Kanals gerettet werden (Liss et al. 2005), was vermuten lässt, dass Hyperpolarisation im Pathomechanismus des Zelluntergangs eine Rolle spielt.

## 1.4 Ziele der Arbeit

Die Suche nach neuroprotektiven Substanzen in der Therapie des IPS ist seit vielen Jahren aktuell, da trotz neuer Erkenntnisse über die Pathogenese eine kurative Therapie noch nicht entwickelt werden konnte. Eine Reihe von Mechanismen spielen bei der Entstehung des IPS eine Rolle. Besonders auffällig ist die Bedeutung der Ionen wie Kalzium und Kalium beim Überleben der dopaminergen Neurone. Ein massiver Kalziumeinstrom in die Zelle und somit auch in die Mitochondrien führt zum Kollabieren des mitochondrialen elektrochemischen Protonengradienten, der für die Funktion der Atmungskette von sehr großer Bedeutung ist. Durch erhöhte Kalziumkonzentration in den Mitochondrien resultiert eine erhöhte Produktion an ROS (Gleichmann und Mattson 2011). ROS aktivieren wiederum Kalziumkanäle, was zum Kalziumeinstrom in die Zelle führt, und schließlich im apoptotischen Zelluntergang der Zelle endet (Wang und Michaelis 2010). Hemmung des Komplexes I der Atmungskette, ATP-Mangel, erhöhter oxidativer Stress sowie eine erhöhte Konzentration an ROS führen zur Öffnung der  $K_{ATP}$ -Kanäle (Liu und Gutterman 2002; Liss et al. 1999; Avshalumov et al. 2005) und damit zur Hyperpolarisation der Zelle.

Das Protein Ghrelin besitzt eine nachgewiesene neuroprotektive Wirkung und unsere Versuche dieser Arbeit zielten auf die Beantwortung folgender Fragen:

- 1) Wirkt Ghrelin in den von uns angewandten Zellkulturmodellen neuroprotektiv, und ist diese Wirkung auf die acylierte Form beschränkt?
- 2) Wirkt Ghrelin nur neuroprotektiv gegenüber  $MPP^+$  oder auch gegenüber 3-NP?
- 3) Spielen verschiedene Ionenkanäle bei der neuroprotektiven Wirkung von Ghrelin eine Rolle?
- 4) Setzt eine mögliche neuroprotektive Wirkung der nicht-acylierten Form des Ghrelins eine Umwandlung in die acylierte Form voraus?

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Artikel Nummer
(+)-MK 801 hydrogen maleate	Sigma	M107-5MG
(Des-octanoyl)-Ghrelin (mouse, rat), triflouracetate salt	Bachem	H-6264
[D-Lys <sup>3</sup> ]-GHRP-6	Tocris	1922
3-Nitropropionic acid	Sigma	N5636-1G
B-27 Serum-Free Supplement 50X liquid	Gibco	17504-044
Cytarabine	Sigma	C1768-100MG
Diazoxide	Sigma	D9035-250MG
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Sigma	D6046
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1 X	Gibco	14190-136 1000 mL
Fetal Bovine Serum Standard Quality	PAA	A11-101
Flunarizin dihydrochloride	Sigma	F8257-1G
Fomaldehyde solution, ACS reagennt, 37wt% in H <sub>2</sub> O	Sigma	25,254-9
Ghrelin (mouse, rat) triflouracetate salt	Bachem	H-4862
Glycerol, 99,5+%, A.C.S. reagent	Sigma	G7893-500 mL
GO-Tat-CoA	Phoenix	032-37
	Pharmaceuticals	
Horse Serum, Heat inactivated, Sterile-filtered	Sigma	H1138-500 mL
L-Aspartic acid	Sigma	A9256-100G
L-Gluatmic acid	Sigma	G1251-100G
L-Glutamine	Sigma	G8540-25G
MPP <sup>+</sup> Iodid	Sigma	D048
Neurobasalmedium 1X liquid	Gibco	21109-049
Nicardipine hydrochloride	Sigma	N7510-1G
Poly(ethyleneimine)solution 50% (w/v) in water	Sigma	P-3143-100 mL
Thimerosal, minimum 97% HPLC	Sigma	T5125-10G
Triton X-100	Sigma	X100-500 mL

### 2.1.2 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Artikel Nummer
Alexa-Fluor® 488 donkey anti-goat IgG ( H+L)	Invitrogen	A11055
AlexaFluor® 647-conjugated Streptavidin	Invitrogen	016-600-084
Anti-NeuN, clone A60, biotin-conjugated monoclonal Antibody	Millipore	MAB377B
Anti-Tyrosine Hydroxylase, host: rabbit	Millipore	AB 152; LV1770323
Cy3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson Immuno Research	111-165-003
GHS-R1a (F-16) sc-10359 goat polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology	H0811

### 2.1.3 Glas und Plastikware

Bezeichnung	Hersteller	Artikel Nummer
10 µl XL, graduated tip, max. Vol 20 µl sterile	StarLab	51180-3810
10 ml in 1/10 ml Serological pipette	Sarstedt	86.1254.001
1000 µl Pipettenspitze	Sarstedt	70.762
5 ml in 1/10 ml Serological pipette	Sarstedt	86.1253.001
Cellstar® 24 well cell culture plate sterile, w/ lid	Greiner bio-one	662-160
Cryopure Tube 1,8 ml mix.colour	Sarstedt	72.379.992
Filtropur V25 0.2, 250 ml Vacuum Filter	Sarstedt	83.1822.001
Nunclon™ Surface 6 well culture plate	Nunc	140675
Tube 15 ml, 120x17 mm, PP	Sarstedt	62.554.512
Tube 50 ml, 115x28 mm, PP	Sarstedt	62.559.001

### 2.1.4 Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Artikel Nummer
AC 260/240V 50/60Hz 625W	Heidolph	MR3001
Camera Controller	Hamamatsu	C4742-95
Ebq 100 isolated	Leistungselektronik Jena	L 18410801
Function line Incubator	Heaus instruments	22020715

Leica DM IRB	Leica	888212
	Microsystems	237143
	Wetzlar GmbH	
Thermo Scientific Megafuge 1.OR	Heraeus	30028067
Ultra Basic pH Meter	Denver Instrument	902379.1 Rev.A
Wild M3Z Heerbrugg Switzerland Type-S	Wild Heerbrugg	

## 2.1.5 Verwendete Lösungen und deren Herstellung

### Neurobasal-Medium

- Gibco Neurobasal-Medium 1x liquid
- 0,5 mM L-Glutamin
- 0,025 mM Glutamat/Aspartat
- 1x B-27
- 5 % FBS (hitzeinaktiviert)
- 1x Penicillin/Streptomycin
- Steril filtrieren (0,2 Filter)

### 0,6% Glukose

- Stock: 30 g D-Glukose in 70 g destilliertes Wasser = 30 % Glukose
- 10 ml 30 % Glukose in 490 ml 1x Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS)
- Steril filtrieren (0,2 Filter)

### Polyethylenimine (PEI)

- 14,4 g Sodium tetraborate deca hydrate (99,5-105,0 %) auf 1 l destilliertes Wasser
- 2 g Poly(ethyleneimine)solution 50 %
- pH mit HCl auf 8,3 einstellen
- 2 Mal steril filtrieren (0,2 Filter)

### 3,7% Formaldehyd

- 1/10 Verdünnung von 37 % Formaldehyd in PBS

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

#### **2.2.1.1 Kultivierung primärer mesencephaler Neurone**

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Function line-Werkbank durchgeführt. Die Zellkulturen wurden in einem CO<sub>2</sub>-begasteten Brutschrank (5 % CO<sub>2</sub>) bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Zellen wurden in 24-well Platten (Greiner Bio-one) kultiviert und als Nährmedium diente Neurobasal-Medium (Gibco) mit entsprechenden Zutaten (s. 2.1.3).

#### **2.2.1.2 Vorbereitung der Platten**

24-well Platten (die 16 inneren wells) wurden am Vortag mit 400 µl PEI beschichtet und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die beschichteten wells vier Mal mit 500 µl Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1 X (PBS) gewaschen und 500 µl PBS in den wells belassen.

#### **2.2.1.3 Herstellung der primären Zellkultur**

Weibliche, E15 trächtige Wistar-Ratten von Janvier wurden in einer CO-Kammer getötet. Nach Desinfektion mit 70 %igem Alkohol wurde die Bauchhöhle eröffnet. Mit Hilfe von zwei mit 70 % Alkohol desinfizierten Pinzetten (Dumont #7, FST) wurden die einzelnen Fruchtblasen aufgetrennt, die Embryos entnommen und in 20 ml 0,6 % Glukose in einem 50 ml Röhrchen aufbewahrt. Um das Mesencephalon zu dissezieren, wurde das Wild M3Z Heerbrugg Switzerland Type-S Mikroskop verwendet und als Unterlage diente eine 6-well Platte. Zunächst wurden mit Hilfe einer spitzen Pinzette die schon vorhandenen knorpeligen Anteile der Schädeldecke, die Dura mater und Teile der Arachnoidea mater entfernt, um dann das Mesencephalon zu entnehmen und es in 2 ml 0,6 % Glukose in einem 15 ml Röhrchen aufzubewahren.



**Abb. 8 Dissektion des Mesencephalons.**

Durch Pipettieren wurden die Zellen untereinander gelöst. Danach wurden 5 ml 0,6 % Glukose hinzugefügt und 5 Minuten abgewartet. Von den 7 ml wurden die oberen 5 ml in ein zweites 15 ml Röhrchen pipettiert. Es wurden die letzten beiden Schritte wiederholt (auf 7 ml auffüllen, warten und die oberen 5 ml abpipettieren). Das Röhrchen mit 10 ml Inhalt wurde mit 800 rpm und bei Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Aus den vorbereiteten wells wurde das PBS entnommen und jeweils 500  $\mu$ l Neurobasal-Medium in die wells pipettiert. Im Durchschnitt enthielt ein well  $2.627 \pm 228$  TH-positive und  $347.893 \pm 21,457$  NeuN-positive Zellen. Die Platten wurden nun im Brutschrank sieben Tage lang kultiviert und behandelt.

#### **2.2.1.4 Kultivierung und Behandlung der Zellen**

An DIV 1 (days in vitro) erfolgte ein Mediumwechsel mit 350  $\mu$ l Neurobasalmedium und an DIV 2 wurden AraC (2 cytarabine) und MK 801 ((+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate) in einer Konzentration von jeweils 2  $\mu$ M hinzugefügt. Bei einer zusätzlichen Behandlung mit dem GHS-R1a-Antagonisten erfolgte an DIV 2 ein Mediumwechsel und die Zugabe von [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 mit einer Endkonzentration von 0,9  $\mu$ M. An DIV 3 erfolgte ein weiterer Mediumwechsel mit 350  $\mu$ l Neurobasalmedium und Ghrelin (acyliertes und nicht-acyliertes Ghrelin) wurde in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt (0,001 nM, 0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM und 10 nM). Bei einer Behandlung mit Diazoxid, Nicardipin oder Flunarizin erfolgte diese zeitgleich mit der Hinzugabe von Ghrelin. Die Behandlung mit dem GOAT Inhibitor fand eine Stunde vor der Behandlung mit Ghrelin statt. An DIV 4 wurden 100  $\mu$ M 3-Nitropropionsäure oder 3  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> (1-methyl-4-

phenylpyridinium) hinzugefügt. Ein kompletter Mediumwechsel erfolgte an DIV 6 und an DIV 7 wurden die Zellen mit 400 µl 3,7 % Formaldehyd für 20 Minuten fixiert, gefolgt von 3 Waschvorgängen mit PBS. Anschließend wurden 500 µl PBS in den wells belassen.

**Tabelle 2 Kultivierung und Behandlung der Zellen.**

DIV 1	Mediumwechsel mit 350 µl Neurobasalmedium
DIV 2	Zugabe von 10 µl AraC (100 µM) und 10 µl MK-801 (100 µM) → Endkonzentration: jeweils 2 µM <u>Ggf. Behandlung mit GHS-R1a:</u> Mediumwechsel (350 µl) mit gleichzeitiger Zugabe von <ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>[D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6:</u> 5 µl von 90 µM Stocksolution (gelöst in destilliertem Wasser) → Endkonzentration: 0,9 µM</li> </ul>
DIV 3	Mediumwechsel (350 µl) mit gleichzeitiger Zugabe von <u>Ghrelin</u> : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Stocksolution: 100 µM (gelöst in Glycerin und destilliertem Wasser (1:1), weitere Verdünnungen auch in destilliertem Wasser) <ul style="list-style-type: none"> <li>o 10 nM: 1 µl der 1:20 Verdünnung</li> <li>o 1 nM: 10 µl der 1:2000 Verdünnung</li> <li>o 0,1 nM: 1 µl der 1:2000 Verdünnung</li> <li>o 0,01 nM: 10 µl der 1:200000 Verdünnung</li> <li>o 0,001 nM: 1 µl der 1:200000 Verdünnung</li> </ul> </li> </ul> <u>Ggf. Behandlung mit</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Diazoxid:</u> 2,5 mM Stocksolution mit 2 % 10 N NaOH und destilliertem Wasser herstellen, dann 1:2 mit destilliertem Wasser verdünnen, 5 µl davon → Endkonzentration: 12,5 µM</li> <li>- <u>Flunarizin:</u> 0,125 mM Stocksolution mit destilliertem Wasser herstellen, 10 µl davon → Endkonzentration: 2,5 µM</li> <li>- <u>Nicardipin:</u> 0,25 mM Stocksolution in destilliertem Wasser herstellen, 6 µl davon → Endkonzentration: 3 µM</li> </ul> <u>Ggf. Behandlung mit GOAT-Inhibitor GO-CoA-Tat:</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 0,5 mM Stocksolution herstellen: 100 µg GO-CoA-Tat + 2 µl DMSO + 53 µl destilliertes Wasser</li> <li>- Eine Stunde <u>vor</u> der Ghrelinzugabe: Mediumwechsel mit 250 µl und Zugabe von 6 µl der Stocksolution → Endkonzentration: 6 µM</li> </ul>
DIV 4	Zugabe von 10 µl 3-NP (5 mM) bzw. 6 µl MPP <sup>+</sup> (0,25 mM), gelöst in destilliertem Wasser → Endkonzentration: 100 µM 3-NP; 3 µM MPP <sup>+</sup>
DIV 5	
DIV 6	Kompletter Mediumwechsel mit 500 µl Neurobasalmedium
DIV 7	Fixieren mit 400 µl 4 % PFA für 20 Minuten, dann 2 Waschvorgänge mit PBS



## 2.2.2 Immunhistochemie

### 2.2.2.1 Anti-Tyrosinhydroxylase (Anti-TH)

Primärer Antikörper: Anti-TH Rabbit (Millipore) 1/5000

- 6 % Horse Serum
- 0,02 % Thimerosal
- 0,2 % Triton X

Sekundärer Antikörper: Cy3 Goat Anti-Rabbit (Jackson Immuno Research) 1/500

- 5 % Horse Serum

Nach Entnahme des PBS wurden jeweils 270 µl des primären Anti-TH rabbit-Antikörpers in die wells pipettiert und 24 Stunden bei 4 °C inkubiert. Danach wurde der primäre Antikörper wieder entnommen, zweimal mit PBS gewaschen und 270 µl des sekundären Cy3 Goat Anti-Rabbit-Antikörpers dazugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde entnommen, es wurde viermal mit PBS gewaschen und 500 µl PBS in den wells gelassen.

### 2.2.2.2 Anti-NeuN (Neuronal Neuclei)

Primärer Antikörper: NeuN-biotinated (Millipore) 1/100

- 6 % Horse Serum
- 0,02 % Thimerosal
- 0,2 % Triton X

Sekundärer Antikörper: Alexa Fluor 647-conjugated Streptavidin (Jackson Immuno Research) 1/300

- 5 % Horse Serum

Jeweils 270 µl des primären NeuN-biotinated-Antikörpers wurden in die wells pipettiert und 24 Stunden bei 4 °C inkubiert. Danach wurde der primäre Antikörper wieder entnommen, zweimal mit PBS gewaschen und 270 µl des sekundären

Alexa Fluor 647-conjugated Streptavidin-Antikörpers dazugegeben und für 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde entnommen, es wurde viermal mit PBS gewaschen und 500 µl PBS in den wells gelassen.

### **2.2.2.3 Anti-Growthhormone Secretagogue Rezeptor 1a**

Primärer Antikörper: Anti-GHS-R1a 1/250

- 6 % Horse Serum
- 0,02 % Thimerosal
- 0,2 % Triton X

Sekundärer Antikörper: Alexa-Fluor® 488 donkey anti-goat IgG ( H+L)

- 5 % Horse Serum

Jeweils 270 µl des primären GHS-R1a-Antikörpers wurden in die wells pipettiert und 24 Stunden bei 4 °C inkubiert. Danach wurde der primäre Antikörper wieder entnommen, zweimal mit PBS gewaschen und 270 µl des sekundären Alexa-Fluor® 488 donkey anti-goat IgG-Antikörpers dazugegeben und für 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde entnommen, es wurde viermal mit PBS gewaschen und 500 µl PBS in den wells gelassen.

## **2.2.3 Mikroskopische Auswertung**

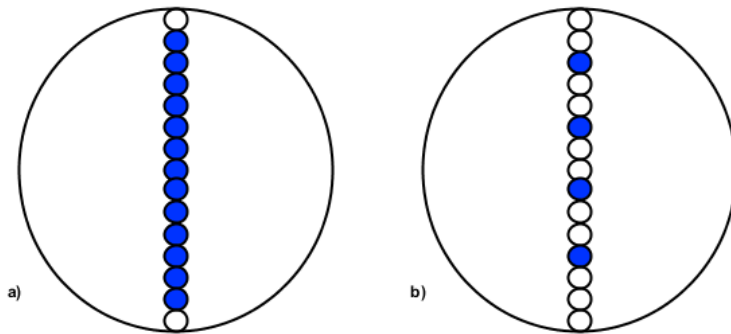
Zum Mikroskopieren wurde das Leica DM IRB Fluoreszenzmikroskop mit dem Fluoreszenzlicht Ebq 100 isolated verwendet. Es wurde mit einer 20-fachen Vergrößerung mikroskopiert.

### **2.2.3.1 Tyrosinhydroxylase-positive Zellen**

Zum Auswerten der TH-positiven Zellen wurden die gefärbten, lebenden Neurone gezählt. Aufgrund des Cy3 sekundären Antikörpers wurde Fluoreszenzlicht mit einer Wellenlänge von ca. 550 nm (grün) benutzt. Pro well entstanden 15 auf der Mittellinie liegende Blickfelder, von denen die inneren 13 ausgezählt wurden. Die Blickfelder am Ober- und Unterrand wurden ausgelassen (siehe Abb. 9a).

### 2.2.3.2 Neuronal Neuclei-positive Zellen

Zum Auswerten der NeuN-positiven Zellen wurde Fluoreszenzlicht mit einer Wellenlänge von ca. 650 nm (rot) genutzt. Es wurden pro well jeweils vier Fotos von vier verschiedenen auf der Mittellinie liegenden Blickfeldern mit der Kamera Hamamatsu gemacht (siehe Abb. 9b). Zum Aufnehmen der Fotos wurde das Programm SimplePCI verwendet. Ausgewertet wurden die Fotos mit Hilfe des Programms ImageJ.



**Abb. 9** Auszählen der Zellen. a) TH-positive Zellen b) NeuN-positive Zellen.

### 2.2.3.3 GHS-R1a-positive Zellen

Das Fluoreszenzlicht mit einer Wellenlänge von ca. 495 nm (zyan) wurde zur Auswertung der GHS-R1a-positiven Zellen verwendet. Mit dem GHS-R1a-Antikörper wurden einige wells gefärbt, um eine qualitative und keine quantitative Aussage zu treffen.

## 2.3 Statistik

Die Ergebnisse wurden in einer Excel Tabelle zusammengefasst und es wurden Mittelwerte  $\pm$  Standard error of the mean (S.E.M.) für jeweils mindestens drei unabhängige Experimente errechnet. Für die statistische Auswertung erfolgte ein one-way ANOVA mit einem post-hoc Dunnett Test zum Vergleich der Versuchsgruppen mit der Kontrollgruppe oder einem post-hoc Holm-Sidak Test zum paarweisen Vergleich. Das Signifikanzniveau wurde bei  $p < 0,05$  festgelegt.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Wirkung von Ghrelin auf eine Hemmung des Komplexes I durch MPP<sup>+</sup>

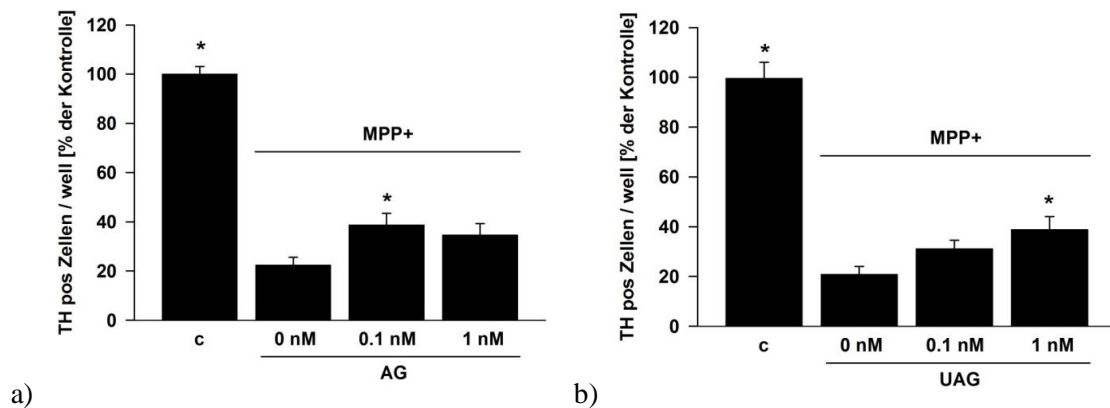
Zunächst überprüften wir, ob wir den neuroprotektiven Effekt von Ghrelin gegenüber MPP<sup>+</sup> unter unseren Bedingungen reproduzieren konnten. Dazu verwendeten wir verschiedene Konzentrationen an acyliertem (AG) und nicht-acyliertem Ghrelin (UAG). Die überprüften Konzentrationen waren 0,001 nM, 0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM und 10 nM.

