

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD**



**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**AUTOIMUNITNÍ MECHANISMY**  
**U PARKINSONOVY NEMOCI**

**KLÁRA MIRSKÁ**

**Vedoucí bakalářské práce: doc. MUDr. Josef Herink, DrSc.**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2021**

## **Poděkování**

Chtěla bych velmi poděkovat panu doc. MUDr. Josefu Herinkovi, DrSc. za vedení mé bakalářské práce, za odborné rady, ochotu a vstřícné jednání při konzultacích. Také bych ráda poděkovala své rodině za velkou podporu během celého mého studia.

*„Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“*

V Hradci Králové 18. 4. 2021

Klára Mirská

# ABSTRAKT

Bakalářská práce se na podkladě literární rešerše zabývá podílem imunitního systému na vzniku a progresi Parkinsonovy nemoci. Poskytuje komplexní pohled na zapojení všech jeho složek do rozvoje autoimunitní reakce a průvodního neurozánětu.

V úvodní části jsou uvedeny možné příčiny vzniku Parkinsonovy nemoci na úrovni exogenních, endogenních a genetických vlivů se zaměřením na roli aberantního  $\alpha$ -synukleinu v patogenezi onemocnění. Následující kapitoly se věnují úloze mikroglíí, dendritických buněk, T-lymfocytů, a především jejich vzájemným interakcím v rámci celého autoimunitního procesu. Významná část této práce se zaměřuje na regulaci neurozánětu v *substantia nigra* prostřednictvím cytokinů produkovaných mikroglíemi a T-lymfocyty. Za klíčové iniciátory autoimunitní odezvy jsou pokládány neoantigeny, které mohou narušit imunitní toleranci a stát se cílovými molekulami cytokinů.

V závěru představuje tato práce na podkladě řady imunologických studií možnosti nového přístupu k terapii Parkinsonovy nemoci. Imunoterapeutické strategie jsou založené buď na podávání induktorů regulačních T-lymfocytů pacientům s Parkinsonovou nemocí, nebo na jejich imunizaci vakcínou proti  $\alpha$ -synukleinu, případně použitím monoklonálních protilátek proti  $\alpha$ -synukleinu.

**Klíčová slova:** Parkinsonova nemoc, autoimunita, cytokiny, neurozáněť, T-lymfocyty

## ABSTRACT

The bachelor thesis concerns with the involvement of immune system in the development and progression of Parkinson's disease and is supported by the literary research. It provides a comprehensive view of the engagement of all the components of the immune system in the autoimmune reaction and the neuroinflammation.

It introduces possible causes of Parkinson's disease at the level of exogenous, endogenous and genetic influences and focuses on the role of aberrant  $\alpha$ -synuclein in the pathogenesis of Parkinson's disease in the second chapter. The following chapters are dedicated to the role of microglia, dendritic cells, T-cells and especially to their reciprocal interactions within the whole autoimmune process. A significant part of this thesis focuses on the regulation of the neuroinflammation in *substantia nigra* by cytokines, which are produced by microglia and T-cells. Neoantigens are thought to be key indicators of the autoimmune response, which can disrupt immune tolerance and become cytokine target molecules.

In the conclusion the bachelor thesis presents the options of a new approach to the therapy of Parkinson's disease on the basis of series of immunological studies. The immunotherapeutic strategies consist in the administration of regulatory T cells inductors to patients with Parkinson's disease or in their immunization by anti- $\alpha$ -synuclein vaccine or by monoclonal anti- $\alpha$ -synuclein antibodies.

**Key words:** Parkinson's disease, autoimmunity, cytokines, neuroinflammation, T-cells

# OBSAH

<b>1. ÚVOD A CÍL PRÁCE .....</b>	<b>8</b>
<b>2. HYPOTÉZY VZNIKU PARKINSONOVY NEMOCI .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Exogenní vlivy.....</b>	<b>9</b>
2.1.1 Neurotoxiny .....	9
2.1.2 Kraniocerebrální trauma .....	10
<b>2.2 Endogenní vlivy .....</b>	<b>10</b>
<b>2.3 Genetické vlivy.....</b>	<b>10</b>
2.3.1 Autozomálně dominantní dědičnost .....	11
2.3.1.1 SNCA .....	11
2.3.1.2 LRRK2 .....	11
2.3.1.3 GBA .....	11
2.3.1.4 VPS35.....	12
2.3.2 Autozomálně recesivní dědičnost.....	12
2.3.2.1 PRKN .....	12
2.3.2.2 PINK1.....	12
2.3.3 Kodominance.....	12
<b>2.4 Prionová hypotéza .....</b>	<b>13</b>
<b>3. AUTOIMUNITNÍ MECHANISMY .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Úloha mikroglíí.....</b>	<b>16</b>
3.1.1 Aktivace mikroglíí $\alpha$ -synukleinem .....	16
3.1.1.1 Molekulární úroveň .....	16
3.1.1.2 Systémová úroveň .....	18
3.1.2 Regulace mikroglíálního zánětu .....	20
<b>3.2 Úloha dendritických buněk .....</b>	<b>20</b>
<b>3.3 Další úlohy nespecifické buněčné imunity .....</b>	<b>22</b>
3.3.1 Pyróptóza .....	22
3.3.2 Imunoexcitotoxicita .....	22
<b>3.4 Úloha specifické humorální imunity.....</b>	<b>23</b>
<b>3.5 Úloha nespecifické humorální imunity.....</b>	<b>23</b>

<b>3.6</b>	<b>Regulace autoimunitních reakcí prostřednictvím cytokinů .....</b>	<b>24</b>
3.6.1	Signální dráha JAK/STAT.....	24
3.6.2	Účinky jednotlivých cytokinů .....	26
3.6.2.1	IL-1 .....	26
3.6.2.2	TNF- $\alpha$ .....	26
3.6.2.3	IL-6.....	27
3.6.2.4	IFN- $\gamma$ .....	27
3.6.2.5	TGF- $\beta$ .....	27
3.6.2.6	CXCL <sub>1</sub> /Gro- $\alpha$ .....	28
3.6.2.7	CXCL <sub>8</sub> /IL-8.....	28
3.6.2.8	CXCL <sub>10</sub> /IL-10.....	28
3.6.2.9	CCL <sub>2</sub> /MCP-1 .....	28
3.6.2.10	CLL <sub>5</sub> /RANTES .....	28
3.6.2.11	CX <sub>3</sub> CL <sub>1</sub> /fraktalkin/neurotaktin.....	29
<b>4.</b>	<b>ÚLOHA T-LYMFOCYTŮ.....</b>	<b>30</b>
<b>4.1</b>	<b>Účinky aktivovaných T-lymfocytů.....</b>	<b>30</b>
4.1.1	CD4+ pomocné T-lymfocyty.....	30
4.1.2	CD8+ cytotoxické T-lymfocyty.....	31
<b>4.2</b>	<b>Neoantigeny rozpoznávané T-lymfocyty .....</b>	<b>33</b>
4.2.1	Mitochondriální antigeny .....	33
4.2.2	A-synuklein .....	34
4.2.3	Neuromelanin .....	37
<b>4.3</b>	<b>Dopamin jako modulátor T-lymfocytů .....</b>	<b>37</b>
<b>5.</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>38</b>
<b>6.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>41</b>
<b>7.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>45</b>

# 1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Parkinsonova nemoc (PN), známá také jako hypokineticko-hypertonický syndrom, je neurodegenerativní onemocnění bazálních ganglií. Označení hypokineticko-hypertonický syndrom vyplývá z příznaků onemocnění, které se typicky projevuje zvýšenou svalovou rigiditou, čímž se zpomaluje pohyb (hypokineze) a klidovým tremorem (hypertonie).

Vlastní příčina vzniku onemocnění není známa. S jistotou můžeme objasnit pouze princip vzniku PN. Klíčovým procesem v patogenezi PN je nadměrný zánik nervových buněk produkující neurotransmitter dopamin, tzn. dopaminergních neuronů, v *pars compacta substantia nigra* bazálních ganglií. V důsledku odumírání těchto neuronů klesá v *substantia nigra* syntéza dopaminu. Ze *substantia nigra* je dopamin transportován axoplazmatickým tokem do striata. Výrazné snížení syntézy dopaminu a jeho následný deficit v synapsích vede k porušení funkce striata a tím k poruše řízení hybnosti a manifestaci PN. První klinické příznaky PN můžeme pozorovat až po úbytku minimálně poloviny dopaminergních neuronů a po poklesu hladiny dopaminu pod 20-30 % z původního množství. Důležitou informací je také fakt, že u všech lidí dochází s pokračujícím věkem k odumírání těchto neuronů a snížení produkce dopaminu fyziologicky. Oproti pacientům s PN probíhá ale tento proces daleko pomaleji, a ne do takové míry.<sup>1</sup>

Onemocnění není bohužel vyléčitelné, podávání antiparkinsonik však dlouhodobě tlumí projevy nemoci a zlepšuje kvalitu života pacientů. Samotný průběh onemocnění je vždy individuální, nezáleží jen na léčbě ale i na psychickém stavu nemocného. Rizikovou skupinu představují zejména starší lidé ve věku šedesáti a více let.<sup>1</sup>

Obecně se PN řadí mezi proteinopatie, kdy asi 5-10% podíl představují familiární formy nemoci, zatímco absolutní většina (sporadických) případů má multifaktoriální ráz. Cílem práce je podání stručného přehledu exogenních a endogenních faktorů PN, hlavním předmětem je pak posouzení úlohy imunitních mechanismů v její patogenezi.<sup>2</sup>



## 2. HYPOTÉZY VZNIKU PARKINSONOVY NEMOCI

Příčina vzniku PN je stále předmětem výzkumu a v současné době existuje více hypotéz vzniku PN. Doposud však žádná nebyla jednoznačně prokázána a neposkytuje kompletní vysvětlení.

Předpokládá se, že vznik PN je podmíněn spolupůsobením mnoha faktorů vnějšího a vnitřního prostředí, kterými jsou především různé toxiny, změny metabolismu a genetické predispozice. Velkou roli v patogenezi PN hraje  $\alpha$ -synuklein, bílkovina, jejíž úlohou v organismu je pravděpodobně zapojení do transportu vezikul a řízení transportu dopaminu. Tvorba této bílkoviny probíhá ve velké míře v centrální nervové soustavě (CNS), její přesná fyziologická funkce však není objasněna. Iniciačním molekulárním mechanismem neurodegenerativního procesu je změna konformace  $\alpha$ -synukleinu z původní  $\alpha$ -šroubovice na patologickou konformaci  $\beta$ -skládaného listu.  $\beta$ -struktury modifikovaného  $\alpha$ -synukleinu jsou náchylnější k seskupování a v cytoplazmě neuronů se formují do fibrilárních agregátů. Tyto agregáty aberantního  $\alpha$ -synukleinu tvoří hlavní složku Lewyho tělísek, která jsou charakteristickým morfoloogickým znakem PN.<sup>2</sup>

### 2.1 Exogenní vlivy

#### 2.1.1 Neurotoxiny

Z exotoxinů, u nichž byl nejlépe prokázán podíl na vzniku PN, se jedná především o pesticidy. Tyto látky iniciují změnu prostorového uspořádání molekuly  $\alpha$ -synukleinu a tím i formování Lewyho tělísek.<sup>2</sup>

Selektivní poškození dopaminergních neuronů způsobuje látka 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP), která je obsažena v herbicidech, pesticidech a průmyslových hnojivech. MPTP je lipofilní protoxin, který se snadno dostává přes hematoencefalickou bariéru (HEB) do mozku. Účinek MPTP se projeví až po jeho metabolické konverzi v gliových buňkách pomocí enzymu monoaminoxidázy typu B (MAO-B) na vlastní toxin 1-methyl-4-fenylpyridin (MPP+). Selektivita a specifčnost působení MPP+ spočívá v jeho schopnosti pronikat dovnitř gliových buněk. Zde MPP+ interaguje s neuromelaninem, ukládá se v mitochondriích a způsobuje tak inhibici komplexu I dýchacího řetězce spojenou s nedostatečnou produkcí ATP, která vede k degeneraci buňky.<sup>3, 4</sup>

V souvislosti s používáním pesticidů a herbicidů byl zaznamenán vyšší výskyt PN v zemědělských oblastech.<sup>3</sup>

### 2.1.2 Kraniocerebrální trauma

Rozvoj PN může také souviset s traumatickým poškozením mozku způsobené např. opakovanými otřesy mozku. Předpokládá se, že PN vzniká na podkladě poškození HEB, které vyvolá imunitní reakci doprovázenou nadprodukcí proteinů akutní fáze. Tyto bílkoviny pak iniciují tvorbu  $\alpha$ -synukleinových agregátů.<sup>2</sup>

## 2.2 Endogenní vlivy

V mozku každého člověka dochází fyziologicky k tvorbě látek, které mohou toxicky působit na mozkovou tkáň. Jejich potenciálně nebezpečný účinek je proto redukován pomocí protektivních detoxikačních systémů.<sup>4</sup>

Endotoxické poškození může nastat buď v důsledku neefektivního odstraňování normálního množství endotoxinů detoxikačními enzymy nebo v důsledku jejich zvýšeného množství nad fyziologickou hladinu, které již detoxikační enzymy nejsou schopné neutralizovat.<sup>4</sup>

Pokud se endotoxiny tvoří v *substantia nigra*, porušují dopaminergní neurony a zvyšují riziko rozvoje PN. Důvodem kumulace toxinů právě v této oblasti může být jejich původ. Některé endotoxiny jsou metabolickými produkty dopaminu, tudíž se hromadí v místě jeho syntézy, tzn. v *substantia nigra*. Příkladem metabolické konverze molekul dopaminu na endotoxiny, které působí selektivně na dopaminergní neurony, je autooxidace dopaminu za vzniku chinonů, semichinonů nebo 6-hydroxydopaminu (6-OHDA).<sup>4</sup>

Nejvíce se však při endotoxickém poškození uplatňují volné radikály kyslíku. Jejich zdrojem je oxidativní deaminace dopaminu MAO-B doprovázená tvorbou peroxidu vodíku, který je za fyziologických podmínek neutralizován glutathionem. Pokud je v *substantia nigra* hladina glutathionu a glutathionperoxidázy snížena, reaguje peroxid vodíku s  $Fe^{2+}$  za vzniku volných radikálů kyslíku (hydroxylových radikálů). Volné radikály kyslíku jsou vysoce reaktivní a mohou poškozovat okolní tkáň především peroxidací lipidových membrán neuronů. Dochází tedy ke vzniku oxidačního stresu, který byl u pacientů s PN prokázán poklesem aktivity detoxikačních enzymů, zvýšenou lipoperoxidací, zvýšenou koncentrací reaktivní formy železa ( $Fe^{2+}$ ) a poklesem aktivity komplexu I a III dýchacího řetězce.<sup>3,4</sup>

## 2.3 Genetické vlivy

Z pohledu dědičnosti můžeme PN rozlišit na dvě formy – sporadickou a familiární (dědičnou). Sporadická forma PN se vyskytuje u většiny případů a její vznik je dán souhrou velkého množství vlivů (vnějšího prostředí, metabolických i genetických abnormalit). Familiární forma představuje 5-10 % z celkového počtu onemocnění a je podmíněná především

mutacemi genu, které přímo způsobují PN. U familiární formy je vyšší riziko přenosu onemocnění na potomky.<sup>2</sup>

Polymorfismy genů související se vznikem PN jsou považovány za rizikové faktory, které mohou způsobit onemocnění pouze po interakci s dalším rizikovým faktorem. Přítomnost vlastní mutace však také nemusí bezpodmínečně znamenat vznik PN, přestože je u ní nebezpečí výrazně vyšší. O projevu mutace ve fenotypu rozhoduje míra jejího uplatnění v patogenezi.<sup>5</sup>

Dědičnost PN je monogenní a zpravidla se řídí Mendelovými zákony. Mezi nejlépe prostudované geny děděné autozomálně dominantně patří SNCA, LRRK2, GBA, VPS35 a mezi geny děděné autozomálně recesivně PRKN a PINK1.<sup>5,6</sup>

## **2.3.1 Autozomálně dominantní dědičnost**

### **2.3.1.1 SNCA**

Prvním popsáním lokusem pro PN byl PARK1, ve kterém se nachází gen SNCA kódující  $\alpha$ -synuklein (v případě duplikace nebo triplicace genu se lokus označuje symbolem PARK4). Základní hypotéza uvádí, že mutacemi tohoto genu se zvýšila jeho funkce, která ovlivnila agregační potenciál  $\alpha$ -synukleinu.<sup>5,7</sup>

### **2.3.1.2 LRRK2**

Gen LRRK2 (s lokusem PARK8) kóduje velký multifunkční protein, přičemž nejvýznamnější funkci zastává je jeho kinázová doména. Neurotoxický účinek se připisuje zvýšené kinázové aktivitě proteinu v důsledku mutace zvyšující funkci LRRK2. Je spojována s degenerací striatonigrálního komplexu a tvorbou Lewyho tělísek. Protein LRRK2 se také podílí na vezikulárním transportu prostřednictvím fosforylace Rab GTPáz (mozkové proteiny související s Ras obsahující guanosintrifosfatázovou doménu).<sup>6,7</sup>

### **2.3.1.3 GBA**

Gen GBA kóduje lysozomální enzym glukocerebrosidázu, která štěpí sfingolipid glukosylceramid na glukózu a ceramid. Mechanismus vlivu mutací GBA není zatím přesně objasněn. Existuje několik teorií, které zahrnují jak mechanismy navýšení funkce, tak i mechanismy ztráty funkce genu. Při zvýšení funkce GBA pravděpodobně dochází k usnadnění akumulace  $\alpha$ -synukleinu pomocí aberantní glukocerebrosidázy nebo k funkčnímu defektu lysozomu způsobující poruchu v drahách ubikvitin-proteazomového systému či autofágie. Případná ztráta funkce genu může také zapříčinit lysozomální dysfunkci, která vede k hromadění substrátu.<sup>6,7</sup>

