

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

Einfluss von Kavalaktonen auf Mikroglia und Astrozyten

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

vorgelegt von
Jan Neumann

Kiel, 2014

1. Referent: Prof. Dr. Lucius

2. Referent: Prof. Dr. Gohlke

Tag der mündlichen Prüfung: 15.04.2015

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Morbus Parkinson	1
1.2	Mikroglia und Neuroinflammation	2
1.3	Astrozyten	6
1.4	Kava – <i>Piper methysticum</i>	7
1.4.1	Geschichte	7
1.4.2	Chemische Struktur	9
1.4.3	Nebenwirkungen	9
1.4.4	Effekte	11
1.5	Zielsetzung	12
2.	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.1.1	Geräte und Hilfsmittel	13
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	14
2.1.3	Chemikalien	14
2.1.4	Kavalaktone	16
2.1.5	Enzyme, Primer und <i>TaqMan</i> -Sonden	16
2.1.6	Gebrauchsfertige Kits	16
2.1.7	Antikörper	16
2.1.8	Lösungen und Puffer	17
2.1.9	Software	20
2.1.10	Versuchstiere	20
2.2.	Methoden	20
2.2.1	Gewinnung primärer Mikroglia und Astrozyten	20
2.2.2	Kultur und Aussaat und Stimulation von Mikroglia	21
2.2.3	Kultur und Aussaat und Stimulation von Astrozyten	21
2.2.4	Immunzytochemische Reinheitskontrolle der Astrozytenkultur	23
2.2.5	MTT Test	23
2.2.6	NO-Messung	23
2.2.7	Untersuchung der Zellmorphologie durch Färbung mit	

	Coomassie Blue	24
2.2.8	Untersuchungen auf RNA-Ebene	24
2.2.8.1	RNA-Isolierung	24
2.2.8.2	Reverse Transkription	25
2.2.8.3	Relative qPCR mit TaqMan®- System	25
2.2.9	Untersuchungen auf Proteinebene	26
2.2.9.1	Proteinisolierung und –quantifizierung	26
2.2.9.2	Western Blot	27
2.2.9.3	ELISA	28
2.2.10	Statistik	28
3.	Ergebnisse	29
3.1	Einfluss der Kavalaktone Kavain, Methysticin und Yangonin auf das Überleben von Mikroglia und Astrozyten	29
3.2	Einfluss der Kavalaktone Kavain, Methysticin und Yangonin auf die Stickoxid (NO)-Produktion von Mikroglia	30
3.3	Einfluss der Kavalaktone Kavain, Methysticin und Yangonin auf die Zellmorphologie von Mikroglia	31
3.4	Einfluss der Kavalaktone Kavain, Methysticin und Yangonin auf die mRNA-Synthese proinflammatorischer Mediatoren in Mikroglia und Astrozyten	34
3.4.1	Einfluss von Kavain auf die iNOS-mRNA-Synthese in Mikroglia und Astrozyten	35
3.4.2	Einfluss von Methysticin auf die iNOS-mRNA-Synthese in Mikroglia und Astrozyten	36
3.4.3	Einfluss von Yangonin auf die iNOS-mRNA-Synthese in Mikroglia und Astrozyten	37
3.4.4	Einfluss einer Koinkubation von Kavain, Methysticin und Yangonin auf die iNOS-mRNA-Synthese in Mikroglia und Astrozyten	38
3.4.5	Einfluss von Kavain auf die IL-6-mRNA-Synthese in Mikroglia und Astrozyten	39
3.4.6	Einfluss von Methysticin auf die IL-6-mRNA-Synthese in Mikroglia und Astrozyten	40
3.4.7	Einfluss von Yangonin auf die IL-6-mRNA-Synthese in Mikroglia und Astrozyten	41

3.4.8	Einfluss einer Koinkubation von Kavain, Methysticin und Yangonin gemeinsam auf die IL-6-mRNA-Synthese in Mikroglia und Astrozyten	42
3.4.9	Einfluss von Kavain auf die IL-1 β -mRNA-Synthese in Mikroglia und Astrozyten	43
3.4.10	Einfluss von Methysticin auf die IL-1 β -mRNA-Synthese in Mikroglia und Astrozyten	44
3.4.11	Einfluss von Yangonin auf die IL-1 β -mRNA-Synthese in Mikroglia und Astrozyten	45
3.4.12	Einfluss einer Koinkubation von Kavain, Methysticin und Yangonin gemeinsam auf die IL-1 β -mRNA-Synthese in Mikroglia und Astrozyten	46
3.4.13	Einfluss von Kavain auf die TNF- α -mRNA -Synthese in Mikroglia und Astrozyten	47
3.4.14	Einfluss von Methysticin auf die TNF- α -mRNA -Synthese in Mikroglia und Astrozyten	48
3.4.15	Einfluss von Yangonin auf die TNF- α -mRNA -Synthese in Mikroglia und Astrozyten	49
3.4.16	Einfluss einer Koinkubation von Kavain, Methysticin und Yangonin gemeinsam auf die TNF- α -mRNA -Synthese in Mikroglia und Astrozyten	50
3.4.17	Zusammenfassende Darstellung der mRNA-Untersuchungen	51
3.5	Einfluss der Kavalaktone Kavain, Methysticin und Yangonin auf die Proteinsynthese proinflammatorischer Mediatoren in Mikroglia	52
3.5.1	Einfluss der Kavalaktone Kavain, Methysticin und Yangonin auf die Proteinsynthese von IL-6 in Mikroglia	52
3.5.2	Einfluss der Kavalaktone Kavain, Methysticin und Yangonin auf die Proteinsynthese von TNF- α in Mikroglia	53
3.6	Einfluss der Kavalaktone Kavain, Methysticin und Yangonin auf den ERK-Signalweg in Mikroglia	54

4.	Diskussion	56
4.1	Toxizität der Kavalaktone	56
4.2	Kavalaktone und Mikroglia	56
4.3	Einfluss von Yangonin auf Mikroglia und Astrozyten	59
4.4	Einfluss von Kavain und Methysticin auf Mikroglia und Astrozyten	60
4.5	Einfluss der Kombination von Kavain, Methysticin und Yangonin auf Mikroglia und Astrozyten	61
4.6	Einfluss von Kavain, Methysticin und Yangonin auf die Stickoxidproduktion von Mikroglia	62
4.7	Besonderheiten von Astrozyten	62
4.8	Einfluss von Kavalaktonen auf intrazelluläre Signalwege	63
4.9	Translationeller Ansatz - Klinische Relevanz von Kavalaktonen	64
5.	Zusammenfassung	65
6.	Literaturverzeichnis	66
	Erklärung	83
	Danksagung	84
	Curriculum vitae	85
	Veröffentlichungen	85

Abkürzungsverzeichnis

AD	Morbus Alzheimer, Demenz vom Alzheimer-Typ
AP-1	Aktivatorprotein 1
ARE	<i>Antioxidant response element</i>
CB	Cannabinoidrezeptor
DMF	Dimethylfumarat
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EAE	Autoimmune experimentelle Enzephalitis
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FDU	Fluorodesoxyuridin
FKS	Fetales Kälberserum
GDNF	<i>Glial-derived neurotrophic factor</i>
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
IKK	NF- κ B-Inhibitor-kinase
IL-1 β	Interleukin 1 beta
IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleukin 10
IFN- γ	Interferon gamma
iNOS	induzierbare Stickoxidsynthase
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
LPS	Lipopolysaccharid, Endotoxin
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MEK	MAP-Kinase-Kinase
MPTP	Methylphenyltetrahydropyridin
MTT	Dimethylthiazoldiphenyltetrazoliumbromid
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
Nrf-2	<i>Nuclear factor (erythroid-derived-2)-like 2</i>
PD	Morbus Parkinson
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1: *Piper methysticum*. Blätter und Blütenspitzen.
- Abb. 1.2: *Piper methysticum*. Getrocknete laterale Wurzeln.
- Abb. 1.3: Chemische Struktur der Kavalaktone.
- Abb. 3.1: Einfluss von Kavain, Methysticin, Yangonin und LPS auf das Zellüberleben von Mikroglia und Astrozyten.
- Abb. 3.2: Einfluss von Kavain, Methysticin, Yangonin auf die NO-Produktion von Mikroglia.
- Abb. 3.3: Veränderung der Zellmorphologie bei Koinkubation mit LPS.
- Abb. 3.4: Veränderung der Zellmorphologie von Mikroglia unter dem Einfluss der Kavalaktone Kavain, Methysticin, Yangonin in An- oder Abwesenheit von LPS.
- Abb. 3.5: Einfluss von Kavain auf die iNOS-mRNA von Mikroglia und Astrozyten.
- Abb. 3.6: Einfluss von Methysticin auf die iNOS-mRNA von Mikroglia und Astrozyten.
- Abb. 3.7: Einfluss von Yangonin auf die iNOS-mRNA von Mikroglia und Astrozyten.
- Abb. 3.8: Einfluss einer Koinkubation von Kavain, Methysticin und Yangonin auf die iNOS-mRNA von Mikroglia und Astrozyten.
- Abb. 3.9: Einfluss von Kavain auf die IL-6-mRNA von Mikroglia und Astrozyten.
- Abb. 3.10: Einfluss von Methysticin auf die IL-6-mRNA auf Mikroglia und Astrozyten.
- Abb. 3.11: Einfluss von Yangonin auf die IL-6-mRNA-Synthese von Mikroglia und Astrozyten.
- Abb. 3.12: Einfluss einer Koinkubation von Kavain, Methysticin und Yangonin auf die IL-6-mRNA von Mikroglia und Astrozyten.
- Abb. 3.13: Einfluss von Kavain auf die IL-1 β -mRNA von Mikroglia und Astrozyten.
- Abb. 3.14: Einfluss von Methysticin auf die IL-1 β -mRNA von Mikroglia und Astrozyten.
- Abb. 3.15: Einfluss von Yangonin auf die IL-1 β -mRNA von Mikroglia und Astrozyten.
- Abb. 3.16: Einfluss einer Koinkubation von Kavain, Methysticin und Yangonin auf die IL-1 β -mRNA von Mikroglia und Astrozyten.
- Abb. 3.17: Einfluss von Kavain auf die TNF- α -mRNA von Mikroglia und Astrozyten.
- Abb. 3.18: Einfluss von Methysticin auf die TNF- α -mRNA von Mikroglia und Astrozyten.
- Abb. 3.19: Einfluss von Yangonin auf die TNF- α -mRNA von Mikroglia und Astrozyten.
- Abb. 3.20: Einfluss einer Koinkubation von Kavain, Methysticin und Yangonin auf die TNF- α -mRNA von Mikroglia und Astrozyten.
- Abb. 3.21: Einfluss von Kavain, Methysticin und Yangonin auf die Proteinsynthese von IL-6 in Mikroglia.
- Abb. 3.22: Einfluss von Kavain, Methysticin und Yangonin auf die Proteinsynthese von TNF- α in Mikroglia.
- Abb. 3.23: Einfluss von Kavain, Methysticin und Yangonin die Menge von pERK1/2 in Mikroglia.
- Abb. 3.24: Densitometrische Auswertung des Einflusses von Kavain, Methysticin und Yangonin die Menge von pERK1/2 in Mikroglia.
- Tab. 3.1: Zusammenfassung der PCR-Ergebnisse (Abb. 11-26) in Mikroglia.
- Tab. 3.2: Zusammenfassung der PCR-Ergebnisse (Abb. 11-26) in Astrozyten.

1. Einleitung

1.1 Morbus Parkinson

Morbus Parkinson (PD) ist eine Erkrankung, die durch einen fortschreitenden selektiven Zellverlust dopaminerger Neurone in der *Substantia nigra* (SN) im Hirnstamm und durch die Ansammlung von aggregiertem α -Synuclein und intraneuronalen Lewy-Körperchen in Teilen von Hirnstamm und später auch Basalganglien und Kortex gekennzeichnet ist (Braak *et al.*, 2006). Das Gehirn der Betroffenen zeigt nach einer oftmals langen Phase der Kompensation Zeichen eines vorwiegend striatalen Mangels an Dopamin, der sich hauptsächlich auf die Motorik auswirkt. Zum Diagnosezeitpunkt zeigen die Erkrankten definitionsgemäß eine ausgeprägte Bewegungshemmung in Kombination mit mindestens einem der Symptome Muskelsteifigkeit, Zittern und posturale Instabilität. Weitere, den Verlauf komplizierende Symptome sind vorwiegend vegetativer, psychischer sowie kognitiver Natur (Lees *et al.*, 2009). Die Epidemiologie zeigt eine mit dem Alter steigende Prävalenz weltweit. Sie wird generell auf etwa 1% bei Menschen über 60 Jahren geschätzt. Nach dem Morbus Alzheimer (AD) ist PD die zweithäufigste neurodegenerative Krankheit (de Lau *et al.*, 2006). Aufgrund der demographischen Entwicklung wird bis 2030 ein starker Anstieg und für einige Länder eine Verdopplung der Fallzahlen bis 2050 prognostiziert (Bach *et al.*, 2011). Der Entstehungsmechanismus der PD ist unzureichend geklärt. Sowohl genetische als auch Umweltfaktoren können das Erkrankungsrisiko erhöhen (Wirdefeldt *et al.*, 2011, Di Monte *et al.*, 2002). Wahrscheinlich liegen der PD mehrere phänotypisch ähnliche Ursachen zugrunde. Ein Teil der Fälle scheint mit der Inkorporation von Pestiziden im Zusammenhang zu stehen, aber auch Schädeltraumata können die Wahrscheinlichkeit zu erkranken erhöhen (Dick *et al.*, 2007). Doch was passiert eigentlich im Hirnstamm der Betroffenen, teilweise schon lange vor dem Auftreten der ersten Symptome? Es zeichnen sich vier wesentliche Pfeiler in der Pathogenese der PD ab: Veränderter Proteinumsatz, mitochondriale Dysfunktion, oxidativer Stress und Neuroinflammation (Schapira *et al.*, 2011, Barnum *et al.*, 2010). In betroffenen Neuronen bilden sich sogenannte Lewy-Körperchen, die zum großen Teil aus α -Synuclein bestehen. Diese können proinflammatorisch auf Mikroglia und Astrozyten wirken und verändern des Ubiquitin-Proteasom-System (Duyckaerts *et al.*, 2010, Roodveldt *et al.*, 2008). Es wurden auch Störungen der proteinabbauenden Systeme (Makroautophagie und Chaperon-vermittelte-Autophagie) und der Mitophagie postuliert (Xilouri *et al.*, 2010). Desweiteren scheint die zelluläre Überwachung der mitochondrialen Funktion gestört zu sein (de Castro *et al.*, 2011, Pilsel *et al.*, 2012). Nigrale Neurone von Patienten mit PD zeigen Anzeichen vermehrten oxidativen Stresses, die Seitenketten intrazellulärer Proteine sind vermehrt durch Sauerstoffradikale, reaktive Stickstoffverbindungen und Produkte der Lipidperoxidation verändert (Jomova *et al.*, 2010, Tobon-Velasco *et al.*, 2010).

1.2 Mikroglia und Neuroinflammation

Neuroinflammation bedeutet zunächst einmal eine lokale Immunreaktion des Gehirns auf infektiöse Stoffe, Moleküle, die im Rahmen von traumatischen oder ischämischen Ereignissen freigesetzt werden, und abnormale Proteinaggregate (Chakraborty *et al.*, 2010). Diese Reaktion dient der Neutralisierung des zugrunde liegenden Agens und letztlich der Restitution der Läsion (Minghetti, 2005).