##### 3.1.1 Acyliertes Ghrelin

Eine alleinige Behandlung mit MPP<sup>+</sup> führte zu einem Verlust an TH-positiven Neuronen von ca. 80 % ( $22,38 \pm 3,17$  % Überleben im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen). Dieser Zellverlust konnte durch eine Behandlung mit AG verhindert werden. Statistisch signifikant war eine Behandlung mit 0,1 nM AG (\* $p < 0,05$ ):  $38,74 \pm 4,72$  % der dopaminergen Neurone überlebten. Nicht statistisch signifikante Effekte ergaben die Behandlungen mit 0,001 nM, 0,01 nM, 1 nM und 10 nM AG ( $24,86 \pm 5,04$  % bei 0,001 nM;  $23,28 \pm 3,26$  % bei 0,01 nM;  $34,65 \pm 4,59$  % bei 1 nM;  $19,97 \pm 5,17$  % bei 10 nM). Veranschaulicht wird dies in Abb. 10a.

##### 3.1.2 Nicht-acyliertes Ghrelin

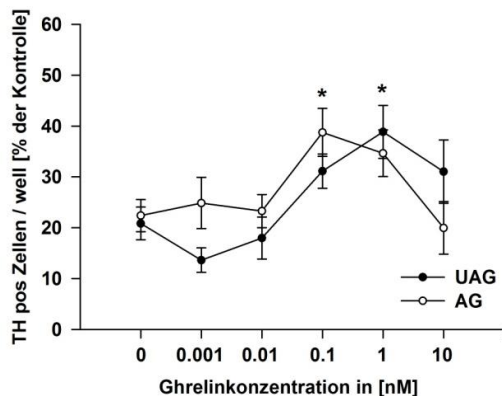
In den Versuchen mit UAG überlebten nach einer alleinigen Behandlung mit MPP<sup>+</sup> nur  $20,84 \pm 3,22$  % der TH-positiven Zellen im Vergleich zu den Kontrollen. Auch eine Behandlung mit UAG verminderte diesen Zellverlust. UAG wirkte mit statistischer Signifikanz (\* $p < 0,05$ ) neuroprotektiv auf die dopaminergen Neurone bei einer Konzentration von 1 nM ( $38,85 \pm 5,21$  % Überleben der TH-positiven Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen). Behandlungen mit 0,001 nM, 0,01 nM, 0,1 nM und 10 nM wiesen keine statistische Signifikanz auf ( $13,63 \pm 2,41$  % bei 0,001 nM;  $17,97 \pm 4,13$  % bei 0,01 nM;  $31,13 \pm 3,37$  % bei 0,1 nM;  $31,04 \pm 6,23$  % bei 10 nM). In Abb. 10b werden die Ergebnisse graphisch dargestellt.



**Abb. 10 Neuroprotektive Wirkung von AG und UAG gegenüber MPP<sup>+</sup>.** a) AG schützte signifikant vor dopaminergem Zellverlust durch MPP<sup>+</sup> bei einer Konzentration von 0,1 nM ( $38,74 \pm 4,72\%$ ) b) Bei einer Konzentration von 1 nM schützte UAG signifikant vor dem dopaminergen Zellverlust durch MPP<sup>+</sup> ( $38,85 \pm 5,21\%$ ), \* $p < 0,05$  verglichen mit der alleinigen Behandlung mit MPP<sup>+</sup>.

### 3.1.3 Dosis-Wirkungs-Beziehung und Zellmorphologie

Zusammengefasst ergaben die Ergebnisse eine Dosis-Wirkungs-Beziehung, die in Abb. 11 dargestellt wird. AG zeigte die höchste neuroprotektive Wirkung bei 0,1 nM, UAG bei einer 10-fach höheren Konzentration von 1 nM. Ab einer Konzentration von 10 nM und unter einer Konzentration von 0,1 nM waren beide Formen von Ghrelin nicht neuroprotektiv.



**Abb. 11 Dosis-Wirkungs-Beziehung von AG bzw. UAG.** Das Wirkungsmaximum von AG lag bei 0,1 nM, bei UAG bei 1 nM, \* $p < 0,05$  verglichen mit der alleinigen Behandlung mit MPP<sup>+</sup>.

Nach einer Behandlung mit  $MPP^+$  nahm nicht nur die Zellzahl ab, sondern auch die Anzahl der Dendriten. Die noch lebenden dopaminergen Neurone hatten deutlich weniger Dendriten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser Verlust konnte durch die Gabe von AG und UAG reduziert werden (siehe Abb. 12).

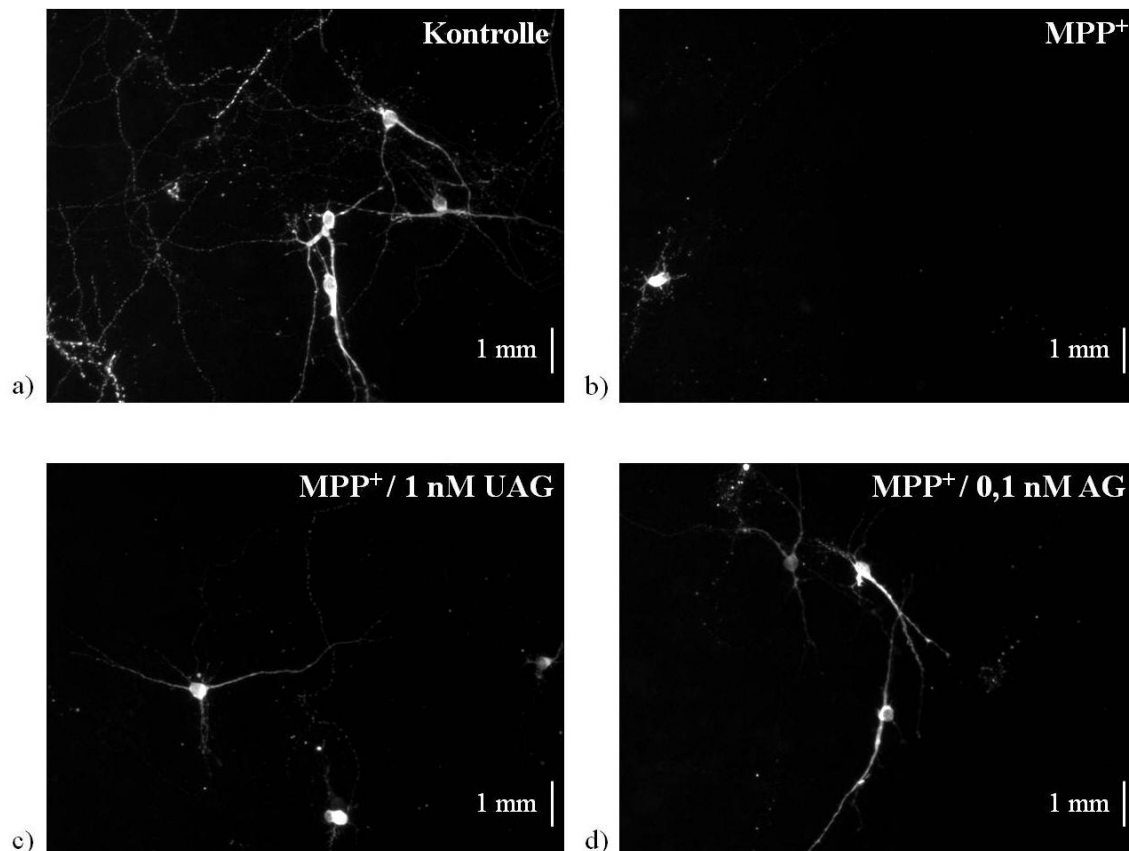
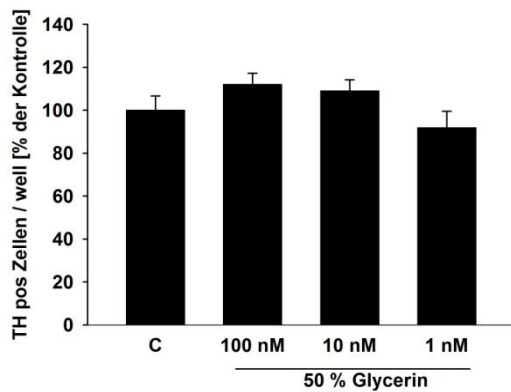


Abb. 12 TH-positive Zellen.

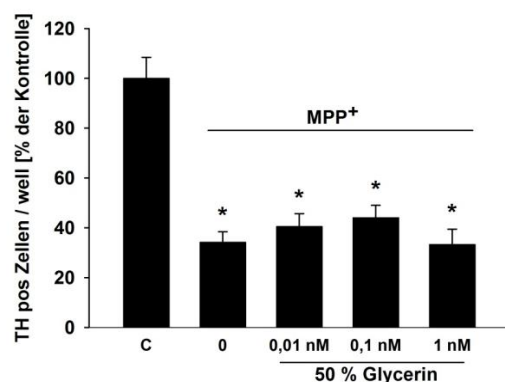
### 3.2 Einfluss von Glycerin

Da das Protein Ghrelin in 50 %igem Glycerin gelöst war, überprüften wir im Vorfeld, ob Glycerin selbst einen Einfluss auf das Überleben der Neurone hat und neuroprotektiv gegenüber  $MPP^+$  wirkt. Eine Behandlung mit 100 nM, 10 nM und 1 nM des 50 %igen Glycerins beeinflusste das Überleben der dopaminergen Neurone nicht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe überlebten  $112,02 \pm 5,19 \%$  bei Behandlung mit 100 nM des 50 %igen Glycerins,  $109,0 \pm 5,2 \%$  bei 10 nM und  $91,95 \pm 7,61 \%$  bei 1 nM (siehe Abb. 13)



**Abb. 13 Einfluss von Glycerin auf dopaminerge Neurone.** Die Behandlung mit 50 % Glycerin beeinflusste nicht das Überleben der dopaminergen Neurone.

Gegenüber einer Behandlung mit  $MPP^+$  wirkte 50 %iges Glycerin nicht neuroprotektiv. Die alleinige Zugabe von  $MPP^+$  führte zu einem Zelltod von ca. 65 %. Es überlebten  $34,18 \pm 4,20$  % der dopaminergen Neurone im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die bei der Behandlung mit AG und UAG sich als neuroprotektiv erwiesene Konzentration von 0,1 nM bzw. 1 nM untersuchten wir hinsichtlich der Wirkung von Glycerin. Konzentrationen von 0,01 nM, 0,1 nM und 1 nM des 50 %igen Glycerins zeigten keine protektive Wirkung auf die dopaminergen Neurone bei einer simultanen Behandlung mit  $MPP^+$ . Es überlebten  $40,51 \pm 5,18$  % der Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe bei 0,01 nM Glycerin,  $44,09 \pm 4,9$  % bei 0,1 nM Glycerin und  $33,27 \pm 6,19$  % bei 1 nM Glycerin (siehe Abb. 14). Somit führte die Behandlung von 50 %igem Glycerin und  $MPP^+$  zu einem signifikanten Zuwachs des Zelltodes im Vergleich zur Kontrollgruppe.



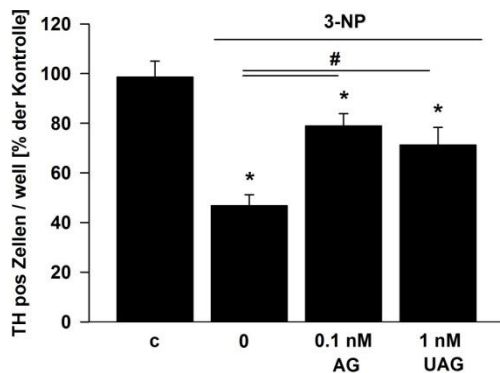
**Abb. 14 Glycerin besitzt keine neuroprotektiven Eigenschaften gegenüber  $MPP^+$ .** Die Behandlung mit 0,01 nM, 0,1 nM und 1 nM des 50 %igen Glycerins wirkte nicht neuroprotektiv auf die TH-positiven Zellen gegenüber einer Behandlung mit  $MPP^+$ . Die alleinige Behandlung mit  $MPP^+$  sowie die simultane Behandlung mit  $MPP^+$  und 0,01 nM, 0,1 nM bzw. 1 nM Glycerin führten zu einem signifikanten Zelltod im Vergleich zur Kontrollgruppe (\* $p < 0,05$ ).

### 3.3 Wirkung von Ghrelin auf eine Hemmung des Komplexes II durch 3-NP

Es stellte sich die Frage, ob die neuroprotektive Wirkung von Ghrelin für eine Hemmung des Komplexes I sowie für dopaminerge Neurone spezifisch ist. Deshalb untersuchten wir die Wirkung von Ghrelin auf eine Hemmung des Komplexes II durch 3-NP in Bezug auf das Überleben TH-positiver und NeuN-positiver Zellen.

#### 3.3.1 TH-positive Zellen

Wie auch bei den Versuchen mit MPP<sup>+</sup> wiesen beide Ghrelinformen bei einer Behandlung mit 3-NP eine neuroprotektive Wirkung auf die dopaminergen Neurone auf. Unter 3-NP überlebten  $46,80 \pm 4,42$  % der TH-positiven Zellen (siehe Abb. 15). Analog zu den obigen Ergebnissen hatte AG sein Wirkungsmaximum bei 0,1 nM ( $78,89 \pm 4,94$  %; #p < 0,05) und UAG bei 1 nM ( $71,23 \pm 7,17$  %; #p < 0,05).



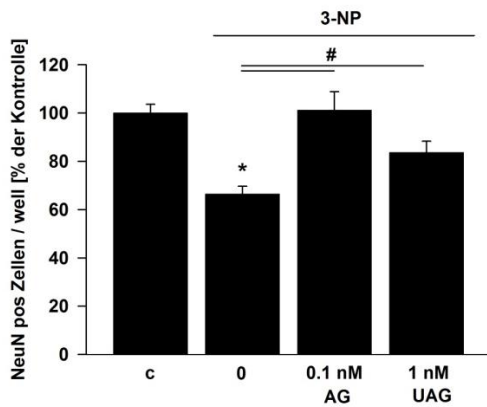
**Abb. 15 Neuroprotektive Wirkung auf dopaminerge Neurone von AG und UAG gegenüber 3-NP.** Eine Behandlung mit 0,1 nM AG und 1 nM UAG führte zu einem statistisch signifikant höheren Überleben der TH-positiven Zellen ( $78,89 \pm 4,94$  % bei 0,1 nM AG und  $71,23 \pm 7,17$  % bei 1 nM UAG), \*p < 0,05 verglichen mit der Kontrollgruppe, #p < 0,05 im paarweisen Vergleich.

#### 3.3.2 NeuN-positive Zellen

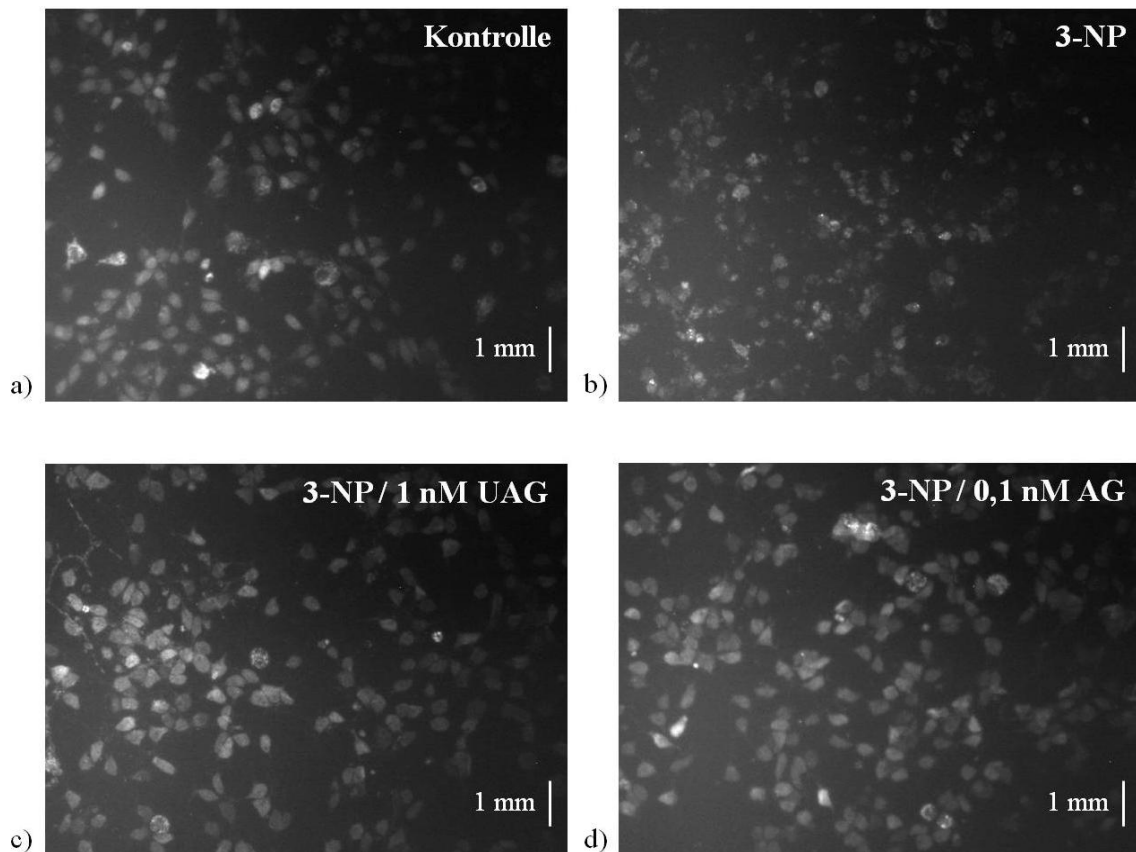
Im Gegensatz zu MPP<sup>+</sup> wird 3-NP nicht nur von dopaminergen Neuronen, sondern von allen neuronalen Zellen aufgenommen. Ist die neuroprotektive Wirkung von Ghrelin gegenüber einer Hemmung des Komplexes II abhängig vom neuronalen Phänotyp? Dafür ergab sich in den durchgeführten Experimenten kein Anhalt. Nach einer Behandlung mit 3-NP überlebten  $66,41 \pm 3,25$  % der NeuN-positiven Neurone (siehe Abb. 16 und 17). Die Auswertung ergab eine statistische Signifikanz der



neuroprotektiven Wirkung bei einer Behandlung mit 0,1 nM AG ( $101,18 \pm 7,51 \%$ ;  $\#p < 0,05$ ) und 1 nM UAG ( $83,84 \pm 4,68 \%$ ;  $\#p < 0,05$ ).



**Abb. 16** Neuroprotektive Wirkung auf NeuN-positive Neurone von AG und UAG gegenüber 3-NP. Bei einer zusätzlichen Behandlung mit 0,1 nM AG stieg das Zellüberleben auf  $101,18 \pm 7,51 \%$  an. Bei einer Gabe von 1 nM UAG überlebten  $83,84 \pm 4,68 \%$  der NeuN-positiven Zellen. \* $p < 0,05$  verglichen mit der Kontrollgruppe, # $p < 0,05$  im paarweisen Vergleich.



**Abb. 17** NeuN-positive Zellen.

### 3.4 Abhängigkeit der neuroprotektiven Wirkung von Kalziumkanälen

Ist die neuroprotektive Wirkung von Ghrelin abhängig von Kalziumkanälen? Und wenn ja, von welchen? Deswegen wurden die T-Typ und L-Typ-Kalziumkanäle selektiv blockiert und die Wirkung von Ghrelin überprüft.

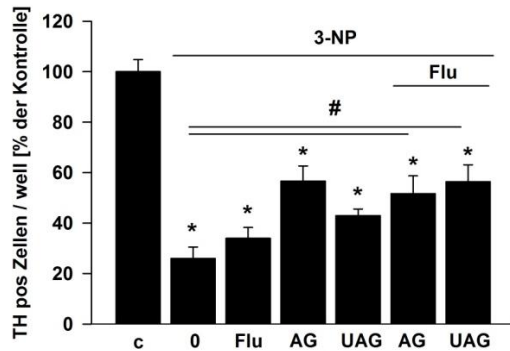
#### 3.4.1 T-Typ-Kalziumkanäle

Flunarizin, ein T-Typ-Kalziumkanalblocker, zeigte bei einer Konzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  keine neuroprotektive Wirkung auf TH-positive ( $33,95 \pm 4,30$  %: Behandlung mit 3-NP und 2,5  $\mu\text{M}$  Flunarizin;  $25,96 \pm 4,58$  %: alleinige Behandlung mit 3-NP) oder NeuN-positive Zellen ( $73,53 \pm 5,57$  %: Behandlung mit 3-NP und 2,5  $\mu\text{M}$  Flunarizin;  $71,83 \pm 5,71$  %: alleinige Behandlung mit 3-NP). Bei einer simultanen Behandlung mit 2,5  $\mu\text{M}$  Flunarizin und Ghrelin wurde die neuroprotektive Wirkung von Ghrelin nicht abgeschwächt. Die gewählte Konzentration des Flunarizins wurde an Versuche aus der Literatur angelehnt (Salthun-Lassalle et al. 2004).