#### 2.3.1.4 VPS35

Mutace v genu VPS35 (s lokusem PARK17) ukazuje na podíl vezikulární recyklace v patogenezi PN. Protein VPS35 je totiž složkou retromer komplexu, který se účastní třídění obsahu z endozomů do Golgiho aparátu.<sup>7</sup>

### 2.3.2 Autozomálně recesivní dědičnost

#### 2.3.2.1 PRKN

Nejčastější příčinou PN děděné autozomálně recesivně jsou mutace genu PRKN (s lokusem PARK2) kódující protein parkin. Parkin je E3 ligáza, která katalyzuje přenos ubikvitinu na specifické cílové proteiny. Přesná funkce parkinu ve vztahu k PN není zcela jasná, ale studie svědčí o jeho účasti při odstraňování poškozených mitochondrií v procesu mitofágie za přítomnosti proteinu PINK1.<sup>6,7</sup>

#### 2.3.2.2 PINK1

Gen PINK1 (s lokusem PARK6) kóduje protein s kinázovou aktivitou, který je lokalizovaný v mitochondriích. Jeho role ve spojení s PN je opět nejasná, ale pravděpodobně je se spolu s proteinem parkin zapojen do procesu aktivace mitofágie.<sup>6,7</sup>

### 2.3.3 Kodominance

Velice zajímavým a důležitým poznatkem je spojitost PN s geny imunitního systému pro molekuly HLA-DR (lidské leukocytární antigeny typu DR). Značí o možném podílu mikroglíí v patogenezi PN prostřednictvím aktivace zánětlivého procesu, který vede neurodegeneraci *substantia nigra*.<sup>2</sup>

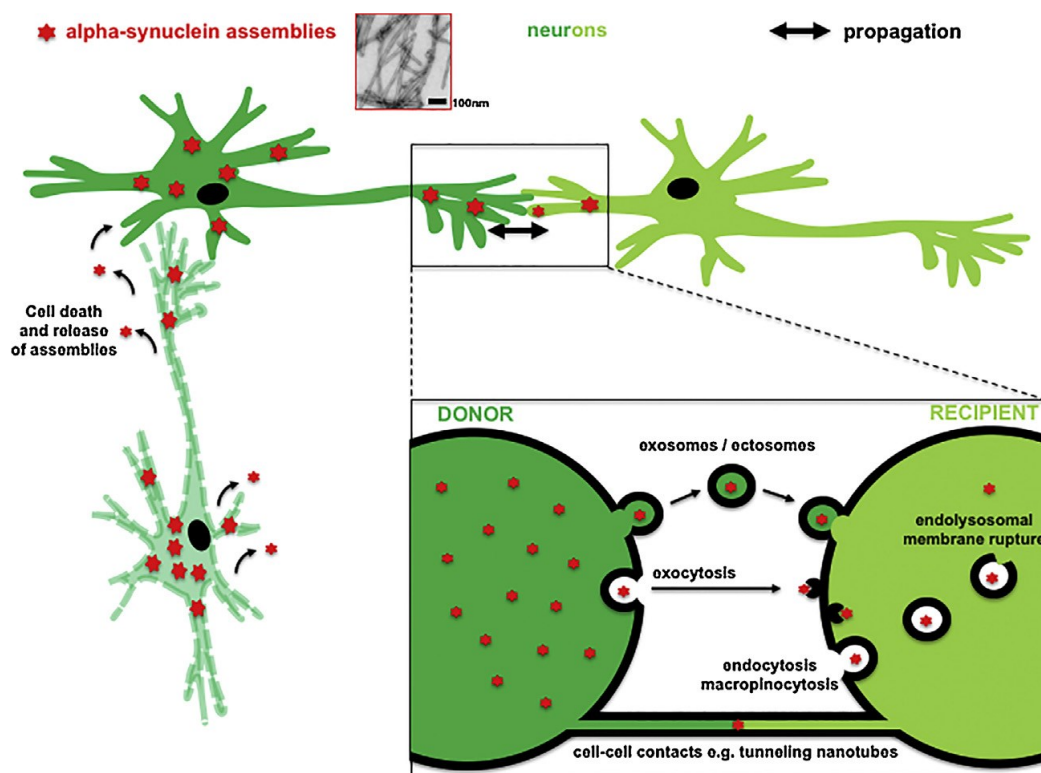
Molekuly II. třídy HLA-DR jsou přítomny na buňkách prezentující antigen, v mozku tedy na mikroglíích. Studie prokázaly zvýšenou expresi molekul HLA-DR v mozku a mozkomíšním moku u pacientů s PN. Trvalá přítomnost reaktivních mikroglíí v *substantia nigra* se objevila jak u pacientů s PN, tak u pacientů s MPTP indukovaným parkinsonismem.<sup>8,9</sup>

Zánětlivá reakce pravděpodobně dále působí na okolí pomocí specifických cytokinů, které potencují shlukování  $\alpha$ -synukleinu.<sup>2</sup>

## 2.4 Prionová hypotéza

Patologické chování abnormální molekuly  $\alpha$ -synukleinu můžeme přirovnat k chování infekčních bílkovin, prionů. Konformačně změněný  $\alpha$ -synukleín může sloužit jako templát, který vyvolá další konformační změny u normálních molekul a způsobí tak řetězovou reakci, která vede v neurodegeneraci. Abnormální molekuly  $\alpha$ -synukleinu mohou být navíc přenášeny z postižených neuronů na zdravé neurony a prohlubovat neurodegenerativní proces. (obr. 1)<sup>2, 10</sup>

Tato teorie je podporována řadou studií. Jednou z nich je *post mortem* studie, při které byly pacientům s pokročilou PN více než deset let před jejich smrtí transplantovány fetální mezencefalické buňky *substantia nigra*. U těchto pacientů se uvnitř transplantovaných neuronů objevily proteinové inkluze podobné Lewyho tělískům. Další experiment zastávající prionovou hypotézu byl proveden na myších, kterým se do striata implantovala předem připravená  $\alpha$ -synukleínová fibrila. V buňkách striata se také vytvořily agregáty podobné Lewyho tělískům. Zasažení části dopaminergních neuronů způsobilo pokles hladiny dopaminu ve striatu a u myši se projevilo motorickou poruchou.<sup>2, 10</sup>



**Obrázek 1: Šíření  $\alpha$ -synukleínových agregátů podobné prionovému šíření.<sup>11</sup>**

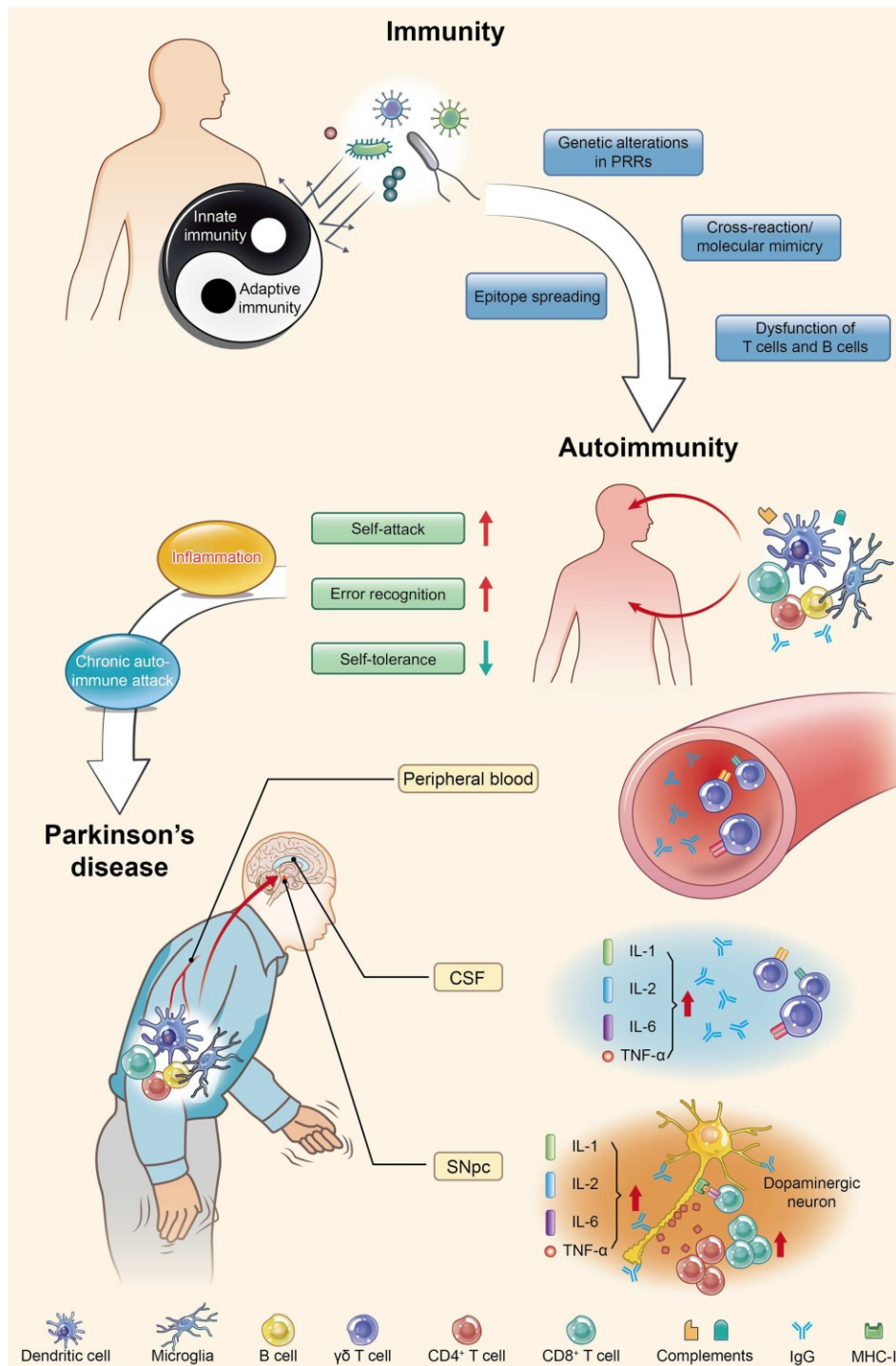
$\alpha$ -synukleínové agregáty (označené červeně) jsou uvolňovány zanikajícími neurony ("donory") a zachyceny nepostíženými, zdravými neurony ("recipienty"). Agregáty se mohou uvolňovat do okolí jako samotné molekuly nebo zůstat uvnitř exozomů. Navíc mohou být agregáty transportovány dovnitř buňky pomocí endocytózy, pinocytózy nebo pomocí buněčných kontaktů (např. synapsí) či membránových struktur (např. nanotubicemi tvořícími „tunel“ pro transportované molekuly).  $\alpha$ -synukleínové agregáty uvnitř endolysozomu způsobí prasknutí endolysozomální membrány, uvolní se do cytosolu, kde mohou dále růst a přeměňovat další normální molekuly  $\alpha$ -synukleinu.

### 3. AUTOIMUNITNÍ MECHANISMY

Původně se CNS považoval za oblast bez rizika napadení vlastním imunitním systémem, protože většina neuronů neexprimuje antigeny, které by rozpoznaly protilátky. Dnes však již známe neurologická onemocnění, jejichž příčinou jsou autoimunitní pochody (např. *sclerosis multiplex*, *myasthenia gravis*). Na základě určitých podobností s mechanismem vzniku roztroušené sklerózy a dále uvedených skutečností se proto uvažuje, že i PN by mohla být vyvolána chronickou aktivací imunitního systému. Předpokládá se, že spouštěcím mechanismem autoimunitních dějů je rozvoj neurozánětu vyvolaný faktory okolního prostředí (např. toxiny, genetickými vlivy), který může trvat desítky let a při neustálém poškozování neuronů mít za následek ireverzibilní degeneraci neuronů. (obr. 2)<sup>12, 13</sup>

Hlavními a prvními aktéry, které iniciují autoimunitní reakce a způsobují neurozánět u pacientů s PN jsou aktivované mikroglie a dendritické buňky. Přestože oba typy buněk vykonávají rozdílné úkony, vzájemně spolu kooperují a přispívají k rozvoji a šíření autoimunitního procesu prostřednictvím uvolňování cytokinů. Vystupují jako antigen prezentující buňky (APC) a aktivují T-lymfocyty, které zahájí imunitní odpověď spočívající v rozpoznání a zničení předkládajících antigenů.<sup>12</sup>

Aktivaci mikroglíí a dendritických buněk mohou u PN stimulovat různé podněty a pokud jsou takové podněty neustále k dispozici, může být aktivace trvalá a vyústit ve smyčku nepřetržitě probíhajících autoimunitních reakcí. Chronický zánět *substantia nigra* následně zapříčiní postupnou degeneraci dopaminergních neuronů a progresi PN.<sup>12</sup>



**Obrázek 2: Vznik autoimunity u Parkinsonovy nemoci.<sup>12</sup>**

Autoimunitní reakce se objeví v případě porušení imunitní homeostázy vnějšími či vnitřními vlivy. Mezi hlavní autoimunitní mechanismy patří alterace v genech pro tzv. „receptory rozpoznávající molekulární vzory“ (pattern recognition receptors), zkřížené imunitních reakce, dysfunkce T-lymfocytů a B-lymfocytů a fenomén tzv. „šíření epitopů“ (epitope spreading). Jejich působením dochází k poklesu imunitní tolerance, ke zvýšené destrukci vlastních antigenů a k chybnému rozpoznávání antigenů. Společně tyto děje vedou ke vzniku neurozánětu a chronického autoimunitního procesu, na jejichž podkladě se rozvíjí PN.

Použité zkratky: CSF – mozkomíšni mok, IL – interleukin, PRRs – receptory rozpoznávající molekulární vzory, SNpc – *substantia nigra pars compacta*, TNF – tumor nekrotizující faktor.

## 3.1 Úloha mikroglíí

Aktivované mikroglie jsou u PN důležitým markerem probíhajícího zánětu v CNS. Největší zastoupení mikroglíí nalezneme v *substantia nigra*, která jich obsahuje 4,5x více než ostatní části mozku. Za fyziologických podmínek jsou mikroglie v klidovém stádiu a jako fagocyty se podílí na selektivní redukci a přestavbě synapsí nezbytné pro správné fungování nervových drah. Pokud se v mozku rozvine patologický proces, jako je neurodegenerace u PN, mikroglie se aktivují, migrují k místu nervového poškození, fagocytují odumírající buňky a uvolňují prozánětlivé i protizánětlivé cytokiny a další mediátory zánětu. Morfologicky se aktivované mikroglie liší od jejich klidového stádia améboidním tvarem, zvětšeným tělem a syntézou buněčných povrchových receptorů *de novo*.<sup>14, 15</sup>

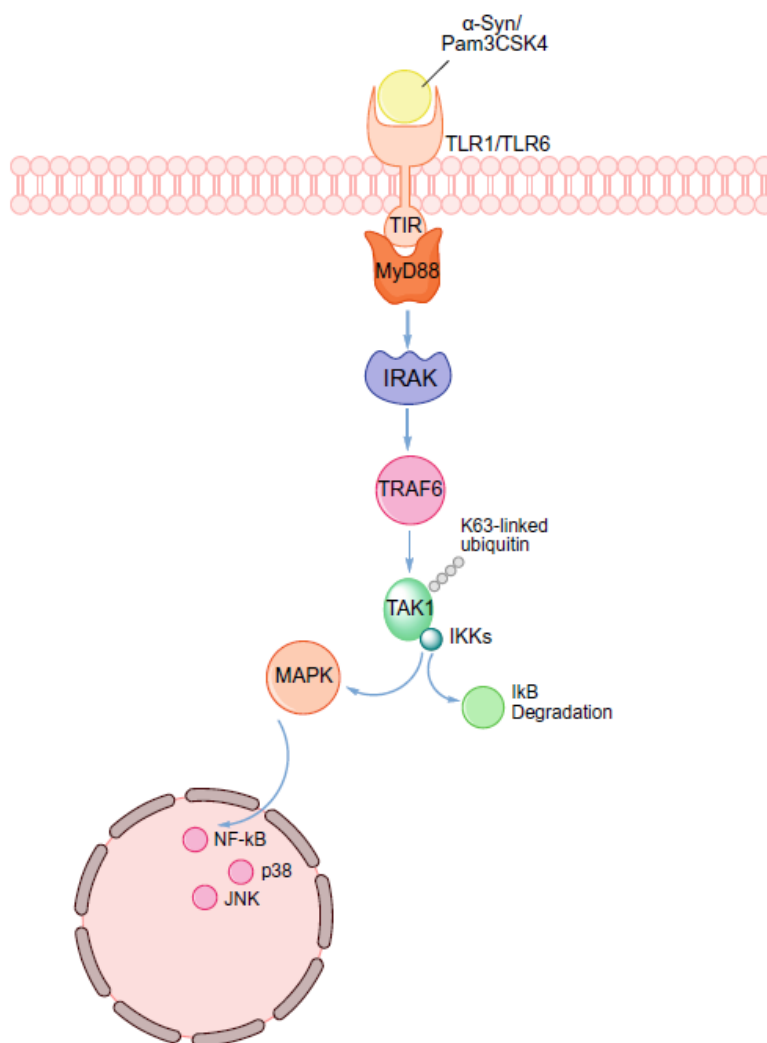
### 3.1.1 Aktivace mikroglíí $\alpha$ -synukleinem

#### 3.1.1.1 Molekulární úroveň

Jako všechny buňky přirozené imunity, mikroglie na svém povrchu exprimují PRR receptory (receptory rozpoznávající molekulární vzory), které odpovídají na vazbu PAMP (molekulární struktury spojené s patogeny) a DAMP (molekulární struktury spojené s poškozením) spuštěním intracelulární signalizační kaskády. Jedním typem receptorů PRR jsou receptory TLR (receptory typu Toll, také receptory podobné Toll), které se významně podílí na aktivaci mikroglíí. Tyto receptory váží ligandy na svoji N-terminální extracelulární doménu s repetitivy bohaté na leucin a přes C-koncovou intracelulární doménu TIR (receptor typu Toll pro interleukin 1) předávají informaci o navázání ligandu do nitra buňky.<sup>15, 16</sup>