Mikroglia sind die ortsständigen myeloischen Abwehrzellen des ZNS. Sie schützen ein hochsensibles und durch die Blut-Hirn-Schranke immunprivilegiertes Gewebe vor Krankheitserregern und anderen Noxen (DeSalvo *et al.*, 2011). Bei Aktivierung gehen sie morphologisch von einem ramifizierten, d.h. einem weitverzweigten und ausgedehnten (Überwachungs-)Zustand über in eine amöboide Zellform (Nimmerjahn *et al.*, 2005). Abwehrreaktionen im ZNS müssen äußerst schnell und örtlich begrenzt ablaufen, damit kostbare neuronale Strukturen möglichst wenig in Mitleidenschaft gezogen werden. Vermutlich führen die meisten dieser Abwehrreaktionen zu einer bestmöglichen Beseitigung schädlicher Einflüsse. Mikroglia fördern auf diese Weise mutmaßlich das Überleben angeschlagener, noch überlebensfähiger Neurone (Ransohoff und Brown, 2012, Inoue *et al.*, 1998). Physiologischerweise herrscht im ZNS ein antiinflammatorisches Milieu, welches durch eine hohe Konzentration von Transforming growth factor beta (TGF- β), Interleukin 10 (IL-10) und Gangliosiden gekennzeichnet ist (Malipiero *et al.*, 2006, Strle *et al.*, 2001, Irani *et al.*, 1996). Zahlreiche Indizien deuten jedoch darauf hin, dass chronisch entzündliche Prozesse im Gehirn, und in deren Zentrum Mikroglia, an der Pathogenese vieler neurodegenerativer Krankheiten beteiligt sind.

Post mortem fand sich in der SN von Parkinsonpatienten eine erhöhte Mikroglia-dichte (McGeer *et al.*, 1988). Im Liquor von Parkinsonpatienten fanden sich erhöhte Spiegel von Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 beta (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) (Long-Smith *et al.*, 2009, Müller *et al.*, 1998, Mogi *et al.*, 1994). In der SN verstorbener Parkinsonpatienten wurde ein vermehrtes Vorkommen der induzierbaren Stickoxidsynthase (iNOS) (Knott *et al.*, 2000, Hunot *et al.*, 1996), IL-1 β und TNF- α nachgewiesen (Hunot *et al.*, 1999, Boka *et al.*, 1994). Gewissermaßen bestätigend haben epidemiologische Studien gezeigt, dass Polymorphismen der Gene für IL-6, IL-1 β und TNF- α das Risiko erhöhen, an PD zu erkranken (Wahner *et al.*, 2007, Wu *et al.*, 2007, Hakansson *et al.*, 2005, McGeer *et al.*, 2002, Krüger *et al.*, 2000). In PET-Studien fand sich eine überdurchschnittliche Mikrogliaaktivität in SN, Pons, Basalganglien, frontalem und temporalem Kortex von Parkinsonpatienten (Iannaccone *et al.*, 2013, Gerhard *et al.*, 2006). Im Rahmen physiologischer zentralnervöser Alterungsprozesse zeigte sich eine ausgeprägte und breite

Steigerung der Expression von Genen im Bereich der Aktivierung des angeborenen Immunsystems, dieses betrifft u.a. *Toll-like-Rezeptor* (TLR)- und Inflammasom-aktivierte Signalkaskaden (Cribbs *et al.*, 2012).

Die Überaktivierung glialer Zellen und die damit einhergehende erhöhte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine trägt vermutlich auch zur Pathogenese der Multiplen Sklerose (Matsumoto *et al.*, 1992), der AD (Itagaki *et al.*, 1989), aber auch psychiatrischer Krankheiten wie Schizophrenie und Depression (Beumer *et al.*, 2012) bei.

Ebenso kann das vermehrte Vorkommen proinflammatorischer Zytokine in Liquor und SN von Parkinsonpatienten auch nur eine Folge der Erkrankung und kein bedeutendes Element der Pathogenese sein (Wyss-Coray und Mucke, 2002).

Erhalten Mikroglia womöglich einen Zustand lokaler chronischer Entzündung aufrecht? Die große Mehrzahl der Hinweise sprechen dafür. Mikroglia besitzen die Fähigkeit ihre Umgebung massiv zu schädigen und Zytokine zu sezernieren, sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung eines Teufelskreises, der zu anhaltender chronischer Neuroinflammation beiträgt (Lijia *et al.*, 2012, Qian *et al.*, 2010, Maquire-Zeiss *et al.*, 2010, Zecca *et al.*, 2008).

Mikroglia als Elemente der angeborenen Immunität erkennen intra- und extrazelluläre molekulare Muster mithilfe von Mustererkennungsrezeptoren (PRR). Eine maßgebliche Rolle spielen TLR, diese erkennen eine breite Palette von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs) von Bakterien, Viren, Pilzen, Hefen und Parasiten (Medzhitov 2001), aber auch endogene, sogenannte Gefahr-assoziierte molekulare Muster (DAMPs). In Mikroglia und Astrozyten werden u.a. TLR-2,-3,-4 und -9 exprimiert (Lee *et al.*, 2013, Bsibsi *et al.*, 2002). Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien sind exogene Liganden von TLR-4 (Poltorak *et al.*, 1998). Endogene Liganden von TLR-4 sind u.a. Hitzeschockproteine (Asea *et al.*, 2002, Vabulas *et al.*, 2001), *High Mobility Group Box-1* (HMGB1) (Park *et al.*, 2004), β -Defensin (Biragyn *et al.*, 2004), Protein S100 (Vogl *et al.*, 2007), oxidierte LDL (Miller *et al.*, 2004) und gesättigte Fettsäuren (Shi *et al.*, 2006). TLR-4 kann mit seinen Begleitproteinen u.a. den Transkriptionsfaktor *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B) und die Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAP-K) *Extracellular signal-regulated kinase* (ERK) 1 und 2 aktivieren (Küper *et al.*, 2012, Yang *et al.*, 2000). ERK 1 und 2 besitzen eine hohe strukturelle und funktionelle Homologie, sie werden daher gemeinsam als ERK1/2 bezeichnet (Roskoski, 2012). Das durch Rezeptortyrosinkinasen aktivierte Rattensarkomprotein (Ras) kann u.a. MAP-Kinase-Kinase (MEK) und NF- κ B aktivieren (Chang *et al.*, 2003, Peyssiniaux *et al.* 2000, Yan *et al.*, 1998). ERK 1 und 2 sind Serin/Threoninkinasen und werden per Phosphorylierung durch MEK 1 und 2 zu pERK 1/2 aktiviert (Pouyssegur *et al.*, 2002, Xu *et al.*, 1995). ERK sind als essentielle Schaltstellen der

intrazellulären Signaltransduktion u.a. an der Regulation von Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Apoptose und Astroglisereaktion beteiligt (Kyosseva, 2004, Carbonell *et al.*, 2003). PERK kann seinerseits verschiedene Zielstrukturen phosphorylieren und damit u.a. die Transkriptionsfaktoren c-Myc, c-Jun, Aktivatorprotein 1 (AP-1), NF- κ B (via NF- κ B-Inhibitor-kinase (IKK)) und *cAMP-response-element-binding protein* (CREB) via ribosomale s6-Kinase (RSK) aktivieren (Chang *et al.*, 2003, Blenis 1993). In der Folge kann die Transkription von IL-6 durch AP-1 und von pro-IL-1 β und TNF- α durch AP-1 und NF- κ B eingeleitet werden (Jeon *et al.*, 2000, Kolbus *et al.*, 2000, Van den Berghe *et al.*, 2000, Cogswell *et al.*, 1994, Collart *et al.*, 1990).

Die Freisetzung von IL-1 β aus pro-IL-1 β durch Caspase 1 unterliegt der Regulation großer intrazellulärer multimolekularer Komplexe, welche Inflammasome genannt werden (Proell *et al.*, 2008). Das umfangreich untersuchte Nacht-, LRR- und PYD-Domänen-enthaltendes Protein-3 (NLRP3)-Inflammasom wird u.a. durch hohe extrazelluläre ATP-Spiegel (Pelegriin und Surprenant, 2006), niedrige intrazelluläre Kaliumspiegel (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2007), durch Amyloid- β (Halle *et al.*, 2008), reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Jin und Flavell, 2010), bakterielle Lipoproteine und - Toxine (Meixenberger *et al.*, 2010, Munoz-Planillo *et al.*, 2009), Pilzantigene (Hise *et al.*, 2009) und virale RNA (Allen *et al.*, 2009) aktiviert. Weiter kann auch über den Inflammasomweg eine Aktivierung von NF- κ B erfolgen (Sarkar *et al.*, 2006).

Die im vorigen Absatz beschriebene Signalkaskade kann also durch viele verschiedene Stimuli aktiviert werden und innerhalb kurzer Zeit zur Freisetzung von IL-1 β führen. IL-1 β wird als Schlüsselzytokin der angeborenen Immunabwehr im ZNS angesehen, es ist biologisch hochpotent und bewirkt seine Effekte wahrscheinlich auto- oder parakrin über TLR4, was zur Produktion von iNOS, interzellulärem Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) und Cyclooxygenase 2 (COX-2) führt (Hanamsagar *et al.*, 2012, Dinarello, 2010). Auch im mit 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) induzierten Parkinson-Mausmodell bewirkt IL-1 β eine verstärkte Aktivität der iNOS (Godoy *et al.*, 2008). IL-1 β ist ein wichtiger Mediator akuter und chronischer inflammatorischer neurodegenerativer Prozesse, darunter auch der dopaminergen Degeneration (Ferrari *et al.*, 2006, Allan *et al.*, 2005). IL-1 β scheint auch die Astroglisereaktion zu initiieren (Herx und Yong, 2001). Durch NF- κ B aktiviert IL-1 β u.a. die Transkription von IL-6, TNF- α und seines eigenen Vorläuferpeptids (Srinivasan *et al.*, 2004).

NF- κ B aktiviert die Transkription der iNOS via p38 und c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) in Mikroglia (Kim *et al.*, 2012). Aktivierte Mikroglia bilden mithilfe der iNOS aus L-Arginin NO. Die Menge des produzierten NO korreliert mit der Expression der iNOS, da sie im Gegensatz zu den konstitutiv exprimierten NO-Synthasen eNOS und nNOS nur irreversibel aktiviert werden kann (Stuehr 1999, Xie *et al.*, 1992). Eine Regulationsmöglichkeit besteht jedoch über den verhältnismäßig schnellen Turnover des Enzyms (Kolodziejewski *et al.*, 2004). NO

wird von Mikroglia als Kampfstoff gegen Pathogene verwendet (Mocada *et al.*, 1991), von Nervenzellen als Neurotransmitter, (Jaffrey und Snyder 1995) und von Endothelzellen zur Regulation des Tonus' der glatten Gefäßwandmuskulatur (Furchgott *et al.*, 1984).

NO schädigt u.a. neuronale Zellen (Boje *et al.*, 1992). NO kann an der Zellwand mit dem dort durch die Nikotinamidadenindinukleotidphosphat-(NADPH)-Oxidase gebildeten Hyperoxid zum hochreaktiven Peroxynitrit reagieren (Beckman *et al.*, 1990), welches mit seiner Säure im Gleichgewicht steht und mit Kohlendioxid zum hochreaktiven Nitroperoxycarbonat weiterreagieren kann (Pryor *et al.*, 1994). Die beim Zerfall von Nitroperoxycarbonat entstehenden Produkte können Tyrosine nitrieren (Pavlovic und Santaniello, 2007).

Peroxynitrit kann die DNA durch multiple Oxidierungen von Purinen und Pyrimidinen schädigen (Ohshima *et al.*, 2006), ungesättigte Fettsäuren oxidieren (Trostchansky *et al.*, 2013) und Proteine nitrieren und oxidieren (Kalyanaraman 2013). Die exzessive Expression der iNOS und die damit verbundene vermehrte Produktion von Stickstoffradikalen (RNS) schädigt insbesondere auch dopaminerge Neurone der SN im Rahmen der Pathogenese der PD (Przedborski und Ischiropoulos, 2005). Mikroglia-produzierte RNS spielen wahrscheinlich auch eine große Rolle in der Pathogenese des AD (Reynolds *et al.*, 2007, Calabrese *et al.*, 2006). Die relativ geringen antioxidativen Kapazitäten bei hohem Energieumsatz können eine erhöhte oxidative Verwundbarkeit des Gehirns erklären (Uttara *et al.*, 2009). Darüber hinaus verstärkt NO die astrozytäre TNF- α -Produktion (Hirsch *et al.*, 2009).

IL-6 scheint gerade in der Frühphase der Entzündungsreaktion von Bedeutung zu sein (Galiano *et al.*, 2001). Im ZNS wird IL-6 hauptsächlich von Astrozyten produziert. Im Rahmen von Neuroinflammation spielt es eine wichtige Rolle in Astrogliose, Mikrogliose und der Integrität der Blut-Hirn-Schranke (Spooren *et al.*, 2011, Woiciechowsky *et al.*, 2004).

TNF- α ist ein multifunktionelles proinflammatorisches Zytokin. Es wird von Astrozyten, Mikroglia und Neuronen produziert (Park *et al.*, 2010) und kommt an Entzündungsherden im Gehirn vermehrt vor, was eine Beteiligung am Krankheitsfortschritt und neuronalem Schaden impliziert – und es damit zu einem Ziel der Entwicklung neuer Therapien zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen macht (Tansey *et al.*, 2008). Es liegen umfangreiche experimentelle Beweise vor, dass TNF- α bei chronischer Neuroinflammation eine Schlüsselstelle für Krankheitsfortschritt, Gliareaktion, Demyelinisierung, Entzündung, Blut-Hirn-Schranken-Funktionsverlust und Zelltod innehat (Montgomery *et al.*, 2011).

1.3 Astrozyten

Astrozyten bilden das mechanische Gerüst des ZNS und regulieren akribisch das Extrazellulärmilieu in ihrer Umgebung, um optimale Bedingungen für die Neurone zu gewährleisten (Sidoryk-Wegrzynowicz *et al.*, 2011). Ihnen wurde lange eine neuroprotektive Rolle bei entzündlichen Prozessen zugeschrieben, denn sie können ROS entgiften oder neurotrophe Faktoren wie *Glial-derived-neurotrophic factor* (GDNF) sezernieren (Lin *et al.*, 1993). Allerdings können Astrozyten innerhalb der Parkinsonpathogenese auch schädliche Einflüsse auf Neuronen ausüben, beispielsweise durch vermehrte Expression des Enzyms Myeloperoxidase, welches die Produktion von Oxidantien katalysiert (Choi *et al.*, 2005). Einigkeit besteht über die konstitutive Expression von TLR-3 in Astrozyten (Park *et al.*, 2006), die Expression von TLR-2, -4, -5 und -9 scheint nur im aktivierten Zustand möglich (Bowman *et al.*, 2003). Astrozyten können pro- und antiinflammatorische Moleküle sezernieren und womöglich die mikrogliale Aktivität modulieren (McGeer, 2008). Die astrozytäre iNOS-Expression ist umstritten, möglicherweise induzieren IL-1 β und TNF- α aus Mikroglia und Interferon-gamma (IFN- γ) aus T-Lymphozyten seine Synthese (John *et al.*, 2003). IL-1 β und LPS induzieren die astrozytäre Produktion von TNF- α (Goldfeld *et al.*, 1990).

Astrozyten erscheinen morphologisch in zwei Hauptformen, als langgestreckte Faserglia hauptsächlich in der weißen Substanz und als protoplasmatische Astrozyten (Kimmelberg, 2010). Letztere akkumulieren möglicherweise alpha-Synuclein im Rahmen der Pathogenese des PD (Song *et al.*, 2009). Im weiteren Krankheitsverlauf werden stetig mehr Astrozyten in den Prozess mit einbezogen, einhergehend mit einer wachsenden mikroglialen Antwort (Halliday und Stevens, 2011).

1.4 Kava – *Piper methysticum*

Auf der Suche nach Substanzen, welche dem schädlichen Prozess der chronischen Überaktivierung des angeborenen Immunsystems im ZNS Einhalt gebieten können, wurde in dieser Dissertation der Einfluss von Kavalaktonen auf Gliazellen untersucht. Kavalaktone werden aus der Kavapflanze (Abb. 1.1), einem Pfefferabkömmling, welcher in Teilen der Südsee traditionell kultiviert und dessen Wurzeln rituell konsumiert werden, gewonnen.