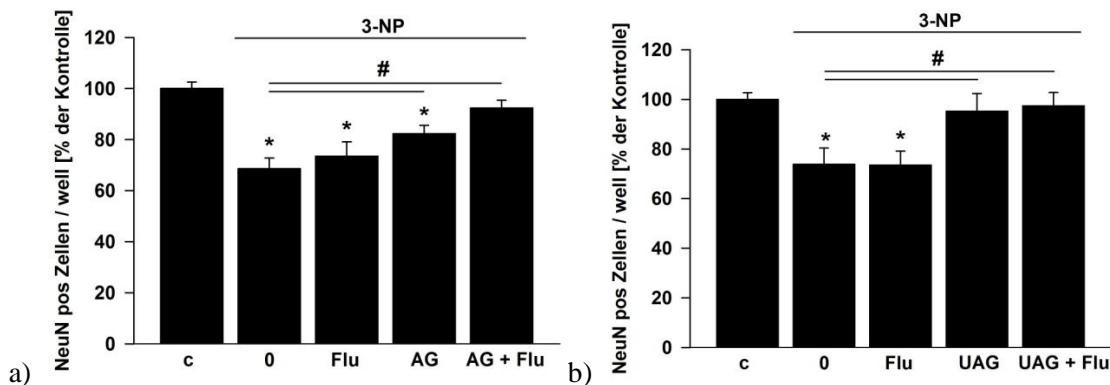
Bei einer Behandlung mit 0,1 nM AG überlebten  $56,66 \pm 6,0$  % der dopaminergen Neurone. Die Hinzugabe von Flunarizin führte zu einem Zellüberleben von  $51,67 \pm 7,03$  %. Analog dazu überlebten  $42,95 \pm 2,62$  % der TH-positiven Neurone bei Hinzugabe von 1 nM UAG und  $56,38 \pm 6,73$  % bei zusätzlicher Behandlung mit Flunarizin (siehe Abb. 18).

Die Auswertung der NeuN-positiven Zellen ergab entsprechende Ergebnisse:  $82,32 \pm 3,24$  % der Zellen überlebten bei einer Behandlung mit 0,1 nM AG und  $92,38 \pm 3,03$  % überlebten bei einer kombinierten Behandlung mit 0,1 nM AG und Flunarizin. Analog dazu veränderte auch eine simultane Behandlung mit 1 nM UAG und Flunarizin das Überleben der NeuN-positiven Zellen nicht (siehe Abb. 19, Zellüberleben im Vergleich zur Kontrolle: 1 nM UAG:  $95,22 \pm 7,07$  %; 1 nM UAG + Flunarizin:  $97,37 \pm 5,38$  %).

Daraus kann gefolgert werden, dass die neuroprotektive Wirkung von Ghrelin auf TH-positive und NeuN-positive Zellen nicht von T-Typ-Kalziumkanälen abhängig ist.



**Abb. 18 Wirkung von Flunarizin auf dopaminerge Neurone.** Die Behandlung von 2,5  $\mu$ M Flunarizin und 3-NP führte nicht zu einem vermehrten Zellüberleben im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit 3-NP. Die Hinzugabe von Flunarizin schwächte die neuroprotektive Wirkung von AG und UAG nicht ab, sodass die Behandlung von AG bzw. UAG + Flu + 3-NP weiterhin statistisch signifikant erhöhtes Zellüberleben im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit 3-NP hatte (# $p < 0,05$ ). Flu = Flunarizin, \* $p < 0,05$  verglichen mit der Kontrollgruppe, # $p < 0,05$  im paarweisen Vergleich.



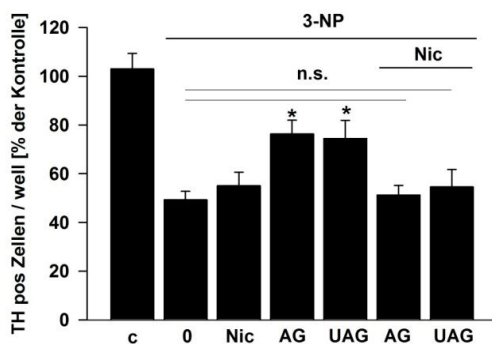
**Abb. 19 Wirkung von Flunarizin auf NeuN-positive Neurone.** Auf NeuN-positive Zellen hatte Flunarizin keinen neuroprotektiven Einfluss. Die simultane Behandlung der Zellen mit AG/UAG und Flunarizin schwächte die Ghrelinwirkung nicht ab: **a)** Behandlung mit 0,1 nM AG **b)** Behandlung mit 1 nM UAG. Flu = Flunarizin, \* $p < 0,05$  verglichen mit der Kontrollgruppe, # $p < 0,05$  im paarweisen Vergleich.

### 3.4.2 L-Typ-Kalziumkanäle

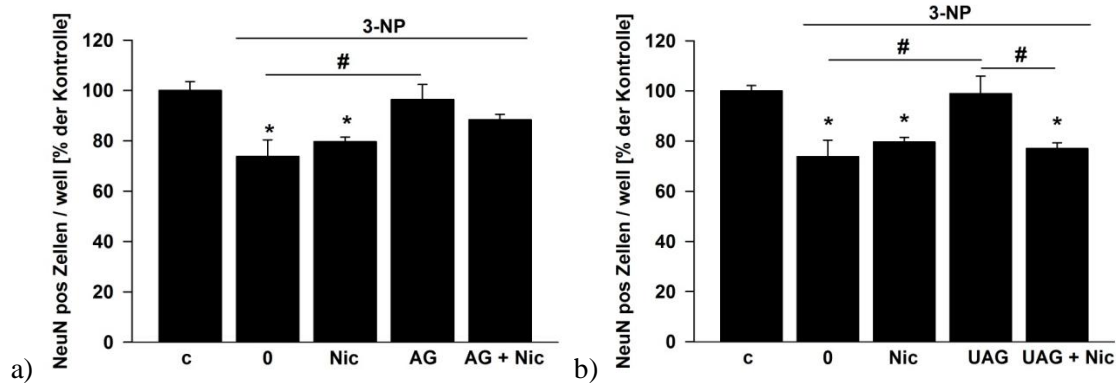
Eine Hemmung des L-Typ-Kalziumkanals mit 3  $\mu$ M Nicardipin erwies sich nicht als neuroprotektiv gegenüber einer Behandlung mit 3-NP.  $49,29 \pm 3,49$  % der TH-positiven Neurone überlebten bei einer Behandlung mit 3-NP und  $55,05 \pm 5,57$  % überlebten bei Hinzugabe von Nicardipin. Analog dazu waren die Ergebnisse der NeuN-positiven Zellen:  $73,78 \pm 6,63$  % Zellüberleben bei Behandlung mit 3-NP und  $79,65 \pm 1,82$  % Zellüberleben bei 3-NP und Nicardipin. Die Dosis des Nicardipins wurde aus Versuche der Literatur angelehnt (Katsuki et al. 2001).

Im Gegensatz zur Hemmung des T-Typ-Kalziumkanals mit Flunarizin, schwächte die Behandlung mit Nicardipin die neuroprotektive Wirkung beider Ghrelinformen ab. Dies traf für TH- und NeuN-positive Zellen zu. Das Überleben der dopaminergen Neurone sank von  $76,32 \pm 5,63$  % auf  $51,26 \pm 3,88$  %, wenn zusätzlich zur Behandlung mit 0,1 nM AG 3  $\mu$ M Nicardipin hinzugegeben wurden. Die Wirkung von 1 nM UAG wurde abgeschwächt von  $74,46 \pm 7,47$  % auf  $54,58 \pm 7,20$  % Überleben TH-positiver Neurone. Somit hob Nicardipin die neuroprotektive Wirkung von Ghrelin auf TH-positive Zellen auf (siehe Abb. 20).

In Bezug auf NeuN-positive Neurone, schwächte Nicardipin die Wirkung von 0,1 nM AG leicht (AG:  $96,45 \pm 5,91$  %; AG + Nicardipin:  $88,36 \pm 2,23$  %) und von 1 nM UAG signifikant ab (UAG:  $98,91 \pm 6,97$  %; UAG + Nicardipin:  $77,04 \pm 2,26$  %; \* $p < 0,05$ ). Dies entsprach dem Zellüberleben unter 3-NP:  $73,78 \pm 6,63$  % (siehe Abb. 21).



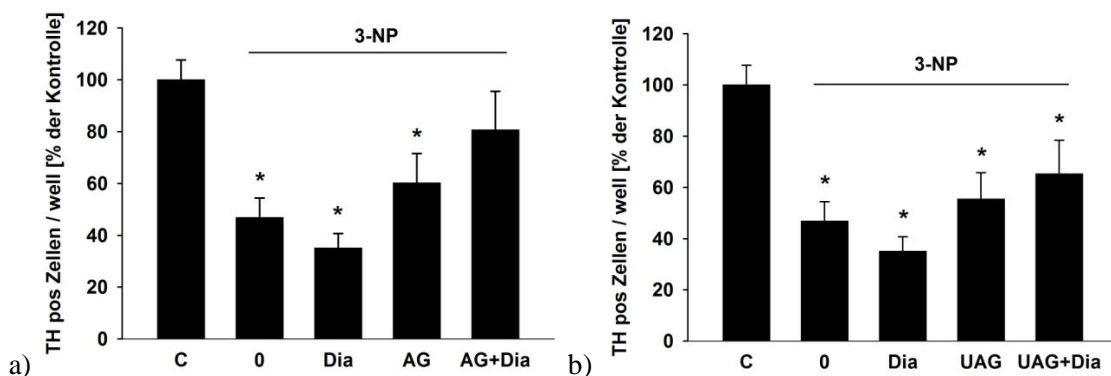
**Abb. 20 Nicardipin verhinderte die Wirkung beider Ghrelinformen auf dopaminerge Neurone.** Die Behandlung mit 3  $\mu$ M Nicardipin verhinderte die statistisch signifikante (\* $p < 0,05$  im Vergleich zur alleinigen 3-NP Behandlung) Neuroprotektion der beiden Ghrelinformen (0,1 nM AG und 1 nM UAG). Nic = Nicardipin, n.s. = nicht signifikant.



**Abb. 21** Nicardipin verringerte bzw. hob die Wirkung der verschiedenen Ghrelinformen auf NeuN-positive Neurone auf. Die neuroprotektive Wirkung von AG und UAG auf NeuN-positive Zellen wurde durch Hinzugabe von 3  $\mu$ M Nicardipin im Fall von 0,1 nM AG verringert (a) bzw. bei 1 nM UAG aufgehoben (b). Nic = Nicardipin, \*p < 0,05 verglichen mit der Kontrollgruppe, #p < 0,05 im paarweisen Vergleich.

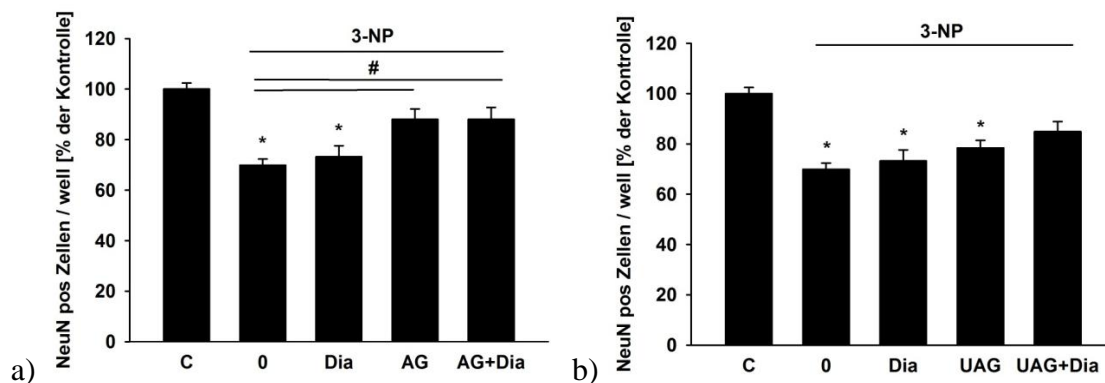
### 3.5 Abhängigkeit der neuroprotektiven Wirkung von $K_{ATP}$ -Kanälen

Des Weiteren stellte sich die Frage, ob die neuroprotektive Wirkung von Ghrelin von  $K_{ATP}$ -Kanälen abhängig war. Dazu wurden diese Kanäle durch Diazoxid geblockt und die Wirkung von Ghrelin untersucht. Die verwendete Konzentration von Diazoxid wurde an Versuche aus der Literatur angelehnt (Toulorge et al. 2010). Die Behandlung mit 12,5  $\mu$ M Diazoxid verhinderte nicht den Zelluntergang durch 3-NP (3-NP:  $46,79 \pm 7,58$  %; 3-NP + Diazoxid:  $35,10 \pm 5,58$  %). Durch die Zugabe von Diazoxid wurde der Effekt von AG und UAG auf die dopaminergen Neurone nicht abgeschwächt (0,1 nM AG:  $60,22 \pm 11,32$  % und AG + Diazoxid:  $80,69 \pm 14,32$  %; 1 nM UAG:  $55,48 \pm 10,30$  %, UAG + Diazoxid:  $65,28 \pm 13,18$  %) (siehe Abb. 22).



**Abb. 22** Wirkung von Diazoxid auf dopaminerge Neurone. Die Behandlung mit 12,5  $\mu$ M Diazoxid verhinderte nicht die protektive Wirkung beider Ghrelinformen auf dopaminerge Neurone bei einer Behandlung mit 3-NP. a) Behandlung mit 0,1 nM AG und Diazoxid. b) Behandlung mit 1 nM UAG und Diazoxid. Dia = Diazoxid, \*p < 0,05 verglichen mit der Kontrollgruppe.

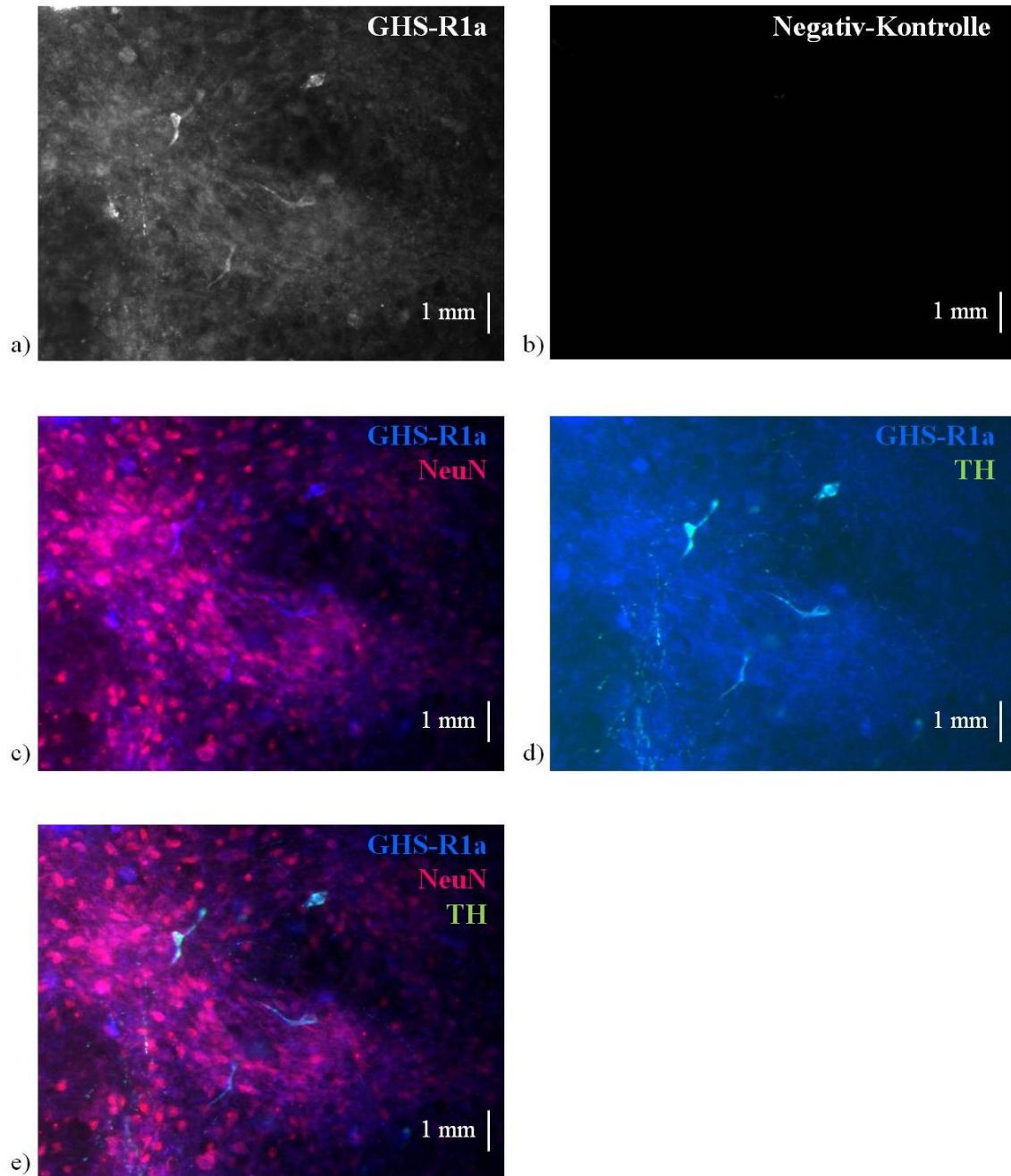
Die Wirkung von Diazoxid wurde auch hinsichtlich der NeuN-positiven Neurone untersucht. Hier zeigte sich analog zu den Ergebnissen an dopaminergen Neuronen keine Veränderung der neuroprotektiven Wirkung beider Ghrelinformen (siehe Abb. 23). Die Behandlung mit Diazoxid veränderte nicht die toxische Wirkung von 3-NP (3-NP: Zellüberleben  $69,84 \pm 2,5$  %; 3-NP und Diazoxid: Zellüberleben  $73,2 \pm 4,37$  %). Bei einer Behandlung von 3-NP, AG und Diazoxid ( $88,06 \pm 4,66$  %) blieb das Zellüberleben unverändert im Vergleich zur Behandlung mit 3-NP und AG ( $88,02 \pm 4,11$  %). Auch die neuroprotektive Wirkung von UAG blieb weitgehend unverändert (3-NP und UAG:  $78,36 \pm 3,04$  %; 3-NP, UAG und Diazoxid:  $84,85 \pm 4,02$  %).



**Abb. 23 Wirkung von Diazoxid auf NeuN-positive Neurone.** Auch die neuroprotektive Wirkung beider Ghrelinformen auf NeuN-positive Zellen wurde durch die Behandlung mit  $12,5 \mu\text{M}$  Diazoxid nicht verhindert. **a)** Behandlung mit 3-NP,  $0,1 \text{ nM}$  AG und Diazoxid. **b)** Behandlung mit 3-NP,  $1 \text{ nM}$  UAG und Diazoxid. Dia = Diazoxid, \* $p < 0,05$  verglichen mit der Kontrollgruppe, # $p < 0,05$  im paarweisen Vergleich.

### 3.6 Expression des Ghrelinrezeptors GHS-R1a

Um den Wirkmechanismus beider Ghrelinformen weiter zu charakterisieren, stellte sich die Frage, ob der Rezeptor GHS-R1a auf den Zellen dieser primären Zellkultur exprimiert wird. Hierzu wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Der Rezeptor ließ sich insbesondere auch auf TH-positiven sowie NeuN-positiven Zellen nachweisen. Eine Färbung ohne primären Antikörper diente als Negativ-Kontrolle (siehe Abb. 24b).



**Abb. 24** Nachweis der GHS-R1a-Expression mittels Immunfluoreszenzfärbung. **a)** Anhand der Färbung mit dem GHS-R1a-Antikörper konnte gezeigt werden, dass der GHS-R1a auf TH-positiven und NeuN-positiven Zellen vorhanden ist. **b)** Negativ-Kontrolle. **c)** GHS-R1a-positiven Zellen in blau und NeuN-positiven Zellen in rot. **d)** GHS-R1a-positiven Zellen in blau und TH-positiven Zellen in grün. **e)** GHS-R1a-positiven Zellen (blau), NeuN-positiven Zellen (rot) und TH-positiven Zellen (grün).

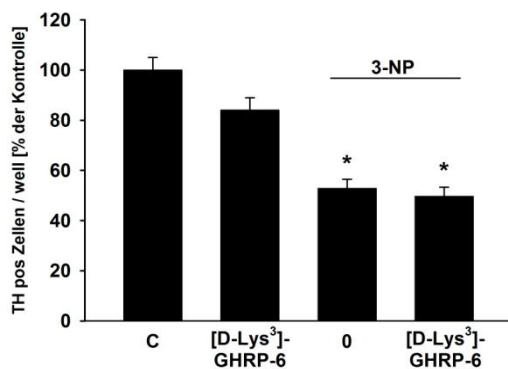


### 3.7 Hemmung der Ghrelinwirkung durch einen Ghrelinrezeptor-Antagonisten

Im Anschluss daran stellte sich die Frage, ob die neuroprotektive Wirkung von Ghrelin durch eine Bindung an den GHS-R1a vermittelt wird. Hierzu wurde der Ghrelinrezeptor-Antagonist [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 im 3-NP-Modell verwendet.

#### 3.7.1 TH-positive Zellen

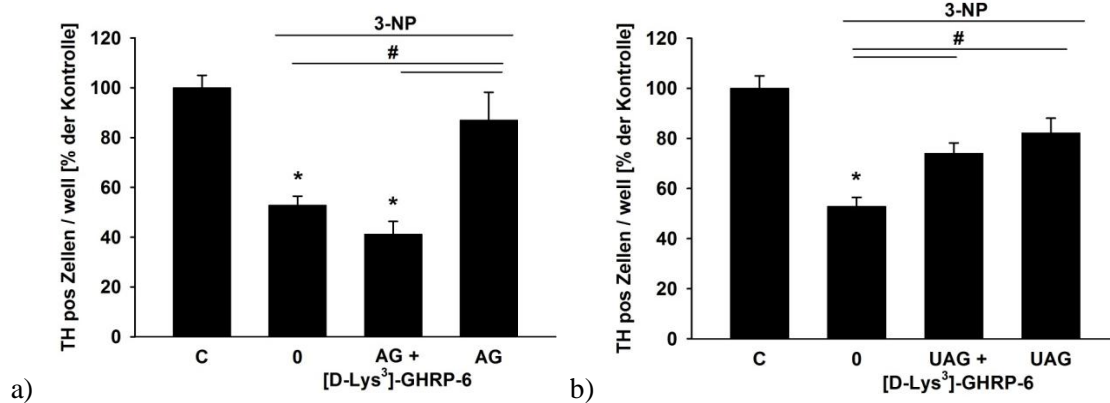
Eine alleinige Behandlung mit [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 führte nicht zu einem signifikanten Zellverlust im Vergleich zur Kontrollgruppe (84,03 ± 4,88 %). Eine Behandlung mit 3-NP und [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 veränderte nicht die neurotoxische Wirkung von 3-NP (3-NP: 52,83 ± 3,61 %; 3-NP + [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6: 49,70 ± 3,61 %; siehe Abb. 25).