Aktivace mikroglíí je u PN pravděpodobně zahájena navázáním  $\alpha$ -synukleinu na receptorový heterodimer TLR1/2, který rozpoznává  $\alpha$ -synukleín jako cizí antigen, PAMP nebo DAMP. Pomocí TIR domény interaguje s adaptorovým proteinem MyD88 (myeloidní diferenciací faktor 88), který aktivuje kinázový komplex IRAK (kináza spojená s receptorem pro interleukin-1). Kinázový komplex IRAK dále aktivuje faktor TRAF6 (faktor 6 spojený s receptorem pro tumor nekrotizující faktor) prostřednictvím K63-vázané auto-ubikvitinace. Tyto postupné signalizační děje zajišťují aktivaci kinázového komplexu TAK1 (kináza 1 aktivovaná transformujícím růstovým faktorem  $\beta$ ) a uvolnění kinázového komplexu IKK (I $\kappa$ B kinázový komplex), který zprostředkovává degradaci I $\kappa$ B $\alpha$  (inhibitor NF- $\kappa$ B) a aktivaci proteinkinázy MAPK (proteinkináza aktivovaná mitogenem). Aktivovaná proteinkináza MAPK umožňuje translokaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B (nukleární faktor kappa B), kinázy JNK (c-Jun N-koncová kináza) a proteinu p38 do jádra, čímž se iniciuje transkripce genů kódující mediátory zánětu a následná syntéza prozánětlivých cytokinů, chemokinů, adhezních molekul a indukovatelné syntázy oxidu dusnatého (iNOS). (obr. 3)<sup>15-18</sup>





**Obrázek 3: Signalizační kaskáda při aktivaci mikroglíí.<sup>15</sup>**

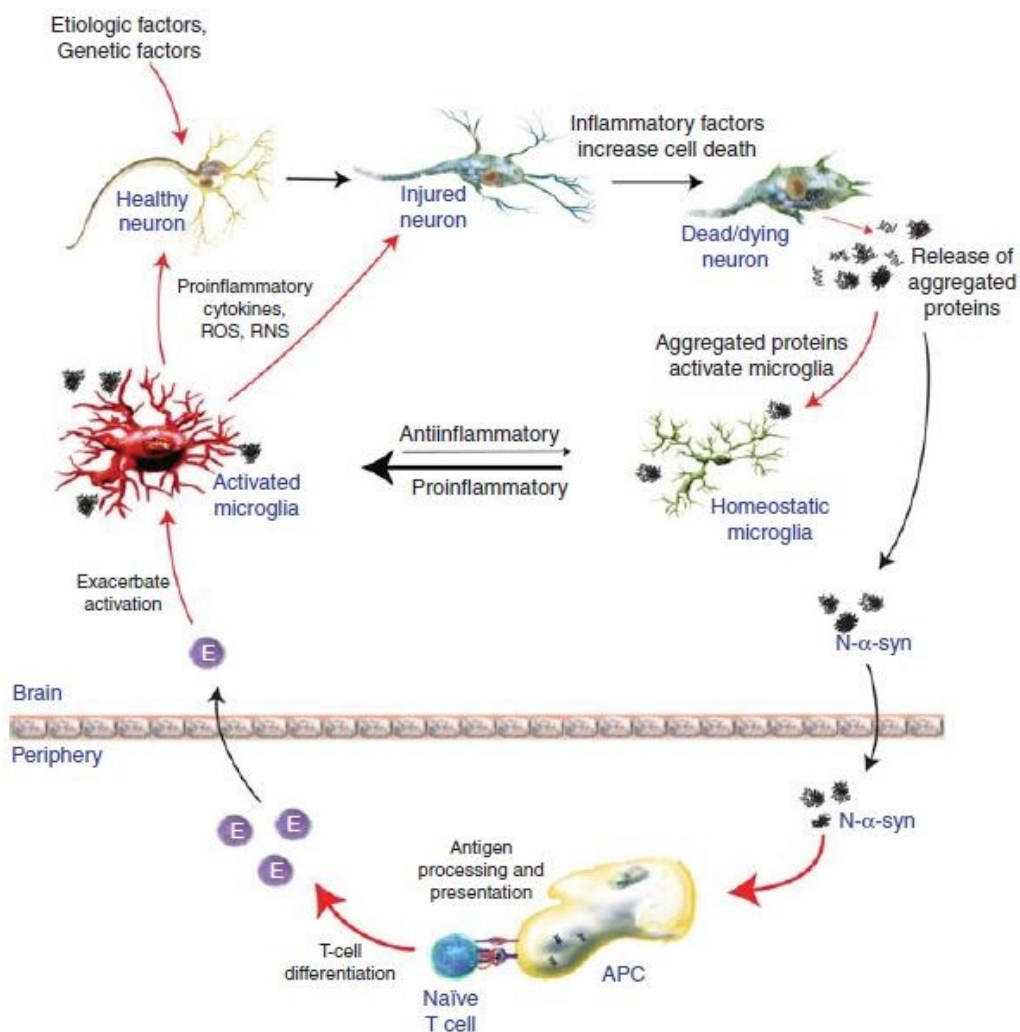
Ligandy jako je  $\alpha$ -synuklein nebo syntetický triacylovaný lipopeptid Pam3CSK4 spouští signalizační kaskádu uvnitř mikroglíí pomocí receptoru TLR2 a jeho koreceptoru TLR1 nebo TLR6. Informace o navázání  $\alpha$ -synukleinu je z receptorového heterodimeru TLR1/2 nebo TLR2/6 přenesena pomocí cytosolové TIR domény na adaptorový protein MyD88 do intracelulárního prostředí. Prostřednictvím MyD88 se aktivuje kinázový komplex IRAK, který zajišťuje aktivaci faktoru TRAF doprovázenou K63-vázanou auto-ubikvitinací. Celá tato kaskáda vede k aktivaci kinázového komplexu TAK1 a uvolnění kinázového komplexu IKK, který zprostředkovává degradaci I $\kappa$ B $\alpha$  a aktivaci proteinkinázy MAPK. Po aktivaci proteinkinázy MAPK dochází k nukleární translokaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B, kinázy JNK a proteinu p38 a následnému zahájení exprese genů kódující cytokiny.

Použité zkratky: I $\kappa$ B $\alpha$  – inhibitor NF- $\kappa$ B, IKK – I $\kappa$ B kinázový komplex, IRAK – kináza spojená s receptorem pro interleukin-1, JNK – c-Jun N-koncová kináza, MAPK – proteinkináza aktivovaná mitogenem, MyD88 – myeloidní diferenační faktor 88, NF- $\kappa$ B – nukleární faktor kappa B, TAK1 – kináza 1 aktivovaná transformujícím růstovým faktorem  $\beta$ , TIR – receptor typu Toll pro interleukin 1, TLR – receptor typu Toll, TRAF6 – faktor 6 spojený s receptorem pro tumor nekrotizující faktor,

### 3.1.1.2 Systémová úroveň

Během neurodegenerace u PN se z poškozených neuronů uvolňují do extracelulárního prostředí molekuly  $\alpha$ -synukleinu. Při nadměrné expresi  $\alpha$ -synukleinu nebo tvorbě jeho aberantní formy (např. nitrace  $\alpha$ -synukleinu) dochází k aktivaci mikroglíí a ke změně jejich funkce. Začnou fagocytovat agregáty  $\alpha$ -synukleinu a uvolňovat prozánětlivé cytokiny a chemokiny, které zvyšují permeabilitu HEB a přitahují T-lymfocyty a B-lymfocyty k poraněným neuronům. Produkci iNOS zvyšují aktivované mikroglie nitraci  $\alpha$ -synukleinu a udržují tak zánětlivý proces. Nitrátovaný  $\alpha$ -synuklein může zároveň vystupovat z CNS do lymfatických uzlin, kde aktivuje APC buňky (např. dendritické buňky). T-lymfocyty rozpoznají  $\alpha$ -synuklein prezentovaný APC buňkami jako cizí antigen, čímž přispívají k aktivaci mikroglíí a zesilují autoimunitní odezvu. (obr. 4)<sup>13, 14</sup>

$\alpha$ -synuklein může být také rozpoznán prostřednictvím fenoménu tzv. „šíření epitopů“ nebo molekulárních mimikrů, při nichž jako první vyvolá imunitní odpověď jiný antigen, který je ale strukturně podobný  $\alpha$ -synukleinu. Na základě molekulové podobnosti s primárním antigenem imunitní systém rozpozná  $\alpha$ -synuklein, který je rozšířen po celém těle a může podléhat různým imunitním reakcím.<sup>17</sup>



**Obrázek 4: Stimulace autoimunitní reakce  $\alpha$ -synukleinem.<sup>13</sup>**

Působením určitých vlivů z vnějšího prostředí může dojít k poškození neuronů. Při jejich odumírání se uvolňují do okolí modifikované a agregované proteiny (např.  $\alpha$ -synuklein), které aktivují mikroglie. M1 neurotoxické mikroglie fagocytují  $\alpha$ -synuklein a produkují prozánětlivé cytokiny a reaktivní formy kyslíku (ROS), čímž zvyšují propustnost HEB pro lymfocyty z periferie. Nitrátovaný  $\alpha$ -synuklein může navíc pronikat do periferie, kde aktivuje APC buňky (např. dendritické buňky). APC buňky předkládají  $\alpha$ -synuklein naivním T-lymfocytům, které se diferencují v efektorové T-lymfocyty a zesilují mikrogliaální aktivaci a neurodegeneraci.

Použité zkratky: APC – antigen prezentující buňky, E – efektorové T-lymfocyty, N- $\alpha$ -syn – nitrátovaný  $\alpha$ -synuklein

### 3.1.2 Regulace mikrogliaálního zánětu

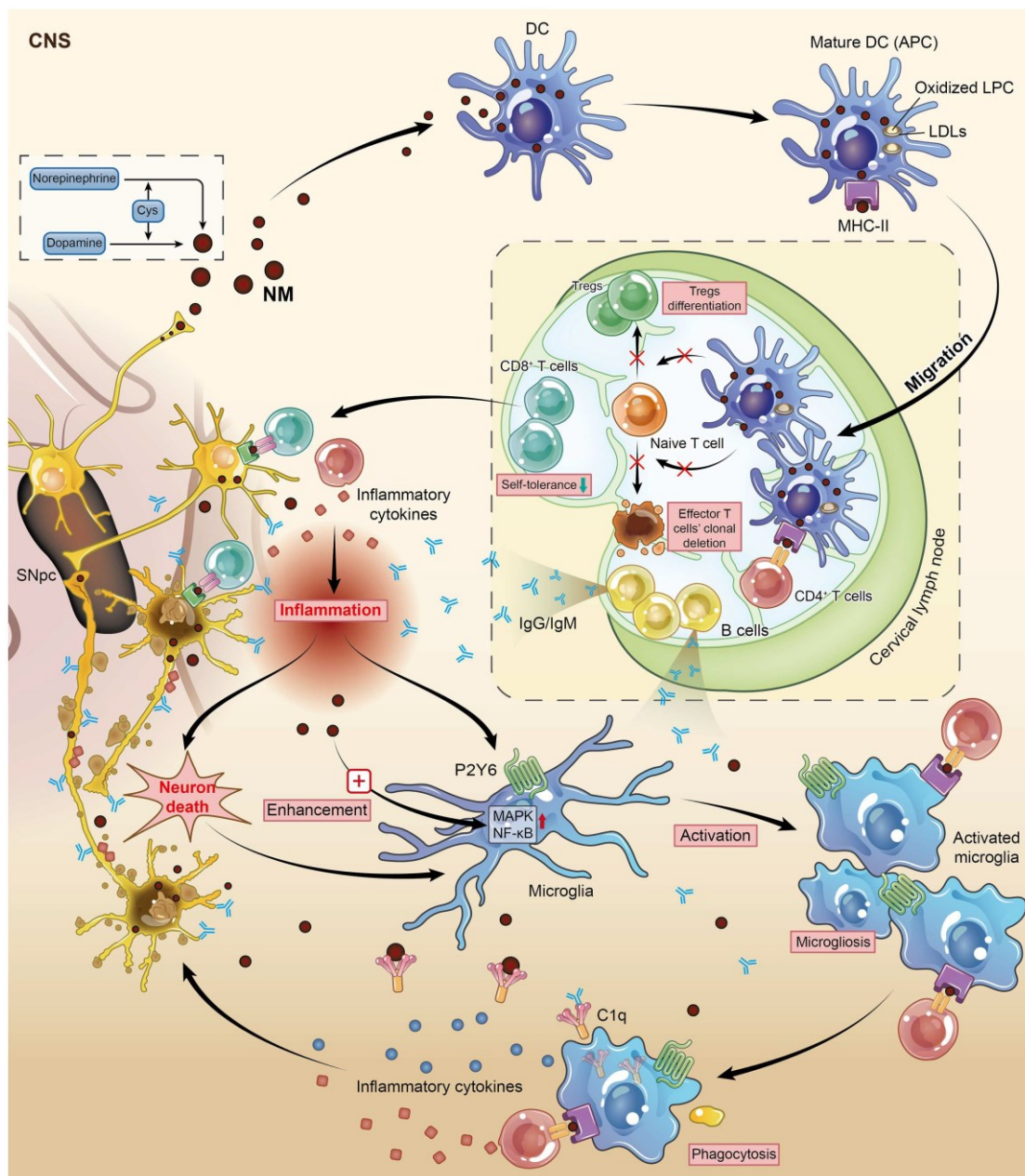
Pomocí cytokinů regulují mikroglie nejen specifickou imunitu, ale i nervové funkce a homeostázu. V závislosti na typu produkovaných cytokinů můžeme aktivované mikroglie rozlišit na M1 neurotoxický typ a M2 neuroprotektivní typ. Mikroglie typu M1 secernují prozánětlivé cytokiny zahrnující interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin 6 (IL-6) a tumor nekrotizující faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) a jsou zodpovědné za úbytek dopaminergních neuronů. Naopak mikroglie typu M2 vylučují protizánětlivé cytokiny jako jsou interleukiny IL-4, IL-13, IL-10 a transformující růstový faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), čímž zmírňují neurozánět a urychlují obnovu nervové tkáně. Ve výsledku aktivované mikroglie při raném stádiu PN působí protichůdnými efekty – jednak zvyšují neurodegeneraci a zároveň podporují přežívání neuronů. Pokud však mikrogliaální zánět trvá dlouhodobě, převládne neurotoxický účinek mikroglíí a degenerace dopaminergních neuronů se zesílí.<sup>13, 15</sup>

## 3.2 Úloha dendritických buněk

Dendritické buňky se nachází poblíž mozkomíšního moku, odkud mohou migrovat do krčních lymfatických uzlin. Za fyziologických podmínek se dendritické buňky vyskytují v CNS jen v minimálním množství, ale při zánětu se zde jejich počet zvyšuje.<sup>19</sup>

O konkrétní funkci, kterou dendritické buňky vykonávají, rozhoduje jejich vývojové stádium. Nevyzrálé dendritické buňky inhibují funkci T-lymfocytů pomocí regulačních T-lymfocytů (Treg lymfocyty), čímž zabraňují autoimunitním reakcím a udržují imunitní homeostázu. Během maturace dendritických buněk se prostřednictvím zvýšené exprese HLA molekul na jejich membráně začíná více uplatňovat jejich imunogenní funkce. Migrují do lymfatických uzlin, ve kterých aktivují T-lymfocyty.<sup>12, 20</sup>

V dopaminergních neuronech se po interakci dopaminu a noradrenalinu s cysteinem tvoří pigment neuromelanin jako sekundární produkt metabolismu. U PN se při zániku dopaminergních neuronů vyplavuje neuromelanin do extracelulárního prostředí, kde může vystupovat jako autoantigen. Uvolněný neuromelanin je fagocytován dendritickými buňkami, čímž stimuluje jejich maturaci a funkční aktivaci. Touto stimulací se do autoimunitní odezvy zapojují složky získané imunity. Zralé dendritické buňky migrují z CNS do krčních lymfatických uzlin, kde předkládají neuromelanin jako autoantigen naivním („panenským“) T-lymfocytům, které následně potencují aktivaci mikroglíí. (obr. 5)<sup>12, 19, 20</sup>



**Obrázek 5: Stimulace autoimunitní reakce neuromelaninem.<sup>12</sup>**

Nezralé dendritické buňky fagocytují neuromelanin uvolněný z odumírajících neuronů. Fagycitovaný neuromelanin stimuluje maturaci dendritických buněk, které migrují do krčních lymfatických uzlin. Zde předkládají neuromelanin naivním a pomocným T-lymfocytům, které aktivují B-lymfocyty k produkci protilátek IgG/IgM. Zároveň je porušena diferenciace regulačních T-lymfocytů a eliminace efektorových T-lymfocytů, čímž se snižuje imunitní tolerance. Neuromelanin a cytokiny produkované pomocnými T-lymfocyty také přispívají k aktivaci mikroglíí. Na základě zvýšené translokace NF- $\kappa$ B do mikroglíálního jádra se zintenzivní sekrece prozánětlivých cytokinů a další progresse zánětu a neurodegenerace.