Abb. 1.1: *Piper methysticum*. Blätter und Blütenspitzen. Aufgenommen von Forest & Kim Starr, 149 Hawea Pl., Makawao, HI 96768, USA.

1.4.1 Geschichte

Kavalaktone oder Kavapyrone stellen einen Teil der aktiven Inhaltsstoffe der Pfefferpflanze *Piper methysticum* dar. Sie ist seit mindestens dreitausend Jahren auf den Inseln des zentralen Pazifiks zu finden und ein domestizierter Abkömmling des wilden Pfeffers *Piper wichmanii* (Lebot *et al.*, 1992, Brunton, 1989). Traditionell wird die Wurzel (Abb. 1.2) des Gewächses

zerkleinert und mit Wasser aufgegossen. Der Effekt des Konsums wurde von Hocart 1929 folgendermaßen beschrieben: „Angenehm, warm, heiter und gesellig, aber träge und nicht gesprächig, der Verstand ist nicht beeinträchtigt“ (Hocart, 1929). Die Insulaner benutzen Kava um Gäste willkommen zu heißen, zu Beginn oder am Ende von Arbeiten in den Dörfern, als Vorbereitung vor Reisen und Ausflügen, um Häuptlinge und Titel zu honorieren, Verträge zu ratifizieren, Geburten, Hochzeiten und Todesfälle zu feiern, vor Kriegen oder Fehden, um Götter zu ehren und Kranke zu heilen (Singh, 1992). Zur Zeit der ersten europäischen Observationen wurde Kava in allen drei geographischen Regionen des Pazifiks angebaut und kultiviert. Die meisten Polynesier, viele Melanesier und einige Micronesier nutzten die Pflanze in der Geschichte und viele führen dieses bis heute fort (Lindstrom, 2004). Erste wissenschaftliche Abhandlungen hierzu stammen von Cook (1785), später haben u.a. Newell (1947) und Titcomb (1948) über den lokalen Gebrauch der Kavapflanze im Pazifikraum im zwanzigsten Jahrhundert berichtet.



Abb. 1.2: *Piper methysticum*. Getrocknete laterale Wurzeln. (Aufnahme: J. Neumann)

Die chemische Untersuchung der Inhaltsstoffe von *Piper methysticum* wurde durch Goble, O'Rourke und Cuzent begonnen, sie alle identifizierten unabhängig voneinander die neutralen kristallinen Verbindungen Methysticin und „Kavahine“ (Cuzent, 1861, Goble, 1860, O'Rourke, 1860). Gut zehn Jahre später wurde eine weitere neutrale kristalline Verbindung von Nölting und Kopp entdeckt, von Lewin bestätigt und Yangonin genannt (Lewin, 1886, Nölting und Kopp, 1874). Bei der genaueren Strukturanalyse von Methysticin, Kavain und Dihydrokavain taten sich vor allem die deutschen Chemiker Borsche und später Achenbach und Hänsel mit

ihren Forschungsgruppen hervor (Aschenbach und Regel 1973, Hänsel, 1968, Borsche und Peitzsch, 1930).

1.4.2 Chemische Struktur

Kavalaktone besitzen einen Laktonring, welcher an Position 4 eine Methoxygruppe aufweist, sowie einen Benzolring mit verschiedenen Substituenten. Die Ringe sind durch eine dreigliedrige Kohlenstoffbrücke verbunden. Interessanterweise ähneln Kavalaktone sowohl strukturell als auch in ihrer Wirkung dem Resveratrol, welches jedoch ein Stilbenderivat ist und im Gegensatz zu den Kavalaktonen keinen Laktonring besitzt. Resveratrol ist ein bekanntes Antioxidans, u.a. in roten Wein enthalten, und besitzt neuroprotektive und antiinflammatorische Eigenschaften (Lu *et al.*, 2010).

Kavalaktone besitzen verheißungsvolle pharmazeutische Eigenschaften wie gute Löslichkeit und hohe Zellpermeabilität (Polastri *et al.*, 2009). Wurden Kavalaktone traditionell in kalten Wasseremulsionen konsumiert, so besteht die moderne Darreichungsform meist aus höherpotenten alkoholischen Extrakten in Tablettenform.

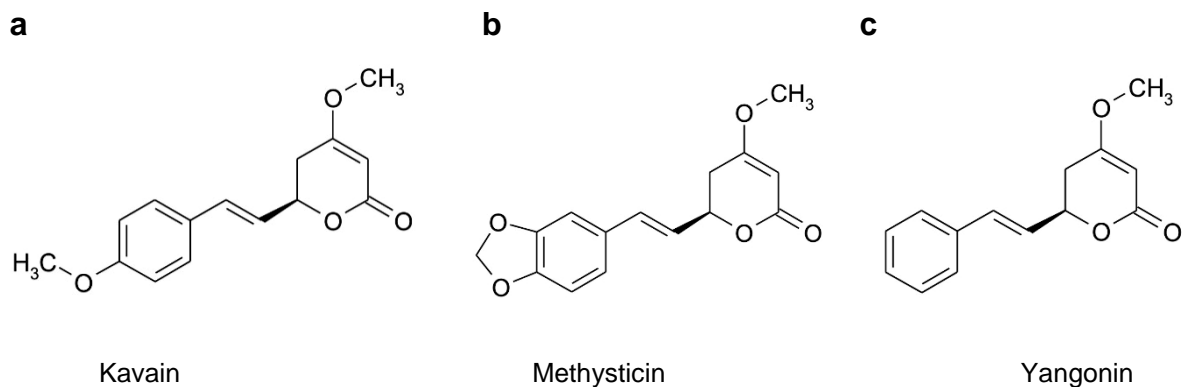


Abb. 1.3: Chemische Struktur der Kavalaktone. Der Laktonring von Kavain (**a**) ist an Position 12 mit einer weiteren Methoxygruppe substituiert. Beim Methysticin (**b**) ist der Benzolring an Position 12 und 13 zu einem Benzodioxol erweitert, im Fall von Yangonin (**c**) ist der Benzolring frei von weiteren Substituenten. Abbildungen gezeichnet von Uwe Schüßler, Universität Bremen.

1.4.2 Nebenwirkungen

Kavaprodukte wurden ab 1992 in vielen westlichen Ländern als „sanfte Anxiolytika“ zunehmend beliebt, dieser Zeitabschnitt wird „Kava-Boom“ genannt. Kavapräparate waren damals rezeptfrei erhältlich. Insbesondere 1996 und 1998 gab es einen enormen Anstieg der Kavaexporte, zumeist in die USA und nach Deutschland. Während dieser Zeit benutzten schätzungsweise 1,3 Millionen Menschen allein in Deutschland Kavapräparate. 1998 tauchten erste Berichte über Lebertoxizität im Zusammenhang mit dem Konsum von Kavaprodukten auf. Im Jahr 2000 verbot die Interkantonale Kontrollstelle (IKS) aufgrund von vier Fällen von

Lebertoxizität Kavaproducte die mit Azeton extrahiert worden waren in der Schweiz. 2001 begann das Bundesamt für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) eine gründlichere Untersuchung des Zusammenhanges von Lebertoxizität und Kavakonsum. Um die Jahreswende 2001-02 sprachen viele EU-Länder Sicherheitswarnungen für Kavaproducte aus. Ende 2001 war der Kavamarkt, obwohl noch keine Verbote ausgesprochen worden waren, effektiv zusammengebrochen. Im Juni 2002 verboten BfArM und IKS den Verkauf kavahaltiger Produkte aufgrund von 41 Fällen von Lebertoxizität in Deutschland und insgesamt 73 Fällen weltweit. Hierauf wurden Kavalaktone in vielen weiteren Ländern als Arzneimittel verboten. Die Qualität der Fallberichte war jedoch unterschiedlich, wie auch die Schwere der berichteten Leberbeschwerden. Die US-amerikanische *Federal Drug Administration* (FDA) sprach eine Warnung für Kavaproducte aus. Die Ursache für die Leberschädlichkeit einiger Kavaproducte ist bis heute nicht sicher geklärt (Baker, 2011). Die Lebertoxizität von Kavazubereitungen und -extrakten ist bis heute Gegenstand einer wissenschaftlichen Kontroverse (Olsen *et al.*, 2011, Teschke *et al.*, 2011, Rowe, 2011). Zu erwähnen ist an dieser Stelle auch ein besonderer Einzelfall einer 45-jährigen Frau, die nach mehrtägiger Einnahme eines Kavaextraktes eine schwere parkinsonoide Symptomatik entwickelte, welche sich unter der Gabe von Anticholinergika besserte. In ihrer Familie waren allerdings auch gehäuft Fälle essentiellen Tremors aufgetreten (Mesequer *et al.*, 2002). Der Effekt starken Kavakonsums auf die Haut wurde bereits früh beschrieben (Titcomb, 1948, Thomson, 1908, Beechey, 1831). Die Läsionen werden auf fijiianisch „kani“ oder „kanikani“ genannt. Zu ihrer Entstehung bedarf es regelmäßigem, beinahe täglichem Kavakonsum von mehreren Monaten bis zu einem Jahr. Dabei wird die Haut trocken, gelblich und schuppenbedeckt. Besonders betroffen sind Handflächen, Fußsohlen, Unterarme, Rücken und Schienbeine (Singh, 2004). Es gab verschiedene Theorien zur Ätiologie dieses Phänomens: Ansammlung von Pflanzenpigmenten (Shulgin, 1973) oder Kavalaktonen (Siegel, 1976) in der Haut, chronisch-allergische Dermatitis (Lebot und Cabalion, 1988), eine Pellagra-ähnliche Dermatose (Frater, 1958) und Reduktion glandulärer Sekretion (Davidson, 1899). Letzterer vermutete eine Interferenz von Kava und Vitamin D-Metabolismus. Der Zustand ließ sich nämlich auch in den schlimmsten Fällen durch eine Reduktion des Kavakonsums und eine ausgeglichene Diät beheben. Später ging man von einer Interferenz von Kava und Cholesterollowerstellung aus. Die zugrunde liegenden Daten stammen von einer Studie an einer australischen Aboriginepopulation, in welcher größte Mengen Kava konsumiert werden (Norton und Ruze, 1994, Mathews *et al.*, 1988) Eine neuere Publikation beschreibt den proinflammatorischen Effekt eines Kavaextraktes auf Mastzellen, welche an der Pathogenese der Kava-Dermopathie beteiligt sein könnten. Dieser Effekt konnte durch Stimulation mit purifizierten Kavalaktonen nicht repliziert werden und muss folglich durch die Wirkung des Gesamtextraktes und seiner Zusammensetzung bedingt sein (Shimoda *et al.*, 2012). Allerdings tritt die hier beschriebene

und im Englischen „kava dermatopathy“ genannte Nebenwirkung nur bei starkem und regelmäßigem Konsum auf und ist stets reversibel, so der Konsens der Autorenschaft.

1.4.3 Effekte

Kavalaktone sind bekannt als effektive und relativ nebenwirkungsarme alternative Anxiolytika. Sie besitzen sedierende, analgetische, lokalanästhetische, antikonvulsive und neuroprotektive Eigenschaften (Singh, 2002, Backhauss *et al.*, 1992). Epidemiologische Daten zeigen eine inverse Korrelation von durchschnittlichem Kavakonsum und der Häufigkeit von Malignomen insgesamt und Kolonkarzinomen im Speziellen (Triolet *et al.*, 2012, Steiner, 2000, Henderson *et al.*, 1995). Vielen Kavalaktonen konnte eine fungizide Wirkung nachgewiesen werden, was ihre ursprüngliche Funktion in der Pflanzenwurzel erklären könnte (Xuan *et al.*, 2006, Hänzel, 1968). Kavain vermag durch den Methylphenyltetrahydropyridin (MPTP) induzierten Untergang dopaminerger Neurone im Mausmodell dramatisch zu reduzieren. Die Autoren vermuteten eine reduzierte glutamaterge Exzitotoxizität als Wirkmechanismus (Schmidt und Ferger, 2001). Einige Kavalaktone wiesen antioxidative und neuroprotektive *in vitro* und *in vivo* Eigenschaften auf, indem sie die Expression einer Reihe antioxidativ wirksamer Gene über den *Nucleic factor erythroid-derived like-2/ antioxidant response element*-(Nrf2/ARE)-Signalweg verstärkten (Wruck *et al.*, 2008). Der Gruppe um Tanaka gelang es zwei Jahre später mit einem von ihnen entwickelten Kavalaktonderivat ebenfalls eine erheblich verstärkte Expression dieser Gene über denselben Signalweg zu erreichen und damit neurale PC12-Zellen vor andernfalls tödlichem oxidativen Stress zu schützen (Tanaka *et al.*, 2010). Einem standardisierten Kavaextrakt konnte im Mausmodell eine chemoprotektive und antikanzerogene Wirkung nachgewiesen werden (Johnson *et al.*, 2011). Einige Kavalaktone, insbesondere Kavain, konnten in der humanen Monozytenleukämiezelllinie THP-1 eine LPS-induzierte TNF- α -vermittelte Entzündung reduzieren und ließ Mäuse andernfalls tödliche Dosen von LPS überleben (Polastri *et al.*, 2009). Die Gruppe um Shaik konnte im selben Jahr zeigen, dass Methysticin starke NF- κ B-inhibierende Eigenschaften aufweist und die Tumorgenese in Lungengewebe verzögert (Shaik *et al.*, 2009). Kavain kann (in hohen Dosen) die Aktivierung von NF- κ B durch TNF- α sowie die damit verbundene veränderte Genexpression unterbinden (Folmer *et al.*, 2006). Auch Yangonin kann die TNF- α -Ausschüttung von Zelllinien vermindern (Hashimoto *et al.*, 2003).

1.5 Zielsetzung

Im vorangegangenen Teil wurde der aktuelle Forschungsstand über die Involvierung von Astrozyten und Mikroglia in chronische neurodegenerative Prozesse im Rahmen der PD beschrieben. Die zwangsweise simplifizierte Erforschung und Darstellung der molekularbiologischen Grundlagen wurde hierbei stets als Annäherung an die realen Abläufe gewertet, die schließlich einer verbesserten klinischen Behandlung betroffener Patienten zugute kommen soll.