**Abb. 25 Wirkung von [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 auf TH-positive Zellen.** [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das Überleben der dopaminergen Neurone. Eine simultane Behandlung mit 3-NP und [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 veränderte nicht die toxische Wirkung von 3-NP. \*p < 0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Wie erwartet verhinderte [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 signifikant (\*p < 0,05) die neuroprotektive Wirkung von AG auf die dopaminergen Zellen (0,1 nM AG + 3-NP: 86,96 ± 11,21 %; AG + 3-NP + [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6: 41,21 ± 5,07 %) gegenüber 3-NP. Im Gegensatz dazu blieb die protektive Wirkung von UAG trotz simultaner Behandlung mit [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 komplett erhalten (1 nM UAG + 3-NP: 82,17 ± 5,91 %; UAG + 3-NP + [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6: 74,02 ± 4,18 %; siehe Abb. 26).

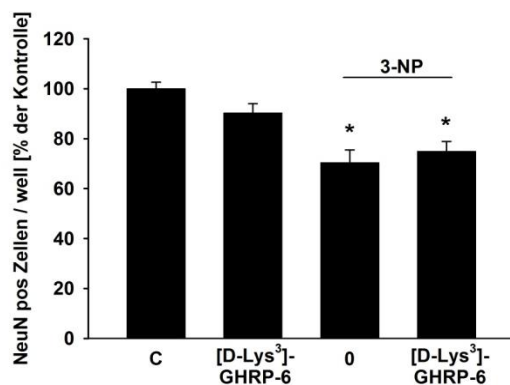




**Abb. 26** Effekt von [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 auf die neuroprotektive Wirkung von AG bzw. UAG auf TH-positive Zellen. **a)** Behandlung mit 0,1 nM AG und [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6. Der GHS-R1a-Antagonist verhinderte die neuroprotektive Wirkung von AG. **b)** [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 verhinderte jedoch nicht die neuroprotektive Wirkung von 1 nM UAG. Das Zellüberleben blieb statistisch signifikant erhöht im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit 3-NP trotz Zugabe des GHS-R1a-Antagonisten. \* $p < 0,05$  verglichen mit der Kontrollgruppe, # $p < 0,05$  im paarweisen Vergleich.

### 3.7.2 NeuN-positive Zellen

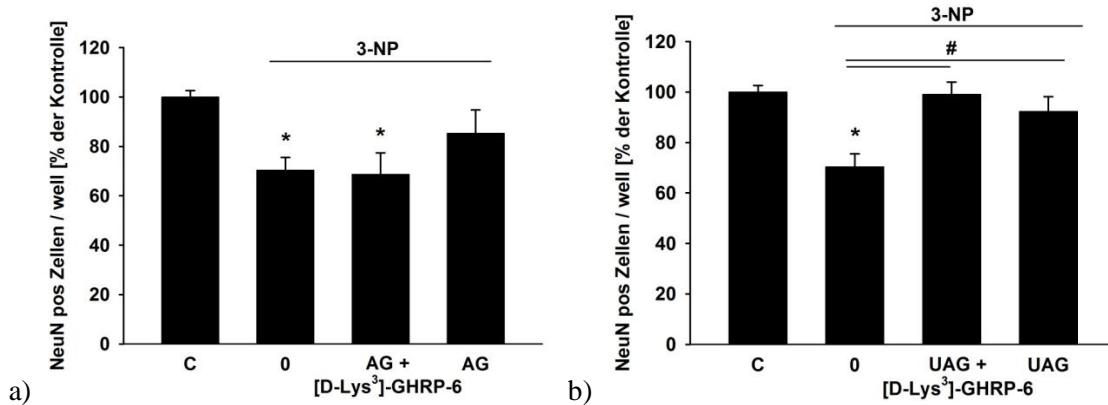
Eine Behandlung mit [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 veränderte nicht das Zellüberleben der NeuN-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe ([D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6:  $90,32 \pm 3,66$  %; Kontrollgruppe:  $100 \pm 2,59$  %). Auch die neurotoxische Wirkung von 3-NP blieb unverändert ([D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 + 3-NP:  $74,92 \pm 3,98$  %; 3-NP:  $70,35 \pm 5,14$  %; siehe Abb. 27).



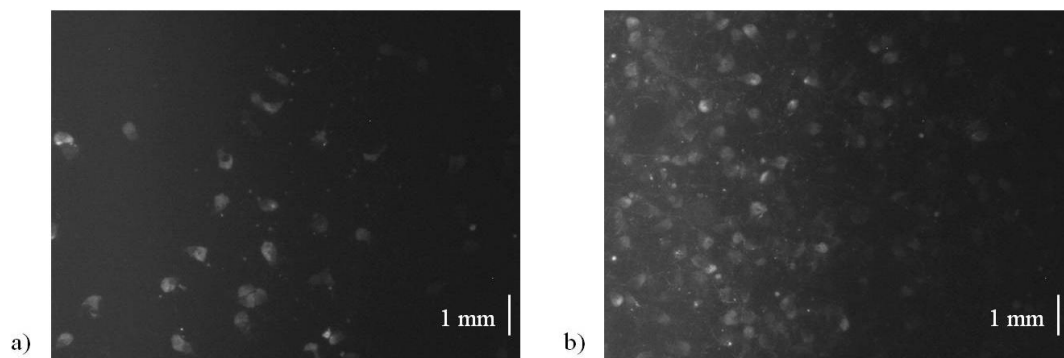
**Abb. 27** Wirkung von [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 auf NeuN-positive Zellen. [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 veränderte weder das Zellüberleben der NeuN-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe, noch die Wirkung von 3-NP. \* $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Analog zur Wirkung auf TH-positive Zellen, verhinderte [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 die neuroprotektive Wirkung von AG, nicht aber von UAG. Die Wirkung von 0,1 nM AG sank von  $85,27 \pm 9,45$  % auf  $68,70 \pm 8,69$  % durch die Zugabe von [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6.

Dagegen wirkte UAG neuroprotektiv trotz Zugabe des GHS-R1a-Antagonisten (1 nM UAG + 3-NP:  $92,30 \pm 5,87 \%$ ; UAG + 3-NP + [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6:  $99,10 \pm 4,85 \%$ ; siehe Abb. 28 und 29).



**Abb. 28** Effekt von [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 auf die neuroprotektive Wirkung von AG bzw. UAG auf NeuN-positive Zellen. **a)** Analog zur Wirkung auf TH-positive Zellen, verhinderte [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 die neuroprotektive Wirkung von AG auf NeuN-positive Zellen. **b)** Die neuroprotektive Wirkung von UAG auf NeuN-positive Zellen wurde durch die Zugabe von [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 nicht verändert. \* $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe, # $p < 0,05$  im paarweisen Vergleich.



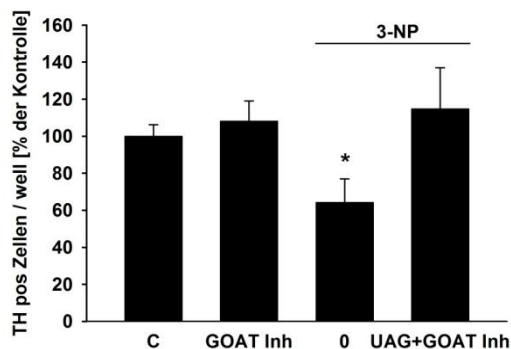
**Abb. 29** NeuN-positive Zellen. **a)** 0,1 nM AG, [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 und 3-NP. Die protektive Wirkung von AG wurde durch [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 verhindert und das Zellüberleben sank beachtlich. **b)** 1 nM UAG, [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 und 3-NP. Die protektive Wirkung von UAG blieb trotz Zugabe von [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 erhalten.

### 3.8 GOAT-Inhibitor

Schließlich stellte sich die Frage, ob die Wirkung von UAG durch eine Umwandlung in AG mit Hilfe des Enzyms GOAT vermittelt wird. Dazu führten wir Versuche mit dem GOAT-Inhibitor GO-Tat-CoA durch und untersuchten die neuroprotektive Wirkung von UAG auf TH- und NeuN-positive Zellen.

### 3.8.1 TH-positive Zellen

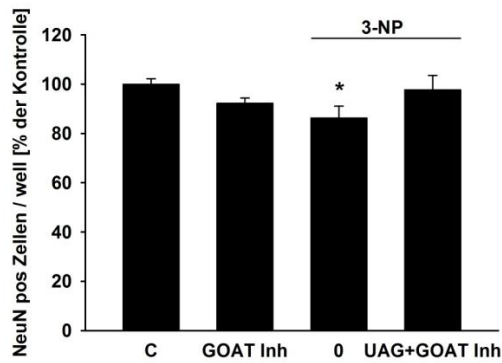
Die alleinige Behandlung mit dem GOAT-Inhibitor veränderte nicht die Zahl der dopaminergen Neurone im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrolle:  $100 \pm 6,19$  %; GOAT-Inhibitor:  $108,20 \pm 10,86$  %). Die Wirkung von 3-NP wurde etwas abgeschwächt, dies war aber nicht signifikant (3-NP:  $64,29 \pm 12,59$  %; GOAT-Inhibitor + 3-NP:  $92,86 \pm 16,79$  %). Das Zellüberleben bei einer simultanen Behandlung mit 1 nM UAG, 3-NP und dem GOAT-Inhibitor veränderte sich nicht im Vergleich zur Behandlung mit 1 nM UAG und 3-NP (UAG + 3-NP + GOAT-Inhibitor:  $114,77 \pm 22,18$  %; UAG + 3-NP:  $107,94 \pm 15,32$  %). Dies wies darauf hin, dass die Wirkung von UAG unabhängig von der GOAT war (siehe Abb. 30).



**Abb. 30** Effekt vom GOAT-Inhibitor GO-Tat-CoA auf die neuroprotektive Wirkung von UAG auf TH-positive Zellen. Die Zugabe des GOAT-Inhibitors GO-Tat-CoA verhinderte nicht die neuroprotektive Wirkung von UAG auf die dopaminergen Neurone bei einer Behandlung mit 3-NP. GOAT Inh. = GOAT-Inhibitor, \* $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe.

### 3.8.2 NeuN-positive Zellen

Auch auf die NeuN-positiven Zellen hatte der GOAT-Inhibitor weder einen neuroprotektiven noch einen neurotoxischen Einfluss (Kontrolle:  $100 \pm 2,17$  %; GOAT-Inhibitor:  $92,27 \pm 2,06$  %). Die Wirkung von 3-NP blieb trotz Zugabe des GOAT-Inhibitors unverändert (3-NP:  $86,35 \pm 4,7$  %; 3-NP und GOAT-Inhibitor:  $84,76 \pm 6,86$  %). Die protektive Wirkung von UAG auf die NeuN-positiven Neurone wurde durch eine Behandlung mit dem GOAT-Inhibitor nicht verändert. Das Zellüberleben nach einer Behandlung mit 3-NP, UAG und GOAT-Inhibitor lag weiterhin bei  $97,77 \pm 5,72$  % (siehe Abb. 31).



**Abb. 31** Effekt vom GOAT-Inhibitor GO-Tat-CoA auf die neuroprotektive Wirkung von UAG auf NeuN-positive Zellen. Die neuroprotektive Wirkung von UAG auf NeuN-positive Zellen wurde nicht durch die Zugabe des GOAT-Inhibitor GO-Tat-CoA verringert. GOAT Inh. = GOAT-Inhibitor, \* $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe.

### 3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

Wie bereits in der Literatur beschrieben, konnte in dieser Arbeit die neuroprotektive Wirkung von acyliertem Ghrelin *in vitro* bestätigt werden. Wir untersuchten die acylierte und die nicht-acylierte Form von Ghrelin. Hier zeigte sich, dass beide Ghrelinformen eine neuroprotektive Wirkung auf dopaminerge Neurone haben, die mit dem neurotoxischen Komplex I-Hemmer  $MPP^+$  behandelt wurden. Für eine vergleichbare Neuroprotektion durch nicht-acyliertes Ghrelin war eine 10-fach erhöhte Konzentration notwendig. Diese Neuroprotektion beider Ghrelinformen ließ sich auch für den Komplex II-Hemmer 3-NP nachweisen, hier auch unabhängig vom neuronalen Phänotyp. Versuche mit L-Typ  $Ca^{2+}$ -, T-Typ  $Ca^{2+}$ - und  $K_{ATP}$ -Kanalinhibitoren zeigten, dass die protektive Wirkung von Ghrelin gegenüber Neurotoxinen von L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanälen abhängig ist, nicht aber von den anderen untersuchten Ionenkanälen. Die Expression des Ghrelinrezeptors GHS-R1a konnte immunhistochemisch nachgewiesen werden. Eine Hemmung dieses Rezeptors mit  $[D-Lys^3]$ -GHRP-6 verhinderte die Wirkung von acyliertem Ghrelin, nicht aber von der nicht-acylierten Form. Abschließend konnte mittels eines GOAT-Inhibitors gezeigt werden, dass die neuroprotektive Wirkung von nicht-acyliertem Ghrelin unabhängig von einer Umwandlung in die acylierte Form war.

## 4 DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde detailliert die Wirkung von acyliertem und nicht-acyliertem Ghrelin auf MPP<sup>+</sup>- bzw. 3-NP-behandelte neuronale Zellen einer Zellkultur aus primären, mesencephalen Neuronen hinsichtlich des neuronalen Phänotyps, der Abhängigkeit von Ionenkanälen, der Bindung an den Ghrelinrezeptor GHS-R1a sowie der Abhängigkeit von der GOAT, untersucht. Besonderes Gewicht wurde dem Studium der dopaminergen Neurone gegeben.

In der Diskussion erfolgt eine kritische Würdigung der Methoden. Es schließt sich eine Diskussion der Zellkulturergebnisse im Kontext der bisherigen in vitro- und in vivo-tierexperimentellen Ergebnisse an. Anschließend werden die Daten im Kontext der Ergebnisse über Ghrelin beim Menschen und insbesondere beim IPS diskutiert.

### 4.1 Diskussion der Methoden

Das Protokoll der Zellkultur ist an das von Douhou et al. beschriebene Protokoll angelehnt (Douhou et al. 2001). Zur Blockade des Astrozytenwachstums diente AraC und zur Verhinderung von unspezifischem oxidativem Stress MK801 (Michel et al. 1997). Aufgrund von Schwierigkeiten mit dem verwendeten N5-Medium wechselten wir zu Neurobasal-Medium und konnten hiermit ein gutes Wachstum der Neurone erreichen (Joseph-Bravo et al. 2002).

Im Umgang mit der primären Zellkultur ist auf ein sauberes und steriles Arbeiten zu achten, um eine Kontamination mit Bakterien, Pilzen oder Viren zu vermeiden. Ein vollständiges Sterilisieren ist nicht immer möglich, da die Entnahme der Embryonen nicht an der sterilen Werkbank durchgeführt werden kann. Deswegen wurde das Infektionsrisiko durch den Einsatz von Penicillin und Streptomycin herabgesetzt.

Da Ghrelin in Glycerin gelöst war, überprüften wir zunächst einen möglichen Einfluss von Glycerin. Glycerin wies jedoch weder eine neuroprotektive noch eine neurotoxische Wirkung auf (siehe 3.2). Analog hierzu untersuchten wir auch die alleinige Behandlung der Zellen mit Flunarizin, Nicardipin, Diazoxid, [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 und GO-CoA-Tat, um einen Einfluss auf das Überleben der Zellen auszuschließen. Die jeweiligen Konzentrationen wurden an in der Literatur bereits beschriebene Konzentrationen

angelehnt (Sheline et al. 2013; Ramsay et al. 1986; Garner und Janda 2011; Traebert et al. 2002; Salthun-Lassalle et al. 2004; Katsuki et al. 2001; Toulorge et al. 2010).

Wichtig zu beachten ist, dass wir die Versuche *in vitro* durchgeführt haben. Experimente *in vitro* besitzen einige Vorteile. So kommt es durch die enge Kontrolle der Wachstumsbedingungen zu einheitlichen Versuchsgruppen und es wird die Variation, die in Tieren normalerweise vorkommt, weitgehend ausgeschaltet. Des Weiteren besteht eine gute Reproduzierbarkeit der Experimente. Da jedoch *in vitro*-Versuche nur ein Modell darstellen, ist die Übertragung auf *in vivo*-Versuche nur bedingt möglich. Außerdem werden systemische Wirkungen und pharmakokinetische Aspekte nicht erfasst. Auch die Blut-Hirn-Schranke kann in Zellmodellversuchen nicht mit untersucht werden.

Außerdem verwendeten wir embryonale Zellen und keine adulten neuronalen Zellen. Der Stoffwechsel ist hier durchaus different und der Alterungsprozess noch nicht eingetreten. Da IPS eine Erkrankung des älteren Menschen ist und neuronale Alterungsprozesse in der Ätiopathogenese durchaus eine Rolle spielen, sind die Ergebnisse nur eingeschränkt übertragbar.

Zusammengefasst eignen sich Zellkulturmodelle, um neuroprotektive Substanzen zu testen und grundlegende intrazelluläre Prozesse aufzudecken. Es kann aber nicht darauf verzichtet werden, positive Ergebnisse im Tiermodell zu bestätigen.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **4.2.1 Wirkung von Ghrelin auf eine Hemmung des Komplexes I durch MPP<sup>+</sup>**

Bislang wurde in der Regel nur an der acylierten Form des Ghrelins (AG) geforscht, da beschrieben ist, dass die nicht-acylierte Form (UAG) nicht an den Ghrelinrezeptor GHS-R1a binden kann (Sato et al. 2012) und diesen dadurch 2300-mal weniger aktiviert (Matsumoto et al. 2001). Für die Bindung an diesen Rezeptor scheinen die ersten vier Aminosäuren inklusive der Acylierung an der dritten Aminosäure Serin die entscheidende Rolle zu spielen (Bednarek et al. 2000).

AG weist konzentrationsabhängig eine neuroprotektive Wirkung auf dopaminerge Neurone der SNpc im MPTP-Mausmodell auf, die durch die Bindung an den Ghrelinrezeptor GHS-R1a vermittelt wird (Jiang et al. 2008). So führt genetisch bedingtes Fehlen von Ghrelin oder von dessen Rezeptor nach Behandlung mit MPTP zu einem gesteigerten Verlust an dopaminergen Zellen in der SNpc und einer geringeren Dopaminkonzentration im Striatum (Andrews et al. 2009). Darüber hinaus inhibiert AG die MPP<sup>+</sup>-induzierte Apoptose, Produktion freier Radikale und NF- $\kappa$ B-Translokation in MES23.5-Zellen (Dong et al. 2009; Liu et al. 2010). Im Einklang mit diesen Studien konnten wir die neuroprotektive Wirkung von AG gegenüber einer Behandlung mit MPP<sup>+</sup> in unserer Zellkultur bestätigen.

Somit stellte sich die interessante Frage, inwieweit auch UAG in dieser primären Zellkultur neuroprotektiv wirken kann. Die Konzentration beider Ghrelinformen wurde in verschiedenen Organen und Geweben der Ratte untersucht und es zeigte sich, dass über 90 % des im Plasma zirkulierenden Ghrelins UAG ist (Hosoda et al. 2000). Somit scheint es naheliegend, dass auch die nicht-acylierte Form durchaus biologische Effekte aufweist. Bereits in anderen Zelltypen konnten protektive Effekte von UAG nachgewiesen werden: In endothelialen Progenitorzellen konnte gezeigt werden, dass UAG, nicht aber AG, den diabetes-induzierten Zellschaden verhindern kann (Togliatto et al. 2010). Auch in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas führte UAG sowie auch AG zu einer erhöhten Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 und verhinderte den Zelluntergang (Granata et al. 2006).

In unserer Zellkultur wirkten beide Ghrelinformen neuroprotektiv. Das acylierte Ghrelin zeigte sein Wirkmaximum bei einer Konzentration von 0,1 nM und die nicht-acylierte Form bei einer Konzentration von einer Zehnerpotenz höher, also 1 nM. Dieser Unterschied der Wirkmaxima zeigte sich auch bei der Stimulation der Insulinfreisetzung in Insulinomzellen von Ratten: hier erwiesen sich 10 nM AG und 100 nM UAG als am wirksamsten (Gauna et al. 2006).

In MES23.5-Zellen lag das Wirkmaximum des acylierten Ghrelins bei 1 nM mit fehlender Wirksamkeit unter 1 pM (Dong et al. 2009). Auch in GH(3)-Zellen zeigte sich eine Dosis-Wirkungskurve der Ghrelinwirkung. Der verminderte Kalziumstrom durch spannungsabhängige Kalziumkanäle konnte bei 10 und 100 nM AG nachgewiesen

werden, jedoch nicht bei einer Konzentration von 1 nM. Analog hierzu resultierte in unseren Versuchen mit verschiedenen Konzentrationen beider Ghrelinformen eine Dosis-Wirkungs-Beziehung mit reduzierter Wirksamkeit bei Konzentrationen unter- und oberhalb des Wirkmaximums von 0,1 nM bei AG und 1 nM bei UAG. Ab einer Konzentration von 10 nM und unter einer Konzentration von 0,01 nM waren beide Formen nicht neuroprotektiv.