Použité zkratky: APC – antigen prezentující buňka, CNS – centrální nervový systém, Cys – cystein, DC – dendritické buňky, Ig – imunoglobulin, LDLs – lipoproteiny s nízkou hustotou, LPC – lysosofatidylcholin, MAPK – proteinkináza aktivovaná mitogenem, MHC-II – molekuly hlavního histokompatibilního komplexu II. třídy, NF- $\kappa$ B – nukleární faktor kappa B, NM – neuromelanin, P2Y6 – purinergní receptor, SNpc – *substantia nigra pars compacta*, Tregs – regulační T-lymfocyty

## 3.3 Další úlohy nespecifické buněčné imunity

### 3.3.1 Pyroptóza

Pyroptóza představuje typ programované buněčné smrti, která je indukovaná prozánětlivými signály. Hlavní úlohu v tomto ději zastává inflamazóm obsažený v různých typech buněk včetně mikroglíí. Inflamazóm je intracelulární multiproteinový komplex tvořený především cytosolovými senzory patřící do skupiny NLR (receptory podobné NOD) a kaspázou 1. Pomocí těchto senzorů deteguje PAMP a DAMP. U PN je aktivace inflamazómu zprostředkována aktivací mikroglíí po navázání  $\alpha$ -synukleinu na jejich receptor TLR2 nebo TLR4. Samotný inflamazóm rozpoznává  $\alpha$ -synuklein prostřednictvím receptoru podobnému NOD obsahující pyrinovou doménu 3 (NLRP3), čímž se aktivuje kaspázová doména. Kaspáza 1 následně štěpí pro-interleukin 1 $\beta$  (pro-IL-1 $\beta$ ) a pro-interleukin 18 (pro-IL-18) na funkční interleukiny IL-1 $\beta$  a IL-18, které spouští zánětlivý proces.<sup>21,22</sup>

### 3.3.2 Imunoexcitotoxicita

Excitotoxicita je jev, při kterém dochází k odumírání neuronů kvůli nadměrné stimulaci receptorů pro excitační aminokyselinu L-glutamát. V rámci PN působí imunoexcitotoxicky cytokiny IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$ , které uvolňují mikroglie aktivované  $\alpha$ -synukleinem. Tyto cytokiny zvyšují hustotu glutamátových receptorů pro  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionovou kyselinu (AMPA) a pro N-methyl-D-aspartát (NMDAR). Zároveň stimulují produkci excitotoxického glutamátu na základě modulace glutaminázy a inhibice glutamátových transportních proteinů, tudíž zvyšují hladinu extracelulárního glutamátu. Nadměrnou aktivací glutamátových receptorů, především receptoru AMPAR, který je propustný pro vápník, také výrazně zvyšují intracelulární koncentraci vápníku. V důsledku zvýšeného influxu vápníku do buněk jsou pak dopaminergní neurony náchylnější k degeneraci.<sup>21</sup>

### 3.4 Úloha specifické humorální imunity

Přestože protilátky proti antigenům dopaminergních neuronů se nacházejí v séru a mozkomíšním moku u pacientů s PN, studium podílu humorální imunity na vzniku PN je teprve na svém počátku a vyžaduje další pozornost.<sup>13</sup>

Předpokládá se, že nadměrné množství  $\alpha$ -synukleinu vyvolává expresi specifického antigenu, který spouští generaci protilátek IgG (imunoglobulin G). Mikroglie vážou IgG přes svůj membránový receptor Fc- $\gamma$  a zahajují tak signalizační kaskádu vedoucí k mikroglální aktivaci a následnému poškození neuronů v *substantia nigra*.<sup>12</sup>

Řada studií *in vitro* a *in vivo* také potvrdila, že syntetické protilátky jsou schopné vázat se na dopaminové receptory a způsobit tak kompetitivní inhibici receptorů vůči vazbě k jejich přirozenému agonistovi.<sup>23, 24</sup>

Výzkum Benklera et al.<sup>24</sup> poukázal na možnou souvislost mezi rozvojem typických příznaků PN a přítomností specifických autoprotilátek v séru pacientů s PN. Během studie se testovalo celkem 77 pacientů s PN na přítomnost protilátek proti nervovým buňkám, mozkovému lyzátu, dsDNA (dvouvláknové deoxyribonukleové kyselině), fosfatidylserinu, kardiolipinu, serotoninu a melanocytům. Z celkového počtu pacientů s PN bylo 35,1 % pozitivních alespoň na jednu autoprotilátku v porovnání se zdravými pacienty. Nejčastěji se u séropozitivních pacientů vyskytly příznaky dyskineze a deprese, které byly asociované s detekcí výrazně zvýšených titrů protilátek proti dsDNA a mozkovému lyzátu.

Výzkum Brudeka et al.<sup>25</sup> zjistil potenciální protektivní účinek přirozených autoprotilátek ve vztahu k PN. Přirozené autoprotilátky chrání organismus na základě blokace a odstraňování patologických proteinů jako je  $\alpha$ -synuklein. Výsledky studie ukázaly, že u pacientů s PN je plazmatická koncentrace vysokoafinitních anti- $\alpha$ -synukleinových přirozených autoprotilátek snížena. Proto se můžeme domnívat, že pacienti s PN mají porušenou schopnost eliminovat účinek patologického  $\alpha$ -synukleinu z důvodu nedostatečné koncentrace anti- $\alpha$ -synukleinových přirozených autoprotilátek.

### 3.5 Úloha nespecifické humorální imunity

*Post mortem* studie u pacientů s PN také odhalily přítomnost C1q složky komplementu na povrchu extracelulárního neuromelaninu. Tato skutečnost ukazuje na možné zapojení komplementu aktivovaného klasickou cestou do zánětlivého procesu u PN. Opsonizace neuromelaninu C1q je zprostředkována buď předchozím navázáním protilátek rozpoznávající neuromelanin, které interagují s C1q nebo přímou vazbou C1q složky na neuromelanin. Za přítomnost C1q v *substantia nigra* jsou zodpovědné mikroglie, které jsou jedinými buňkami v této oblasti schopné exprimovat iniciační složku komplementové kaskády.<sup>12, 13, 20</sup>

## 3.6 Regulace autoimunitních reakcí prostřednictvím cytokinů

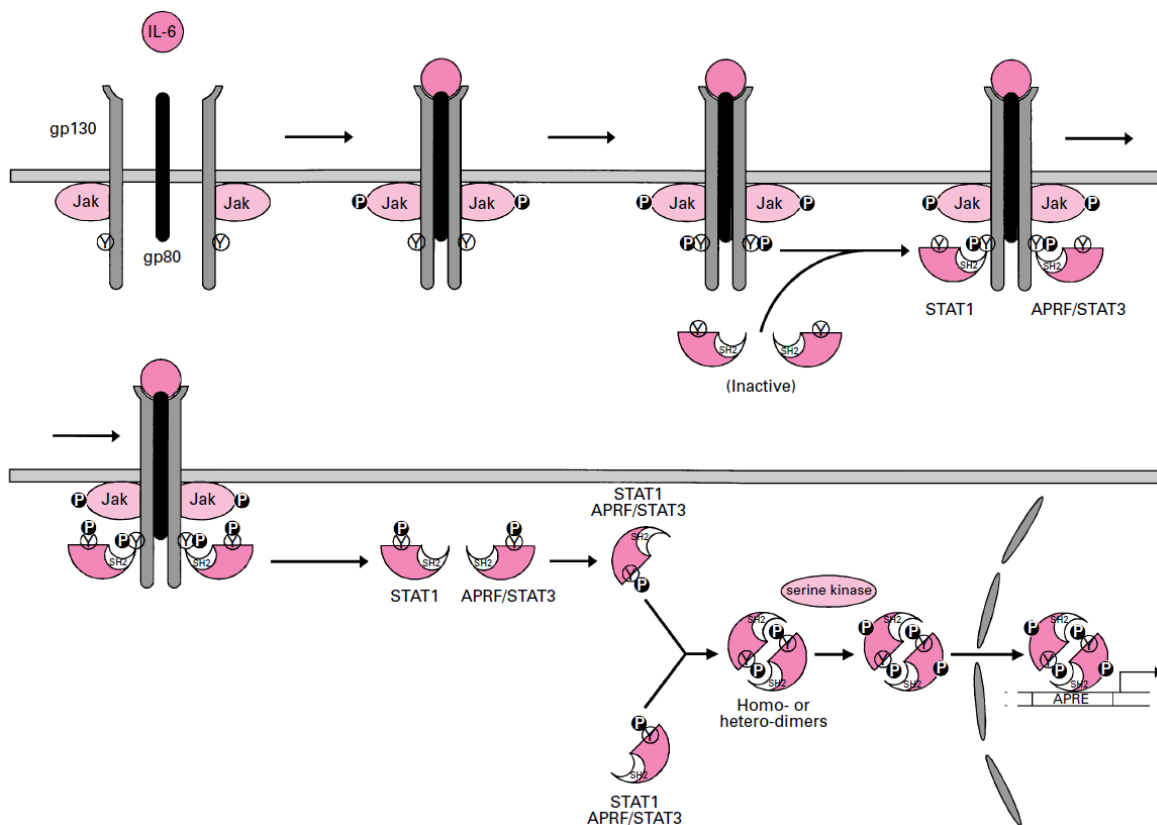
### 3.6.1 Signální dráha JAK/STAT

Produkce cytokinů je stimulována mimo výše zmíněné aktivace transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B také pomocí signální dráhy JAK/STAT (signální dráha, které se účastní Janusovy kinázy, signální transduktory a aktivátory transkripce). Dysregulace v rámci této dráhy s velkou pravděpodobností také přispívá k autoimunitnímu procesu u PN.<sup>26</sup>

V séru pacientů s PN se nachází zvýšené koncentrace cytokinů IFN- $\gamma$  (interferon  $\gamma$ ) a IL-6, které představují jedny z nejúčinnějších aktivátorů JAK/STAT signální dráhy. Proto se můžeme domnívat, že především tyto cytokiny spouští u PN signalizaci JAK/STAT. Navázáním cytokinu na příslušný tyrosinkinázový membránový receptor se změní jeho konformace, čím se aktivuje JAK. Aktivované JAK fosforylují tyrozinový zbytek na cytosolové doměně cytokinového receptoru a poskytují tak vazebné místo pro STAT. STAT se váží na fosforylovanou část receptoru přes svoji SH2 doménu (Src homologní 2 doména) a pomocí JAK jsou fosforylovány na svých tyrozinových zbytcích. Aktivované STAT se uvolní z receptoru a v cytoplazmě tvoří homodimery nebo heterodimery prostřednictvím SH2-fosfátových interakcí. Z cytoplazmy se STAT dimery translokují do jádra, ve kterém se váží na cílovou promotorovou část DNA a zahajují genovou expresi a syntézu cytokinů. (obr. 6)<sup>26-28</sup>

V signální dráze JAK/STAT se u PN uplatňuje především protein STAT3. Přesná úloha STAT3 není zcela jasná, ale existují důkazy o jeho podílu na různých dějích. Zatímco některé studie ukazují, že aktivace STAT3 má za následek expresi genů, které postupně potlačují transkripci genů pro prozánětlivé cytokiny, tudíž potlačují zánětlivou reakci, jiné studie prokázaly schopnost STAT3 indukovat apoptózu. Aktivace STAT3 pravděpodobně vede k programované smrti dopaminergních neuronů pomocí aktivace transkripce genů regulujících apoptózu jako jsou geny kódující Fas receptor (receptor prvního apoptotického signálu), kaspázy, protein Bcl-xL (protein související s velkobuněčným B-lymfomem) a cytokin TRAIL (TNF-příbuzný ligand indukující apoptózu).<sup>18, 26, 29</sup>





**Obrázek 6: JAK/STAT signální dráha.<sup>28</sup>**

IL-6 se naváže na svůj cytokinový receptor IL-6R, konkrétně na jeho podjednotku Gp80. Touto vazbou dojde ke změně prostorového uspořádání receptoru a k propojení dvou dalších podjednotek Gp130 v homodimer. Změna konformace receptoru vede k aktivaci JAK kináz, které fosforylují receptor v místě, na něž se váží STAT1 a STAT3. Obě navázané molekuly STAT na fosforylovaná místa receptoru jsou fosforylovány a aktivovány JAK kinázami. Po uvolnění aktivovaných molekul STAT z receptoru podléhají molekuly STAT v cytoplasmě dimerizaci. Dimery STAT vstupují do jádra a iniciují transkripci příslušných genů.

Použité zkratky: APRE – element odpovědi akutní fáze, APRF – faktor odpovědi akutní fáze, Gp – glykoprotein, IL – interleukin, JAK – Janusova kináza, P – fosfát, SH2 – Src homologní 2 doména, STAT – přenašeče signálu a aktivátory transkripce, Y – tyrozin

## 3.6.2 Účinky jednotlivých cytokinů

### 3.6.2.1 IL-1

IL-1 je jeden z hlavních prozánětlivých cytokinů a u PN se exprimuje ve zvýšené míře. Existuje ve dvou izoformách, IL-1 $\alpha$  a IL-1 $\beta$ , které vykonávají podobné biologické funkce jako je aktivace T-lymfocytů, indukce exprese dalších prozánětlivých cytokinů a exprese adhezních molekul.<sup>30, 31</sup>

Přestože se IL-1 považuje za prozánětlivý cytokin, některé studie ukazují, že za určitých podmínek může mít i neuroprotektivní účinek. Výzkum, který využil adenovirový vektor pro produkci IL-1 $\beta$ , zjistil, že trvalá exprese IL-1 $\beta$  v *substantia nigra* vede k aktivaci mikroglíí, k nevratné degeneraci dopaminergních neuronů a k motorickým projevům jako je např. akineze. Na druhou stranu IL-1 $\beta$  může mít při akutním zánětu i neuroprotektivní účinek, který zprostředkovává na základě stimulace sekrece neurotrofního faktoru odvozeného od gliových buněk (GDNF) z astrocytů. Z těchto poznatků vyplývá, že trvalá, ale ne akutní exprese IL-1 $\beta$  má neurotoxický účinek na buňky *substantia nigra*.<sup>31-33</sup>

Tvorba IL-1 aktivovanými mikroglíemi vede také k aktivaci NADPH oxidázy (nikotinamid adenin dinukleotid fosfát oxidázy) a iNOS a k následné tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS). Vzniká tak oxidační stres, který poškozuje dopaminergní neurony v *substantia nigra*.<sup>30</sup>

### 3.6.2.2 TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  je prozánětlivý cytokin, na nějž jsou dopaminergní neurony extrémně citlivé. Jeho funkce je zprostředkována dvěma receptory TNF-R1 (receptor 1 pro TNF), který se vyskytuje ve většině tkání a TNF-R2 (receptor 2 pro TNF), který se nachází na imunocytech, oligodendrocytech a určitých podtypech neuronů.<sup>32, 33</sup>

Podobně jako IL-1 $\beta$  působí především prozánětlivě, nicméně za určitých podmínek může mít také ochranný efekt vůči neuronům. O jeho pozitivním nebo negativním účinku na neurony tedy rozhoduje jeho aktuální koncentrace a zdravotní stav jedince. Tento opačný efekt můžeme u PN pozorovat ve studii založené na inhibici TNF- $\alpha$ . Při inhibici TNF- $\alpha$  v raném stádiu poškození neuronů, např. v rámci týdne po podání 6-OHDA, se projevil neurotoxický účinek, tudíž TNF- $\alpha$  v této fázi pravděpodobně působil neuroprotektivně. V případě, že se inhibice TNF- $\alpha$  uskutečnila v pozdním stádiu poškození, např. mezi 7-15 dny po podání 6-OHDA, měla inhibice ochranný efekt, a tudíž TNF- $\alpha$  efekt neurotoxický. Další výzkumy také potvrdily, že při chronické expresi TNF- $\alpha$  dochází k zániku dopaminergních neuronů. Např. při studii využívající adenovirový vektor kódující TNF- $\alpha$ , který byl injekčně podán hrabošům do *substantia nigra*, se po 14 dnech inokulace adenoviru u hrabošů projevila kromě neurodegenerace i akineze. Pro shrnutí můžeme říct, že podle těchto výzkumů TNF- $\alpha$  způsobuje neurodegeneraci dopaminergních neuronů při jeho dlouhodobé tvorbě a dlouhodobém působení v *substantia nigra* nebo při jeho akutní, ale velmi vysoké expresi. Naopak nižší koncentrace TNF- $\alpha$  navozuje neuroprotektivní účinek proti 6-OHDA v *substantia nigra*.<sup>31, 32</sup>

TNF- $\alpha$  může také v *substantia nigra* prostřednictvím aktivace mikroglíí a jejich NADPH oxidázy a iNOS vyvolat oxidační stres. Vzniklé ROS pak lipoperoxidací a dalšími oxidačními ději poškozují dopaminergní nerony.<sup>30, 33</sup>

### 3.6.2.3 IL-6

IL-6 je neuropoetický cytokin zodpovědný za vývoj, obnovu a odumírání neuronů. Porucha regulace tvorby tohoto cytokinu může také přispívat k rozvoji PN.<sup>30, 32</sup>

Neurodegenerativní proces, na kterém se podílí IL-6, závisí na aktivaci dvou rozdílných signálních drah. Prvním typem této signální dráhy je tzv. klasická signalizace, která je zahájena vazbou IL-6 na Gp80 (glykoprotein 80) podjednotku cytokinového receptoru pro IL-6 (IL-6R). Následně proběhne propojení dvou dalších podjednotek tohoto receptoru Gp130 v homodimer. Tato změna konformace IL-6R spouští další dvě signální dráhy – výše popsanou JAK/STAT a MAPK/ERK (kináza regulovaná extracelulárním signálem).<sup>28, 32</sup>

Vzhledem k tomu, že IL-6R mají na svém povrchu pouze neutrofily, monocyty, makrofágy, některé subpopulace lymfocytů a jaterní buňky, nemohly by teoreticky ostatní buňky vázat IL-6 a být jím aktivovány. S IL-6 ale interaguje mnohem větší počet buněčných typů, a to na základě tzv. trans signalizace. Jedná se o signální dráhu, která je aktivována vazbou IL-6 na solubilní IL-6R (sIL-6R) v plazmě za vzniku komplexu IL-6/sIL-6R. Tento cirkulující komplex umožní vytvoření homodimerů Gp130 i v těch buňkách, které neexprimují IL-1R.<sup>28, 32</sup>