Vor diesem Hintergrund war das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluss von Kavain, Methysticin und Yangonin auf primäre Mikroglia und Astrozyten zu untersuchen. Hierzu sollte zunächst die Toxizität der Substanzen untersucht werden, gefolgt von einer Analyse möglicher Effekte der oben genannten Kavalaktone auf den zytosolischen NO-Gehalt und die Morphologie der Zellen. Anschließend sollte eine molekularbiologische Analyse des potentiellen Einflusses auf iNOS, IL-6, IL-1 β und TNF- α erfolgen. Schließlich sollte der mögliche Einfluss auf Signalkaskaden untersucht werden und die gewonnenen Ergebnisse dann im Hinblick auf die publizierte Literatur diskutiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Hilfsmittel

Brutschrank Hera Cell 150	Heraeus (Hanau)
Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss (Jena)
Mikroskop Axioskop	Zeiss (Jena)
Mikroskop Wilovert	Hund (Wetzlar)
Binokular STEMI V8	Zeiss (Jena)
Blot-Kammer Trans-Blot SD Cell	Bio-Rad (München)
Digitalkamera 429k	Herolab (Wiesloch)
Elektrodenkammer	Bio-Rad (München)
Elektrophoresekammer	Biometra (Göttingen)
Filmcassette Hypercassette	Amersham (Freiburg)
Gelgießstand	Bio-Rad (München)
Take 3 Multi Volume Plate	Biotek (Bad Friedrichshall)
Plattenausleser EAR 340 ATTC	Tecan (CH-Männedorf)
Plattenausleser GENios Basic	Tecan (CH-Männedorf)
Präzisionswaage BP 610	Sartorius (Göttingen)
Rotationsschüttler	Gerhard (Bonn)
Spektrophotometer U-2000	Hitachi (Krefeld)
Spektroskop Epoch, multi volume	Biotek (Bad Friedrichshall)
Stromquelle Power Pac 200	Bio-Rad (München)
Thermocycler ABI 7000	Applied Biosystems (Darmstadt)
Thermocycler ABI 7500 fast	Applied Biosystems (Darmstadt)
Thermocycler Gene AMP-9700	Applied Biosystems (Darmstadt)
Thermomixer Compact	Eppendorf (Hamburg)
Ultrospec 3100pro	Amersham (Freiburg)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (Karlsruhe)
Wasserbad	Köttermann (Uetze/Hänigsen)
Zählkammer Neubauer 0,0025mm ² Raster	Roth (Karlsruhe)
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Minispin	Eppendorf (Hamburg)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Chemilumineszenzfilm „Hyperfilm ECL“	Amersham (Freiburg)
Deckgläser (\varnothing 12mm, 26mm)	Menzel (Braunschweig)
Maxisorp-Platten (96-Napf)	Nunc (Langensfeld)
Objektträger	Omnilab (Bremen)
PCR-Platte (96-Napf)	Sarstedt (Nürmbrecht)
Petrischalen (60x15mm)	Sarstedt (Nürmbrecht)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg)
PVDF-Membran	GE (Freiburg)
Reaktionsgefäße (0,2ml)	Eppendorf (Hamburg)
Reaktionsgefäße (0,5ml)	Eppendorf (Hamburg)
Reaktionsgefäße (1,5ml)	Eppendorf (Hamburg)
Whatmann Pappe	Whatmann (Dassel)
Zellkulturplatten 6-, 24- und 96-Loch	Sarstedt (Nürmbrecht)
Zellkulturflaschen 25cm ² und 75cm ²	Sarstedt (Nürmbrecht)
Zellschaber	Sarstedt (Nürmbrecht)
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt (Nürmbrecht)

2.1.3 Chemikalien

Azeton	Merck (Darmstadt)
Acrylamid/ Bisacrylamid (29:1)	Bio-Rad (München)
Agarose	Roth (Karsruhe)
Ammoniumpersulfat	Merck (Darmstadt)
Amphotericin	Sigma (Hamburg)
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad (München)
Bovines Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Bradford-Reagenz	Bio-Rad (München)
Bromphenolblau	Riedel-de Haen (Seelze)
Milchpulver	Reformhaus
Chloroform	Sigma (Hamburg)
Chlorwasserstoff	Roth (Karsruhe)
Coomassie Blue	Bio-Rad (München)
Desoxynukleotidmix 10mM	5-Prime (Hamburg)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (Hamburg)
DNA-Längenstandard	Promega (Mannheim)
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	(Invitrogen, Darmstadt)

Dulbecco's Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (DPBS)	Invitrogen (Darmstadt)
Entwicklungslösung	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth (Karsruhe)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Fluka (Buchs)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
DNase I, RNase-frei	Roche (Mannheim)
Fluorodesoxyuridin	Sigma (Hamburg)
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen (Darmstadt)
Fixierlösung	Roth (Karlsruhe)
Glutaraldehyd	Merck Schuchardt (Hohenbrunn)
Glycin	Roth (Karsruhe)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Glycogen	Sigma (Hamburg)
Griess-Reagenz	Sigma (Hamburg)
HEPES	Biomol (Hamburg)
"Immu-Mount" Eindeckmedium	Thermo Scientific (Bonn)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Kaisers Glyceringelatine	Merck (Darmstadt)
L-Glutamin	PAA (Cölbe)
Lipopolysaccharid (LPS) aus Salmonella typhimurium	Sigma (Hamburg)
2-Mercaptoethanol	Sigma (Hamburg)
Methanol	Roth (Karsruhe)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Karsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg)
Natronlauge (NaOH)	Roth (Karsruhe)
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Merck (Darmstadt)
Penicillin/ Streptomycin	PAA (Cölbe)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth (Karsruhe)
Tetrazoliumbromid, 98%ig	Sigma (Hamburg)
Trichloressigsäure	Merck (Darmstadt)
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Sigma (Hamburg)
TRIS-EDTA-Puffer	Amersham (Freiburg)
Triton X-100	Sigma (Hamburg)
Trypsin	Invitrogen (Darmstadt)

Tween 20	Roth (Karsruhe)
Quiazol Reagenz	Quiagen (Hilden)

2.1.4 Kavalaktone

Zum Herstellen einer Stammlösung wurden die Kavalaktone in einer Konzentration von je 5mM in 1%DMSO-haltigem DPBS gelöst.

Kavain	Sigma (Hamburg)
Methysticin	LKT Laboratories (St.Paul,MN,USA)
Yangonin	LKT <i>Laboratories (St.Paul,MN,USA)</i>

2.1.5 Enzyme, Primer und TaqMan®-Sonden

Eukaryotische 18s-RNA	(Invitrogen, Darmstadt)
Induzierbare NO-Synthase (iNOS)	(Invitrogen, Darmstadt)
Interleukin-1 β	(Invitrogen, Darmstadt)
Interleukin-6	(Invitrogen, Darmstadt)
Random Hexamer Primer (200 μ g/ml)	Fermentas (St.Leon-Rot)
Revert Aid H Minus M-MuLV (200U/ μ l)	Fermentas (St.Leon-Rot)
RNase freie DNase I (10U/ μ l)	Promega (Mannheim)
Thermus Aquaticus DNA-Polymerase (5U/ μ l)	Fermentas (St.Leon-Rot)
Tumornekrosefaktor-alpha	(Invitrogen, Darmstadt)

2.1.6 Gebrauchsfertige Kits

ABC-Peroxidase-Kit	Linares (Wertheim-Bettingen)
DAB-Substrat-Kit	Linares (Wertheim-Bettingen)
DNTP-Kit	(VWR, Darmstadt)
ECL Kit	GE (Freiburg)
Rat IL-6 ELISA Kit (Nr. 550319)	BD Biosciences (Heidelberg)
Rat TNF- α ELISA Kit (Nr.558535)	BD Biosciences (Heidelberg)
RNase-free Dnase Kit	Promega (Mannheim)
TaqMan Universal PCR Mastermix	Applied Biosystems (Darmstadt)
TMB-Substrat-Kit	Fisher Scientific (Schwerte)

2.1.7 Antikörper

Goat-anti-rabbit IgG (1mg/ml)	Invitrogen (Karlsruhe)
Rabbit anti-GFAP, polyclonal (2,8mg/ml)	Dako (Glostrup, DK)
Rabbit-HRP-conj. IgG (1mg/ml)	Dianova (Hamburg)

Rabbit Phospho-p44/42 MAPK (Erk 1/2) (Thr 202/Tyr 204), polyclonal (200µg/ml)	Cell Signaling Technology (Boston)
Rabbit p42 MAP Kinase (Erk2) (200µg/ml)	Cell Signaling Technology (Boston)
Mouse-anti-rat, monoklonal OX-42 (0,5mg/ml)	Vera-lab (Sussex, England)
Goat-anti-mouse IgG (H+L, 1,5mg/ml)	Linares (Wertheim)

2.1.8 Lösungen, Medien und Puffer

Coomassie Blue-Färbelösung	1g Coomassie Blue 450 ml Methanol 450 Aqua bidest 100ml Essigsäure
Dissoziationslösung	0,024 g HEPES 0,020 g Trypsin 0,002 g EDTA 35µl DNase (1mg/ml) ad 10ml DMEM
Elektrodenpuffer (Laufpuffer, pH 8,2)	12,2 g Tris 57,6 g Glycin 4 g SDS ad 4l Aqua bidest
Gel-Färbelösung	500 ml Wasser 50 µl Ethidiumbromid 1%
Gelpuffer I (pH 8,8)	1,5M Tris HCl 0,4% SDS, pH 8,8 Ad 250ml Aqua bidest
Gelpuffer II (pH 6,8)	0,5M Tris HCl 0,4% SDS
Kernextraktionspuffer A	10 mM HEPES 10 mM KCl 0,2 mM EDTA 1 mM Dithiotreitol 0,5 mM PMSF

	10 µg/ml Aprotinin ad 5ml Aqua bidest
Kernextraktionspuffer B	10 mM HEPES 0,4 M NaCl 0,2 mM EDTA 1 mM Dithiotreitol 0,5 mM PMSF 10 µg/ml Aprotinin ad 5ml Aqua bidest
Kulturmedium Mikroglia	500 ml DMEM (4,5g Glucose/l) 60 ml FKS (bei 44-53°C inaktiviert) 5 ml L-Glutamin (200mM) 5 ml Penicillin (10000U/ml) und Streptomycin (10mg/ml) in PBS
Kulturmedium Astrozyten	500 ml DMEM (4,5 g Glucose/l) 60 ml FKS (bei 56°C inaktiviert) 5 ml L-Glutamin (200mM) 6 ml Penicillin (10000U/ml) und Streptomycin (10mg/ml) in PBS
Gesamtproteinextraktionspuffer	10mM NaCl 50mM TRIS pH 7,5 5mM EDTA 1% Triton X-100 2mM Natrium-Vanadat 2,5 mM Natrium-Pyrophosphat 1mM β-Glycerol-phosphat 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid
Probenpuffer	0,23g SDS 1,25ml Gelpuffer II 1ml Glycin 50mM DTT 60µl APS 10%

	30µl TEMED ad 10ml Aqua bidest
Sammelgel (4,5%)	2,6 ml Gelpuffer II 1,67 ml Acrylamid 5,79ml Aqua bidest 60µl APS 10% 30µl TEMED
Solubilisierungslösung	20g SDS gelöst in 70ml 50%-DMF 2,5ml 80%-Essigsäure 2,5ml 1N HCL
TAE-Puffer	242g TRIS 57,1ml Eisessig 100ml 0,5 M EDTA-Lösung ad 1l mit Aqua bidest
Transferpuffer	25 mM TRIS 192 mM Glycin 10% Methanol
Trenngel (12,5%)	2,5ml Gelpuffer I 4,17ml Acrylamid 3,29ml Aqua bidest 60µl APS 10% 30µl TEMED
Tris-gepufferte Saline Tween (TBS-T)	50mM TRIS 150mM NaCl 1mM EDTA 0,1% Tween
Waschpuffer (ELISA)	80g NaCl 11,6 Natriumhydrogenphosphat 2g Kaliumhydrogenphosphat 2g Kaliumchlorid

auf 10 L Wasser + 5ml Tween

Zellablöselösung
 0,030 g EDTA
 0,003 g Trypsin
 25ml PBS

Zamboni-Fixierlösung
 8g Paraformaldehyd gelöst in
 35ml gesättigter Pikrinsäure
 ad 200ml Phospatpuffer

2.1.9 Software

Axiovision 4.7	Zeiss (Jena)
ABI Prism 7000 SDS	Applied Biosystems (Darmstadt)
PCBAS 2.09	(Raytest, Straubenhardt)
Prism 5	(GraphPad, La Jolla, USA)

2.1.10 Versuchstiere

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden neugeborenen, ein- bis drei Tage alten Ratten vom Stamm Wistar entnommen. Die Ratten wurden unter Standardbedingungen im Victor-Hensen-Tierhaus der vorklinischen Institute der Christian-Albrechts-Universität Kiel gehalten.

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung primärer Mikroglia und Astrozyten

10-12 neugeborene Ratten wurden mittels Skalpell dekapitiert, die Gehirne entnommen und in Gewebekulturschälchen überführt. In semisteriler Arbeitsweise wurden die Gehirne mit 1% Penicillin/Streptomycin-enthaltendem DPBS gespült, von den Meningen befreit und Kleinhirne, Dienzephali, Hippocampi und Bulbi olfactorii entfernt. Die verbleibenden Kortizes und Mesenzephali wurden in separate Gewebekulturschälchen mit DPBS überführt und mechanisch zerkleinert. Nach Überführung der Gewebestückchen in 10ml-Zentrifugenröhrchen folgte eine dreißigminütige Inkubation in 3ml Dissoziationslösung mit 35µl DNase im Wasserbad bei 37°C, wobei nach fünfzehn Minuten der Überstand verworfen und neue Dissoziationslösung hinzugefügt wurde. Der Trypsinaktivität in der Dissoziationslösung wurde anschließend durch Zugabe von je 2ml FKS-haltigem Medium, supplementiert mit 50µl DNase, gestoppt. Es folgte eine Zentrifugation bei 500 x g für fünf Minuten, nach Verwerfen der Überstände wurden die dissoziierten Zellen in je 1ml Mikroglia- bzw. Astrozytenmedium aufgenommen, mit einer Pasteurpipette resuspendiert und vereinzelt.

2.2.2 Kultur, Aussaat und Stimulation von Mikroglia

Für die Kultivierung der Mikroglia wurden die aus zwei dissoziierten Kortizes bzw. aus zwei dissoziierten Mesenzephalien gewonnenen Zellen mit 8 ml Mikrogliaedium in eine 75cm²-Zellkulturflasche ausgesät und bei 37°C und 8,4%CO₂-Sättigung im Brutschrank für durchschnittlich zehn Tage inkubiert, bevor mit der Ernte begonnen wurde. Das Kulturmedium wurde erstmalig nach vierundzwanzig Stunden und anschließend alle zwei Tage bis zur Zellernte gewechselt. Für die Ernte der Mikroglia wurden die Flaschen per Hand geschüttelt, um die Mikroglia vom Astrozytenrasen zu lösen. Die freischwimmenden Mikrogliazellen wurden mit dem Kulturmedium in 50ml-Zentrifugenröhrchen dekantiert, hierbei wurden mesenzephalale und kortikale Mikroglia wieder zusammengeführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 500 x g für fünf Minuten, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1ml Mikrogliaedium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden je 10µl der Zellsuspension und Trypanblau gemischt und die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Zellen wurden dann in der gewünschten Dichte ausgesät.

Im Folgenden sind die Mikrogliaaussaadichten für die unterschiedlichen Experimente angegeben.

MTT-Test:	100.000 Zellen/Napf in 96-Napf-Zellkulturplatte.
NO-Messung:	100.000 Zellen/Napf in 96-Napf-Zellkulturplatte
Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR):	1.000.000 Zellen/Napf in 12-Napf-Zellkulturplatte
ELISA:	1.000.000 Zellen/Napf in 12-Napf-Zellkulturplatte
Western Blot:	1.000.000 Zellen/Napf in 12-Napf-Zellkulturplatte
Coomassie Blue-Färbung:	200.000 Zellen/Deckglas

Nach einer eintägigen Wachstumsphase wurden die Mikroglia stimuliert. Hierzu erfolgte in den Experimentalgruppen zunächst eine dreißigminütige Präinkubation mit Kavain, Methysticin und/oder Yangonin (5µM), fakultativ gefolgt von einer Inkubation mit LPS (5ng/ml). Gleichzeitig erhielten Kontrollansätze lediglich ein äquivalentes Volumen an DPBS. Die Stimulationsdauer betrug für MTT-Tests und NO-Messungen vierundzwanzig Stunden, für qPCR sechs oder vierundzwanzig Stunden, für ELISA vierundzwanzig Stunden, für Western Blot – Analysen fünfzehn Minuten und für die Coomassie-Färbungen vierundzwanzig Stunden.

2.2.3 Kultur, Aussaat und Stimulation von Astrozyten

Für die Kultivierung der Astrozyten wurden die aus zwei dissoziierten Kortexhälften gewonnenen Zellen in drei 25cm²-Zellkulturflaschen in je 8ml Astrozytenmedium ausgesät und das Medium alle achtundvierzig Stunden gewechselt. Am 6. und 8. Kulturtag wurden dem

Medium je 2,5µg/ml Amphotericin hinzugefügt. Am 9. Kulturtag wurden die Zellkulturflaschen zur Entfernung der Oligodendrozyten und Mikroglia zwanzig Stunden bei Raumtemperatur auf dem Rotationsschüttler geschüttelt. Die Filterdeckel der Zellkulturflaschen wurden hierfür mit Parafilm verschlossen. Danach wurde der Zellkulturüberstand verworfen und dem neuen Astrozytenmedium 10µM Fluorodesoxyuridin (FDU) hinzugefügt, um den Anteil an Mikroglia weiter zu reduzieren. Nach weiterer eintägiger Kultivierung im Brutschrank bei 37°C und 8,4% CO₂ erfolgte ein erneuter Mediumwechsel mit FDU, gefolgt von einer weiteren zweitägigen Kultivierung.