#### **4.2.2 Wirkung von Ghrelin auf eine Hemmung des Komplexes II durch 3-NP**

Die bisher beschriebene neuroprotektive Wirkung von AG auf dopaminerge Neurone bezog sich nur auf das MPTP-Toxinmodell. So stellte sich die Frage, ob die Wirkung spezifisch nur auf eine Hemmung des Komplexes I der Atmungskette zurückzuführen ist oder ob Ghrelin auch protektiv gegen weitere Neurotoxine wirken kann.

Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass der protektive Effekt von AG auf dopaminerge Neurone gegen MPP<sup>+</sup> auf einer erhöhten Expression von UCP2 (uncoupling protein 2) beruht (Andrews et al. 2008; Andrews et al. 2009; Bayliss und Andrews 2013). Folge von vermehrtem UCP2 ist die Pufferung der freien Radikale in den Mitochondrien, eine vermehrte Induktion der Atmungskette sowie eine verstärkte mitochondriale Biosynthese, was insgesamt zu einer verbesserten Funktion der dopaminergen Neurone führt (Andrews et al. 2005a; Andrews et al. 2005b). Daher sollte die neuroprotektive Wirkung von Ghrelin nicht auf eine Hemmung des Komplexes I der Atmungskette beschränkt sein. Deswegen untersuchten wir die Wirkung beider Ghrelinformen hinsichtlich einer Behandlung mit 3-NP. 3-NP hemmt den Komplex II der Atmungskette und wirkt dadurch ähnlich wie MPP<sup>+</sup> neurotoxisch. Da die Aufnahme von 3-NP nicht über den Dopamintransporter erfolgt, sind hiervon nicht nur dopaminerge Neurone, sondern auch alle weiteren neuronalen Zelltypen betroffen.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass AG und UAG mit den gleichen vorher beschriebenen Wirkmaxima neuroprotektiv gegenüber einer Behandlung mit 3-NP wirken. Dies zeigte sich sowohl bei den dopaminergen als auch NeuN-positiven Zellen. Dies ist nicht ungewöhnlich, da der Ghrelinrezeptor GHS-R1a auch in anderen Bereichen des Gehirns exprimiert wird, wie z.B. dem Mesencephalon, dem Hippokampus und der Hypophyse



(Kojima et al. 1999; Guan et al. 1997). Dass die Wirkung von AG nicht auf dopaminerge Neurone der SNpc beschränkt ist, wurde bereits gezeigt: AG wirkt antiapoptotisch auf hippocampale Neurone nach einer Behandlung mit Pilocarpin (Zhang et al. 2013). Zusätzlich verhindert AG die MPTP-induzierte Aktivierung der Mikroglia in der SNpc und im Striatum sowie die Expression der proinflammatorischen Moleküle TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (Moon et al. 2009).

### **4.2.3 Abhängigkeit der neuroprotektiven Wirkung von Ghrelin von Ionenkanälen**

Der Zusammenhang zwischen elektrischer Aktivität und dem Überleben dopaminerger Neurone wurde bereits ausführlich untersucht (Michel et al. 2007). Die Hemmung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen führt zu einem vermehrten Verlust dopaminerger Neurone (Michel et al. 2007; Salthun-Lassalle et al. 2004; Douhou et al. 2001). Wir untersuchten die Wirkung von AG und UAG bei einer simultanen Blockade der L- bzw. T-Typ-Kalziumkanäle mit Nicardipin bzw. Flunarizin. In unserer Studie konnten wir zeigen, dass die neuroprotektive Wirkung beider Ghrelinformen abhängig von einer Aktivierung der L-Typ-Kalziumkanäle ist. Eine Blockade dieser Kanäle mit Nicardipin verhinderte den protektiven Effekt von AG und UAG auf alle neuronalen Zellen. Im Gegensatz dazu blieb die Wirkung beider Ghrelinformen bei einer Behandlung mit Flunarizin (T-Typ-Kalziumkanalinhibitor) unbeeinflusst.

Zu unseren Ergebnissen passt, dass bereits gezeigt wurde, dass die Freisetzung des Wachstumshormons (growth hormone, GH) nach Aktivierung des Ghrelinrezeptors GHS-R1a durch AG auf einen Kalziumeinstrom durch L-Typ-Kalziumkanäle beruht. Nifedipin (L-Typ-Kalziumkanalblocker) reduzierte die durch AG induzierte GH-Freisetzung auf 44 % sowie den Ghrelin-induzierten Kalziumeinstrom über den L-Typ-Kalziumkanal (Yamazaki et al. 2004). In Wachstumshormon-, Prolaktin-, Adrenokortikotropin- und Luteinisierendes Hormon-produzierenden Zellen der Hypophyse erhöht AG auch die intrazelluläre Kalziumkonzentration (Yamazaki et al. 2012). Toshinai et al. untersuchten UAG und konnten zeigen, dass es durch UAG zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in Orexin-Neuronen kommt (Toshinai et al. 2006). Goldberg et al. zeigten, dass eine Überaktivierung der L-Typ-Kalziumkanäle zu einem erhöhten mitochondrialen oxidativen Stress und somit zur

neuronalen Zelldysfunktion und zum Zelluntergang führt (Goldberg et al. 2012). Des Weiteren wurde in vitro und in vivo nachgewiesen, dass eine Hemmung der  $Ca_v1.3$ -Kanäle mit Isradipin den MPTP-induzierten Zellverlust halbiert und die Entstehung der motorischen Symptome verhindert. Ähnliche Ergebnisse wurden in Rotenon- und 6-OHDA-Parkinson-Tiermodellen erzielt (Chan et al. 2007). Eine  $Ca_v1.3$ -Kanal-Hemmung reduziert signifikant die Sensitivität der dopaminergen Neurone auf Neurotoxine, die für Parkinson-Tiermodelle verwendet werden. In Neuropeptid-Y-haltigen Neuronen führt AG zu einer Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration. Dieser Mechanismus scheint hauptsächlich über N-Typ-Kalziumkanäle zu funktionieren und nur am Rande durch L-Typ-Kalziumkanäle (Kohno et al. 2003). Im Gegensatz dazu reduzieren 100 nM und 10 nM AG signifikant und reversibel den Kalziumstrom über den cGMP-abhängigen Phosphokinase G-Weg. Beteiligt sind hierbei L-Typ-, T-Typ- sowie non-L- und non-T-Typ-Kalziumkanäle (Han et al. 2011). Dies passt zu Forschungsergebnissen, die zeigen, dass die intrazelluläre Kalziumkonzentration gegensätzliche Effekte haben kann, abhängig davon, ob die Konzentration sich noch im physiologischen Bereich befindet oder nicht (Michel et al. 2007). Durch einen Kalziumeinstrom in die Mitochondrien steigt die ATP-Produktion zunächst an (Gleichmann und Mattson 2011), aber ein massiver Kalziumeinstrom in die Zelle und somit auch in die Mitochondrien führt zum Kollabieren des mitochondrialen elektrochemischen Protonengradienten. Dadurch wird die ATP-Produktion gestört und es kommt zum nekrotischen Zelltod (Celsi et al. 2009).

Klinisch konnte bereits gezeigt werden, dass die chronische Einnahme von zentral wirksamen Dihydropyridinen (L-Typ-Kalziumkanalblocker) zu einer 26-30 %-igen Risikoreduktion führt, ein IPS zu entwickeln. Dies konnte für andere Antihypertensiva, wie ACE-Hemmer oder AT1-Inhibitoren, nicht gezeigt werden (Ritz et al. 2010).

So stehen unsere Ergebnisse im Einklang mit dem aktuellen Forschungsstand: L-Typ-Kalziumkanäle spielen eine wichtige Rolle im Überleben dopaminerge Neurone. Die neuroprotektive Wirkung von AG und UAG auf dopaminerge sowie NeuN-positive Neurone gegenüber einer Behandlung mit 3-NP beruht auf einer Aktivierung dieser Kanäle.

Auch  $K_{ATP}$ -Kanäle scheinen beim Überleben von dopaminergen Neuronen eine Rolle zu spielen: eine Überaktivierung der  $K_{ATP}$ -Kanäle (Liu und Gutterman 2002; Liss et al. 1999; Avshalumov et al. 2005), wodurch es zum Kaliumeinstrom und somit zur Hyperpolarisation der Zelle kommt, führt zum vermehrten Zellverlust dopaminerger Neurone. Zusätzlich erwies sich eine Hemmung des  $K_{ATP}$ -Kanals mit Glibenclamid als neuroprotektiv. So wurde das Überleben der dopaminergen Neurone nach MPTP- und Glibenclamidgabe deutlich verbessert im Vergleich zur alleinigen MPTP-Gabe (Toulorge et al. 2010). Geöffnete  $K_{ATP}$ -Kanäle tragen so zur Vulnerabilität der dopaminergen Neurone in der SNpc bei, weshalb unsere Überlegung war, ob die neuroprotektive Wirkung von Ghrelin über  $K_{ATP}$ -Kanäle vermittelt wird.

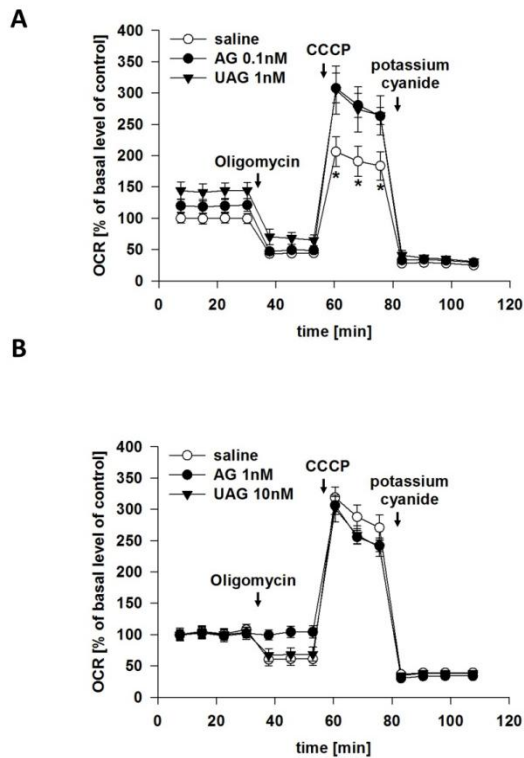
Wir untersuchten die Wirkung beider Ghrelinformen bei einer simultanen Behandlung mit Diazoxid, einem  $K_{ATP}$ -Kanal-Inhibitor. Erstaunlicherweise wurden die protektiven Eigenschaften von AG und UAG auf dopaminerge und NeuN-positive Neurone hierdurch nicht beeinflusst. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit Untersuchungen am mesenterialen Gefäßbett von Ratten, wo AG und UAG einen vasodilatatorischen Effekt ausübten. Die Behandlung mit Glibenclamid beeinflusste diese Vasodilatation nicht (Moazed et al. 2009).

#### 4.2.4 Abhängigkeit der Ghrelinwirkung von der UCP2-Expression

UCP2 ist ein relevantes Protein, das mitverantwortlich für das Zellüberleben sowie die Vulnerabilität gegenüber Neurotoxinen ist (Andrews et al. 2005b). In transgenen Mäusen mit einer Überexpression des UCP2 im Gehirn führte die Erhöhung der UCP2-Konzentration in den dopaminergen Neuronen der SNpc nach einer Behandlung mit MPTP zu deren Neuroprotektion sowie zu einer Aufrechterhaltung der motorischen Funktion (Conti et al. 2005). Außerdem haben Studien gezeigt, dass der neuroprotektive Effekt von acyliertem Ghrelin gegen  $MPP^+$  durch eine Erhöhung von UCP2 vermittelt wird (Andrews et al. 2008; Andrews et al. 2009; Bayliss und Andrews 2013).

Wir konnten bestätigen, dass AG den Sauerstoffverbrauch nach Behandlung mit dem entkoppelnden, mitochondrialen Protein CCCP (Carbonylcyanide 3-chlorophenyl hydrazone) erhöhen kann. Dieser Effekt zeigte sich auch bei einer Behandlung mit UAG. Dies war jedoch beschränkt auf die zuvor ermittelten Konzentrationen der beiden

Ghrelinformen, unter denen eine neuroprotektive Wirkung gezeigt wurde (Wagner et al., submitted).



**Abb. 32 Wirkung von AG und UAG auf den Sauerstoffverbrauch.** Nach der sequenziellen Behandlung mit Oligomycin und CCCP wiesen AG- und UAG-behandelte Neurone einen signifikant erhöhten Sauerstoffverbrauch im Vergleich zu Kontrollzellen auf. Dieser Effekt war beschränkt auf 0,1 nM bei AG und 1 nM bei UAG. \* $p < 0,05$ .

Stevanovic et al. demonstrierten, dass auch UAG einen Einfluss auf UCP2 hat. Im Hypothalamus kam es nach Behandlung mit UAG zu einer signifikanten Reduktion der UCP2-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe sowie auch im Vergleich zur Behandlung mit AG (Stevanovic et al. 2014).

#### 4.2.5 Expression des Ghrelinrezeptors GHS-R1a

Um im weiteren Verlauf zu untersuchen, inwiefern der Ghrelinrezeptor GHS-R1a für die Wirkung von Ghrelin notwendig ist, war ein Nachweis des Rezeptors notwendig. In Mäusen wurde bereits das Vorkommen des GHS-R1a immunhistochemisch in dopaminergen Neuronen und Gliazellen nachgewiesen (Moon et al. 2009). Wir verwendeten primäre Zellkulturen ausgehend von mesencephalen Zellen embryonaler

Ratten. In unseren Zellkulturen konnte die Expression des GHS-R1a immunhistochemisch auf TH- und NeuN-positiven Neuronen nachgewiesen werden.

Der GHS-R1a kann auf Proteinebene zusätzlich mittels Western-Blot nachgewiesen werden. Wir beschränkten uns auf den immunhistochemischen Nachweis, da dieser bereits etabliert und anerkannt ist (Jiang et al. 2008; Moon et al. 2009). Außerdem wurden im Gehirn von Ratten, insbesondere auch im Mesencephalon und in der SNpc, hohe Konzentrationen an GHS-R1a-mRNA nachgewiesen (Zigman et al. 2006).

#### **4.2.6 Hemmung der Ghrelinwirkung durch Ghrelinrezeptor-Antagonisten**

Es wird davon ausgegangen, dass die UCP2-abhängige Wirkung sowie die Neuroprotektion von acyliertem Ghrelin auf einer Aktivierung des Rezeptors GHS-R1a beruhen. Da wir jedoch zeigen konnten, dass beide Ghrelinformen ähnliche Effekte aufweisen, untersuchten wir diesen Mechanismus genauer. Zunächst führten wir eine simultane Behandlung mit dem GHS-R1a-Antagonisten [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 durch. In unseren Versuchen war dadurch die neuroprotektive Wirkung von AG gegenüber TH-positiven sowie NeuN-positiven Neuronen aufgehoben. Der neuroprotektive Effekt durch UAG blieb jedoch auch in Anwesenheit des GHS-R1a-Antagonisten unbeeinflusst.

Dies passt zu den Forschungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Jiang et al. konnten zeigen, dass die Vorbehandlung mit dem GHS-R1a-Antagonisten [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 die neuroprotektive Wirkung von acyliertem Ghrelin im MPTP-Modell verhindert (Jiang et al. 2008). In vitro-Untersuchungen an Zellkulturen aus Sprague-Dawley Ratten (E14) zeigten, dass eine Applikation von [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 vor AG-Gabe dessen neuroprotektive Wirkung verhindert (Moon et al. 2009). Auch im Pankreas hemmt [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 die Ghrelinfunktion. Der GHS-R1a-Antagonist hemmt die inhibitorische Wirkung von AG auf die GLP-1-vermittelte cAMP-Signalisierung und Insulinsekretion (Damdindorj et al. 2012).

Es gibt eine Reihe von Studien, die das Vorhandensein von weiteren Rezeptoren, die die Wirkung von AG und UAG vermitteln, unterstreichen. Die fettbildende Wirkung von UAG und AG im Knochenmark scheint durch einen anderen Rezeptor vermittelt zu werden, da dieser Effekt bei beiden Ghrelinformen beobachtet wird, nicht aber bei

GHS-R1a-Agonisten (Thompson et al. 2004). An H9c2-Kardiomyozyten und Endothelzellen kann AG und UAG den Zelltod verhindern, obwohl in H9c2-Kardiomyozyten kein GHS-R1a exprimiert wird (Baldanzi 2002). Auf das vaskuläre System haben beide Ghrelinformen einen vasodilatatorischen Effekt, bisher nachgewiesen in Ratten und im Menschen (Kleinz et al. 2006; Moazed et al. 2009). Interessanterweise verhindert [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 diesen Effekt von AG oder UAG auf das mesenteriale Gefäßbett von Ratten nicht (Moazed et al. 2009). Des Weiteren wird das Zellwachstum von Mammakarzinomzellen nicht nur durch AG, sondern auch durch UAG und EP-80317 inhibiert, welche beide keine Wirkung über den GHS-R1a ausüben (Cassoni et al. 2001). Auch in DU-145- und PC-3-Prostatakarzinom-Zelllinien hemmen beide Ghrelinformen die DNA-Synthese sowie die Zellproliferation (Cassoni et al. 2004).

Dass vor allem UAG über einen anderen Mechanismus wirkt, konnte auch Toshinai et al. zeigen. Die Nahrungsaufnahme-stimulierende Wirkung kann auch bei GHS-R-Knock-out Mäusen durch UAG vermittelt werden (Toshinai et al. 2006). Analog zu unseren Ergebnissen konnte auch gezeigt werden, dass [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 die AG-Wirkung auf die Insulinfreisetzung hemmt, nicht aber die Wirkung von UAG (Delhanty et al. 2012). Im Gegensatz dazu zeigten Studien, dass [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 die UAG-vermittelte Stimulation der Aufnahme von Fettsäuren hemmt (Miegeue et al. 2011), was sehr ungewöhnlich ist, da UAG aufgrund der fehlenden Acylierung nicht an den GHS-R1a binden kann. In Tabelle 3 sind die Forschungsergebnisse bezüglich der Wirkung vom GHS-R1a-Inhibitor [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 auf durch AG und UAG vermittelte Funktionen zusammengefasst.

**Tabelle 3 Effekt vom GHS-R1a-Inhibitor [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 auf durch AG und UAG vermittelte Funktionen.**

<b>Organ: Funktion des Ghrelins</b>	<b>Effekt auf AG-Wirkung</b>	<b>Effekt auf UAG-Wirkung</b>	<b>Quelle</b>
<i>β-Zellen im Pankreas:</i> Ghrelin hemmt die GLP-1-vermittelte cAMP-Signalisierung und Insulinsekretion	Hemmung	Nicht untersucht	Damdindorj et al. 2012
<i>SNpc:</i> neuroprotektive Wirkung im MPTP-Maus Modell	Hemmung	Nicht untersucht	Jiang et al. 2008
<i>SNpc:</i> neuroprotektive Wirkung gegenüber MPP <sup>+</sup> in primärer mesencephaler Zellkultur aus Rattenembryonen	Hemmung	Nicht untersucht	Moon et al. 2009
<i>Insulinomzellen:</i> Insulinfreisetzung	Hemmung	Keine Hemmung	Gauna et al. 2006
<i>Mesenteriales Gefäßbett:</i> vasodilatatorischer Effekt	Keine Hemmung	Keine Hemmung	Moazed et al. 2009
<i>Hypothalamus:</i> Nahrungsaufnahme-stimulierende Wirkung Untersuchung an GHS-R-Knock-out Mäusen	Hemmung	Keine Hemmung	Toshinai et al. 2006
<i>Adipozyten:</i> UAG stimuliert Aufnahme von Fettsäuren	Nicht untersucht	Hemmung	Miegeueu et al. 2011
<i>Hippokampus:</i> AG hemmt die Pilocarpin-induzierte Apoptose	Hemmung	Nicht untersucht	Zhang et al. 2013
<i>Mesencephalon:</i> neuroprotektive Wirkung gegenüber 3-NP	Hemmung	Keine Hemmung	Vorliegende Arbeit

#### 4.2.7 GOAT-Inhibitor

Nach den vorherigen Ergebnissen lag es nahe, dass die Wirkung von UAG nicht auf eine Umwandlung in die rezeptorbindende, acylierte Form zurückzuführen ist. Mit Hilfe der Ghrelin-O-Acyltransferase (GOAT) wird dem Pro-Ghrelin an der dritten Aminosäure Serin eine Octansäure angehängt und Ghrelin dadurch acyliert (Yang et al. 2008). Wir behandelten die Zellen zeitgleich mit dem GOAT-Inhibitor GO-Tat-CoA und UAG. Trotz dieses Inhibitors wurde die Wirkung von UAG nicht beeinflusst, was zusätzlich unterstreicht, dass UAG über einen anderen Mechanismus, unabhängig vom Rezeptor GHS-R1a wirken muss.

Weitere Versuche, die die Wirkung von UAG im Zusammenhang mit diesem GOAT-Inhibitor untersuchen, liegen nicht vor. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die systemische Applikation von GO-Tat-CoA zur Reduktion der AG-Konzentration, nicht aber der UAG-Konzentration im Serum führt (Teubner et al. 2013; Garner und Janda 2011). Außerdem verhinderte dieser Inhibitor die AG-vermittelte Gewichtszunahme (Teubner et al. 2013).