Dráha klasické signalizace řídí protizánětlivé a imunosupresivní pochody, zatímco dráha trans signalizace reguluje prozánětlivé děje. O konkrétním účinku IL-6 rozhoduje také jeho hladina v těle jedince a další specifické podmínky. Např. v případě nižší koncentrace IL-6, působí IL-6 protizánětlivě a podporuje přežívání neuronů. Naopak nadměrná exprese IL-6 zvyšuje schopnost adheze a migrace leukocytů, poškození HEB, aktivaci mikroglíí a produkci ROS. IL-6 tedy ve vysoké koncentraci vystupuje jako prozánětlivý mediátor a přispívá k degeneraci dopaminergních neuronů.<sup>30, 32</sup>

### 3.6.2.4 IFN- $\gamma$

IFN- $\gamma$  je vedle IL-6 dalším hlavním aktivátorem JAK/STAT signální dráhy u PN. Produkují ho T-lymfocyty a NK buňky (přirození zabíječi) a u pacientů s PN je jeho koncentrace v plazmě a mozku zvýšená. Podle výzkumu Barcia et al.<sup>34</sup> IFN- $\gamma$  zprostředkovává společně s TNF- $\alpha$  aktivaci mikroglíí a přispívá tak neurodegeneraci v *substantia nigra*.<sup>31</sup>

### 3.6.2.5 TGF- $\beta$

TGF- $\beta$  je významným regulátorem buněčného růstu, přežívání a apoptózy. *In vitro* studie ukázaly, že TGF- $\beta$  má v patogenezi PN neuroprotektivní funkci a reguluje aktivaci mikroglíí. Protizánětlivý účinek TGF- $\beta$  potlačuje prozánětlivé reakce aktivovaných mikroglíí.<sup>30, 31</sup>

### 3.6.2.6 CXCL<sub>1</sub>/Gro- $\alpha$

CXCL<sub>1</sub> (chemokinový ligand 1 s jednou aminokyselinou jinou než cystein značenou „X“ mezi dvěma N-terminálními cysteiny značené „C“) označovaný také jako Gro- $\alpha$  (růstem regulovaný onkogen  $\alpha$ ) je chemokin, který řídí diferenciaci prekursorů dopaminergních neuronů a zajišťuje jejich regeneraci.<sup>35</sup>

### 3.6.2.7 CXCL<sub>8</sub>/IL-8

CXCL<sub>8</sub> běžně známý jako IL-8 je chemokin, který působí chemotakticky na neutrofilu a přes HEB je přitahuje k místu zánětu. CXCL<sub>8</sub> se váže na receptor CXCR<sub>1</sub> s vysokou specifitou a na receptor CXCR<sub>2</sub> s nižší specifitou. CXCL<sub>8</sub> produkují kromě jiných buněk také aktivované mikroglie, které zároveň exprimují CXCR<sub>2</sub>, a tudíž poskytují pozitivní zpětnou vazbu pro udržení probíhajícího neurozánětu. Vazbou CXCL<sub>8</sub> na svůj receptor může CXCL<sub>8</sub> vyvolat interakce mezi mikroglie a dopaminergními neurony, čímž může přispívat k poruše dopaminergních neuronů.<sup>32, 35</sup>

### 3.6.2.8 CXCL<sub>10</sub>/IL-10

CXCL<sub>10</sub> známý také jako IL-10 je chemokin, který vykonává svoji chemotaktickou funkci pomocí vazby na svůj receptor CXCR<sub>3</sub>. Zároveň má CXCL<sub>10</sub> protizánětlivý účinek spočívající v inhibici prozánětlivých cytokinů IL-1 a TNF- $\alpha$  a v inhibici aktivace jejich receptorů. Experimenty na myším modelu PN vyvolané lipopolysacharidem naznačily, že CXCL<sub>10</sub> působí neuroprotektivně na základě inhibice mikroglie aktivace, čímž zmírňuje poškození dopaminergních neuronů.<sup>31, 35</sup>

### 3.6.2.9 CCL<sub>2</sub>/MCP-1

CCL<sub>2</sub> (chemokinový ligand 2 se dvěma přímo sousedícími cysteiny značené „C“ na N-konci) neboli MCP-1 (monocytový chemotaktický protein 1) je jeden z nejvíce se uplatňujících chemoatraktantů při zánětu. Vazbou na svůj receptor CCR<sub>2</sub> indukuje zánětlivé děje, které zahrnují zvýšení permeability HEB a migraci monocytů do CNS. Za normálních podmínek v mozku neprobíhá tvorba CCL<sub>2</sub>. Pokud je však mozek poškozen, spustí se exprese CCL<sub>2</sub> jako je tomu u PN. Zvýšená produkce CCL<sub>2</sub> vede k aktivaci mikroglie a polarizaci dalších makrofágů, které se podílí na progresi PN.<sup>32, 35</sup>

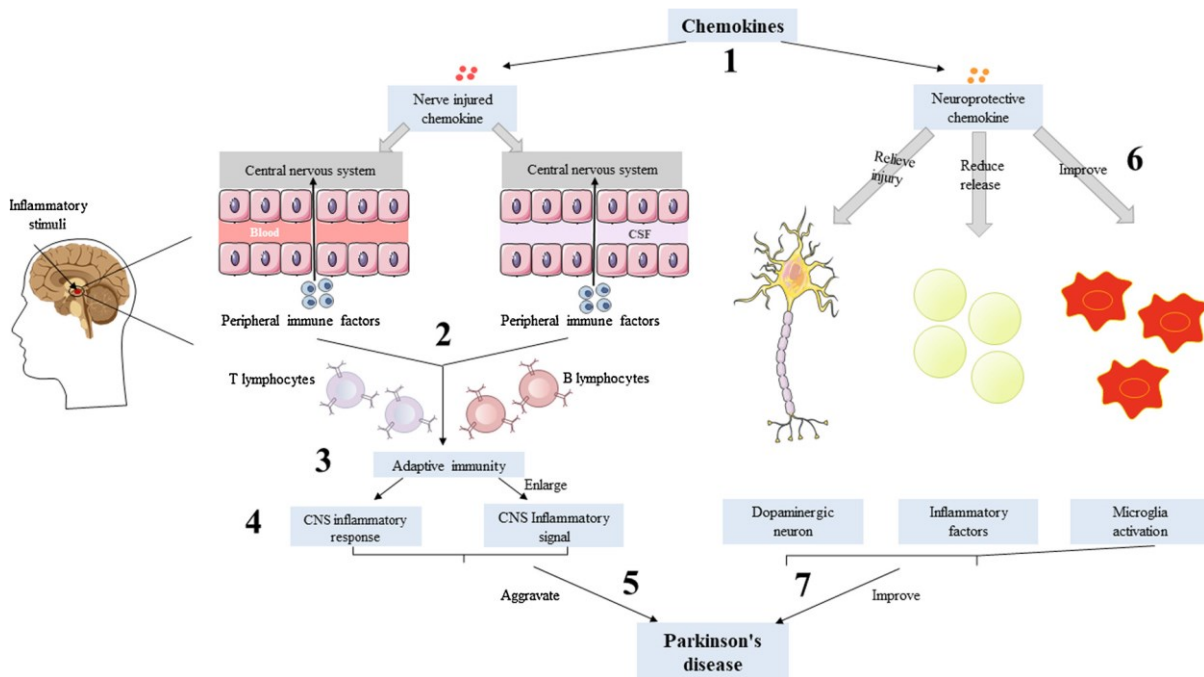
### 3.6.2.10 CLL<sub>5</sub>/RANTES

CLL<sub>5</sub> známější jako RANTES (chemokin exprimovaný, vylučovaný a regulovaný po aktivaci normálních T lymfocytů) je další chemokin, který se pravděpodobně účastní v patogenezi PN. Jeho neurotoxický efekt demonstroval výzkum Dutty et al.<sup>36</sup>, při němž se myším s PN vyvolanou MPTP podával dvakrát za týden rekombinantní RANTES. Výsledkem byla indukce infiltrace Th17 lymfocytů (pomocných T-lymfocytů produkující IL-17) do *substantia nigra* a zvýšení degenerace dopaminergních neuronů.<sup>35</sup>

### 3.6.2.11 CX<sub>3</sub>CL<sub>1</sub>/fraktalkin/neurotakin

CX<sub>3</sub>CL<sub>1</sub> (chemokinový ligand 1 se třemi aminokyselinami jinými než cystein značené „X“ mezi dvěma N-terminálními cysteiny značené „C“) označovaný také jako fraktalkin nebo neurotakin je chemokin vyskytující se ve dvou izoformách, které se obě váží na jejich specifický receptor CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub>. Solubilní forma CX<sub>3</sub>CL<sub>1</sub> vykonává úlohu klasického chemokinu a zesiluje aktivaci mikroglíí, monocytů, dendritických buněk a NK buněk, jejichž funkce dále řídí. Na membránu vázaná forma CX<sub>3</sub>CL<sub>1</sub> funguje jako adhezní molekula zajišťující zachycení leukocytů a jejich průnik do místa zánětu.<sup>35, 37</sup>

Existují důkazy svědčící o jak prozánětlivém, tak protizánětlivém účinku CX<sub>3</sub>CL<sub>1</sub> v patogenezi PN. Výzkum využívající myši model PN indukované  $\alpha$ -synukleinem dospěl k závěru, že u myši bez exprese CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub> došlo ke zmírnění neurozánětu na úrovni mikroglíální fagocytózy  $\alpha$ -synukleinových agregátů, k poklesu ukládání IgG a k poklesu exprese mikroglíálních HLA molekul II. třídy. Experimenty na myších s PN indukovanou 6-OHDA zjistily, že CX<sub>3</sub>CL<sub>1</sub> má naopak protektivní efekt spočívající v potlačení mikroglíální aktivity. (Obecná role chemokinů je popsána na obr. 7.)<sup>35, 38</sup>



**Obrázek 7: Role chemokinů u Parkinsonovy nemoci.<sup>35</sup>**

(1) Chemokiny zastávají u PN dvojí roli – působí jak neurotoxicky, tak i neuroprotektivně. (2) Aktivované mikroglie produkují neurotoxické chemokiny, které zvyšují permeabilitu HEB a chemotakticky atrahují lymfocyty do CNS. (3) Chemokiny a další zánětlivé mediátory stimulují získanou imunitu. (4) Složky získané imunity zesilují imunitní odpověď v CNS. (5) Vystupňovaný zánětlivý proces následně zhoršuje PN. (6) Aktivované mikroglie produkují také neuroprotektivní chemokiny, které naopak zmírňují mikroglíální aktivaci a poškození dopaminergních neuronů. (7) Účinek neuroprotektivních chemokinů zlepšuje stav pacienta s PN.

Použité zkratky: CNS – centrální nervová soustava, CSF – mozkomíšni mok, HEB – hematoencefalická bariéra, PN – Parkinsonova nemoc

## 4. ÚLOHA T-LYMFOCYTŮ

Hypotéza o úloze T-lymfocytů při rozvoji PN předpokládá, že autoantigeny z CNS mohou být transportovány do lymfatických uzlin, kde je fagocytují APC buňky a předkládají je naivním T-lymfocytům. T-lymfocyty jsou tak aktivovány a diferencují se do různých výkonných podskupin, které na základě chemotaxe migrují přes porušenou HEB do *substantia nigra*, kde mohou zastávat jak prozánětlivou, tak protizánětlivou roli.<sup>39</sup>

Podíl získané buněčné imunity na vzniku PN zahrnuje roli CD4+ T-lymfocytů, CD8+ T-lymfocytů i B-lymfocytů. Nejvýznamnější úlohu v patogenezi PN mají však CD4+ T-lymfocyty, které představují hlavní iniciátory neurozánětu v *substantia nigra*. Některé subpopulace CD4+ T-lymfocytů mohou po aktivaci specifickým antigenem stimulovat polarizaci mikroglíí do M1 neurotoxického typu následovanou sekrecí prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$ , čímž během PN potencují neurodegeneraci.<sup>40</sup>

### 4.1 Účinky aktivovaných T-lymfocytů

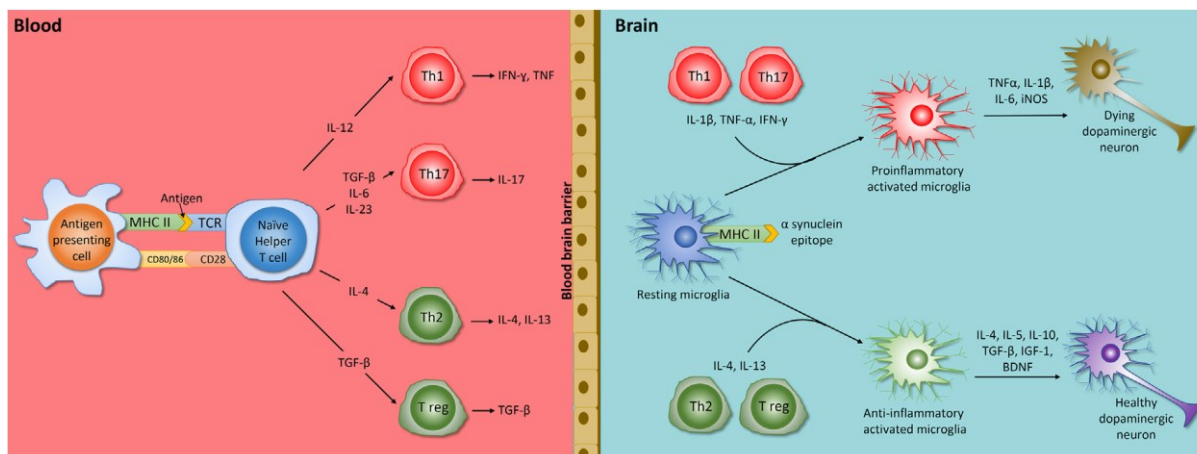
#### 4.1.1 CD4+ pomocné T-lymfocyty

Aktivace CD4+ pomocných T-lymfocytů (Th lymfocyty) probíhá na základě kontaktu jejich T-buněčných receptorů (TCR) s neuronálními antigeny předkládanými APC buňkami, jako jsou mikroglie a dendritické buňky, pomocí HLA molekul II. třídy. Th lymfocyty mohou vykonávat prozánětlivé či protizánětlivé funkce v závislosti na jejich diferenciaci. (obr. 8)<sup>21</sup>

Mezi prozánětlivé Th lymfocyty patří lymfocyty Th1 a Th17, které svými cytokiny podporují neurotoxický účinek mikroglíí typu M1 a makrofágů z periferie. Th1 lymfocyty indukují apoptózu neuronů pomocí sekrece prozánětlivých cytokinů TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  a IL-6. Th17 lymfocyty produkují IL-17, jehož zvýšená produkce a zvýšená odpověď jeho receptorů vede k zesílení funkce NF- $\kappa$ B, který zprostředkovává apoptózu neuronů.<sup>21, 39-41</sup>

Protizánětlivé Th lymfocyty zahrnují lymfocyty Th2 a Treg, které jsou zodpovědné za udržování imunitní tolerance. Th2 lymfocyty uvolňují protizánětlivé cytokiny IL-4, IL-5, a IL-10 a Treg lymfocyty protizánětlivé cytokiny TGF- $\beta$  a IL-10. Společně zmírňují neurotoxické působení mikroglíí typu M1 ve smyslu omezení jejich migrace, fagocytózy a produkce ROS. Zároveň oba typy lymfocytů stimulují mikroglie k produkci neurotrofních faktorů jako jsou např. inzulinu podobný růstový faktor 1 (IGF-1) a mozkový neurotrofní faktor (BDNF), čímž je transformují z jejich původního M1 neurotoxického fenotypu do M2 neuroprotektivního fenotypu. Lymfocyty Th2 a Treg tak zajišťují přežívání neuronů a obnovu nervové tkáně.<sup>39-41</sup>

CD4+ T-lymfocyty mohou také aktivovat B-lymfocyty, které se mění v plazmatické buňky produkující protilátky. Tyto protilátky se váží na mikroglíální receptory a zajišťují tak stimulaci mikroglíí k sekreci prozánětlivých cytokinů nebo se přímo váží na neuronální antigeny exprimované dopaminergními neurony, čímž spouští programovanou buněčnou smrt.<sup>21</sup>