Anschließend wurden die Zellen mit Dulbecco's Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (DPBS) gespült, zwanzig Sekunden mit 2ml der Ablöselösung behandelt, der Überstand verworfen und die Zellen für zwei Minuten im Brutschrank inkubiert, abgeklopft, und dann pro Zellkulturflasche 3ml Astrozytenmedium hinzugegeben. Die verbliebenen Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden abgelöst und durch mehrmalige Resuspension vereinzelt. Die Zellsuspension wurde in ein Gewebekulturschälchen überführt und für zehn Minuten in den Brutschrank gestellt, damit sich die verbliebenen Mikroglia am Boden absetzen. Der astrozytenreiche Überstand wurde in ein 10ml Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgte ein fünfminütige Zentrifugation bei 700 x g, der Überstand wurde verworfen, und das Zellpellet in 2ml Astrozytenmedium resuspendiert. Dann wurden die Zellen in der Neubauerzählkammer gezählt und den Versuchen entsprechend ausgesät. Im Folgenden sind die Aussaatdichten für die unterschiedlichen Experimente angegeben.

MTT-Test:	10.000 Zellen/Napf in 96-Napf-Zellkulturplatte.
Quantitative Echtzeit-PCR:	150.000 Zellen/Napf in 12-Napf-Zellkulturplatte
Immunzytochemie mit OX-42:	150.000 Zellen/Napf in 12-Napf-Zellkulturplatte

Die Wachstumsphase der ausgesäten Astrozyten erfolgte bis zum Erreichen eines konfluenten Zellrasens, üblicherweise wurde dies nach 6-8 Tagen erreicht. Während dieser Phase erfolgte ein regelmäßiger Wechsel des Mediums. Für die Stimulation der Astrozyten erfolgte in den Experimentalgruppen zunächst eine dreißigminütige Präinkubation mit Kavain, Methysticin und/oder Yangonin (5µM), fakultativ gefolgt von einer Inkubation mit LPS (10ng/ml). Gleichzeitig erhielten Kontrollansätze lediglich ein äquivalentes Volumen an DPBS. Die Stimulationsdauer betrug für MTT-Tests vierundzwanzig Stunden, für qPCR sechs oder vierundzwanzig Stunden, für die Immunzytochemie wurden unstimulierte Astrozyten eingesetzt.

2.2.4 Immunzytochemische Reinheitskontrolle der Astrozytenkultur

Um die Reinheit der Astrozytenkultur zu überprüfen, wurden vor den geplanten Versuchen Kontrollansätze angelegt. Nach der Wachstumphase wurde eine immunzytochemische Färbung mit dem Mikroglia marker OX-42 durchgeführt, welcher an CD11/11b bindet.

Hierzu wurden die Zellen bei Raumtemperatur zunächst in DPBS gewaschen und fünfzehn Minuten in Methanol fixiert, dann erneut dreifach in DPBS gewaschen. Es folgte eine sechzigminütige Inkubation mit einem Antikörper gegen OX-42 (1:200 in 0,75% BSA in DPBS), ungebundener Antikörper wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit DPBS entfernt. Die Bindung des primären Antikörpers wurde anschließend durch eine fünfundvierzigminütige Inkubation mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (anti-mouse IgG, 1:300 in DPBS) durchgeführt. Dann erfolgte die Enzym-Substrat-spezifische Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers durch eine fünfundvierzigminütige Inkubation mit einem ABC-Kit nach Herstellerangaben und dem chromogenen Diaminobenzidin (DAB) für zehn Minuten. Nach dreimaligem Waschen mit Aqua bidest wurden die Zellen mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt und die gefärbten Mikroglia unter dem Mikroskop ausgezählt. Eine Astrozytenkultur wurde bis zu einem Mikrogliaanteil von 2% als rein erachtet und für Versuche eingesetzt.

2.2.5 MTT-Test

Das Zellüberleben unter dem Einfluss von Kavalaktonen wurde durch einen MTT-Test (nach Mosmann, 1983) bestimmt. Bei diesem Test wird die Reduktion von gelbem, wasserlöslichen MTT (3[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-Diphenoltetrazoliumbromid) in blau-violettes, wasserunlösliches Formazan photometrisch gemessen. Die Reduktion des MTT geschieht nur in Mitochondrien lebender Zellen, hierdurch lässt sich auf die Toxizität einer zu testenden Substanz rückschließen.

Nach erfolgter Stimulation wurden die Zellüberstände in den Näpfen abgesaugt, die Zellen dreimal mit je 200µl DPBS gewaschen und anschließend mit 100µl Mikroglia medium versetzt. Dann wurden zu jedem Ansatz 25µl MTT-Lösung pipettiert und die Platte für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert, während dieser Zeit wandeln lebende Zellen das MTT in violette Formazankristalle um. Nach der Inkubation wurden je 100µl Solubilisierungslösung hinzupipettiert. Es erfolgte eine weitere zweistündige Inkubation im Brutschrank, in welcher die Zellen lysiert und die Formazankristalle aufgelöst wurden. Nach Homogenisierung mittels Rührstäbchen wurde die Absorption bei 540nm photometrisch bestimmt.

2.2.6 NO-Messung

Die Menge des von den Mikroglia erzeugten NO wurde indirekt durch den Nachweis von Nitrit (nach Green *et. al.*, 1982) im Zellkulturüberstand bestimmt.

Hierzu wurden je 100µl Griess-Reagenz und eine äquivalente Menge des Zellkulturüberstands in eine ELISA-Platte gemischt und für fünfzehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 540nm und einer Referenzwellenlänge von 650nm am Photometer.

2.2.7 Untersuchung der Zellmorphologie durch Färbung mit Coomassie Blue

Zur Darstellung der Zellmorphologie wurden die auf Deckgläsern ausgesäten Mikroglia zunächst vom Medium befreit und mit DPBS gewaschen, bevor sie für vierzig Minuten in 2,5% Glutaraldehyd fixiert wurden. Danach erfolgte eine dreifache Spülung mit DPBS, anschließend eine vierzigminütige Inkubation in Coomassie-Blue-Lösung. Dann wurden die Zellen bis zur gewünschten Farbintensität mit Entfärberlösung behandelt, mit Aqua bidest gespült und mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch.

2.2.8 Untersuchungen auf RNA-Ebene

Zur Untersuchung des Einflusses der Kavalaktone auf die Transkription von iNOS, IL-1 β , IL-6 und TNF- α wurden qPCR-Analysen durchgeführt.

Hierzu wurde zunächst die RNA aus den Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben.

2.2.8.1 RNA-Isolierung

Zunächst wurden die Überstände der Versuchsansätze abgesaugt, die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und dann jeweils mit 1ml Qiazol-Reagenz zur Lyse versetzt. Die noch adhärenen Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden abgeschabt, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und für zehn Minuten bei 2-8°C bei 12000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Eppendorfgefäße überführt. Es erfolgte eine Inkubation für fünf Minuten bei Raumtemperatur, anschließend wurden 200µl Chloroform hinzugegeben und die Ansätze fünfzehn Sekunden per Hand geschüttelt und für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte eine Zentrifugation für fünfzehn Minuten bei 12000 x g bei 2-8°C, hierdurch wurden die Ansätze in drei Phasen aufgeteilt. Die oberste, RNA-enthaltende Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 1µl Glycogen (70mg/ml) und 500µl Isopropanol vermischt. Nach zehn Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Ansätze zehn Minuten bei 12000 x g bei 2-8°C zentrifugiert. Danach wurden die Überstände verworfen und die am Boden des Gefäßes als Pellet befindliche RNA durch Zugabe von 1ml Ethanol (75%), Schütteln und Zentrifugation für fünf Minuten bei 7500 x g und 2-8°C gewaschen. Der Überstand wurde verworfen, das RNA-Pellet bei Raumtemperatur luftgetrocknet, in 30µl Probenpuffer gelöst und für zehn Minuten bei 60°C inkubiert. Zur Konzentrationsbestimmung wurden 995µl Messpuffer mit 5µl des Isolates in eine Messküvette überführt. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde photometrisch bei 260nm zu 280nm

(kontaminierende DNA) ermittelt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -70°C gelagert.

2.2.8.2 Reverse Transkription

Zunächst wurden die RNA-Isolate von DNA-Resten gereinigt. Dafür wurden $8\mu\text{l}$ jedes Ansatzes mit $1\mu\text{l}$ DNase und $1\mu\text{l}$ DNase-Puffer versetzt, mittels Vortex vermischt, kurz zentrifugiert und für fünfzehn Minuten bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Dann wurden die Ansätze auf Eis gestellt und die Aktivität der DNase gestoppt, dafür wurden zu jedem Ansatz $1\mu\text{l}$ 25mM Stopplösung aus dem DNase Kit hinzupipettiert, mit dem Vortex vermischt, für zehn Minuten bei 65°C im Thermocycler inkubiert und auf Eis gestellt.

Darauf folgte die reverse Transkription, bei der die RNA in cDNA umgeschrieben wurde. Hierzu wurde jedem RNA-Ansatz $1\mu\text{l}$ eines Random-Hexamer-Primer-Gemisches pipettiert, für fünf Minuten bei 70°C im Thermocycler inkubiert und auf Eis gestellt.

Anschließend wurden zu jedem Ansatz $1\mu\text{l}$ Aqua bidest, $2\mu\text{l}$ dNTP-Mix und $4\mu\text{l}$ 5x-Reaktionspuffer pipettiert, im Vortex gemischt, kurz zentrifugiert und für fünf Minuten bei 25°C im Thermocycler inkubiert. Erst dann wurde $1\mu\text{l}$ Reverse Transkriptase hinzugegeben. Die reverse Transkription erfolgte sequenziell für zehn Minuten bei 25°C , für sechzig Minuten bei 42°C und für zehn Minuten bei 70°C im Thermocycler. Das Produkt, die cDNA, konnte für mehrere Wochen bei -20°C gelagert werden.

2.2.8.3 Relative qPCR mit TaqMan®-System

Die Quantifizierung spezifischer intrazellulärer mRNA erfolgte per qPCR. Hierbei wird die cDNA mithilfe sequenzspezifischer Primer und TaqMan®-Sonden und der temperaturabhängig aktiven Taq-Polymerase zyklisch vervielfältigt. Die TaqMan®-Sonden bestehen aus einem der gesuchten Sequenz komplementären Oligonukleotid, am 5'-Ende befindet sich ein FAM-Reporterelement und am 3'-Ende ein TAMRA-Löscherelement. Bei intakter Sonde bewirkt ein Lichtimpuls kein Fluoreszenzsignal. Im Hybridisierungsschritt binden sowohl Primer als auch Sonde an verschiedenen Orten an die Zielsequenz. Während der Elongationsphase produziert die Taq-Polymerase einen der Zielsequenz komplementären Nukleotidstrang, durch die Exonukleaseaktivität des Enzyms wird dabei die Sonde zerstört und Reporter und Löscher örtlich voneinander getrennt. Der Reporter kann nun nach Anregung fluoreszieren, die Zunahme der Fluoreszenz eines Ansatzes korreliert innerhalb des linearen Bereichs der qPCR mit der Zunahme der Zielsequenz. Abhängig von seiner Ausgangsmenge erhebt sich das Fluoreszenzsignal einer gesuchten Sequenz früher oder später vom Störsignal und erreicht sein Plateau.

Jeder Reaktionsansatz bestand aus $10\mu\text{l}$ Taq-Man-Universal PCR Mastermix, $1\mu\text{l}$ Taq-Man-Assay on Demand, $5\mu\text{l}$ Aqua bidest und $4\mu\text{l}$ der 1:20 mit Aqua bidest verdünnten cDNA-Probe.

In der Assay on Demand Lösung waren der Sense- und der Antisenseprimer sowie eine spezifische Sonde bereits enthalten. Nach Zentrifugation der Platte mit den Ansätzen wurde die Genexpression von iNOS, IL-6, IL1beta und TNF- α detektiert. Als endogene Kontrolle diente 18s-RNA, ein so genanntes „Haushaltsgen“. Die Ergebnisse wurden mit der $\Delta\Delta$ -Ct-Methode berechnet. Es wurden Sonden mit den folgenden Sequenzen verwendet:

iNOS	5'-TGC TAT TCC CAG CCC AAC AAC ACA G-3'
IL-1 β	5'-ATA AGC CAA CAA GTG GTA TTC TCC A-3'
IL-6	5'-GAG AAA AGA GTT GTG CAA TGG CAA T-3'
TNF- α	5'-CTC ACA CTC AGA TCA TCT TCT CAA A -3'
18s RNA	5'-TCC ATT GGA GGG CAA GTC TGG TGC C-3'

Das qPCR-Programm setzte sich aus folgenden Zyklen zusammen:

1. fünfzehn Sekunden, 94°C (Denaturieren)
2. sechzig Sekunden, 60°C (Bindung/Hybridisierung)
3. fünfundvierzig Sekunden, 72°C (Elongation)

Insgesamt wurden vierzig Zyklen durchgeführt, gefolgt von einer zehnminütigen Extensionsphase bei 72°C. Während jedes Zyklus wurde die Fluoreszenz mit dem Abi Prism Sequence Detection System 7000 oder 7500 fast gemessen.

2.2.9 Untersuchung auf Proteinebene

Es erfolgten Untersuchungen von IL-6 und TNF- α im Zellkulturüberstand per ELISA, sowie des gesamtzellulären pERK per Western Blot.

2.2.9.1 Proteinisolierung und -quantifizierung

Für Western Blot-Analysen wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen zweifach mit DPBS gespült. Nach Hinzugabe von 100 μ l Lysispuffer und Abschabung der Zellen wurde das Lysat in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und resuspendiert. Zur Proteinquantifizierung (Bradford, 1976) wurden je 5 μ l des Zelllysats zu 795 μ l Aqua bidest und 200 μ l Bradford-Reagenz pipettiert. Das Gemisch wurde zunächst für zwanzig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei einer Wellenlänge von 595nm in einer Messküvette gegen einen Standard photometrisch analysiert. Dieser Standard bestand aus 10 μ l BSA(1g/ml), 10 μ l Lysepuffer, 780 μ l Aqua bidest und 200 μ l Bradford-Reagenz. Aus dem Verhältnis der Lichtabsorptionen wurde die Proteinkonzentration der Probe berechnet.

2.2.9.2 Western Blot

Der Western Blot dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen. Das zu untersuchende Proteingemisch wird dazu in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch nach Ladung und Größe aufgetrennt, dann durch ein zur Gelebene lotrechtes elektrisches Feld auf eine Membran übertragen (Blotten), an welcher die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkung haften bleiben. Dann erfolgt die immunologische Detektion des gesuchten Proteins.