Zu der Vermutung, dass UAG über einen anderen Mechanismus als AG wirkt, passt, dass UAG teilweise eine entgegengesetzte Wirkung im Vergleich zu AG hat. UAG kann also synergistisch zu AG, antagonistisch zu AG oder unabhängig von AG wirken. Bei simultaner Gabe von UAG und AG kann UAG auch als funktioneller AG-Antagonist wirken. So führt AG alleine zu einer Erhöhung der Insulinsensitivität, AG gemeinsam mit UAG jedoch zu einer Senkung der Insulinsensitivität (Delhanty et al. 2012). Im Hypothalamus und im Hirnstamm erhöht UAG unabhängig von AG die neuronale elektrische Aktivität und zusätzlich kann UAG im Hypothalamus (Nuclei solitarius und paraventricularis) die durch AG induzierte neuronale Aktivität unterdrücken (Stevanovic et al. 2014). Somit wird klar, dass die nicht-acylierte Form durchaus biologische Aktivität hat, die aber über einen anderen Mechanismus als bei der acylierten Form vermittelt wird und dadurch auch unterschiedliche Wirkungen haben kann.

### **4.3 Ausblick**

In Studien konnte bereits die neuroprotektive Wirkung von Ghrelin auf dopaminerge Neurone gezeigt werden (Jiang et al. 2008; Andrews et al. 2009). Daraufhin wurde Ghrelin im Zusammenhang mit dem IPS untersucht: Patienten mit IPS haben geringere Ghrelinkonzentrationen im Blut und eine statistisch signifikante gestörte Regulation der Ghrelinkonzentration im Serum in der postprandialen Phase im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten (Unger et al. 2011). Auch bei Patienten mit Adipositas ist Ghrelin im Blut geringer konzentriert im Vergleich zu gesunden Patienten (Scerif et al. 2011) und Adipositas ist ein nachgewiesener Risikofaktor für die Entstehung eines IPS (Hu et al. 2006; Abbott et al. 2002). Braak et al. beschrieben, dass es bei der Entstehung der Erkrankung zuerst zu einem Untergang des dorsalen Vaguskerne kommt (Braak et al. 2003). Der dorsale Vaguskerne innerviert den Magen und Ghrelin wird hauptsächlich



von Belegzellen des Magens produziert. Nach Vagotomie fehlt die stimulierende Wirkung von Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme und die Freisetzung des Wachstumshormons. Somit scheint der dorsale Vagus Kern die ausschlaggebende Afferenz für die Freisetzung von Ghrelin im Magen zu sein (Date et al. 2002). Postuliert werden kann, dass es durch den Untergang des dorsalen Vagus Kerns zu Beginn der Erkrankung zu einer verminderten Innervation des Magens kommt, was zu geringeren Ghrelinkonzentrationen im Serum führt. Damit fehlte den dopaminergen Neuronen eine ausreichende neuroprotektive Wirkung von Ghrelin, was das weitere Fortschreiten der Erkrankung nach sich ziehen könnte. Außerdem zeigten Patienten mit IPS eine verminderte gastrale Motilität (Unger et al. 2010b), was zum einen durch die fehlende vagale Stimulation, zum anderen durch die verminderte Ghrelinkonzentration erklärt werden kann, da Ghrelin eine prokinetische Wirkung auf den Gastrointestinaltrakt hat (Ejskjaer et al. 2009).

Wir konnten in unseren Experimenten nachweisen, dass acyliertes sowie nicht-acyliertes Ghrelin neuroprotektiv in Gegenwart von MPP<sup>+</sup> oder 3-NP wirken. Dies betrifft dopaminerge sowie NeuN-positive Neurone und wird bei UAG nicht durch den Ghrelinrezeptor GHS-R1a oder durch Umwandlung in die acylierte Form vermittelt. Offensichtlich sind verschiedene Mechanismen für die Wirkung von AG bzw. UAG verantwortlich, beide benötigen jedoch die Aktivierung von L-Typ-Kalziumkanälen.

Eine Studie hat bereits gezeigt, dass Ghrelin auch nach der MPTP-Gabe wirksam sein kann (Moon et al. 2009). Interessant wäre es zu untersuchen, ob Ghrelin in unserem Zellkulturmodell auch nach einer Behandlung mit MPP<sup>+</sup> bzw. 3-NP noch neuroprotektiv wirkt. Hier ist die zu Grunde liegende Frage, ob Ghrelin auch im Verlauf der Erkrankung als protektive Substanz eingesetzt werden könnte.

Im Verlauf sind noch weitere Versuche notwendig, um die potentielle Rolle von Ghrelin in der Pathogenese des IPS zu beleuchten. So stellt sich letztendlich die Frage, ob verminderte Ghrelinkonzentrationen im Plasma oder im Liquor zu einem schnelleren Fortschreiten der Erkrankung durch den Untergang dopaminergener Neurone in der SNpc beitragen.

## ANHANG

### Abkürzungsverzeichnis

3-NP	3-Nitropropionsäure
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenokortikotropin
AD	Autosomal dominant
AG	Acyliertes Ghrelin
ANOVA	Analysis of variance; Varianzanalyse
AR	Autosomal rezessiv
AraC	2 cytarabine
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BMI	Body Mass Index
CBD	kortikobasale Degeneration
CCCP	Carbonylcyanide 3-chlorophenyl hydrazone
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
COX	Cyclooxygenase
CSPG	Chondroitinsulfat Proteoglykan
Cy3	Cyanin 3
DAT	Dopamintransporter
DIV	Days in vitro
DLB	Demenz vom Lewy-Körper-Typ
DMSO	Dimethylsulfoxid
FBS	Fetal bovine Serum
FST	Fine Science Tools
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GFAP	Saures Gliafaseprotein = glial fibrillary acidic protein
GH	Growth hormone, Wachstumshormon
GHS-R1a	Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a

GOAT	Ghrelin-O-Acyltransferase
GPe	Globus pallidus pars externa
GPi	Globus pallidus pars interna
GSH	Glutathion
HCN	hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
IPS	Idiopathisches Parkinson-Syndrom
LPS	Lipopolysaccharid
MAO-B	Monoaminoxidase B
MK 801	(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate
MPDP <sup>+</sup>	1-Methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridine
MPP <sup>+</sup>	1-methyl-4-phenylpyridinium
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine
mRNA	Messenger RNA
MSA	Multisystematrophie
mtDNA	Mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
NeuN	Neuronal Neuclei
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMS	Nicht-motorische Symptome
NSAID	Nicht-steroidale Antiphlogistika
NST	Nucleus subthalamicus
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1 X
PD	Parkinson's disease
PEI	Poly(ethyleneimine)solution
PS	Parkinson Syndrom
PSP	progressive supranukleäre Blickparese
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
S.E.M.	Standard error of the mean
SNpc	Substantia nigra pars compacta
SNpr	Substantia nigra pars reticulata
SUR1	Sulfonylharnstoffrezeptor 1
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor

TH	Tyrosinhydroxylase
TNF	Tumornekrosefaktor
UAG	Unacylated Ghrelin (des-acyl Ghrelin)
UCP2	Uncoupling protein 2
UPS	Ubiquitin-Proteasomsystem
VTA	Ventrales Tegmentum
ZNS	Zentrales Nervensystem

# Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

## Abbildungen

<b>Abb. 1</b>	Die Entstehung von Acyl-Ghrelin aus Desacyl-Ghrelin mit Hilfe der GOAT.....	5
<b>Abb. 2</b>	Motorische Basalganglienschleife.....	12
<b>Abb. 3</b>	Braak Stadien.....	13
<b>Abb. 4</b>	Übersicht über die wesentlichen Pathomechanismen, die zum neuronalen Zelluntergang bei IPS führen. ....	13
<b>Abb. 5</b>	Reaktion von MPTP zu MPP <sup>+</sup> mit Hilfe der Monoaminoxidase B (MAO-B). ....	21
<b>Abb. 6</b>	Strukturformel von 3-NP. ....	22
<b>Abb. 7</b>	Zusammenhang zwischen elektrischer Aktivität dopaminerger Neurone und deren Zelluntergang.....	23
<b>Abb. 8</b>	Dissektion des Mesencephalons.....	33
<b>Abb. 9</b>	Auszählen der Zellen. ....	37
<b>Abb. 10</b>	Neuroprotektive Wirkung von AG und UAG gegenüber MPP <sup>+</sup> .....	39
<b>Abb. 11</b>	Dosis-Wirkungs-Beziehung von AG bzw. UAG.....	39
<b>Abb. 12</b>	TH-positive Zellen. ....	40
<b>Abb. 13</b>	Einfluss von Glycerin auf dopaminerge Neurone. ....	41
<b>Abb. 14</b>	Glycerin besitzt keine neuroprotektiven Eigenschaften gegenüber MPP <sup>+</sup> .....	41
<b>Abb. 15</b>	Neuroprotektive Wirkung auf dopaminerge Neurone von AG und UAG gegenüber 3-NP.....	42
<b>Abb. 16</b>	Neuroprotektive Wirkung auf NeuN-positive Neurone von AG und UAG gegenüber 3-NP. ....	43
<b>Abb. 17</b>	NeuN-positive Zellen.....	43
<b>Abb. 18</b>	Wirkung von Flunarizin auf dopaminerge Neurone.....	45
<b>Abb. 19</b>	Wirkung von Flunarizin auf NeuN-positive Neurone. ....	45
<b>Abb. 20</b>	Nicardipin verhinderte die Wirkung beider Ghrelinformen auf dopaminerge Neurone. ....	46

<b>Abb. 21</b>	Nicardipin verringerte bzw. hob die Wirkung der verschiedenen Ghrelinformen auf NeuN-positive Neurone auf. ....	47
<b>Abb. 22</b>	Wirkung von Diazoxid auf dopaminerge Neurone.....	47
<b>Abb. 23</b>	Wirkung von Diazoxid auf NeuN-positive Neurone .....	48
<b>Abb. 24</b>	Nachweis der GHS-R1a-Expression mittels Immunfluoreszenzfärbung.....	49
<b>Abb. 25</b>	Wirkung von [D-Lys <sup>3</sup> ]-GHRP-6 auf TH-positive Zellen. ....	50
<b>Abb. 26</b>	Effekt von [D-Lys <sup>3</sup> ]-GHRP-6 auf die neuroprotektive Wirkung von AG bzw. UAG auf TH-positive Zellen. ....	51
<b>Abb. 27</b>	Wirkung von [D-Lys <sup>3</sup> ]-GHRP-6 auf NeuN-positive Zellen. ....	51
<b>Abb. 28</b>	Effekt von [D-Lys <sup>3</sup> ]-GHRP-6 auf die neuroprotektive Wirkung von AG bzw. UAG auf NeuN-positive Zellen. ....	52
<b>Abb. 29</b>	NeuN-positive Zellen.....	52
<b>Abb. 30</b>	Effekt vom GOAT-Inhibitor GO-Tat-CoA auf die neuroprotektive Wirkung von UAG auf TH-positive Zellen. ....	53
<b>Abb. 31</b>	Effekt vom GOAT-Inhibitor GO-Tat-CoA auf die neuroprotektive Wirkung von UAG auf NeuN-positive Zellen. ....	54
<b>Abb. 32</b>	Wirkung von AG und UAG auf den Sauerstoffverbrauch.....	62
 <b>Tabellen</b>		
<b>Tabelle 1</b>	Genetische Parkinsonsyndrome. ....	15
<b>Tabelle 2</b>	Kultivierung und Behandlung der Zellen. ....	34
<b>Tabelle 3</b>	Effekt vom GHS-R1a-Inhibitor [D-Lys <sup>3</sup> ]-GHRP-6 auf durch AG und UAG vermittelte Funktionen. ....	65

## Literaturverzeichnis

Abbott, R. D.; Ross, G. W.; White, L. R.; Nelson, J. S.; Masaki, K. H.; Tanner, C. M. et al. (2002): Midlife adiposity and the future risk of Parkinson's disease. In: *Neurology* 59 (7), S. 1051–1057.

Ahlskog (2000): Diagnosis and differential diagnosis of Parkinson's disease and parkinsonism. In: *Parkinsonism Relat Disord* 7 (1), S. 63–70.

Alberio, Tiziana; Lopiano, Leonardo; Fasano, Mauro (2012): Cellular models to investigate biochemical pathways in Parkinson's disease. In: *FEBS J* 279 (7), S. 1146–1155.

Alston, T. A.; Mela, L.; Bright, H. J. (1977): 3-Nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (9), S. 3767–3771.

Alvarez-Fischer, Daniel; Guerreiro, Serge; Hunot, Stephane; Saurini, Françoise; Marien, Marc; Sokoloff, Pierre et al. (2008): Modelling Parkinson-like neurodegeneration via osmotic minipump delivery of MPTP and probenecid. In: *J Neurochem* 107 (3), S. 701–711.

Andersen, Julie K. (2004): Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? In: *Nat Med* 10, S. S18-25.

Andreassen, O. A.; Ferrante, R. J.; Dedeoglu, A.; Albers, D. W.; Klivenyi, P.; Carlson, E. J. et al. (2001): Mice with a partial deficiency of manganese superoxide dismutase show increased vulnerability to the mitochondrial toxins malonate, 3-nitropropionic acid, and MPTP. In: *Exp Neurol* 167 (1), S. 189–195.

Andrews, Z. B.; Erion, D.; Beiler, R.; Liu, Z.-W; Abizaid, A.; Zigman, J. et al. (2009): Ghrelin Promotes and Protects Nigrostriatal Dopamine Function via a UCP2-Dependent Mitochondrial Mechanism. In: *Journal of Neuroscience* 29 (45), S. 14057–14065.

Andrews, Zane B.; Diano, Sabrina; Horvath, Tamas L. (2005a): Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: in support of function and survival. In: *Nat Rev Neurosci* 6 (11), S. 829–840.

Andrews, Zane B.; Horvath, Balazs; Barnstable, Colin J.; Elsworth, John; Yang, Lichuan; Beal, M. Flynt et al. (2005b): Uncoupling protein-2 is critical for nigral dopamine cell survival in a mouse model of Parkinson's disease. In: *J Neurosci* 25 (1), S. 184–191.

Andrews, Zane B.; Liu, Zhong-Wu; Wallingford, Nicholas; Erion, Derek M.; Borok, Erzsebet; Friedman, Jeffery M. et al. (2008): UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. In: *Nature* 454 (7206), S. 846–851.

Avshalumov, Marat V.; Chen, Billy T.; Koos, Tibor; Tepper, James M.; Rice, Margaret E. (2005): Endogenous hydrogen peroxide regulates the excitability of midbrain dopamine neurons via ATP-sensitive potassium channels. In: *J Neurosci* 25 (17), S. 4222–4231.

Bacon, K. B.; Westwick, J.; Camp, R. D. (1989): Potent and specific inhibition of IL-8-, IL-1 alpha- and IL-1 beta-induced in vitro human lymphocyte migration by calcium channel antagonists. In: *Biochem Biophys Res Commun* 165 (1), S. 349–354.

- Baldanzi, G. (2002): Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. In: *The Journal of Cell Biology* 159 (6), S. 1029–1037.
- Bao, Li; Avshalumov, Marat V.; Rice, Margaret E. (2005): Partial mitochondrial inhibition causes striatal dopamine release suppression and medium spiny neuron depolarization via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elevation, not ATP depletion. In: *J Neurosci* 25 (43), S. 10029–10040.
- Barone, Paolo; Antonini, Angelo; Colosimo, Carlo; Marconi, Roberto; Morgante, Letterio; Avarello, Tania P. et al. (2009): The PRIAMO study: A multicenter assessment of nonmotor symptoms and their impact on quality of life in Parkinson's disease. In: *Mov Disord* 24 (11), S. 1641–1649.
- Bayliss, Jacqueline A.; Andrews, Zane B. (2013): Ghrelin is neuroprotective in Parkinson's disease: molecular mechanisms of metabolic neuroprotection. In: *Ther Adv Endocrinol Metab* 4 (1), S. 25–36.
- Becker, Claudia; Jick, Susan S.; Meier, Christoph R. (2008): Use of antihypertensives and the risk of Parkinson disease. In: *Neurology* 70 (16 Pt 2), S. 1438–1444.
- Bednarek, M. A.; Feighner, S. D.; Pong, S. S.; McKee, K. K.; Hreniuk, D. L.; Silva, M. V. et al. (2000): Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. In: *J Med Chem* 43 (23), S. 4370–4376.
- Berger, Alison K.; Cortese, Giuseppe P.; Amodeo, Katherine D.; Weihofen, Andreas; Letai, Anthony; LaVoie, Matthew J. (2009): Parkin selectively alters the intrinsic threshold for mitochondrial cytochrome c release. In: *Hum Mol Genet* 18 (22), S. 4317–4328.
- Berridge, M. J. (1998): Neuronal calcium signaling. In: *Neuron* 21 (1), S. 13–26.
- Bezard, E.; Gross, C. E.; Fournier, M. C.; Dovero, S.; Bloch, B.; Jaber, M. (1999): Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter. In: *Exp Neurol* 155 (2), S. 268–273.
- Blandini, Fabio; Armentero, Marie-Therese (2012): Animal models of Parkinson's disease. In: *FEBS J* 279 (7), S. 1156–1166.
- Braak, Heiko; Del Tredici, Kelly; Rub, Udo; Vos, Rob A. I. de; Jansen Steur, Ernst N. H.; Braak, Eva (2003): Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. In: *Neurobiol Aging* 24 (2), S. 197–211.
- Braak, Heiko; Ghebremedhin, Estifanos; Rub, Udo; Bratzke, Hansjurgen; Del Tredici, Kelly (2004): Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. In: *Cell Tissue Res* 318 (1), S. 121–134.
- Broglio, F.; Arvat, E.; Benso, A.; Gottero, C.; Muccioli, G.; Papotti, M. et al. (2001): Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. In: *J Clin Endocrinol Metab* 86 (10), S. 5083–5086.
- Broglio, Fabio; Gottero, Cristina; Arvat, Emanuela; Ghigo, Ezio (2003): Endocrine and non-endocrine actions of ghrelin. In: *Horm Res* 59 (3), S. 109–117.



- Brouillet, E.; Guyot, M. C.; Mittoux, V.; Altairac, S.; Conde, F.; Palfi, S.; Hantraye, P. (1998): Partial inhibition of brain succinate dehydrogenase by 3-nitropropionic acid is sufficient to initiate striatal degeneration in rat. In: *J Neurochem* 70 (2), S. 794–805.
- Bueler, Hansruedi (2010): Mitochondrial dynamics, cell death and the pathogenesis of Parkinson's disease. In: *Apoptosis* 15 (11), S. 1336–1353.
- Cassoni, P.; Papotti, M.; Ghe, C.; Catapano, F.; Sapino, A.; Graziani, A. et al. (2001): Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. In: *J Clin Endocrinol Metab* 86 (4), S. 1738–1745.
- Cassoni, Paola; Ghe, Corrado; Marrocco, Tiziana; Tarabra, Elena; Allia, Elena; Catapano, Filomena et al. (2004): Expression of ghrelin and biological activity of specific receptors for ghrelin and des-acyl ghrelin in human prostate neoplasms and related cell lines. In: *Eur J Endocrinol* 150 (2), S. 173–184.
- Celsi, Fulvio; Pizzo, Paola; Brini, Marisa; Leo, Sara; Fotino, Carmen; Pinton, Paolo; Rizzuto, Rosario (2009): Mitochondria, calcium and cell death: A deadly triad in neurodegeneration. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1787 (5), S. 335–344.
- Chan, C. Savio; Gertler, Tracy S.; Surmeier, D. James (2009): Calcium homeostasis, selective vulnerability and Parkinson's disease. In: *Trends Neurosci* 32 (5), S. 249–256.
- Chan, C. Savio; Guzman, Jaime N.; Ilijic, Ema; Mercer, Jeff N.; Rick, Caroline; Tkatch, Tatiana et al. (2007): 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. In: *Nature* 447 (7148), S. 1081–1086.
- Chan, P.; DeLanney, L. E.; Irwin, I.; Langston, J. W.; Di Monte, D. (1991): Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain. In: *J Neurochem* 57 (1), S. 348–351.
- Chen, H.; Zhang, S. M.; Schwarzschild, M. A.; Hernan, M. A.; Ascherio, A. (2005a): Physical activity and the risk of Parkinson disease. In: *Neurology* 64 (4), S. 664–669.
- Chen, Honglei; Jacobs, Eric; Schwarzschild, Michael A.; McCullough, Marjorie L.; Calle, Eugenia E.; Thun, Michael J.; Ascherio, Alberto (2005b): Nonsteroidal antiinflammatory drug use and the risk for Parkinson's disease. In: *Ann Neurol* 58 (6), S. 963–967.
- Chen, Honglei; Zhang, Shumin M.; Hernan, Miguel A.; Schwarzschild, Michael A.; Willett, Walter C.; Colditz, Graham A. et al. (2003): Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. In: *Arch Neurol* 60 (8), S. 1059–1064.
- Chiba, K.; Peterson, L. A.; Castagnoli, K. P.; Trevor, A. J.; Castagnoli, N., JR (1985): Studies on the molecular mechanism of bioactivation of the selective nigrostriatal toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. In: *Drug Metab Dispos* 13 (3), S. 342–347.
- Chiba, K.; Trevor, A.; Castagnoli, N., JR (1984): Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. In: *Biochem Biophys Res Commun* 120 (2), S. 574–578.