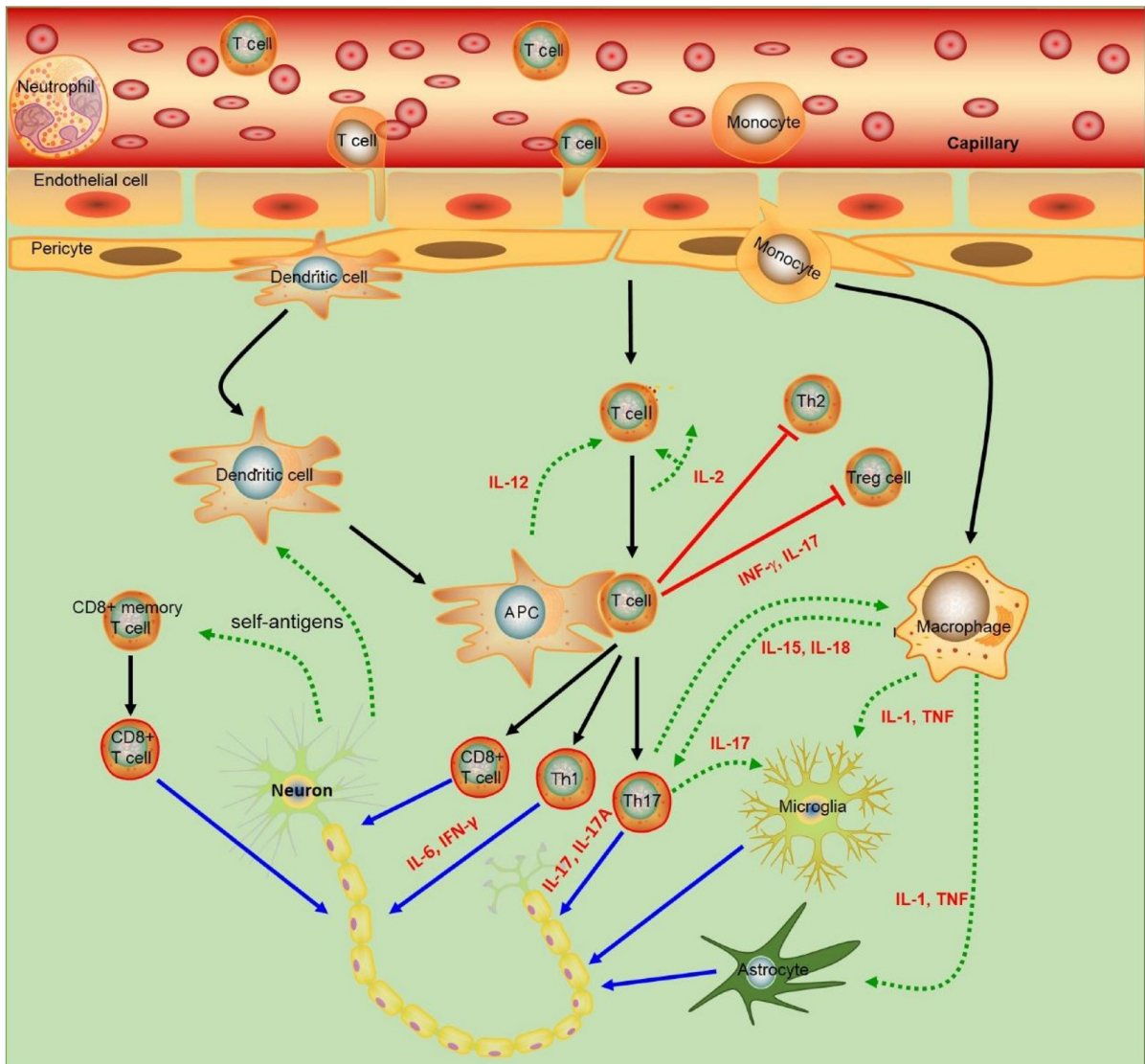
**Obrázek 8: Aktivace a diference naivních Th lymfocytů.<sup>41</sup>**

APC buňka prostřednictvím kontaktu HLA molekul II. třídy nesoucí neuronální antigen s TCR receptorem naivního Th lymfocytu aktivuje naivní Th lymfocyt, který se dále diferencuje do určitého výkonného podtypu a prostupuje přes HEB do *substantia nigra*. Th1 lymfocyty produkující IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a Th17 lymfocyty produkující IL-17 působí neurotoxicky a stimulují mikroglie k produkci prozánětlivých mediátorů TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 a iNOS, které zapříčiňují zánik dopaminergních neuronů. Na druhou stranu Th2 lymfocyty uvolňující IL-4, IL-13 a Treg lymfocyty uvolňující TGF- $\beta$  působí neuroprotektivně a aktivují produkci mikroglálních protizánětlivých mediátorů IL-4, IL-5, IL-10, TGF- $\beta$  a neurotrofních faktorů IGF-1, BDNF, které podporují přežívání dopaminergních neuronů.

Použité zkratky: APC – antigen prezentující buňky, BDNF – mozkový neurotrofní faktor, CD – povrchové znaky označující buňky, HEB – hematoencefalická bariéra, HLA molekuly II. třídy – lidské leukocytární antigeny II. třídy také označované jako MHC II – molekuly hlavního histokompatibilního komplexu II. třídy, IGF-1 – inzulinu podobný růstový faktor 1, IL – interleukin, IFN- $\gamma$  – interferon  $\gamma$ , iNOS – indukovatelná syntáza oxidu dusnatého, TCR – T-buněčný receptor, TGF- $\beta$  – transformující růstový faktor  $\beta$ , Th lymfocyty – pomocné T lymfocyty, TNF- $\alpha$  – tumor nekrotizující faktor  $\alpha$ , Treg – regulační T lymfocyty

#### 4.1.2 CD8<sup>+</sup> cytotoxické T-lymfocyty

CD8<sup>+</sup> cytotoxické T-lymfocyty (Tc lymfocyty) detegují svými TCR receptory neuronální antigeny prezentované HLA molekulami I. třídy, které se vyskytují na povrchu téměř všech jaderných buněk včetně dopaminergních neuronů. Produkci FasL (ligand prvního apoptotického signálu) nebo TNF- $\alpha$ , které se váží na své receptory cílových buněk, spouští Tc lymfocyty apoptózu dopaminergních neuronů a napomáhají jí uvolněním perforinů a granzymů. (obecná role T-lymfocytů je popsána na obr. 9.)<sup>21, 39, 42</sup>



**Obrázek 9: Role T-lymfocytů u Parkinsonovy nemoci.<sup>39</sup>**

Naivní T-lymfocyty jsou aktivovány APC buňkami (např. dendritickými buňkami) předkládajícími autoantigeny a následně se diferencují do funkčních podskupin. Prozánětlivou funkci zastávají Th1 lymfocyty pomocí sekrece IL-6, IFN- $\gamma$  a Th17 lymfocyty uvolňující IL-17. Oba typy lymfocytů tedy působí neurotoxicky a zároveň potlačují protizánětlivý efekt Th2 a Treg lymfocytů. Během patogeneze PN tak vzniká nerovnováha v populaci T-lymfocytů, při níž je preferována stimulace prozánětlivých Th lymfocytů. Vedle toho mohou CD8+ T-lymfocyty indukovat apoptózu dopaminergních neuronů svým přímým cytotoxickým účinkem. Neurodegeneraci také výrazně zesilují mikroglie, makrofágy z periferie i astrocyty.

Použité zkratky: APC – antigen prezentující buňky, CD – povrchové znaky označující buňky, IL – interleukin, IFN- $\gamma$  – interferon  $\gamma$ , PN – Parkinsonova nemoc, Th lymfocyty – pomocné T lymfocyty, TNF – tumor nekrotizující faktor, Treg – regulační T lymfocyty



## 4.2 Neoantigeny rozpoznávané T-lymfocyty

### 4.2.1 Mitochondriální antigeny

Mutace v genech kódující proteiny PINK1 a parkin lokalizované v mitochondriích jsou nejčastější příčinou vzniku familiární PN s autozomálně dominantní dědičností. Tyto proteiny společně zprostředkovávají degradaci poškozených mitochondrií pomocí mitofágie a degradaci vezikulů odvozených od mitochondrií. Mitochondriální vezikuly transportují mitochondriální proteiny do lysozomu pro jejich zpracování a následnou prezentaci jejich antigenních peptidů na HLA molekulách I třídy. Za normálních podmínek PINK1 a parkin inhibují dráhu mitochondriálních vezikulů, čímž brání prezentaci mitochondriálních antigenů. Pokud se však proteinů PINK1 a parkin tvoří nedostatečné množství nebo ztratí svoji funkci, zvýší se tvorba mitochondriálních vezikulů a prezentace mitochondriálních antigenů, která může u PN indukovat autoimunitní odpověď.<sup>12, 21, 43, 44</sup>

Autoimunitní reakci může také zapříčinit neefektivní mitofágie, která potlačuje prezentaci mitochondriálních antigenů a reguluje zánět na základě inhibice funkce inflamazómu. Důvodem neefektivní mitofágie je opět defekt proteinů PINK1 a parkin. V důsledku porušené mitofágie dochází k akumulaci narušených mitochondrií v cytoplazmě dopaminergních neuronů, ve kterých vzniká oxidační stres přispívající k jejich odumírání.<sup>44, 45</sup>

Teorie autoimunitní reakce vyvolané prezentací mitochondriálních antigenů popisuje jako primární děje zúčastněné v této patogenezi oxidační stres a aktivaci mikroglií, které sekrecí prozánětlivých cytokinů a ROS vytvářejí neurotoxické prostředí. Dochází tak k poruše HEB, přes kterou mohou snadněji prostupovat T-lymfocyty infiltrující CNS. Při nedostatku proteinů PINK1 a parkin se v dopaminergních neuronech za účasti Rab9 GTPázy a třídícího nexinu 9 (SNX9) formují mitochondriální vezikuly ve zvýšené míře. GTPázy Rab7 umožňují následnou fúzi mitochondriálních vezikulů s lysozomem, ve kterém se mitochondriální proteiny štěpí na peptidy určené k prezentaci na HLA molekulách I. třídy. Mitochondriální antigeny předkládané dopaminergními neurony jsou rozpoznány CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty specifickými pro mitochondrie, které cytotoxicky působí na dopaminergní neurony a indukují jejich buněčnou smrt.<sup>43, 44, 46</sup>

## 4.2.2 A-synuklein

Aktivace T-lymfocytů u PN může být podmíněna pozměněnou konformací neuronálních proteinů, nejčastěji  $\alpha$ -synukleinu. V důsledku oxidačního stresu a posttranslačních modifikací vlastních proteinů mohou vznikat na těchto proteinech nové epitopy, se kterými se buňky imunitního systému dosud neseťkaly. Kovalentně modifikované proteiny představují v těle neoantigeny, které mohou narušit imunitní toleranci a stát se cílovými molekulami pro složky získané imunity.<sup>17, 40, 47</sup>

A-synuklein je termostabilní protein skládající se ze 140 aminokyselin, které jsou uspořádané do třech strukturních oblastí. N-terminální doména zahrnující aminokyseliny 1–60 má amfifilní charakter a umožňuje vazbu  $\alpha$ -synukleinu na lipidové vezikuly. Oblast od 61. do 95. aminokyseliny se nazývá neamyloidní- $\beta$  komponenta, která se také nachází v  $\beta$ -amyloidu, v typickém morfologickém znaku Alzheimerovy choroby a je zodpovědná za agregaci  $\alpha$ -synukleinu a jeho formaci do  $\beta$ -struktur. Poslední C-terminální doména zahrnuje aminokyseliny 96–140 a představuje hlavní cílovou strukturu pro fosforylaci a další posttranslační modifikace.<sup>48, 49</sup>

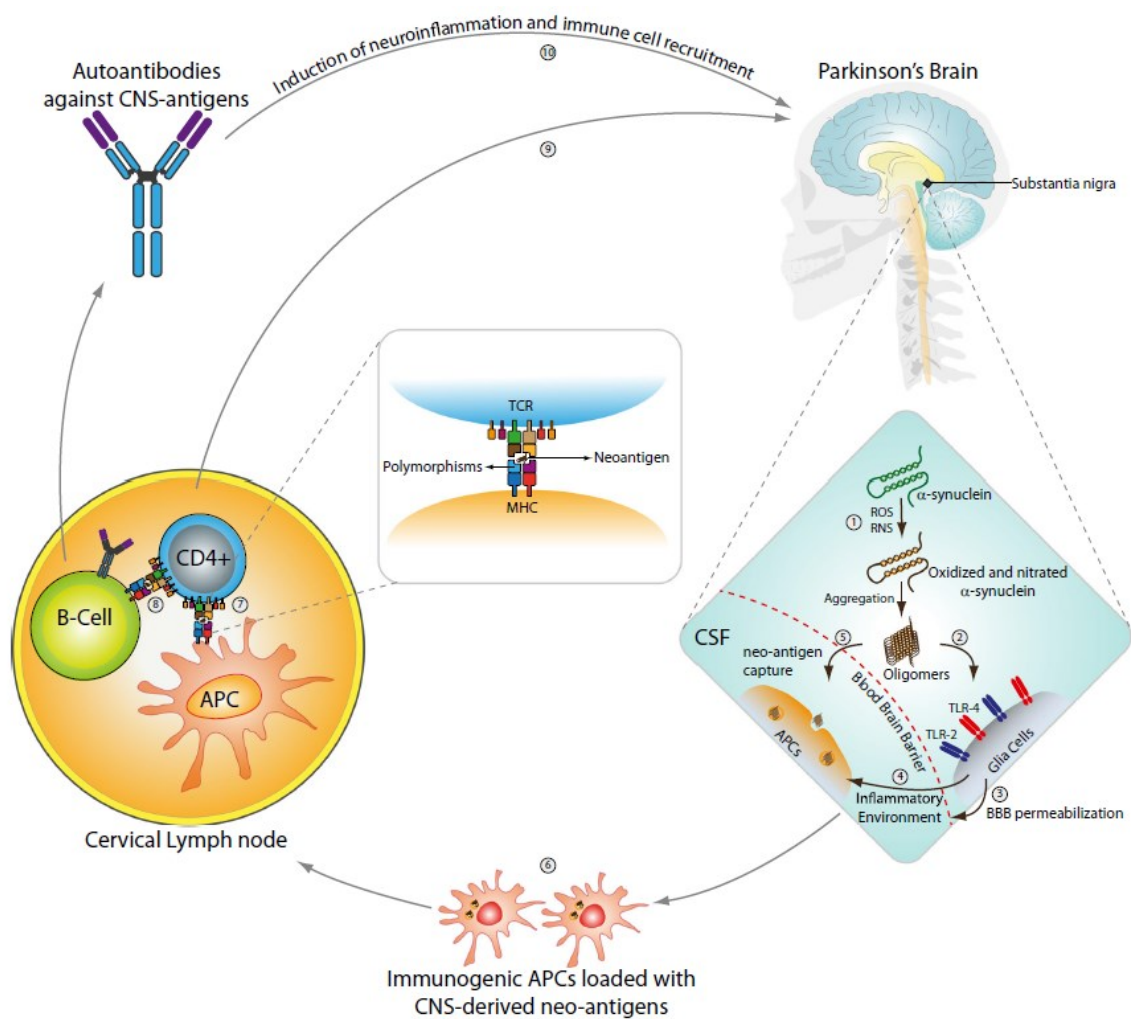
Za hlavní příčinu tvorby nových antigenů u PN můžeme považovat oxidační stres zprostředkovaný ROS a reaktivními formami dusíku (RNS), který mimo jiné usnadňuje produkci  $\alpha$ -synukleinových agregátů. Aktivací iNOS dochází k nitraci  $\alpha$ -synukleinu na jeho tyrozinových zbytcích. Následně vzniklý nitrátovaný  $\alpha$ -synuklein představuje u PN pravděpodobně nejvýznamnější neoantigen rozpoznávaný Th lymfocyty.<sup>40, 50</sup>

Mezi důležité antigenní oblasti, proti kterým je směřovaná imunogenní odpověď Th lymfocytů patří S129 fosforylovaná oblast  $\alpha$ -synukleinu. Jedná se o posttranslační modifikaci  $\alpha$ -synukleinu zprostředkovanou především kaseinovými kinázami 1 a 2. Důkazem, že fosforylovaná oblast S129  $\alpha$ -synukleinu hraje významnou úlohu v patogenezi PN, je také výzkum, který ukázal, že u zdravých osob se v mozku vyskytuje méně než 4 %  $\alpha$ -synukleinu fosforylovaného v S129 oblasti, zatímco u pacientů s PN je v Lewyho tělískách fosforylováno v S129 oblasti více jak 90 %  $\alpha$ -synukleinu.<sup>49-51</sup>

Významným epitopem se rovněž ukázala být Y39 oblast  $\alpha$ -synukleinu. Y39 oblast má dobrou vazebnou afinitu k HLA-DR molekulám a při její prezentaci Th-lymfocytům může spustit imunitní odezvu.<sup>21, 39</sup>

Dalším možným důvodem přítomnosti nových antigenů v CNS je alterace lysozomální degradace neuronálních proteinů a alterace jejich následného zpracování pro prezentaci antigenů. Agregáty  $\alpha$ -synukleinu jsou rezistentní vůči jejich autofágii zprostředkované chaperony, tudíž buňky předkládají jako antigeny jiný soubor vytvořených peptidů. Nedokonalý rozklad  $\alpha$ -synukleinových agregátů vede ke vzniku zkrácených C-koncových forem  $\alpha$ -synukleinu a toxických C-koncových fragmentů, které jsou vystavovány Th lymfocytům jako neoantigeny.<sup>47, 50</sup>

Pro porozumění komplexního autoimunitního procesu, který se odehrává u PN indukované  $\alpha$ -synukleinem, si můžeme představit následovný průběh jednotlivých autoimunitních reakcí. Oxidační stres jako výchozí děj celého patologického procesu vyvolává v *substantia nigra* tvorbu nitrátovaného  $\alpha$ -synukleinu, který stimuluje TLR receptory na membráně mikroglií. Aktivované mikroglie indukují produkcí zánětlivých mediátorů maturaci okolních dendritických buněk v mozkomíšním moku, které také fagocytují nitrátovaný  $\alpha$ -synuklein a migrují do krčních lymfatických uzlin. Zde předkládají nitrátovaný  $\alpha$ -synuklein naivním Th lymfocytům, které přes své TCR receptory rozpoznávají nitrátovaný  $\alpha$ -synuklein jako neoantigen. Aktivované Th lymfocyty se diferencují do jednotlivých výkonných forem, které infiltrují CNS. Th1 a Th17 lymfocyty jsou v *substantia nigra* restimulovány aktivovanými mikrogliemi prostřednictvím mikrogliální prezentace nitrátovaného  $\alpha$ -synukleinu na HLA molekulách II. třídy. Restimulované lymfocyty Th1 a Th17 uvolňují velké množství TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$ , čímž potencují neurotoxický efekt M1 mikroglií. Sekrecí TNF- $\alpha$ , ROS a RNS vyvolávají mikroglie zánik dopaminergních neuronů a další oxidaci a nitraci  $\alpha$ -synukleinu. Při primární aktivaci mikroglií  $\alpha$ -synukleinem je také působením mikrogliálních cytokinů zvýšena propustnost HEB pro vstup leukocytů. Th1 a Th17 lymfocyty svou sekrecí chemotaxinů (chemoatraktantů) atrahují přes HEB do *substantia nigra* makrofágy a neutrofiley z periferie, které dále zvyšují poškození nervové tkáně. Zároveň restimulované Th lymfocyty stimulují B-lymfocyty k produkci protilátek proti  $\alpha$ -synukleinu, které také přispívají k neurodegeneraci. Naopak Treg lymfocyty mají neuroprotektivní účinek a inhibují tvorbu ROS indukovanou  $\alpha$ -synukleinem a aktivaci NF- $\kappa$ B v mikrogliích, nicméně jejich efekt je u PN potlačen.  $\alpha$ -synuklein může být také prezentován Tc lymfocytům dopaminergními neurony na HLA molekulách I. třídy. Aktivované Tc lymfocyty na základě interakce svých TCR receptorů s HLA molekulami I. třídy přímo indukují smrt dopaminergních neuronů. Ve výsledku tak u PN vzniká smyčka neustále probíhajících autoimunitních dějů, které posléze vedou v chronický neurozánět a progresi degenerace dopaminergních neuronů. (obr. 10)<sup>17, 39, 40, 47, 52, 53</sup>



**Obrázek 10: Autoimunitní odpověď na neoantigeny u Parkinsonovy nemoci.<sup>40</sup>**

(1) Počáteční oxidační stres vyvolaný produkcí ROS a RNS v dopaminergních neuronech způsobuje oxidaci a nitraci  $\alpha$ -synukleinu. (2) Oxidovaný a nitrátovaný  $\alpha$ -synukleín vystupuje jako neoantigen a vytváří oligomery a agregáty, které se váží na mikroglální TLR receptory a mikroglie aktivují. (3) Aktivované mikroglie uvolňují zánětlivé mediátory, které zvyšují permeabilitu HEB. (4) Zároveň mikroglální zánětlivé mediátory stimulují maturaci APC buněk v mozkomíšním moku. (5) APC buňky fagocytují neoantigeny a získávají imunogenní charakter. (6) Imunogenní APC buňky migrují do krčních lymfatických uzlin, kde předkládají neoantigeny CD4+ T-lymfocytům. (7) V závislosti na polymorfismu v MHC komplexu mohou být neoantigeny předkládány TCR receptorům na CD4+ T-lymfocyttech. (8) V případě efektivní aktivace CD4+ T-lymfocytů specifických pro neoantigeny, mohou aktivované CD4+ T-lymfocyty stimulovat B-lymfocyty. (9) Aktivované CD4+ T-lymfocyty se dále diferencují a migrují do CNS. (10) Protilátky produkované B-lymfocyty specifickými pro neoantigeny také infiltrují CNS a indukují neurodegeneraci.