Für die Polyacrylamidelektrophorese (PAGE) wurde eine 12,5%-ige Trenngellösung zwischen zwei Glasplatten des Gelgießstandes gefüllt. Nach der Polymerisation wurde darüber ein 4,5%-iges Sammelgel gegossen und ein Gelkamm für die Bildung der Probenaschen eingesetzt. Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt. Jeweils 5µg Protein wurden mit SDS-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 10-20µl aufgefüllt, für fünf Minuten bei 99°C denaturiert und in die Geltaschen pipettiert. Eine Tasche wurde dabei stets mit 5 µl eines Molekulargewichtsmarkers befüllt. Die Gele wurden dann in die Laufkammer eingespannt und diese mit Laufpuffer aufgefüllt. Um die Lauflinie sichtbar zu machen, wurden 10µl Bromphenolblau in die innere Kammer gegeben. Es wurde eine Spannung von 200V und eine Stromstärke von 170mA angelegt, bis der Lauffrontanzeiger das untere Ende des Trenngels erreicht hatte. Für das Blotten wurde zunächst eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran aktiviert, in dem sie eine Minute in Methanol eingeweicht, mit Aqua bidest gespült und für fünfzehn Minuten in Transferpuffer gelegt wurde. Ebenfalls mit Transferpuffer getränkt wurden vier Whatmann-Pappen. Nach dem Sandwichprinzip wurden zwei Whatmann-Pappen auf die mit Transferpuffer befeuchtete Kathodenplatte der Blotkammer gelegt und die Luftblasen ausgestrichen. Darauf wurde die aktivierte Membran und das zu blottende Polyacrylamidgel, gefolgt von zwei weiteren Whatmann-Pappen gelegt. Wieder wurden Luftblasen ausgestrichen und die mit Transferpuffer befeuchtete Anodenplatte zuoberst befestigt. Für das „Blotten“ wurden eine Spannung von 25V und eine Stromstärke von 340mA für fünfundsiebzig Minuten angelegt. Dann erfolgte die Immundetektion von phosphoryliertem ERK. Dafür wurde die PVDF-Membran zunächst für eine Stunde in Kasein –TBS-T (1:19) geblockt, jeweils unter einer ständigen leichten Kreisbewegung auf dem Rotationsschüttler und anschließend dreimal fünfzehn Minuten mit DPBS gespült. Die PVDF-Membran wurde mit TBS-T gewaschen und der Primärantikörper (pERK oder ERK2, 1:1000) in 1ml TBS-T auf die Membran aufgebracht. Die Membran wurde luftdicht eingeschweisst und für eine Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für fünfzehn Minuten mit 10ml TBS-T auf dem Rotationsschüttler gewaschen und mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (1:30000) in 10ml TBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Danach wurde die Membran erneut für dreimal fünfzehn Minuten unter Bewegung in TBS-T

gespült. Zur Sichtbarmachung der detektierten Banden wurde ein verstärkendes Chemilumineszenzverfahren benutzt.

Dabei wurde die Membran mit einer ECL-Kit-Lösung nach Herstellerangaben inkubiert, der Überschuss entfernt und die Membran in dünne Plastikfolie faltenfrei eingeschlagen und in einer lichtdichten Kassette in die Dunkelkammer transportiert. Dann wurde ein Röntgefilm in Abhängigkeit der Stärke des Chemilumineszenzsignals für zwei bis fünf Minuten auf die Membran gelegt, der Film dann entwickelt und fixiert. Die quantitative Auswertung erfolgte nach Digitalisierung durch Einscannen densitometrisch mit dem Programm PCBAS.

2.2.9.3 ELISA

Zur Quantifizierung von IL-6 und TNF- α in den Überständen der Ansätze wurde jeweils ein Sandwich-ELISA nach dem modifizierten Protokoll des Herstellers BD Biosciences durchgeführt. Dafür wurden 96-Napf-Mikrotiterplatten über Nacht bei 4°C mit je 100 μ l des Primärantikörpers anti-TNF- α (1:250 in DPBS) bzw. anti-IL-6 (1:250 in DPBS) beschichtet.

Die Mikrotiterplatte wurde danach fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 200 μ l Blockierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, danach wieder gewaschen. Anschließend wurden jeweils 50 μ l des verdünnten Zellkulturüberstand (1:50 für TNF- α , 1:10 für IL-6) in die Vertiefungen pipettiert. Mehrere Proteinstandards wurden zur Kontrolle mitgeführt.

Die Platten wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden danach dreimal mit Waschpuffer gewaschen und mit einem biotynilierten Sekundärantikörper (1:200) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit Waschpuffer wurden die Platten mit Merretich-Peroxidase-(HRP)-konjugiertem Streptavidin (1:250) für dreißig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und siebenmal gewaschen, dann wurden 100 μ l TMB-Substrat hinzugegeben und die Indikatorreaktion nach zehn Minuten durch Zugabe von 50 μ l Stopplösung (Schwefelsäure) beendet. Die Absorption wurde photometrisch bei 450nm gegen eine Referenzwellenlänge von 592nm bestimmt.

2.2.10 Statistik

Sämtliche Berechnungen und graphische Darstellungen wurden mit Prism (GraphPad, La Jolla, USA) erstellt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM (Standardabweichung des Mittelwertes) dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurden Varianzanalysen (ANOVA) gefolgt von multiplen paarweisen Bonferoni-Testungen durchgeführt. Eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss der Kavalaktone Kavain, Methysticin und Yangonin auf das Überleben von Mikroglia und Astrozyten

Um eine potentielle Toxizität der Kavalaktone auf Mikroglia und Astrozyten auszuschließen, wurde in dieser Arbeit ein MTT-Test durchgeführt. Eine durch toxische Einflüsse reduzierte Zellzahl kann eine verminderte Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren bedingen, ohne dass die überlebenden Zellen ihre eigentliche Syntheseaktivität verändern.

Die in dieser Arbeit für alle Versuche eingesetzten Konzentrationen von jeweils 5 μM Kavain, Methysticin bzw. Yangonin allein oder in Kombination mit 5 ng/ml LPS bei Mikroglia und 10 ng/ml LPS bei Astrozyten zeigten nach einer Inkubationszeit von vierundzwanzig Stunden keine zytotoxischen Effekte auf Mikroglia und Astrozyten im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Hierbei wurden den nur mit DPBS behandelten Kontrollen einer Überlebenszeit von rechnerisch 100% zugeordnet, bei den Mikroglia (a) ergab sich im Vergleich bei Inkubation mit LPS 5ng/ml eine auf 96,3% verringerte Reduktion des MTT, im weiteren sind jeweils Stimulationsansatz und prozentuales Überleben angegeben: Kavain: 100,1%, Kavain + LPS 89,3%, Methysticin 98,2%, Methysticin + LPS 94,4%, Yangonin 92,3%, Yangonin + LPS 95,6%, Kavain + Methysticin + Yangonin 87,1%, Kavain + Methysticin + Yangonin + LPS 88,7%. Bei den Astrozyten (b) ergab sich: DPBS-Kontrolle: 100%, LPS 91,9%, Kavain 97,2%, Kavain + LPS 92,5%, Methysticin 99,7%, Methysticin + LPS 92,6%, Yangonin 100,6%, Yangonin + LPS 94,9%, Kavain + Methysticin + Yangonin 95,7%, Kavain + Methysticin + Yangonin + LPS 92,8%.

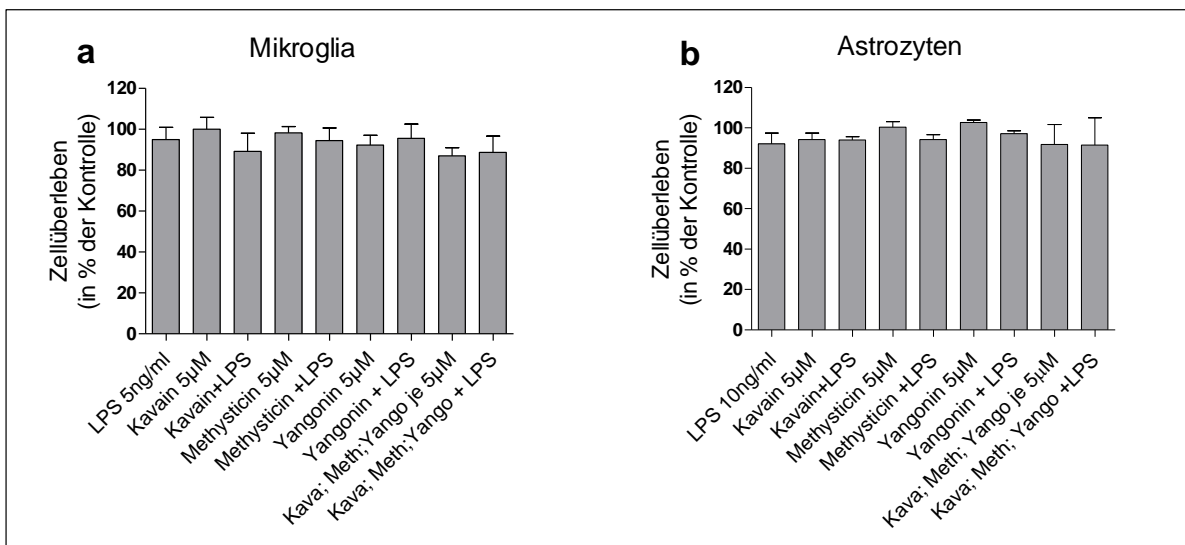


Abb. 3.1: Einfluss von Kavain, Methysticin, Yangonin und LPS auf das Zellüberleben von Mikroglia und Astrozyten. Nach einer Inkubationszeit von vierundzwanzig Stunden zeigte sich im MTT-Test, dass die Kavalaktone in der eingesetzten Konzentration (5 μM) und LPS (5 ng/ml bei Mikroglia, 10ng/ml bei Astrozyten) nicht zytotoxisch auf Mikroglia und Astrozyten wirken. (Daten sind dargestellt als Mittelwert + SEM, n = 3).

3.2 Einfluss der Kavalaktone Kavain, Methysticin und Yangonin auf die Stickoxid (NO)-Produktion von Mikroglia

Aktivierte Mikroglia setzen NO frei, welches von ihnen als Waffe u.a. gegen feindliche Mikroorganismen eingesetzt wird. Dieser Vorgang wird bei vielen zentralnervösen Entzündungsgeschehen beobachtet und bedarf strikter Regulation.

NO ist eine flüchtige Verbindung, welche rückwirkend durch Analyse des akkumulierten Nitritgehaltes im Zellkulturüberstand mittels des Griess-Reagenz quantifiziert wurde.

In Abb. 3.2 ist der Einfluss der Kavalaktone Kavain, Methysticin und Yangonin auf die NO-Produktion LPS-aktivierter Mikroglia dargestellt.

Nach vierundzwanzig-stündiger Stimulation der Mikroglia mit LPS zeigte sich eine drastische Hochregulation der NO-Freisetzung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle und den Einzelstimulationen mit Kavain, Methysticin oder Yangonin. Eine kombinierte Stimulation mit Kavain und LPS konnte die NO-Freisetzung der LPS-aktivierten Mikroglia von 100% auf durchschnittlich 94,9% (a) und Yangonin von 100% auf 94,9% (c) senken. Methysticin hatte keinen Einfluss auf die NO-Freisetzung (b).

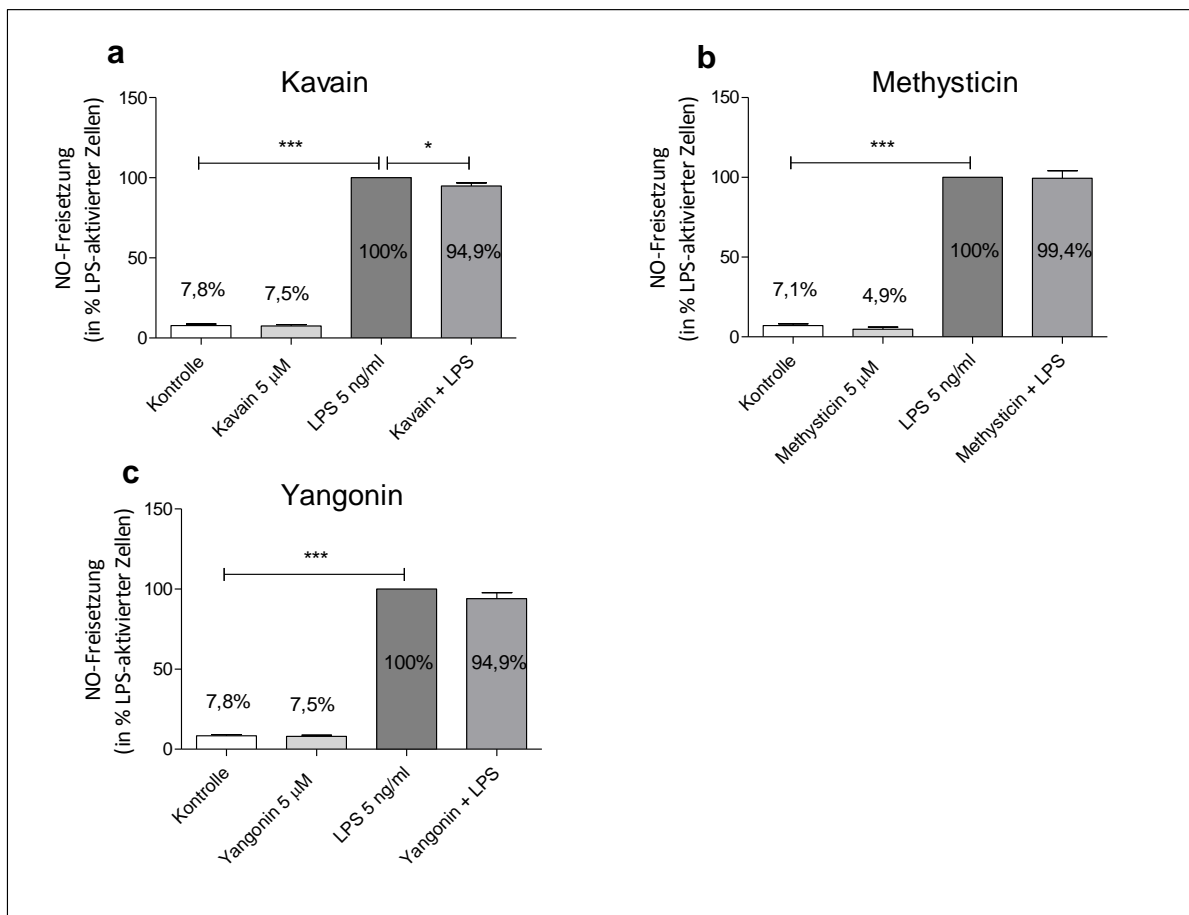


Abb. 3.2: Einfluss von Kavain, Methysticin, Yangonin auf die NO-Produktion von Mikroglia. (Daten sind dargestellt als Mittelwert + SEM, $n \geq 3$; * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$).

3.3 Einfluss der Kavalaktone Kavain, Methysticin und Yangonin auf die Zellmorphologie von Mikroglia

Aktivierte Mikroglia ändern ihre Zellmorphologie und gehen vermehrt vom ramifizierten Zustand in die amöboide Form über (Streit, 1996). Um den Einfluss von einer Inkubation mit LPS und Kavalaktönen auf die Morphologie der Zellen zu untersuchen, wurden diese auf Objektträgern fixiert und gefärbt.

In den folgenden Abbildungen sind repräsentative Bilder von Coomassie-gefärbter Mikroglia dargestellt, die jeweils mit Kavain, Methysticin, Yangonin (5 μ M) und/ oder LPS (5ng/ml) stimuliert wurden. Abbildung 3.3.a zeigt Mikroglia, welche vierundzwanzig Stunden mit einem äquivalentem Volumen an DPBS inkubiert wurden, diese zeigen eine weitgehend ramifizierte Form, die feinen Ausläufer der Zellen strecken sich weit in den Extrazellulärraum, es sind zahlreiche Vakuolen im Zytosol zu sehen, die Zellkerne sind groß. In Abbildung 3.3.b sind Mikroglia gezeigt, welche für vierundzwanzig Stunden mit LPS 5ng/ml stimuliert wurden, im Vergleich zu Abbildung 3.3.a erscheinen Zellen voluminöser, die Zellkern-Zytoplasma-Relation ist zugunsten des Zytoplasmas verschoben, Anzahl und Länge der Zellausläufer sind deutlich reduziert und intrazytoplasmatische Vakuolen sind weniger zahlreich.