- Chiueh, C. C.; Miyake, H.; Peng, M. T. (1993): Role of dopamine autoxidation, hydroxyl radical generation, and calcium overload in underlying mechanisms involved in MPTP-induced parkinsonism. In: *Adv Neurol* 60, S. 251–258.
- Choi-Lundberg, D. L.; Lin, Q.; Chang, Y. N.; Chiang, Y. L.; Hay, C. M.; Mohajeri, H. et al. (1997): Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy. In: *Science* 275 (5301), S. 838–841.
- Chu, Yaping; Kordower, Jeffrey H. (2007): Age-associated increases of alpha-synuclein in monkeys and humans are associated with nigrostriatal dopamine depletion: Is this the target for Parkinson's disease? In: *Neurobiol Dis* 25 (1), S. 134–149.
- Conti, Bruno; Sugama, Shuei; Lucero, Jacinta; Winsky-Sommerer, Raphaelle; Wirz, Sebastian A.; Maher, Pamela et al. (2005): Uncoupling protein 2 protects dopaminergic neurons from acute 1,2,3,6-methyl-phenyl-tetrahydropyridine toxicity. In: *J Neurochem* 93 (2), S. 493–501.
- Cuervo, Ana Maria; Bergamini, Ettore; Brunk, Ulf T.; Droge, Wulf; Ffrench, Martine; Terman, Alexei (2005): Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells. In: *Autophagy* 1 (3), S. 131–140.
- Cummings, D. E.; Purnell, J. Q.; Frayo, R. S.; Schmidova, K.; Wisse, B. E.; Weigle, D. S. (2001): A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. In: *Diabetes* 50 (8), S. 1714–1719.
- Damdindorj, Boldbaatar; Dezaki, Katsuya; Kurashina, Tomoyuki; Sone, Hideyuki; Rita, Rauza; Kakei, Masafumi; Yada, Toshihiko (2012): Exogenous and endogenous ghrelin counteracts GLP-1 action to stimulate cAMP signaling and insulin secretion in islet beta-cells. In: *FEBS Lett* 586 (16), S. 2555–2562.
- Date, Yukari; Murakami, Noboru; Toshinai, Koji; Matsukura, Shigeru; Nijjima, Akira; Matsuo, Hisayuki et al. (2002): The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. In: *Gastroenterology* 123 (4), S. 1120–1128.
- Dauer, William; Przedborski, Serge (2003): Parkinson's disease: mechanisms and models. In: *Neuron* 39 (6), S. 889–909.
- Davey, G. P.; Tipton, K. F.; Murphy, M. P. (1992): Uptake and accumulation of 1-methyl-4-phenylpyridinium by rat liver mitochondria measured using an ion-selective electrode. In: *Biochem J* 288 (Pt 2), S. 439–443.
- Delhanty, Patric J. D.; Neggens, Sebastian J.; van der Lely, Aart J. (2012): Mechanisms in endocrinology: Ghrelin: the differences between acyl- and des-acyl ghrelin. In: *Eur J Endocrinol* 167 (5), S. 601–608.
- Dexter, D. T.; Carayon, A.; Javoy-Agid, F.; Agid, Y.; Wells, F. R.; Daniel, S. E. et al. (1991): Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. In: *Brain* 114 (Pt 4), S. 1953–1975.
- Dong, Juanjuan; Song, Ning; Xie, Junxia; Jiang, Hong (2009): Ghrelin antagonized 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP(+))-induced apoptosis in MES23.5 cells. In: *J Mol Neurosci* 37 (2), S. 182–189.

- Douhou, A.; Troadec, J. D.; Ruberg, M.; Raisman-Vozari, R.; Michel, P. P. (2001): Survival promotion of mesencephalic dopaminergic neurons by depolarizing concentrations of K<sup>+</sup> requires concurrent inactivation of NMDA or AMPA/kainate receptors. In: *J Neurochem* 78 (1), S. 163–174.
- Ejskjaer, N.; Vestergaard, E. T.; Hellstrom, P. M.; Gormsen, L. C.; Madsbad, S.; Madsen, J. L. et al. (2009): Ghrelin receptor agonist (TZP-101) accelerates gastric emptying in adults with diabetes and symptomatic gastroparesis. In: *Aliment Pharmacol Ther* 29 (11), S. 1179–1187.
- Fernagut, Pierre-O; Diguet, Elsa; Jaber, Mohamed; Bioulac, Bernard; Tison, Francois (2002): Dopamine transporter knock-out mice are hypersensitive to 3-nitropropionic acid-induced striatal damage. In: *Eur J Neurosci* 15 (12), S. 2053–2056.
- Findley, L. J.; Gresty, M. A.; Halmagyi, G. M. (1981): Tremor, the cogwheel phenomenon and clonus in Parkinson's disease. In: *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 44 (6), S. 534–546.
- Forno, L. S.; Langston, J. W.; DeLanney, L. E.; Irwin, I.; Ricaurte, G. A. (1986): Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys. In: *Ann Neurol* 20 (4), S. 449–455.
- Fortin, Doris L.; Nemani, Venu M.; Voglmaier, Susan M.; Anthony, Malcolm D.; Ryan, Timothy A.; Edwards, Robert H. (2005): Neural activity controls the synaptic accumulation of alpha-synuclein. In: *J Neurosci* 25 (47), S. 10913–10921.
- Garner, Amanda L.; Janda, Kim D. (2011): Shedding light on the ghrelin/GOAT metabolism saga. In: *Chembiochem* 12 (4), S. 523–525.
- Gauna, Carlotta; Delhanty, Patric J. D.; van Aken, Maarten O.; Janssen, Joop A. M. J. L.; Themmen, Axel P. N.; Hofland, Leo J. et al. (2006): Unacylated ghrelin is active on the INS-1E rat insulinoma cell line independently of the growth hormone secretagogue receptor type 1a and the corticotropin releasing factor 2 receptor. In: *Mol Cell Endocrinol* 251 (1-2), S. 103–111.
- Georg Thieme Verlag Stuttgart (Hg.) (2012): Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. 5. überarbeitete Auflage. Stuttgart, New York, NY: Thieme.
- Ghe, Corrado; Cassoni, Paola; Catapano, Filomena; Marrocco, Tiziana; Deghenghi, Romano; Ghigo, Ezio et al. (2002): The antiproliferative effect of synthetic peptidyl GH secretagogues in human CALU-1 lung carcinoma cells. In: *Endocrinology* 143 (2), S. 484–491.
- Giasson, B. I.; Duda, J. E.; Murray, I. V.; Chen, Q.; Souza, J. M.; Hurtig, H. I. et al. (2000): Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. In: *Science* 290 (5493), S. 985–989.
- Gleichmann, Marc; Mattson, Mark P. (2011): Neuronal calcium homeostasis and dysregulation. In: *Antioxid Redox Signal* 14 (7), S. 1261–1273.
- Goedert, Michel; Spillantini, Maria Grazia; Del Tredici, Kelly; Braak, Heiko (2012): 100 years of Lewy pathology. In: *Nat Rev Neurol* 9 (1), S. 13–24.
- Goldberg, Joshua A.; Guzman, Jaime N.; Estep, Chad M.; Ilijic, Ema; Kondapalli, Jyothisri; Sanchez-Padilla, Javier; Surmeier, D. James (2012): Calcium entry induces

mitochondrial oxidant stress in vagal neurons at risk in Parkinson's disease. In: *Nat Neurosci* 15 (10), S. 1414–1421.

Gonon, F. G.; Buda, M. J. (1985): Regulation of dopamine release by impulse flow and by autoreceptors as studied by in vivo voltammetry in the rat striatum. In: *Neuroscience* 14 (3), S. 765–774.

Grace, A. A. (1988): In vivo and in vitro intracellular recordings from rat midbrain dopamine neurons. In: *Ann N Y Acad Sci* 537, S. 51–76.

Grace, A. A.; Bunney, B. S. (1983): Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--2. Action potential generating mechanisms and morphological correlates. In: *Neuroscience* 10 (2), S. 317–331.

Granata, R.; Settanni, F.; Trovato, L.; Destefanis, S.; Gallo, D.; Martinetti, M. et al. (2006): Unacylated as well as acylated ghrelin promotes cell survival and inhibit apoptosis in HIT-T15 pancreatic beta-cells. In: *J Endocrinol Invest* 29 (9), S. RC19-22.

Guan, X. M.; Yu, H.; Palyha, O. C.; McKee, K. K.; Feighner, S. D.; Sirinathsinghji, D. J. et al. (1997): Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. In: *Brain Res Mol Brain Res* 48 (1), S. 23–29.

Guzman, Jaime N.; Sanchez-Padilla, Javier; Chan, C. Savio; Surmeier, D. James (2009): Robust pacemaking in substantia nigra dopaminergic neurons. In: *J Neurosci* 29 (35), S. 11011–11019.

Han, Xuefeng; Zhu, Yunlong; Zhao, Yufeng; Chen, Chen (2011): Ghrelin reduces voltage-gated calcium currents in GH(3) cells via cyclic GMP pathways. In: *Endocrine* 40 (2), S. 228–236.

Hardy, John; Lewis, Patrick; Revesz, Tamas; Lees, Andrew; Paisan-Ruiz, Coro (2009): The genetics of Parkinson's syndromes: a critical review. In: *Current Opinion in Genetics & Development* 19 (3), S. 254–265.

Heath, R. B.; Jones, R.; Frayn, K. N.; Robertson, M. D. (2004): Vagal stimulation exaggerates the inhibitory ghrelin response to oral fat in humans. In: *J Endocrinol* 180 (2), S. 273–281.

Heikkila, R. E.; Hess, A.; Duvoisin, R. C. (1984): Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice. In: *Science* 224 (4656), S. 1451–1453.

Hellenbrand, W.; Seidler, A.; Robra, B. P.; Vieregge, P.; Oertel, W. H.; Joerg, J. et al. (1997): Smoking and Parkinson's disease: a case-control study in Germany. In: *Int J Epidemiol* 26 (2), S. 328–339.

Hettiarachchi, Nishani T.; Parker, Andrew; Dallas, Mark L.; Pennington, Kyla; Hung, Chao-Chun; Pearson, Hugh A. et al. (2009): alpha-Synuclein modulation of Ca<sup>2+</sup> signaling in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. In: *J Neurochem* 111 (5), S. 1192–1201.

Hirsch, Etienne C.; Hunot, Stephane; Hartmann, Andreas (2005): Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. In: *Parkinsonism Relat Disord* 11 Suppl 1, S. S9-S15.

- Holst, Birgitte; Holliday, Nicholas D.; Bach, Anders; Elling, Christian E.; Cox, Helen M.; Schwartz, Thue W. (2004): Common structural basis for constitutive activity of the ghrelin receptor family. In: *J Biol Chem* 279 (51), S. 53806–53817.
- Hosoda, H.; Kojima, M.; Matsuo, H.; Kangawa, K. (2000): Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. In: *Biochem Biophys Res Commun* 279 (3), S. 909–913.
- Houlden, Henry; Singleton, Andrew B. (2012): The genetics and neuropathology of Parkinson's disease. In: *Acta Neuropathol* 124 (3), S. 325–338.
- Howard, A. D.; Feighner, S. D.; Cully, D. F.; Arena, J. P.; Liberato, P. A.; Rosenblum, C. I. et al. (1996): A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. In: *Science* 273 (5277), S. 974–977.
- Huang, Li-shar; Sun, Gang; Cobessi, David; Wang, Andy C.; Shen, John T.; Tung, Eric Y. et al. (2006): 3-nitropropionic acid is a suicide inhibitor of mitochondrial respiration that, upon oxidation by complex II, forms a covalent adduct with a catalytic base arginine in the active site of the enzyme. In: *J Biol Chem* 281 (9), S. 5965–5972.
- Hu, G.; Jousilahti, P.; Nissinen, A.; Antikainen, R.; Kivipelto, M.; Tuomilehto, J. (2006): Body mass index and the risk of Parkinson disease. In: *Neurology* 67 (11), S. 1955–1959.
- Hunot, S.; Brugg, B.; Ricard, D.; Michel, P. P.; Muriel, M. P.; Ruberg, M. et al. (1997): Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (14), S. 7531–7536.
- Hurley, Michael J.; Dexter, David T. (2012): Voltage-gated calcium channels and Parkinson's disease. In: *Pharmacol Ther* 133 (3), S. 324–333.
- Jiang, Hong; Li, Lin-Jing; Wang, Jun; Xie, Jun-Xia (2008): Ghrelin antagonizes MPTP-induced neurotoxicity to the dopaminergic neurons in mouse substantia nigra. In: *Exp Neurol* 212 (2), S. 532–537.
- Ji, Huifang; Hougaard, Charlotte; Herrik, Kjartan Frisch; Strøbaek, Dorte; Christophersen, Palle; Shepard, Paul D. (2009): Tuning the excitability of midbrain dopamine neurons by modulating the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of SK channels. In: *European Journal of Neuroscience* 29 (9), S. 1883–1895.
- Joselin, Alvin P.; Hewitt, Sarah J.; Callaghan, Steve M.; Kim, Raymond H.; Chung, Young-Hwa; Mak, Tak W. et al. (2012): ROS-dependent regulation of Parkin and DJ-1 localization during oxidative stress in neurons. In: *Hum Mol Genet* 21 (22), S. 4888–4903.
- Joseph-Bravo, Patricia; Perez-Martinez, Leonor; Lezama, Leticia; Morales-Chapa, Claudia; Charli, Jean-Louis (2002): An improved method for the expression of TRH in serum-supplemented primary cultures of fetal hypothalamic cells. In: *Brain Res Brain Res Protoc* 9 (2), S. 93–104.
- Katsuki, H.; Takenaka, C.; Kume, T.; Kaneko, S.; Akaike, A. (2001): Requirement of neural activity for the maintenance of dopaminergic neurons in rat midbrain slice cultures. In: *Neurosci Lett* 300 (3), S. 166–170.
- Klein, Matthias J.; Maguire, Janet J.; Skepper, Jeremy N.; Davenport, Anthony P. (2006): Functional and immunocytochemical evidence for a role of ghrelin and des-

- octanoyl ghrelin in the regulation of vascular tone in man. In: *Cardiovasc Res* 69 (1), S. 227–235.
- Kohno, Daisuke; Gao, Hong-Zhi; Muroya, Shinji; Kikuyama, Sakae; Yada, Toshihiko (2003): Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca<sup>2+</sup> signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. In: *Diabetes* 52 (4), S. 948–956.
- Kojima, M.; Hosoda, H.; Date, Y.; Nakazato, M.; Matsuo, H.; Kangawa, K. (1999): Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. In: *Nature* 402 (6762), S. 656–660.
- Kojima, Masayasu; Kangawa, Kenji (2010): Ghrelin: more than endogenous growth hormone secretagogue. In: *Ann N Y Acad Sci* 1200, S. 140–148.
- Koller, W. C.; Glatt, S.; Vetere-Overfield, B.; Hassanein, R. (1989): Falls and Parkinson's disease. In: *Clin Neuropharmacol* 12 (2), S. 98–105.
- Kumar, Kishore R.; Djarmati-Westenberger, Ana; Grunewald, Anne (2011): Genetics of Parkinson's disease. In: *Semin Neurol* 31 (5), S. 433–440.
- Langston, J. W.; Ballard, P.; Tetrud, J. W.; Irwin, I. (1983): Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. In: *Science* 219 (4587), S. 979–980.
- Langston, J. William (2006): The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. In: *Ann Neurol* 59 (4), S. 591–596.
- Lau, Lonneke M. L. de; Breteler, Monique M. B. (2006): Epidemiology of Parkinson's disease. In: *Lancet Neurol* 5 (6), S. 525–535.
- Lee, W. T.; Yin, H. S.; Shen, Y. Z. (2002): The mechanisms of neuronal death produced by mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: the roles of N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and mitochondrial calcium overload. In: *Neuroscience* 112 (3), S. 707–716.
- Leppik, Ilo E. (2004): Zonisamide: chemistry, mechanism of action, and pharmacokinetics. In: *Seizure* 13 Suppl 1, S. S5-9; discussion S10.
- Liss, B.; Bruns, R.; Roeper, J. (1999): Alternative sulfonylurea receptor expression defines metabolic sensitivity of K-ATP channels in dopaminergic midbrain neurons. In: *EMBO J* 18 (4), S. 833–846.
- Liss, Birgit; Haeckel, Olga; Wildmann, Johannes; Miki, Takashi; Seino, Susumu; Roeper, Jochen (2005): K-ATP channels promote the differential degeneration of dopaminergic midbrain neurons. In: *Nat Neurosci* 8 (12), S. 1742–1751.
- Liu, Li; Xu, Huamin; Jiang, Hong; Wang, Jun; Song, Ning; Xie, Junxia (2010): Ghrelin prevents 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced cytotoxicity through antioxidation and NF-kappaB modulation in MES23.5 cells. In: *Exp Neurol* 222 (1), S. 25–29.
- Liu, Rui; Guo, Xuguang; Park, Yikyung; Huang, Xuemei; Sinha, Rashmi; Freedman, Neal D. et al. (2012): Caffeine intake, smoking, and risk of Parkinson disease in men and women. In: *Am J Epidemiol* 175 (11), S. 1200–1207.
- Liu, Yanping; Gutterman, David D. (2002): Oxidative stress and potassium channel function. In: *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29 (4), S. 305–311.

- Louis, E. D.; Klatka, L. A.; Liu, Y.; Fahn, S. (1997): Comparison of extrapyramidal features in 31 pathologically confirmed cases of diffuse Lewy body disease and 34 pathologically confirmed cases of Parkinson's disease. In: *Neurology* 48 (2), S. 376–380.
- Lozano, A. M.; Lang, A. E.; Hutchison, W. D.; Dostrovsky, J. O. (1998): New developments in understanding the etiology of Parkinson's disease and in its treatment. In: *Curr Opin Neurobiol* 8 (6), S. 783–790.
- Ludolph, A. C.; He, F.; Spencer, P. S.; Hammerstad, J.; Sabri, M. (1991): 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. In: *Can J Neurol Sci* 18 (4), S. 492–498.
- Maker, H. S.; Weiss, C.; Silides, D. J.; Cohen, G. (1981): Coupling of dopamine oxidation (monoamine oxidase activity) to glutathione oxidation via the generation of hydrogen peroxide in rat brain homogenates. In: *J Neurochem* 36 (2), S. 589–593.
- Markey, S. P.; Johannessen, J. N.; Chiueh, C. C.; Burns, R. S.; Herkenham, M. A. (1984): Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. In: *Nature* 311 (5985), S. 464–467.
- Marras, Connie; Lang, Anthony (2008): Invited article: changing concepts in Parkinson disease: moving beyond the decade of the brain. In: *Neurology* 70 (21), S. 1996–2003.
- Matsuda, Noriyuki; Sato, Shigeto; Shiba, Kahori; Okatsu, Kei; Saisho, Keiko; Gautier, Clement A. et al. (2010): PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. In: *J Cell Biol* 189 (2), S. 211–221.
- Matsumoto, M.; Hosoda, H.; Kitajima, Y.; Morozumi, N.; Minamitake, Y.; Tanaka, S. et al. (2001): Structure-activity relationship of ghrelin: pharmacological study of ghrelin peptides. In: *Biochem Biophys Res Commun* 287 (1), S. 142–146.
- Mattson, Mark P.; Gleichmann, Marc; Cheng, Aiwu (2008): Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. In: *Neuron* 60 (5), S. 748–766.
- Mau, S. E.; Witt, M. R.; Bjerrum, O. J.; Saermark, T.; Vilhardt, H. (1995): Growth hormone releasing hexapeptide (GHRP-6) activates the inositol (1,4,5)-trisphosphate/diacylglycerol pathway in rat anterior pituitary cells. In: *J Recept Signal Transduct Res* 15 (1-4), S. 311–323.
- Michel, P. P.; Agid, Y. (1996): Chronic activation of the cyclic AMP signaling pathway promotes development and long-term survival of mesencephalic dopaminergic neurons. In: *J Neurochem* 67 (4), S. 1633–1642.
- Michel, P. P.; Ruberg, M.; Agid, Y. (1997): Rescue of mesencephalic dopamine neurons by anticancer drug cytosine arabinoside. In: *J Neurochem* 69 (4), S. 1499–1507.
- Michel, Patrick P.; Alvarez-Fischer, Daniel; Guerreiro, Serge; Hild, Audrey; Hartmann, Andreas; Hirsch, Etienne C. (2007): Role of activity-dependent mechanisms in the control of dopaminergic neuron survival. In: *J Neurochem* 101 (2), S. 289–297.
- Miegun, Pierre; St Pierre, David; Broglio, Fabio; Cianflone, Katherine (2011): Effect of desacyl ghrelin, obestatin and related peptides on triglyceride storage, metabolism and GHSR signaling in 3T3-L1 adipocytes. In: *J Cell Biochem* 112 (2), S. 704–714.

- Moazed, Banafsheh; Quest, Dale; Gopalakrishnan, Venkat (2009): Des-acyl ghrelin fragments evoke endothelium-dependent vasodilatation of rat mesenteric vascular bed via activation of potassium channels. In: *Eur J Pharmacol* 604 (1-3), S. 79–86.
- Moon, Minho; Kim, Hyo Geun; Hwang, Lakkyong; Seo, Ji-Hyung; Kim, Sehee; Hwang, Sunyoung et al. (2009): Neuroprotective effect of ghrelin in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease by blocking microglial activation. In: *Neurotox Res* 15 (4), S. 332–347.
- Mounsey, Ross B.; Teismann, Peter (2010): Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: pathogenesis and neuroprotection. In: *Parkinsons Dis* 2011, S. 617472.
- Muccioli, Giampiero; Tschop, Matthias; Papotti, Mauro; Deghenghi, Romano; Heiman, Mark; Ghigo, Ezio (2002): Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. In: *Eur J Pharmacol* 440 (2-3), S. 235–254.
- Muchowski, Paul J. (2002): Protein misfolding, amyloid formation, and neurodegeneration: a critical role for molecular chaperones? In: *Neuron* 35 (1), S. 9–12.
- Murakami, N.; Hayashida, T.; Kuroiwa, T.; Nakahara, K.; Ida, T.; Mondal, M. S. et al. (2002): Role for central ghrelin in food intake and secretion profile of stomach ghrelin in rats. In: *J Endocrinol* 174 (2), S. 283–288.
- Murakami, Tetsuro; Shoji, Mikio; Imai, Yuzuru; Inoue, Haruhisa; Kawarabayashi, Takeshi; Matsubara, Etsuro et al. (2004): Pael-R is accumulated in Lewy bodies of Parkinson's disease. In: *Ann Neurol* 55 (3), S. 439–442.
- Murata, Miho (2010): Zonisamide: a new drug for Parkinson's disease. In: *Drugs Today (Barc)* 46 (4), S. 251–258.
- Murata, Miho; Hasegawa, Kazuko; Kanazawa, Ichiro (2007): Zonisamide improves motor function in Parkinson disease: a randomized, double-blind study. In: *Neurology* 68 (1), S. 45–50.
- Murer, M. G.; Raisman-Vozari, R.; Yan, Q.; Ruberg, M.; Agid, Y.; Michel, P. P. (1999): Survival factors promote BDNF protein expression in mesencephalic dopaminergic neurons. In: *Neuroreport* 10 (4), S. 801–805.
- Nagatsu, T.; Mogi, M.; Ichinose, H.; Togari, A. (2000): Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. In: *J Neural Transm Suppl* (60), S. 277–290.
- Nagaya, N.; Kojima, M.; Uematsu, M.; Yamagishi, M.; Hosoda, H.; Oya, H. et al. (2001a): Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. In: *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280 (5), S. R1483-7.
- Nagaya, N.; Miyatake, K.; Uematsu, M.; Oya, H.; Shimizu, W.; Hosoda, H. et al. (2001b): Hemodynamic, renal, and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure. In: *J Clin Endocrinol Metab* 86 (12), S. 5854–5859.
- Nakamura, Yoichi (2002): Regulating factors for microglial activation. In: *Biol Pharm Bull* 25 (8), S. 945–953.
- Narayanan, V.; Scarlata, S. (2001): Membrane binding and self-association of alpha-synucleins. In: *Biochemistry* 40 (33), S. 9927–9934.