Použité zkratky: APC – antigen prezentující buňky, BBB/HEB – hematoencefalická bariéra, CD – povrchové znaky označující buňky, CNS – centrální nervová soustava, CSF – mozkomíšní mok, MHC – hlavní histokompatibilní komplex, RNS – reaktivní formy dusíku, ROS – reaktivní formy kyslíku, TCR – T-buněčný receptor, TLR – receptor typu Toll

### 4.2.3 Neuromelanin

Neuromelanin uvolněný z odumřelých dopaminergních neuronů se také může uplatňovat jako cílová molekula pro zahájení imunitní odpovědi Th lymfocyty. Při kontaktu neuromelaninu s dendritickými buňkami se spouští jejich maturace. Dendritické buňky fagocytují neuromelanin a následně se přemísťují z CNS do lymfatických uzlin. Zde předkládají neuromelanin jako neoantigen naivním Th lymfocytům. Aktivované Th lymfocyty migrují do CNS, kde jsou restimulovány mikroglie aktivovanými neuromelaninem. Th lymfocyty tak v CNS proliferují a potencují zánik dopaminergních neuronů. Zároveň mohou Th lymfocyty aktivovat B-lymfocyty, které přispívají k neurodegeneraci sekrecí protilátek proti neuromelaninu.<sup>20, 39</sup>

## 4.3 Dopamin jako modulátor T-lymfocytů

Účinek T-lymfocytů také ovlivňuje koncentrace dopaminu. Pokud se koncentrace dopaminu odchýlí od fyziologické hodnoty, může pozměnit funkci nejen neuronů, ale i mikroglie, dendritických buněk a T lymfocytů.<sup>40</sup>

U PN snížená koncentrace dopaminu indukuje aktivaci T-lymfocytů a jejich adhezi k fibronektinu umožňujícím průnik T-lymfocytů do nervové tkáně. *In vitro* studie zjistily, že za přítomnosti dopaminu produkovaného APC buňkami, zaujímají T-lymfocyty protizánětlivou roli a diferencují se v Th2 lymfocyty. Naopak pokud APC buňky nesyntetizovaly dopamin, T-lymfocyty se polarizovaly do prozánětlivých Th1 lymfocytů a Th17 lymfocytů.<sup>41</sup>

O prozánětlivém nebo protizánětlivém účinku dopaminu na T-lymfocyty rozhoduje také typ aktivovaného dopaminového receptoru. Dopamin se může vázat na pět různých receptorů označovaných jako D1R-D5R, ze kterých každý vykazuje jinou afinitu k dopaminu. T-lymfocyty nesou na svém povrchu všechny typy dopaminových receptorů, z nichž se u PN z důvodu nízké koncentrace dopaminu v *substantia nigra* více uplatňují v regulaci funkce T-lymfocytů ty receptory, které mají vyšší afinitu. Vazba dopaminu především na D3R receptory s nejvyšší afinitou svědčí o nízké koncentraci dopaminu v striatonigrálním komplexu a vede k polarizaci T-lymfocytů do prozánětlivých podtypů Th1 a Th17. Restimulace Th1 a Th17 lymfocytů APC buňkami předkládající neuronální antigeny indukuje u těchto lymfocytů sekreci prozánětlivých cytokinů TNF- $\alpha$  a IFN $\gamma$ . Restimulované T-lymfocyty pomocí svých cytokinů potencují M1 neurotoxický účinek mikroglie a chemotakticky přitahují neutrofile a makrofágy z periferie, čímž přispívají k zániku dopaminergních neuronů. Zároveň při vazbě dopaminu na receptor D3R dochází k potlačení diferenciaci Th2 lymfocytů. U Treg vazba dopaminu na receptor D5R s druhou nejvyšší afinitou inhibuje jejich schopnost potlačovat působení efektorových T-lymfocytů (Teff lymfocyty) a vede ke snížené produkci protizánětlivých cytokinů IL-10 a TGF- $\beta$ . Naopak vazbou na receptor D2R podporuje dopamin uvolňování IL-10.<sup>40, 41, 54, 55</sup>

## 5. ZÁVĚR

Ústřední děj v patogenezi PN představuje chronický neurozánět vznikající jako odpověď na oxidační stres. Tento poznatek vznesl otázku, zda PN může být vyvolána autoimunitními mechanismy. Řada studií potvrdila účast na rozvoji PN jak buněčné, tak humorální složky imunitního systému a jejich prozánětlivý efekt na dopaminergní neurony v *substantia nigra*.

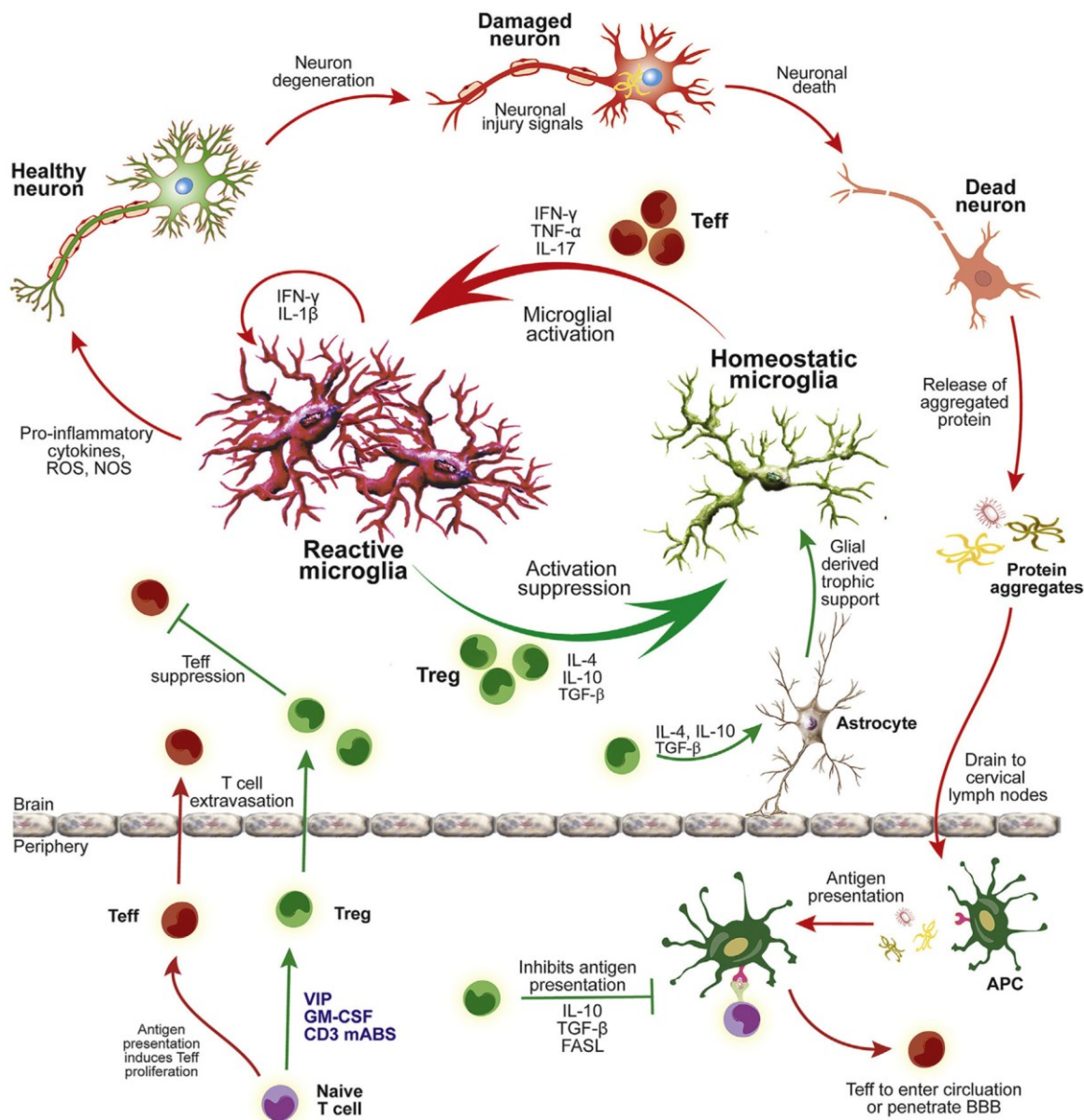
Na podkladě těchto výzkumů vznikla hypotéza, že u PN probíhá komplexní autoimunitní proces zahrnující spolupůsobení všech složek imunity, z nichž hlavní úlohu hrají aktivované mikroglie, dendritické buňky a T-lymfocyty. Klíčovými iniciátory autoimunitní odpovědi jsou buď mitochondriální neoantigeny, které se v *substantia nigra* objevily v důsledku genového defektu, nebo – častěji – neoantigeny vznikající v důsledku uvolnění obsahu odumřelých dopaminergních neuronů a případné posttranslační modifikací  $\alpha$ -synukleinu (nitratovaného, fosforylovaného) a neuromelaninu. Velmi významně se na regulaci autoimunity u PN podílí cytokiny produkované především aktivovanými mikroglie a T-lymfocyty. Vliv cytokinů na průběh PN může být jak neurotoxický, tak neuroprotektivní v závislosti na typu cytokinu, jeho koncentraci a fázi onemocnění.

Dalším neurotoxickým působkem produkovaným mikroglie je iNOS způsobující nitraci  $\alpha$ -synukleinu. Nitrátovaný  $\alpha$ -synuklein (jako jeden z hlavních neoantigenů indukujících autoimunitní odezvu) se dostává do lymfatických uzlin, kde ho fagocytují dendritické buňky a předkládají naivním T-lymfocytům. T-lymfocyty rozpoznají nitrátovaný  $\alpha$ -synuklein jako cizí antigen, diferencují se do výkonných podtypů a na základě chemotaxe migrují přes porušenou HEB do *substantia nigra*. Zde T-lymfocyty uvolněním svých prozánětlivých cytokinů potencují neurotoxický účinek mikroglie a chemotakticky přitahují periferní imunocyty nebo přímo indukují apoptózu dopaminergních neuronů.

Díky mnohým imunologickým studiím a poznatkům se přistoupilo k terapii PN z nového pohledu. Na rozdíl od klasické léčby levodopou/karbidopou, které zvyšují hladinu dopaminu a řeší tak až následky neurodegenerace, se imunoterapie zaměřuje na prevenci zvýšeného odumírání dopaminergních neuronů a jejich regeneraci. Imunoterapie je založená na využití látek indukujících Treg lymfocyty, které zmírňují neurozánět a zároveň zajišťují protekci dopaminergních neuronů. Mezi tato potenciální imunoterapeutika, která jsou dosud předmětem dalších studií, patří především faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF), vazoaktivní intestinální peptid (VIP) a anti-CD3 monoklonální protilátky (anti-CD3 mAbs). Zajišťují indukci tolerogenních dendritických buněk, které orientují diferenciaci naivních T-lymfocytů do Treg lymfocytů a sekrecí TGF- $\beta$  mohou dendritické buňky zprostředkovat konverzi efektorových (prozánětlivých) T-lymfocytů do Treg lymfocytů. (obr. 11)<sup>56</sup>

Další možné využití imunoterapie spočívá v imunizaci pacientů s PN za účelem snížení množství extracelulárního  $\alpha$ -synukleinu. Tento přístup využívá specifické protilátky proti  $\alpha$ -synukleinu, které mají za cíl zvýšit degradaci  $\alpha$ -synukleinu a tím redukovat jeho toxické působení na nervové buňky a zamezit tak šíření patologického procesu. Aktivní imunizace představuje možné využití vakcín proti  $\alpha$ -synukleinu AFFITOPE-PD01A a AFFITOPE-PD03A, které napodobují C-terminální doménu  $\alpha$ -synukleinu (aminokyseliny 110–130) a

zajišťují dlouhotrvající odstraňování  $\alpha$ -synukleinu bez nutnosti dlouhodobého a opakovaného podávání. Strategie léčby pomocí aktivní imunizace musí u PN překonat dvě překážky, které limitují míru účinku této léčby – reprogramovat imunitní toleranci organismu pro cílové antigeny a zajistit dostatečnou dodávku protilátek přes HEB do *substantia nigra*. Pro léčbu PN na základě pasivní imunizace se ukazují být perspektivní monoklonální protilátky PRX002/RG7935 (Prasinezumab) cílící na C-terminální doménu  $\alpha$ -synukleinu a BIIB054, která cílí na N-terminální doménu  $\alpha$ -synukleinu. Tyto protilátky vyžadují opakované dávkování, jejich výhodou je však jejich selektivita k epitopům cílových antigenů.<sup>57, 58</sup>



**Obrázek 11: Imunosupresivní účinek Treg lymfocytů potencionovaný Treg induktory.<sup>56</sup>**

Neurozánět udržuje aktivaci mikroglíi a Teff lymfocytů, které produkují prozánětlivé cytokiny a přispívají tak u PN k neurodegeneraci. Při chronickém neurodegenerativním procesu je funkce Treg lymfocytů překonána prozánětlivým působením Teff lymfocytů z důvodu nízkého počtu či dysfunkce Treg lymfocytů. Imunoterapie založená na podávání Treg induktorů, jako jsou vazoaktivní intestinální peptid, faktor stimulujiící granulocytární a makrofágní kolonie a anti-CD3 monoklonální protilátky, indukuje navýšení počtu Treg lymfocytů a stimuluje jejich neuroprotektivní funkci. Treg lymfocyty migrují přes HEB a v *substantia nigra* inhibují neurotoxický účinek Teff lymfocytů. Produkci IL-4, IL-10 a TGF- $\beta$  zmírňují Treg lymfocyty neurozánět a podporují tak neuronální homeostázu a neurotrofní prostředí. Zároveň v periférii inhibují prezentaci antigenů APC buňkami prostřednictvím sekrece IL-10, TGF- $\beta$  a FasL.