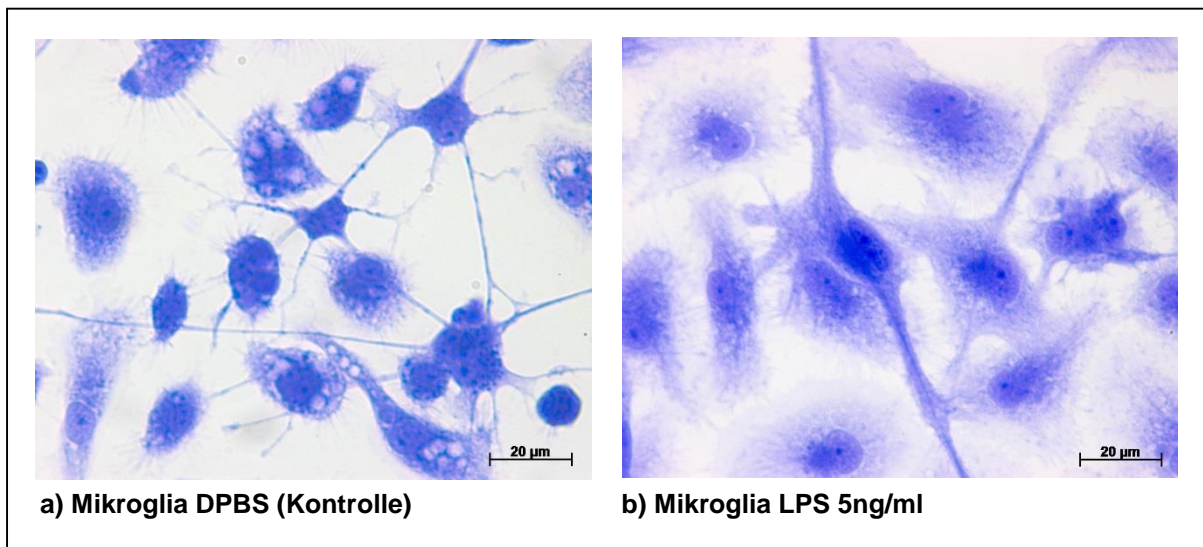


Abb. 3.3: Veränderung der Zellmorphologie ohne Stimulation (a) und bei Koinkubation mit LPS (b).

In Abbildung 3.4.a sind Mikroglia nach vierundzwanzig-stündiger Inkubation mit Kavain 5 μ M dargestellt, die Zellen stellen sich weitgehend ramifiziert dar und zeigen viele intrazytoplasmatische Vakuolen. Die Zellen sind mittelgroß, die Zellkern-Zytoplasma-Relation ausgewogen.

In Abbildung 3.4.b sind Mikroglia nach vierundzwanzig-stündiger Inkubation mit Kavain 5 μ M und LPS 5ng/ml abgebildet, die Zellen sind insgesamt vergrößert, ähnlich Abbildung 3.3.b (LPS), zeigen aber eine eher ramifizierte Zellform. Es finden sich wenige Vakuolen.

Abbildung 3.3.c zeigt Mikroglia nach vierundzwanzig-stündiger Inkubation mit Methysticin 5 μ M, die Zellen haben zeigen eine eher kleine Zellgröße, viele Vakuolen und zahlreiche kleine und große Ausläufer im Sinne eines ramifizierten Zustands. Die Kern-Zytoplasma-Relation ist zugunsten des Kerns verschoben.

In Abbildung 3.3.d sind Mikroglia nach vierundzwanzig-stündiger Inkubation mit Methysticin 5 μ M und LPS 5ng/ml gezeigt, die Zellen wirken gedrungen und mit vergrößertem Zytoplasma, weiter finden sich viele kleine und große Ausziehungen. Auch hier ist Kern-Zytoplasma-Relation ist zugunsten des Kerns verschoben.

In Abbildung 3.3.e sind Mikroglia nach vierundzwanzig-stündiger Inkubation mit Yangonin 5 μ M dargestellt, die Zellen sind eher groß, zeigen ausgeprägte Vakuolen und zahlreiche, eher feine Zellausläufer. Die Kern-Zytoplasma-Relation ist zugunsten des Kerns verschoben.

In Abbildung 3.3.f sind Mikroglia nach vierundzwanzig-stündiger Inkubation mit Yangonin 5 μ M und LPS 5ng/ml dargestellt, die Zellen sind größer als jene in Abbildung 3.3.e, haben weniger Vakuolen und weniger feingliedrige Zellausläufer. Die Kern-Zytoplasma-Relation ist im Vergleich zu 3.3.e zugunsten des Zytoplasmas verschoben.

In allen Abbildungen, in welchen die Zellen eine Koinkubation von Kavalaktonen und LPS erhielten zeigt sich im Vergleich zur reinen Inkubation mit LPS eine vermehrte Anzahl an Zellausläufern.

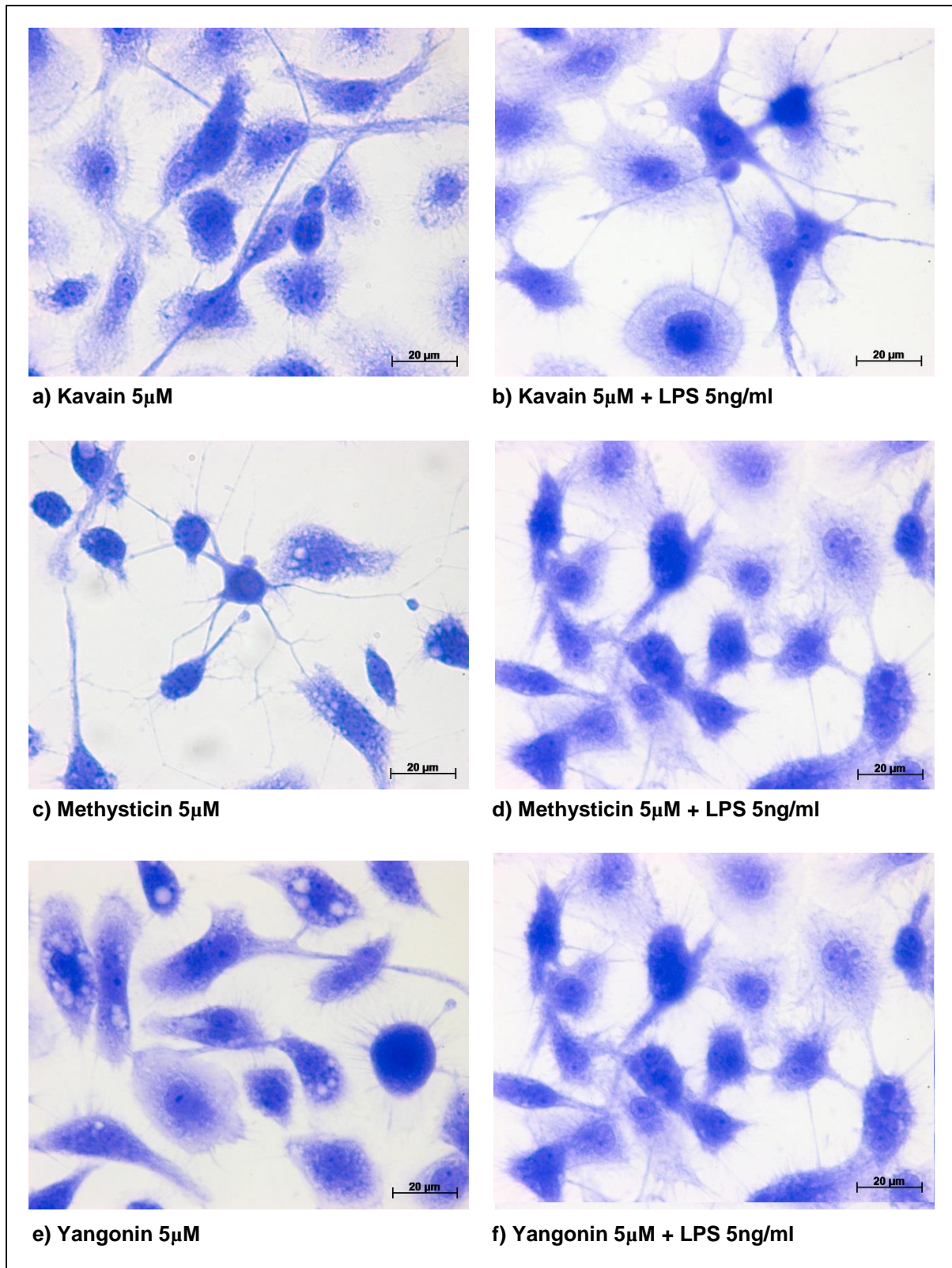


Abb. 3.4: Veränderung der Zellmorphologie von Mikroglia unter dem Einfluss der Kavalaktone Kavain (a), Methysticin (c), Yangonin (e) ± LPS (b,d,f).

3.4 Einfluss der Kavalaktone Kavain, Methysticin und Yangonin auf die mRNA-Synthese proinflammatorischer Mediatoren in Mikroglia und Astrozyten

Klassischerweise werden eine ganze Reihe von Entzündungsmediatoren unter dem Einfluss von LPS hochreguliert, darunter iNOS, IL-6, IL-1 β und TNF- α . Können Kavalaktone diese Aktivierung beeinflussen und wenn ja, in welche Richtung? Um dieser Frage nachzugehen, wurde die mRNA-Synthese von iNOS, IL-6, IL-1 β und TNF- α in Mikroglia und Astrozyten mittels qPCR untersucht. Um die Vielzahl der Befunde übersichtlicher zu gestalten, erfolgt zunächst jeweils eine Darstellung der Ergebnisse zur Wirkung eines Kavalaktons auf einen Parameter im zellspezifischen Vergleich (Mikroglia versus Astrozyten) sowie im Zeitverlauf (nach sechs und nach vierundzwanzig Stunden). Anschließend sind die Befunde zur „Kombinationstherapie“ (alle Kavalaktone als Gemisch eingesetzt) dargestellt.

3.4.1 Einfluss von Kavain auf die iNOS-mRNA-Synthese in Mikroglia und Astrozyten

In LPS-aktivierter Mikroglia zeigte sich nach einer sechs- und einer vierundzwanzig-stündigen Koinkubation mit Kavain eine signifikante Herabregulation der iNOS-mRNA-Synthese im Vergleich zu einer alleinigen Stimulation mit LPS. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle hatte eine Einzelstimulation mit Kavain bei beiden untersuchten Inkubationszeiten keinen Einfluss auf die Synthese der iNOS-mRNA in Mikroglia. In aktivierten Astrozyten zeigte sich eine leichte Reduktion der iNOS-mRNA nach sechs Stunden, nach vierundzwanzig Stunden war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar (Abb. 3.5).

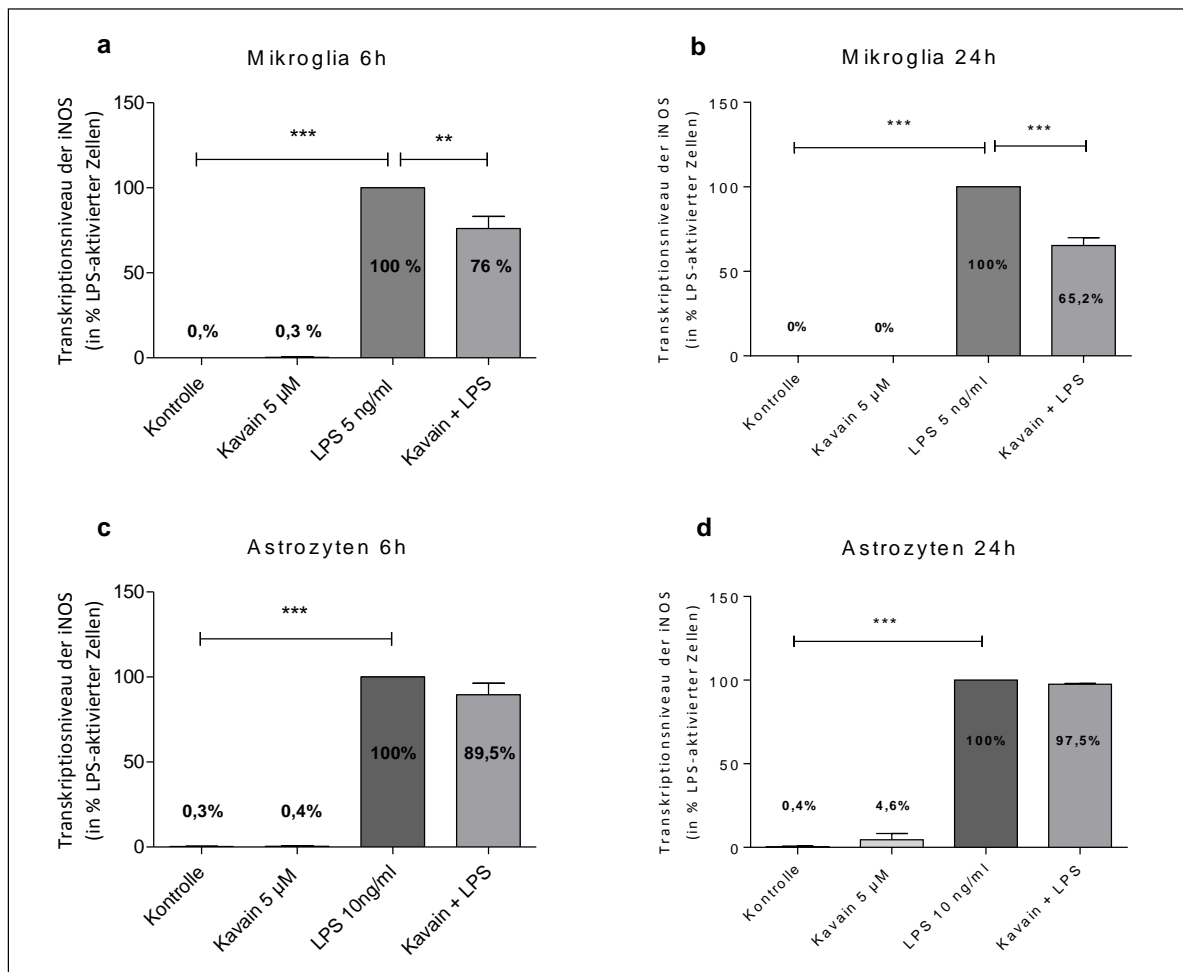


Abb. 3.5: Einfluss von Kavain auf die iNOS-mRNA von Mikroglia und Astrozyten. Kavain (5 μ M) reduzierte signifikant die Menge der iNOS-mRNA in LPS-aktivierter (5 ng/ml) Mikroglia nach sechs Stunden von 100% auf 76% und nach vierundzwanzig Stunden von 100% auf 65,2%. In LPS-aktivierten (10 ng/ml) Astrozyten zeigte sich nach sechs Stunden eine Reduktion der iNOS-mRNA-Synthese von 100% auf 89,5%, die jedoch nach vierundzwanzig Stunden nicht mehr nachweisbar war. (Daten sind dargestellt als Mittelwert + SEM, n = 3 (a+d), n = 4 (b+c); ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).