- Nath, S.; Goodwin, J.; Engelborghs, Y.; Pountney, D. L. (2011): Raised calcium promotes alpha-synuclein aggregate formation. In: *Mol Cell Neurosci* 46 (2), S. 516–526.
- Nicklas, W. J.; Vyas, I.; Heikkila, R. E. (1985): Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. In: *Life Sci* 36 (26), S. 2503–2508.
- Nishino, H.; Kumazaki, M.; Fukuda, A.; Fujimoto, I.; Shimano, Y.; Hida, H. et al. (1997): Acute 3-nitropropionic acid intoxication induces striatal astrocytic cell death and dysfunction of the blood-brain barrier: involvement of dopamine toxicity. In: *Neurosci Res* 27 (4), S. 343–355.
- Oakley, A. E.; Collingwood, J. F.; Dobson, J.; Love, G.; Perrott, H. R.; Edwardson, J. A. et al. (2007): Individual dopaminergic neurons show raised iron levels in Parkinson disease. In: *Neurology* 68 (21), S. 1820–1825.
- Oertel, W. H.; Mugnaini, E. (1984): Immunocytochemical studies of GABAergic neurons in rat basal ganglia and their relations to other neuronal systems. In: *Neurosci Lett* 47 (3), S. 233–238.
- Oertel, Wolfgang H.; Deuschel, Günther; Poewe, Werner (2012): Parkinson-Syndrom und andere Bewegungsstörungen: Thieme.
- Oestreicher, E.; Sengstock, G. J.; Riederer, P.; Olanow, C. W.; Dunn, A. J.; Arendash, G. W. (1994): Degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons increases iron within the substantia nigra: a histochemical and neurochemical study. In: *Brain Res* 660 (1), S. 8–18.
- Patil, N.; Cox, D. R.; Bhat, D.; Faham, M.; Myers, R. M.; Peterson, A. S. (1995): A potassium channel mutation in weaver mice implicates membrane excitability in granule cell differentiation. In: *Nat Genet* 11 (2), S. 126–129.
- Perier, Celine; Tieu, Kim; Guegan, Christelle; Caspersen, Casper; Jackson-Lewis, Vernice; Carelli, Valerio et al. (2005): Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (52), S. 19126–19131.
- Perry, T. L.; Godin, D. V.; Hansen, S. (1982): Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency? In: *Neurosci Lett* 33 (3), S. 305–310.
- Peterson, L. A.; Caldera, P. S.; Trevor, A.; Chiba, K.; Castagnoli, N., JR (1985): Studies on the 1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium species 2,3-MPDP<sup>+</sup>, the monoamine oxidase catalyzed oxidation product of the nigrostriatal toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). In: *J Med Chem* 28 (10), S. 1432–1436.
- Ramsay, R. R.; Dadgar, J.; Trevor, A.; Singer, T. P. (1986): Energy-driven uptake of N-methyl-4-phenylpyridine by brain mitochondria mediates the neurotoxicity of MPTP. In: *Life Sci* 39 (7), S. 581–588.
- Ramsay, R. R.; Kowal, A. T.; Johnson, M. K.; Salach, J. I.; Singer, T. P. (1987): The inhibition site of MPP<sup>+</sup>, the neurotoxic bioactivation product of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine is near the Q-binding site of NADH dehydrogenase. In: *Arch Biochem Biophys* 259 (2), S. 645–649.

- Rhodes, K. E.; Raivich, G.; Fawcett, J. W. (2006): The injury response of oligodendrocyte precursor cells is induced by platelets, macrophages and inflammation-associated cytokines. In: *Neuroscience* 140 (1), S. 87–100.
- Riederer, P.; Sian-Hulsmann, J. (2012): The significance of neuronal lateralisation in Parkinson's disease. In: *J Neural Transm* 119 (8), S. 953–962.
- Ritz, Beate; Ascherio, Alberto; Checkoway, Harvey; Marder, Karen S.; Nelson, Lorene M.; Rocca, Walter A. et al. (2007): Pooled analysis of tobacco use and risk of Parkinson disease. In: *Arch Neurol* 64 (7), S. 990–997.
- Ritz, Beate; Rhodes, Shannon L.; Qian, Lei; Schernhammer, Eva; Olsen, Jorgen H.; Friis, Soren (2010): L-type calcium channel blockers and Parkinson disease in Denmark. In: *Ann Neurol* 67 (5), S. 600–606.
- Salthun-Lassalle, Benedicte; Hirsch, Etienne C.; Wolfart, Jakob; Ruberg, Merle; Michel, Patrick P. (2004): Rescue of mesencephalic dopaminergic neurons in culture by low-level stimulation of voltage-gated sodium channels. In: *J Neurosci* 24 (26), S. 5922–5930.
- Sato, Takahiro; Nakamura, Yuki; Shiimura, Yuki; Ohgusu, Hideko; Kangawa, Kenji; Kojima, Masayasu (2012): Structure, regulation and function of ghrelin. In: *J Biochem* 151 (2), S. 119–128.
- Savitt, Joseph M.; Dawson, Valina L.; Dawson, Ted M. (2006): Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. In: *J Clin Invest* 116 (7), S. 1744–1754.
- Scerif, Miski; Goldstone, Anthony P.; Korbonits, Marta (2011): Ghrelin in obesity and endocrine diseases. In: *Mol Cell Endocrinol* 340 (1), S. 15–25.
- Schapira, A. H. V. (2010): Complex I: inhibitors, inhibition and neurodegeneration. In: *Exp Neurol* 224 (2), S. 331–335.
- Schapira, A. H.; Cooper, J. M.; Dexter, D.; Jenner, P.; Clark, J. B.; Marsden, C. D. (1989): Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. In: *Lancet* 1 (8649), S. 1269.
- Schapira, Anthony H. V. (2008): Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. In: *Lancet Neurol* 7 (1), S. 97–109.
- Scott, R. M.; Brody, J. A.; Schwab, R. S.; Cooper, I. S. (1970): Progression of unilateral tremor and rigidity in Parkinson's disease. In: *Neurology* 20 (7), S. 710–714.
- Sheline, Christian T.; Zhu, Julia; Zhang, Wendy; Shi, Chunxiao; Cai, Ai-Li (2013): Mitochondrial inhibitor models of Huntington's disease and Parkinson's disease induce zinc accumulation and are attenuated by inhibition of zinc neurotoxicity in vitro or in vivo. In: *Neurodegener Dis* 11 (1), S. 49–58.
- Shiia, Tomomi; Nakazato, Masamitsu; Mizuta, Masanari; Date, Yukari; Mondal, Muhtashan S.; Tanaka, Muneki et al. (2002): Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. In: *J Clin Endocrinol Metab* 87 (1), S. 240–244.
- Shulman, Joshua M.; Jager, Philip L. de; Feany, Mel B. (2011): Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. In: *Annu Rev Pathol* 6, S. 193–222.

- Sian-Hulsmann, Jeswinder; Mandel, Silvia; Youdim, Moussa B. H.; Riederer, Peter (2011): The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. In: *J Neurochem* 118 (6), S. 939–957.
- Soriano-Guillen, Leandro; Barrios, Vicente; Campos-Barros, Angel; Argente, Jesus (2004): Ghrelin levels in obesity and anorexia nervosa: effect of weight reduction or recuperation. In: *J Pediatr* 144 (1), S. 36–42.
- Stevanovic, Darko M.; Grefhorst, Aldo; Themmen, Axel P. N.; Popovic, Vera; Holstege, Joan; Haasdijk, Elize et al. (2014): Unacylated Ghrelin Suppresses Ghrelin-Induced Neuronal Activity in the Hypothalamus and Brainstem of Male Rats. In: *PLoS ONE* 9 (7), S. e102636.
- Sun, Yu; Huang, Xiangui; Liu, Meiying; Cao, Junping; Chen, Jing; Wang, Hongjun et al. (2012): A new alternative NF-KappaB Pathway mediated the neuroprotection of GDNF on 6-OHDA-induced DA neurons neurotoxicity. In: *Brain Res* 1437, S. 38–49.
- Surmeier, D. James; Guzman, Jaime N.; Sanchez-Padilla, Javier (2010): Calcium, cellular aging, and selective neuronal vulnerability in Parkinson's disease. In: *Cell Calcium* 47 (2), S. 175–182.
- Swerdlow, R. H.; Parks, J. K.; Miller, S. W.; Tuttle, J. B.; Trimmer, P. A.; Sheehan, J. P. et al. (1996): Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease. In: *Ann Neurol* 40 (4), S. 663–671.
- Tai, Chun-Hwei; Yang, Ya-Chin; Pan, Ming-Kai; Huang, Chen-Syuan; Kuo, Chung-Chin (2011): Modulation of subthalamic T-type Ca(2+) channels remedies locomotor deficits in a rat model of Parkinson disease. In: *J Clin Invest* 121 (8), S. 3289–3305.
- Tansey, Malu G.; McCoy, Melissa K.; Frank-Cannon, Tamy C. (2007): Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. In: *Exp Neurol* 208 (1), S. 1–25.
- Teubner, Brett J. W.; Garretson, John T.; Hwang, Yousang; Cole, Philip A.; Bartness, Timothy J. (2013): Inhibition of ghrelin O-acyltransferase attenuates food deprivation-induced increases in ingestive behavior. In: *Horm Behav* 63 (4), S. 667–673.
- Thompson, Nichola M.; Gill, Dave A. S.; Davies, Rhos; Loveridge, Nigel; Houston, Pamela A.; Robinson, Iain C. A. F.; Wells, Timothy (2004): Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. In: *Endocrinology* 145 (1), S. 234–242.
- Tilleux, Sebastien; Hermans, Emmanuel (2007): Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders. In: *J Neurosci Res* 85 (10), S. 2059–2070.
- Togliatto, G.; Trombetta, A.; Dentelli, P.; Baragli, A.; Rosso, A.; Granata, R. et al. (2010): Unacylated Ghrelin Rescues Endothelial Progenitor Cell Function in Individuals With Type 2 Diabetes. In: *Diabetes* 59 (4), S. 1016–1025.
- Tolosa, Eduardo; Wenning, Gregor; Poewe, Werner (2006): The diagnosis of Parkinson's disease. In: *Lancet Neurol* 5 (1), S. 75–86.
- Toshinai, Koji; Yamaguchi, Hideki; Sun, Yuxiang; Smith, Roy G.; Yamanaka, Akihiro; Sakurai, Takeshi et al. (2006): Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism

- independent of the growth hormone secretagogue receptor. In: *Endocrinology* 147 (5), S. 2306–2314.
- Toulorge, Damien; Guerreiro, Serge; Hirsch, Etienne C.; Michel, Patrick P. (2010): KATP channel blockade protects midbrain dopamine neurons by repressing a glia-to-neuron signaling cascade that ultimately disrupts mitochondrial calcium homeostasis. In: *J Neurochem* 114 (2), S. 553–564.
- Traebert, M.; Riediger, T.; Whitebread, S.; Scharrer, E.; Schmid, H. A. (2002): Ghrelin acts on leptin-responsive neurones in the rat arcuate nucleus. In: *J Neuroendocrinol* 14 (7), S. 580–586.
- Tschop, M.; Weyer, C.; Tataranni, P. A.; Devanarayan, V.; Ravussin, E.; Heiman, M. L. (2001): Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. In: *Diabetes* 50 (4), S. 707–709.
- Ueberberg, B.; Unger, N.; Saeger, W.; Mann, K.; Petersenn, S. (2009): Expression of Ghrelin and its Receptor in Human Tissues. In: *Horm Metab Res* 41 (11), S. 814–821.
- Unger, Marcus M.; Hattemer, Katja; Moller, Jens C.; Schmittinger, Katrin; Mankel, Katharina; Eggert, Karla et al. (2010a): Real-time visualization of altered gastric motility by magnetic resonance imaging in patients with Parkinson's disease. In: *Mov Disord* 25 (5), S. 623–628.
- Unger, Marcus M.; Hattemer, Katja; Moller, Jens C.; Schmittinger, Katrin; Mankel, Katharina; Eggert, Karla et al. (2010b): Real-time visualization of altered gastric motility by magnetic resonance imaging in patients with Parkinson's disease. In: *Mov Disord* 25 (5), S. 623–628.
- Unger, Marcus M.; Moller, Jens C.; Mankel, Katharina; Eggert, Karla M.; Bohne, Katharina; Bodden, Maren et al. (2011): Postprandial ghrelin response is reduced in patients with Parkinson's disease and idiopathic REM sleep behaviour disorder: a peripheral biomarker for early Parkinson's disease? In: *J Neurol* 258 (6), S. 982–990.
- Uversky, V. N.; Li, J.; Fink, A. L. (2001): Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular NK between Parkinson's disease and heavy metal exposure. In: *J Biol Chem* 276 (47), S. 44284–44296.
- Vyas, I.; Heikkila, R. E.; Nicklas, W. J. (1986): Studies on the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: inhibition of NAD-linked substrate oxidation by its metabolite, 1-methyl-4-phenylpyridinium. In: *J Neurochem* 46 (5), S. 1501–1507.
- Wang, Xinkun; Michaelis, Elias K. (2010): Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. In: *Front Aging Neurosci* 2, S. 12.
- Wickman, K.; Clapham, D. E. (1995): Ion channel regulation by G proteins. In: *Physiol Rev* 75 (4), S. 865–885.
- Wojtera, Marcin; Sikorska, Beata; Sobow, Tomasz; Liberski, Pawel P. (2005): Microglial cells in neurodegenerative disorders. In: *Folia Neuropathol* 43 (4), S. 311–321.

- Yamada, T.; McGeer, P. L.; Baimbridge, K. G.; McGeer, E. G. (1990): Relative sparing in Parkinson's disease of substantia nigra dopamine neurons containing calbindin-D28K. In: *Brain Res* 526 (2), S. 303–307.
- Yamazaki, M.; Kobayashi, H.; Tanaka, T.; Kangawa, K.; Inoue, K.; Sakai, T. (2004): Ghrelin-induced growth hormone release from isolated rat anterior pituitary cells depends on intracellular and extracellular Ca<sup>2+</sup> sources. In: *J Neuroendocrinol* 16 (10), S. 825–831.
- Yamazaki, Mami; Aizawa, Sayaka; Tanaka, Toru; Sakai, Takafumi; Sakata, Ichiro (2012): Ghrelin increases intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in the various hormone-producing cell types of the rat pituitary gland. In: *Neurosci Lett* 526 (1), S. 29–32.
- Yang, F.; Feng, L.; Zheng, F.; Johnson, S. W.; Du, J.; Shen, L. et al. (2001): GDNF acutely modulates excitability and A-type K<sup>+</sup> channels in midbrain dopaminergic neurons. In: *Nat Neurosci* 4 (11), S. 1071–1078.
- Yang, Jing; Brown, Michael S.; Liang, Guosheng; Grishin, Nick V.; Goldstein, Joseph L. (2008): Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. In: *Cell* 132 (3), S. 387–396.
- Yano, Ryohei; Yokoyama, Hironori; Kuroiwa, Hayato; Kato, Hiroyuki; Araki, Tsutomu (2009): A novel anti-Parkinsonian agent, zonisamide, attenuates MPTP-induced neurotoxicity in mice. In: *J Mol Neurosci* 39 (1-2), S. 211–219.
- Yoshikawa, T. (1993): Free radicals and their scavengers in Parkinson's disease. In: *Eur Neurol* 33 Suppl 1, S. 60–68.
- Zeng, B-Y; Medhurst, A. D.; Jackson, M.; Rose, S.; Jenner, P. (2005): Proteasomal activity in brain differs between species and brain regions and changes with age. In: *Mech Ageing Dev* 126 (6-7), S. 760–766.
- Zhang, Ruiyun; Yang, Guanglu; Wang, Qingyi; Guo, Feng; Wang, Hua (2013): Acylated ghrelin protects hippocampal neurons in pilocarpine-induced seizures of immature rats by inhibiting cell apoptosis. In: *Mol Biol Rep* 40 (1), S. 51–58.
- Zigman, Jeffrey M.; Jones, Juli E.; Lee, Charlotte E.; Saper, Clifford B.; Elmquist, Joel K. (2006): Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. In: *J Comp Neurol* 494 (3), S. 528–548.

## Publikationsliste und Publikation

**Poster und Abstract:** 8. Deutscher Parkinson-Kongress, Würzburg, 13.-15.03.2013

**Both acetylated and unacetylated ghrelin confer neuroprotection on mesencephalic neurons against various toxins**

J. Wagner, B. Arns, M. Unger, W.H. Oertel, V. Ries, D. Alvarez-Fischer

Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Neurowoche 2014, München, 15.-19.09.2014

**Acetylated and unacetylated ghrelin confer neuroprotection to mesencephalic neurons**

J. Wagner, F. Vulinovic, A. Grunewald, M. Unger, C. Moller, C. Klein, W. Oertel, P. Michel, D. Alvarez-Fischer, V. Ries

17th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Sydney, 16.-20.06.2013:

Wagner, J., Arns, B., Grünewald, A., Unger, M.M., Oertel, W.H., Ries, V., Alvarez-Fischer, D.; **Both acetylated and unacetylated ghrelin confer neuroprotection on mesencephalic neurons against various toxins** [abstract]. *Movement Disorders 2013;28 Suppl 1 :106.*

**Paper – submitted:** **Acetylated and unacetylated ghrelin confers neuroprotection to mesencephalic neurons**

Johanna Wagner<sup>1</sup>, Franca Vulinović<sup>2</sup>, Anne Grünewald<sup>2,3</sup>, Marcus M. Unger<sup>1,4</sup>, Jens C. Möller<sup>5</sup>, Christine Klein<sup>2</sup>, Wolfgang H. Oertel<sup>1</sup>, Patrick P. Michel<sup>6</sup>, Vincent Ries<sup>1\*</sup>, Daniel Alvarez-Fischer<sup>1,2,7\*</sup>

1. Department of Neurology, Philipps-University of Marburg, 35043 Marburg, Germany
2. Institute of Neurogenetics, University of Lübeck, 23562 Lübeck
3. Wellcome Trust Centre for Mitochondrial Research, Institute of Ageing and Health, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, NE2 4HH, UK
4. Department of Neurology, Saarland University, 66421 Homburg, Germany
5. Neurocentro della Svizzera Italiana, Clinical Trials Unit, Ospedale Regionale di Lugano, Via Tesserete 46, 6903 Lugano, Switzerland
6. Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06 UMR75, INSERM U1127, CNRS UMR 7725, Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière, F-75013 Paris, France
7. Department of Psychiatry, University of Lübeck, 23562 Lübeck

## **Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Adamkiewicz, Alter, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Becker, Berger, Bette, Bien, Bohlander, Cordes, Czubayko, Daut, Dettmeyer, Duda, Eikmann, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Görg, Gress, Grosse, Grundmann, Hamer, Hertl, Heverhagen, Hilt, Höffken, Hofmann, Hoyer, Kalder, Kann, Kill, Kim-Berger, Kircher, Klose, König, Köhler, Koolman, Kruse, Kühnert, Lill, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Moosdorf, Moll, Mueller, Mutters, Neubauer, Nimsky, Oertel, Pagenstecher, Plant, Preisig-Müller, Renz, Richter, Ries, Röhm, Ruchholtz, Schäfer, Schieffer, Schneider, Schmidt, Schratt, Schütz, Seifart, Sekundo, Vogelmeier, Wagner, Waldegger, Weihe, Werner, Westermann, Wulf, Zemlin, Zovko.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit sehr unterstützt haben.

Zunächst bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. W. H. Oertel für die Möglichkeit, die Dissertationsarbeit in seiner Klinik erstellen zu können sowie für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch PD Dr. Vincent Ries für die sehr gute Betreuung, die konstruktive und hilfreiche Korrektur dieser Arbeit.

Des Weiteren bedanke ich mich ganz herzlich bei meinem Betreuer Dr. Daniel Alvarez-Fischer für die Bereitstellung des Themas und die stets großartige Hilfe bei allen Fragen, seine ständige Erreichbarkeit sowie viel Geduld und konstruktive Kritik.

Außerdem möchte ich mich bei Silke Caspari, Sabine Anfimov und Rosemarie Burmester für die problemlose Hilfe im Labor bedanken. Ein Dankeschön geht auch an Guido Schemken und die Tierhaltung des BMFZ für die tatkräftige Unterstützung.

Auch möchte ich mich bei meiner Schwester Julia und meinen Freunden, die mich während der Studienzeit begleitet haben, ganz herzlich für die Unterstützung bedanken.

Ein weiteres Dankeschön geht an Lorenz, der mir stets mit viel Geduld Mut zugesprochen und mich in meiner Arbeit bestärkt hat.

Und nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt und mich während meines gesamten Studiums geduldig und uneingeschränkt unterstützt haben.