Použité zkratky: APC – antigen prezentující buňka, CD3 mAbs – anti-CD3 monoklonální protilátky, FasL – ligand prvního apoptotického signálu, GM-CSF – faktor stimulujiící kolonie granulocytů a makrofágů, HEB/BBB – hematoencefalická bariéra, IFN- $\gamma$  – interferon  $\gamma$ , IL – interleukin, NOS – syntáza oxidu dusnatého, ROS – reaktivní formy kyslíku, Teff – efektorové T-lymfocyty, TGF- $\beta$  – transformujiící růstový faktor, TNF- $\alpha$  – tumor nekrotizující faktor  $\alpha$ , Treg – regulační T-lymfocyty, VIP – vazoaktivní intestinální peptid



## 6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMPAR	receptor pro $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionovou kyselinu
anti-CD3 mAbs	anti-CD3 monoklonální protilátky
APC	antigen prezentující buňka (antigen-presenting cell)
APRE	element odpovědi akutní fáze (acute-phase response element)
APRF	faktor odpovědi akutní fáze (acute-phase response factor)
Bcl-xL	protein související s velkobuněčným B-lymfomem (B-cell lymphoma-extra large)
BDNF	mozkový neurotrofní faktor (brain-derived neurotrophic factor)
CCL	chemokinový ligand se dvěma přímo sousedícími cysteiny (značené „C“ na N-konci)
CCR	receptor pro CCL
CD	povrchové znaky označující buňky (cluster of designation)
CNS	centrální nervová soustava
CXCL	chemokinový ligand s jednou aminokyselinou jinou než cystein (značené „X“ mezi dvěma N-terminálními cysteiny značené „C“)
CXCR	receptor pro CXCL
CX <sub>3</sub> CL	chemokinový ligand se třemi aminokyselinami jinými než cystein (značené „X“ mezi dvěma N-terminálními cysteiny značené „C“)
CX <sub>3</sub> CR	receptor pro CX <sub>3</sub> CL
DAMP	molekulární vzory spojené s poškozením (damage associated molecular pattern)
DR	dopaminový receptor
dsDNA	dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina (double-stranded deoxyribonucleic acid)
ERK	kináza regulovaná extracelulárním signálem (extracellular signal-regulated kinase)
FasL	ligand prvního apoptotického signálu (ligand of the first apoptosis signal)

GBA	gen pro kyselou $\beta$ -glukosidázu (acid beta-glucosidase gene)
GDNF	neurotrofní faktor odvozený od gliových buněk (glial cell-derived neurotrophic factor)
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (granulocyte macrophage-colony stimulating factor)
Gp	glykoprotein
Gro- $\alpha$	růstem regulovaný onkogen $\alpha$ (growth-regulated oncogene alpha)
GTPáza	guanosintrifosfatáza
HEB	hematoencefalická bariéra
HLA-DR	lidské leukocytární antigeny typu DR (human leukocyte antigen – DR type)
IFN	interferon
IGF-1	inzulinu podobný růstový faktor 1; somatomedin 1 (insulin-like growth factor 1)
IgG	imunoglobulin G
I $\kappa$ B $\alpha$	inhibitor nukleárního faktoru kappa B
IKK	I $\kappa$ B kinázový komplex (I $\kappa$ B kinase complex)
IL	interleukin
IL-6R	receptor pro IL-6
iNOS	indukovatelná syntáza oxidu dusnatého
IRAK	kináza spojená s receptorem pro interleukin-1 (interleukin-1 receptor associated kinase)
JAK	Janusova kináza (The Janus Kinase)
JNK	c-Jun N-koncová kináza (c-Jun N-terminal kinase)
LRRK2	gen pro kinázu 2 s repeticí bohatou na leucin (leucine-rich repeat kinase 2 gene)
MAO-B	monoaminoxidáza typu B
MAPK	proteinkináza aktivovaná mitogenem (mitogen activated protein kinase)
MCP-1	monocytový chemotaktický protein 1 (monocyte chemotactic protein-1)

MPP+	1-methyl-4-fenylpyridin
MPTP	1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
MyD88	myeloidní diferenciační faktor 88 (myeloid differentiation factor 88)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NF- $\kappa$ B	nukleární faktor kappa B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NK buňky	přirození zabíječi (natural killers)
NLR	receptory podobné NOD (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors)
NLRP3	receptor podobný NOD obsahující pyrinovou doménu 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor pyrin domain containing 3)
NMDAR	receptor pro N-methyl-D-aspartát
6-OHDA	6-hydroxydopaminu
PAMP	molekulární struktury spojené s patogeny (pathogen associated molecular pattern)
PARK	genový lokus pro Parkinsonovu nemoc
PINK1	PTEN indukovaná kináza 1 (PTEN induced kinase 1)
PN	Parkinsonova nemoc
PRKN	gen parkin
PRR	receptor rozpoznávající molekulární vzory (pattern recognition receptor)
Rab	mozkový protein související s Ras (Ras-related protein in brain)
RANTES	chemokin exprimovaný, vylučovaný a regulovaný po aktivaci normálních T lymfocytů (regulated upon activation normal T-cells expressed and secreted)
RNS	reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
SH2	Src homologní 2 doména (Src homology 2 domain)
sIL-6R	solubilní receptor pro IL-6
SNCA	gen pro $\alpha$ -synuklein (alpha-synuclein gene)

STAT	signální transduktory a aktivátory transkripce (Signal Transducers and Activators of Transcription)
SNX9	třídící nexin 9 (sorting nexin 9)
TAK1	kináza 1 aktivovaná transformujícím růstovým faktorem $\beta$ (transforming growth factor $\beta$ activated kinase 1)
Tc	CD8+ cytotoxický T-lymfocyt
TCR	T-buněčný receptor (T-cell receptor)
Teff	efektorový (prozánětlivý) T-lymfocyt
TGF	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
Th	CD4+ pomocný (helper) T-lymfocyt
TIR	receptor typu Toll pro interleukin 1 (Toll-interleukin 1 receptor)
TLR	receptor typu Toll (Toll-like receptor)
TNF	tumor nekrotizující faktor (tumor necrosis factor)
TNF-R	receptor pro TNF
TRAF6	faktor 6 spojený s receptorem pro tumor nekrotizující faktor (tumor necrosis factor receptor associated factor 6)
TRAIL	TNF-příbuzný ligand indukující apoptózu (TNF-related apoptosis-inducing ligand)
Treg	regulační T-lymfocyt
VIP	vazoaktivní intestinální peptid
VPS35	gen pro protein 35 třídící vezikuly (vacuolar protein sorting 35 gene)

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Roth J, a kol. Parkinsonova nemoc. 4. Praha: Maxdorf; c2009. 222 s. ISBN 978-80-7345-178-3.
2. Illarioškin S, N. Příčiny vzniku parkinsonovy nemoci - nové představy a nové výzvy. Česk Slov Neurol Neurochir [online]. 2015; 78/111(3); s. 283-91. ISSN 1803-6597. Dostupné z: <https://www.csnn.eu/casopisy/ceska-slovenska-neurologie/2015-3-8/priciny-vzniku-parkinsonovy-nemoci-nove-predstavy-a-nove-vyzvy-52142>.
3. Berger J, Kalita Z, Ulč, I. Parkinsonova choroba. Praha: Maxdorf; c2000. 147 s. ISBN 80-85912-13-9.
4. Růžička E, et al. Extrapiramidová onemocnění. 1, Parkinsonova nemoc a parkinsonské syndromy. 1. Praha: Galén; c2000. 293 s. ISBN 80-7262-048-7.
5. Fiala O, Růžička E. Genetika Parkinsonovy nemoci. Česk Slov Neurol Neurochir [online]. 2009; 72/105(5); s. 419-28. ISSN 1803-6597. Dostupné z: <https://www.csnn.eu/casopisy/ceska-slovenska-neurologie/2009-5/genetika-parkinsonovy-nemoci-33206>.
6. Kim CY, Alcalay RN. Genetic Forms of Parkinson's Disease. Semin Neurol. 2017; 37(2); s. 135-46. ISSN 1098-9021.
7. Koros C, Simitsi A, Stefanis L. Genetics of Parkinson's Disease: Genotype-Phenotype Correlations. Int Rev Neurobiol. 2017; 132; s. 197-231. ISSN 2162-5514.
8. Hamza TH, Zabetian CP, Tenesa A, Laederach A, Montimurro J, Yearout D, et al. Common genetic variation in the HLA region is associated with late-onset sporadic Parkinson's disease. Nat Genet. 2010; 42(9); s. 781-5. ISSN 1546-1718.
9. Ahmed I, Tamouza R, Delord M, Krishnamoorthy R, Tzourio C, Mulot C, et al. Association between Parkinson's disease and the HLA-DRB1 locus. Mov Disord. 2012; 27(9); s. 1104-10. ISSN 1531-8257.
10. Olanow CW, Brundin P. Parkinson's disease and alpha synuclein: is Parkinson's disease a prion-like disorder? Mov Disord. 2013; 28(1); s. 31-40. ISSN 1531-8257.
11. Melki R. Alpha-synuclein and the prion hypothesis in Parkinson's disease. Rev Neurol (Paris). 2018; 174(9); s. 644-52. ISSN 0035-3787.

12. Jiang T, Li G, Xu J, Gao S, Chen X. The Challenge of the Pathogenesis of Parkinson's Disease: Is Autoimmunity the Culprit? *Front Immunol.* 2018; 9; s. 1-13. ISSN 1664-3224.
13. Mosley RL, Hutter-Saunders JA, Stone DK, Gendelman HE. Inflammation and adaptive immunity in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012; 2(1); s. 1-18. ISSN 2157-1422.
14. Monahan AJ, Warren M, Carvey PM. Neuroinflammation and peripheral immune infiltration in Parkinson's disease: an autoimmune hypothesis. *Cell Transplant.* 2008; 17(4); s. 363-72. ISSN 0963-6897.
15. Ho MS. Microglia in Parkinson's Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2019; 1175; s. 335-53. ISSN 0065-2598.
16. Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med.* 2007; 13(11); s. 460-9. ISSN 1471-4914.
17. Schonhoff AM, Williams GP, Wallen ZD, Standaert DG, Harms AS. Innate and adaptive immune responses in Parkinson's disease. *Prog Brain Res.* 2020; 252; s. 169-216. ISSN 1875-7855.
18. Tiwari PC, Pal R. The potential role of neuroinflammation and transcription factors in Parkinson disease. *Dialogues Clin Neurosci.* 2017; 19(1); s. 71-80. ISSN 1958-5969.
19. Ludewig P, Gallizioli M, Urrea X, Behr S, Brait VH, Gelderblom M, et al. Dendritic cells in brain diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2016; 1862(3); s. 352-67. ISSN 0006-3002.
20. Koutsilieri E, Lutz MB, Scheller C. Autoimmunity, dendritic cells and relevance for Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna).* 2013; 120(1); s. 75-81. ISSN 1435-1463.
21. Tan JSY, Chao YX, Rotzschke O, Tan EK. New Insights into Immune-Mediated Mechanisms in Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(23); s. 1-18. ISSN 1422-0067.
22. Wang S, Yuan YH, Chen NH, Wang HB. The mechanisms of NLRP3 inflammasome/pyroptosis activation and their role in Parkinson's disease. *Int Immunopharmacol.* 2019; 67; s. 458-64. ISSN 1878-1705.
23. De Virgilio A, Greco A, Fabbrini G, Inghilleri M, Rizzo MI, Gallo A, et al. Parkinson's disease: Autoimmunity and neuroinflammation. *Autoimmun Rev.* 2016; 15(10); s. 1005-11. ISSN 1873-0183.

24. Benkler M, Agmon-Levin N, Hassin-Baer S, Cohen OS, Ortega-Hernandez OD, Levy A, et al. Immunology, autoimmunity, and autoantibodies in Parkinson's disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2012; 42(2); s. 164-71. ISSN 1559-0267.
25. Brudek T, Winge K, Folke J, Christensen S, Fog K, Pakkenberg B, et al. Autoimmune antibody decline in Parkinson's disease and Multiple System Atrophy; a step towards immunotherapeutic strategies. *Mol Neurodegener*. 2017; 12(1); s. 1-16. ISSN 1750-1326.
26. Nabavi SM, Ahmed T, Nawaz M, Devi KP, Balan DJ, Pittala V, et al. Targeting STATs in neuroinflammation: The road less traveled! *Pharmacol Res*. 2019; 141; s. 73-84. ISSN 1096-1186.
27. Yan Z, Gibson SA, Buckley JA, Qin H, Benveniste EN. Role of the JAK/STAT signaling pathway in regulation of innate immunity in neuroinflammatory diseases. *Clin Immunol*. 2018; 189; s. 4-13. ISSN 1521-7035.
28. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*. 1998; 334 ( Pt 2); s. 297-314. ISSN 0264-6021.
29. Yin L, Dai Q, Jiang P, Zhu L, Dai H, Yao Z, et al. Manganese exposure facilitates microglial JAK2-STAT3 signaling and consequent secretion of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  to promote neuronal death. *Neurotoxicology*. 2018; 64; s. 195-203. ISSN 1872-9711.
30. Alam Q, Alam MZ, Mushtaq G, Damanhoury GA, Rasool M, Kamal MA, et al. Inflammatory Process in Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Central Role of Cytokines. *Curr Pharm Des*. 2016; 22(5); s. 541-8. ISSN 1873-4286.
31. Yan J, Fu Q, Cheng L, Zhai M, Wu W, Huang L, et al. Inflammatory response in Parkinson's disease (Review). *Mol Med Rep*. 2014; 10(5); s. 2223-33. ISSN 1791-3004.
32. Policastro G, Brunelli M, Tinazzi M, Chiamulera C, Emerich DF, Paolone G. Cytokine-, Neurotrophin-, and Motor Rehabilitation-Induced Plasticity in Parkinson's Disease. *Neural Plast*. 2020; 2020; s. 1-15. ISSN 1687-5443.
33. Tansey MG, McCoy MK, Frank-Cannon TC. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Exp Neurol*. 2007; 208(1); s. 1-25. ISSN 0014-4886.
34. Barcia C, Ros CM, Annese V, Gomez A, Ros-Bernal F, Aguado-Yera D, et al. IFN- $\gamma$  signaling, with the synergistic contribution of TNF- $\alpha$ , mediates cell specific microglial and astroglial activation in experimental models of Parkinson's disease. *Cell Death Dis*. 2011; 2; s. 1-12. ISSN 2041-4889.

35. Liu JQ, Chu SF, Zhou X, Zhang DY, Chen NH. Role of chemokines in Parkinson's disease. *Brain Res Bull.* 2019; 152 s. 11-8. ISSN 1873-2747.
36. Dutta D, Kundu M, Mondal S, Roy A, Ruehl S, Hall DA, et al. RANTES-induced invasion of Th17 cells into substantia nigra potentiates dopaminergic cell loss in MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2019; 132; s. 1-36. ISSN 1095-953X.
37. Angelopoulou E, Paudel YN, Shaikh MF, Piperi C. Fractalkine (CX3CL1) signaling and neuroinflammation in Parkinson's disease: Potential clinical and therapeutic implications. *Pharmacol Res.* 2020; 158; s. 1-12. ISSN 1096-1186.
38. Thome AD, Standaert DG, Harms AS. Fractalkine Signaling Regulates the Inflammatory Response in an alpha-Synuclein Model of Parkinson Disease. *PLoS One.* 2015; 10(10); s. 1-13. ISSN 1932-6203.
39. Chen Z, Chen S, Liu J. The role of T cells in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2018; 169; s. 1-23. ISSN 1873-5118.
40. Gonzalez H, Contreras F, Pacheco R. Regulation of the Neurodegenerative Process Associated to Parkinson's Disease by CD4+ T-cells. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2015; 10(4); s. 561-75. ISSN 1557-1904.
41. Baird JK, Bourdette D, Meshul CK, Quinn JF. The key role of T cells in Parkinson's disease pathogenesis and therapy. *Parkinsonism Relat Disord.* 2019; 60; s. 25-31. ISSN 1873-5126.
42. Kannarkat GT, Boss JM, Tansey MG. The role of innate and adaptive immunity in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis.* 2013; 3(4); s. 493-514. ISSN 1877-718X.
43. Roberts RF, Fon EA. Presenting mitochondrial antigens: PINK1, Parkin and MDVs steal the show. *Cell Res.* 2016; 26(11); s. 1180-1. ISSN 1748-7838.
44. Fahmy AM, Boulais J, Desjardins M, Matheoud D. Mitochondrial antigen presentation: a mechanism linking Parkinson's disease to autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 2019; 58; s. 31-7. ISSN 1879-0372.
45. Yan X, Wang B, Hu Y, Wang S, Zhang X. Abnormal Mitochondrial Quality Control in Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Neurosci.* 2020; 14; s. 1-18. ISSN 1662-5102.
46. Mantegazza AR, Marks MS. Pink Light on Mitochondria in Autoimmunity and Parkinson Disease. *Cell Metab.* 2016; 24(1); s. 11-2. ISSN 1932-7420.



47. Garretti F, Agalliu D, Lindestam Arlehamn CS, Sette A, Sulzer D. Autoimmunity in Parkinson's Disease: The Role of alpha-Synuclein-Specific T Cells. *Front Immunol.* 2019; 10 s. 1-12. ISSN 1664-3224.
48. Castillo-Gonzalez JA, Loera-Arias MJ, Saucedo-Cardenas O, Montes-de-Oca-Luna R, Garcia-Garcia A, Rodriguez-Rocha H. Phosphorylated alpha-Synuclein-Copper Complex Formation in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis.* 2017; 2017; s. 1-9. ISSN 2090-8083.
49. Burre J, Sharma M, Sudhof TC. Cell Biology and Pathophysiology of alpha-Synuclein. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018; 8(3); s. 1-28. ISSN 2157-1422.
50. Allen Reish HE, Standaert DG. Role of alpha-synuclein in inducing innate and adaptive immunity in Parkinson disease. *J Parkinsons Dis.* 2015; 5(1); s. 1-19. ISSN 1877-718X.
51. Lindestam Arlehamn CS, Garretti F, Sulzer D, Sette A. Roles for the adaptive immune system in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Curr Opin Immunol.* 2019; 59; s. 115-20. ISSN 1879-0372.
52. Campos-Acuna J, Elgueta D, Pacheco R. T-Cell-Driven Inflammation as a Mediator of the Gut-Brain Axis Involved in Parkinson's Disease. *Front Immunol.* 2019; 10; s. 1-14. ISSN 1664-3224.
53. Cao JJ, Li KS, Shen YQ. Activated immune cells in Parkinson's disease. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2011; 6(3); s. 323-9. ISSN 1557-1904.
54. Prado C, Bernales S, Pacheco R. Modulation of T-cell mediated immunity by dopamine receptor d5. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2013; 13(2); s. 184-94. ISSN 2212-3873.
55. Yang P, Perlmutter JS, Benzinger TLS, Morris JC, Xu J. Dopamine D3 receptor: A neglected participant in Parkinson Disease pathogenesis and treatment? *Ageing Res Rev.* 2020; 57; s. 1-17. ISSN 1872-9649.
56. Schwab AD, Thurston MJ, Machhi J, Olson KE, Namminga KL, Gendelman HE, et al. Immunotherapy for Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2020; 137; s. 1-29. ISSN 1095-953X.
57. Fabbri M, Perez-Lloret S, Rascol O. Therapeutic strategies for Parkinson's disease: promising agents in early clinical development. *Expert Opin Investig Drugs.* 2020; 29(11); s. 1249-67. ISSN 1744-7658.
58. Chatterjee D, Kordower JH. Immunotherapy in Parkinson's disease: Current status and future directions. *Neurobiol Dis.* 2019; 132; s. 1-12. ISSN 1095-953X.