3.4.2 Einfluss von Methysticin auf die iNOS-mRNA-Synthese in Mikroglia und Astrozyten

In LPS-aktivierter Mikroglia zeigte sich nach einer sechs- und einer vierundzwanzig-stündigen Koinkubation mit Methysticin eine signifikante Herabregulation der iNOS-mRNA-Synthese im Vergleich zu einer alleinigen Stimulation mit LPS. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle hatte eine Einzelstimulation mit Methysticin bei beiden untersuchten Inkubationszeiten keinen Einfluss auf die Synthese der iNOS-mRNA in Mikroglia. In aktivierten Astrozyten zeigte sich eine Reduktion der iNOS-mRNA nach sechs Stunden und nach vierundzwanzig Stunden (Abb. 3.6)

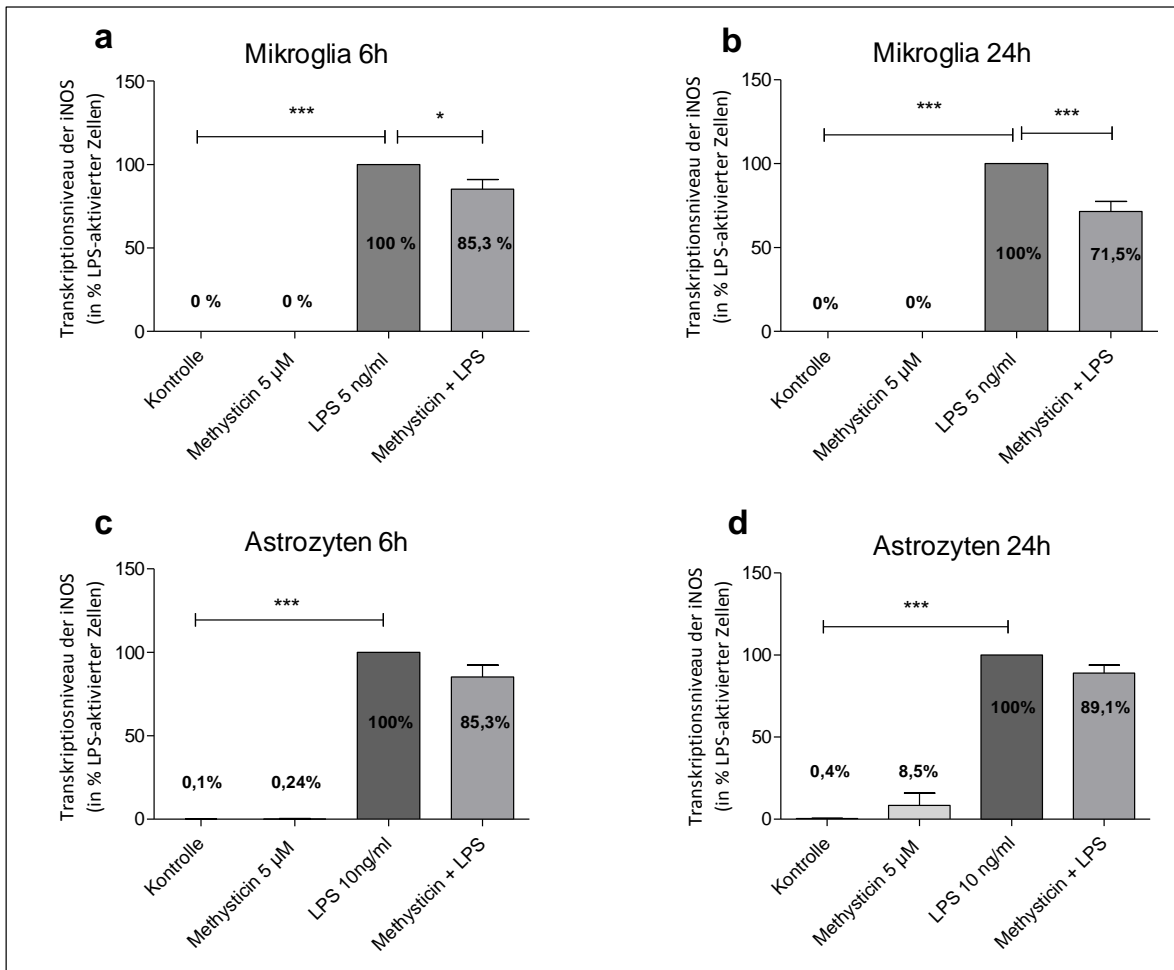


Abb. 3.6: Einfluss von Methysticin auf die iNOS-mRNA von Mikroglia und Astrozyten. Methysticin (5µM) reduzierte signifikant die Menge der iNOS-mRNA in LPS-aktivierter (5 ng/ml) Mikroglia nach sechs Stunden von 100% auf 85,3% und nach vierundzwanzig Stunden von 100% auf 71,5%. In LPS-aktivierten (10 ng/ml) Astrozyten zeigte sich nach sechs Stunden eine Reduktion der iNOS-mRNA-Synthese von 100% auf 85,3%, nach vierundzwanzig Stunden auf 89,1%. (Daten sind dargestellt als Mittelwert + SEM, n = 3(a), n = 4(b+c+d); * = p<0,05; *** = p < 0,001).

3.4.3 Einfluss von Yangonin auf die iNOS-mRNA-Synthese in Mikroglia und Astrozyten

In LPS-aktivierter Mikroglia zeigte sich nach einer sechs-stündigen Koinkubation mit Yangonin eine signifikante Herabregulation der iNOS-mRNA-Synthese im Vergleich zu einer alleinigen Stimulation mit LPS. Nach einer vierundzwanzig-stündigen Koinkubation zeigte sich eine signifikante Erhöhung der iNOS-mRNA im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit LPS. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle hatte eine Einzelstimulation mit Methysticin bei beiden untersuchten Inkubationszeiten keinen Einfluss auf die Synthese der iNOS-mRNA in Mikroglia. In aktivierten Astrozyten zeigte sich eine Erhöhung der iNOS-mRNA nach sechs und nach vierundzwanzig Stunden (Abb. 3.7).

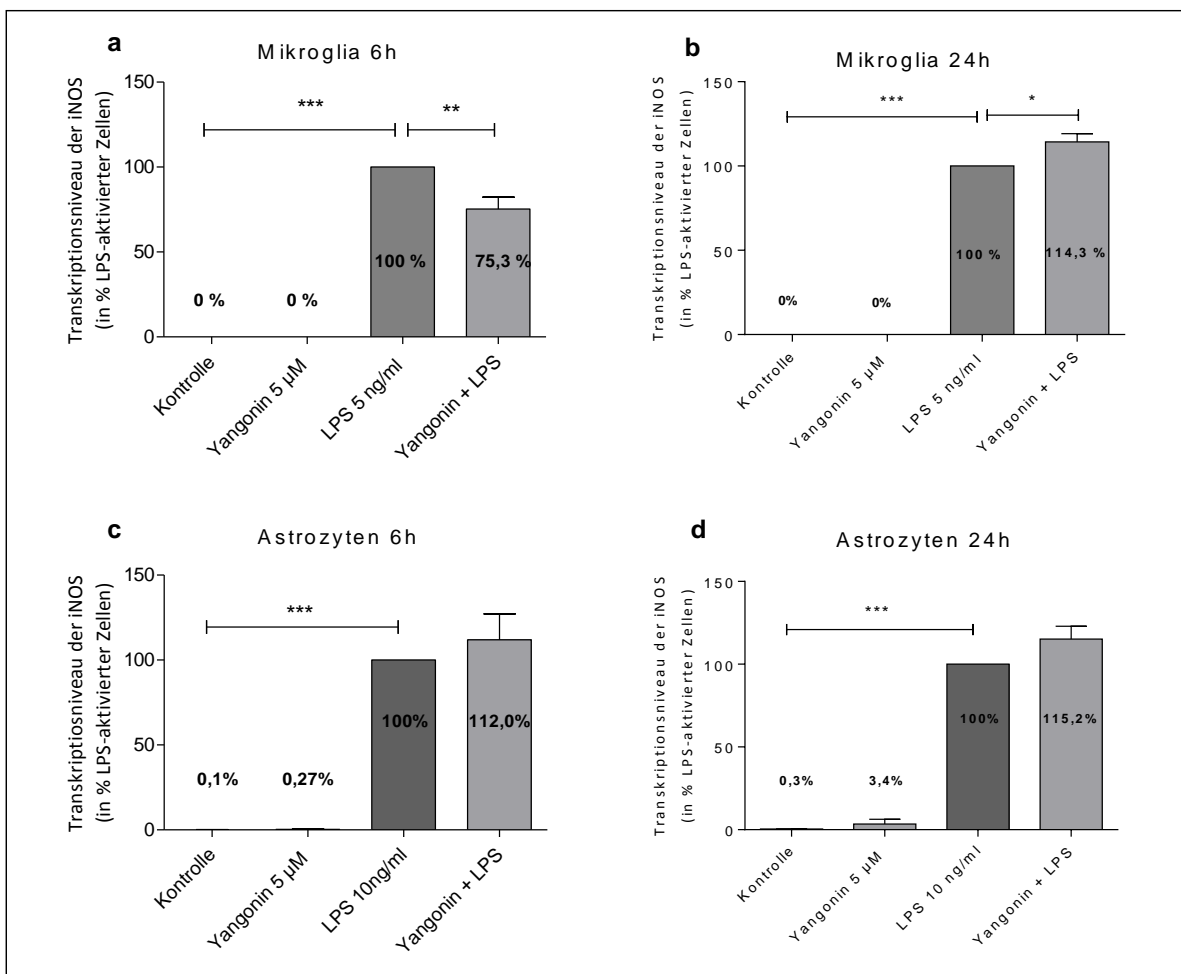


Abb. 3.7: Einfluss von Yangonin auf die iNOS-mRNA von Mikroglia und Astrozyten. Yangonin (5µM) reduzierte signifikant die Menge der iNOS-mRNA in LPS-aktivierter (5 ng/ml) Mikroglia nach sechs Stunden von 100% auf 75,3%, nach vierundzwanzig Stunden jedoch zeigte sich eine signifikante Erhöhung von 100% auf 114,3%. In LPS-aktivierten (10 ng/ml) Astrozyten zeigte sich eine Erhöhung der iNOS-mRNA nach sechs Stunden von 100% auf 112%, nach vierundzwanzig Stunden auf 115,4%. (Daten sind dargestellt als Mittelwert + SEM, n = 3 (a+d), n = 4 (b+c); * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).

3.4.4 Einfluss einer Koinkubation von Kavain, Methysticin und Yangonin auf die iNOS-mRNA-Synthese in Mikroglia und Astrozyten

Eine sechs-stündige Koinkubation LPS-aktivierter Mikroglia mit den Kavalaktonen Kavain, Methysticin und Yangonin (KMY) zeigte eine signifikante Erhöhung der iNOS-mRNA-Synthese im Vergleich zu einer alleinigen Stimulation mit LPS, nach vierundzwanzig-stündiger Konkubation zeigte sich eine signifikante Reduktion der iNOS-mRNA. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle hatte eine Stimulation mit Kavain, Methysticin und Yangonin bei beiden untersuchten Inkubationszeiten keinen Einfluss auf die Synthese der iNOS-mRNA in Mikroglia. In aktivierten Astrozyten zeigte sich eine Reduktion der iNOS-mRNA nach sechs und eine Erhöhung der iNOS-mRNA nach vierundzwanzig Stunden (Abb. 3.8).

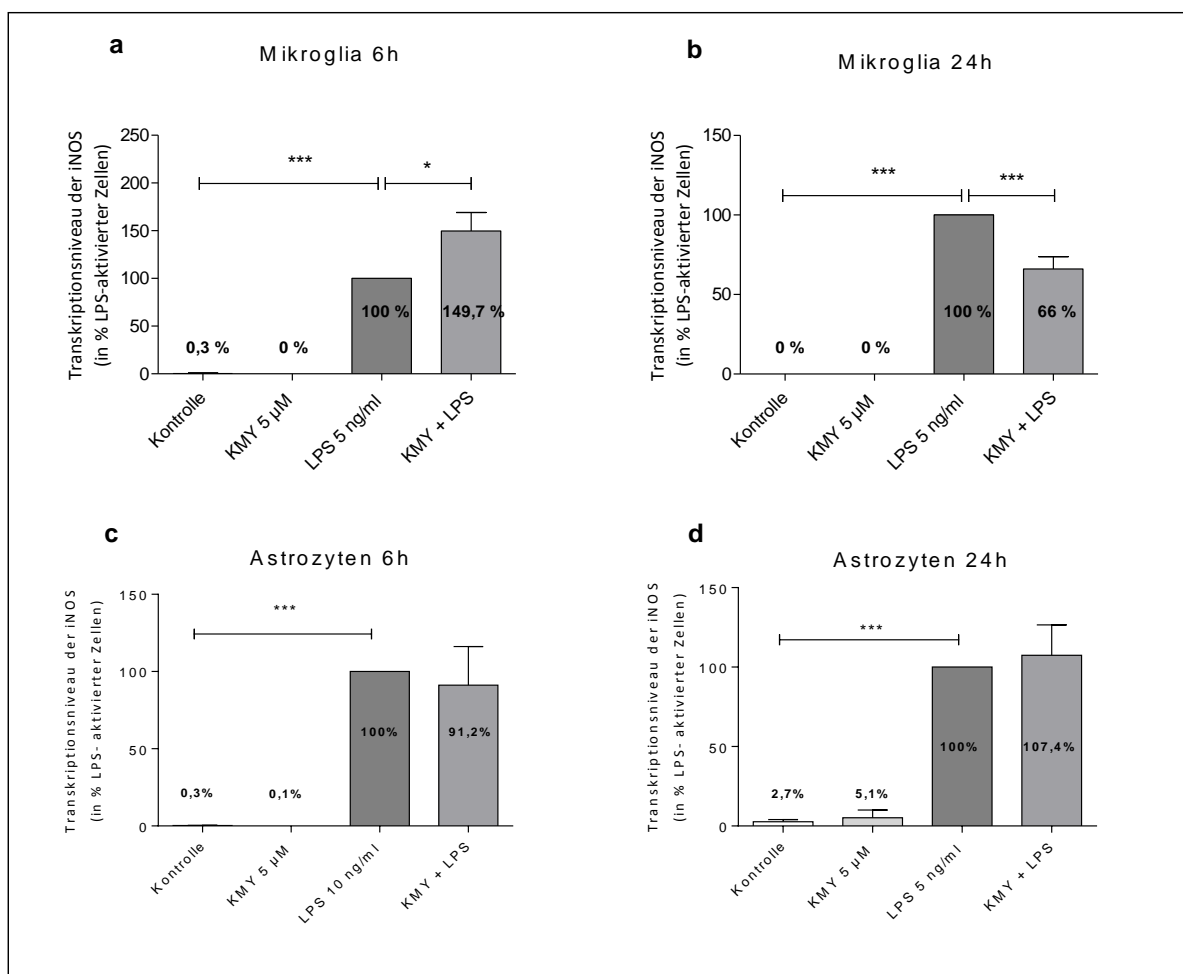


Abb. 3.8: Einfluss einer Koinkubation von Kavain, Methysticin und Yangonin auf die iNOS-mRNA von Mikroglia und Astrozyten. Eine Koinkubation mit Kavain, Methysticin und Yangonin (KMY, je 5µM) erhöhte signifikant die Menge der iNOS-mRNA in LPS-aktivierter (5 ng/ml) Mikroglia nach sechs Stunden von 100% auf 149,7%, nach vierundzwanzig Stunden fand sich eine signifikante Reduktion von 100% auf 66%. In LPS-aktivierten (10 ng/ml) Astrozyten zeigte sich nach sechs Stunden eine Reduktion der iNOS-mRNA-Synthese von 100% auf 91,2%, nach vierundzwanzig Stunden fand sich eine Erhöhung auf 107,4%. (Daten sind dargestellt als Mittelwert + SEM, n = 3(a+b), n = 4(c+d); * = p < 0,05; *** = p < 0,001).

3.4.5 Einfluss von Kavain auf die IL-6-mRNA-Synthese in Mikroglia und Astrozyten

In LPS-aktivierter Mikroglia zeigte sich nach einer sechs- und einer vierundzwanzig-stündigen Koinkubation mit Kavain eine signifikante Herabregulation der IL-6-mRNA-Synthese im Vergleich zu einer alleinigen Stimulation mit LPS. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle hatte eine Einzelstimulation mit Kavain bei beiden untersuchten Inkubationszeiten keinen Einfluss auf die Synthese der IL-6-mRNA in Mikroglia. In aktivierten Astrozyten zeigte sich keine deutliche Veränderung der IL-6-mRNA nach sechs und nach vierundzwanzig Stunden (Abb. 3.9).

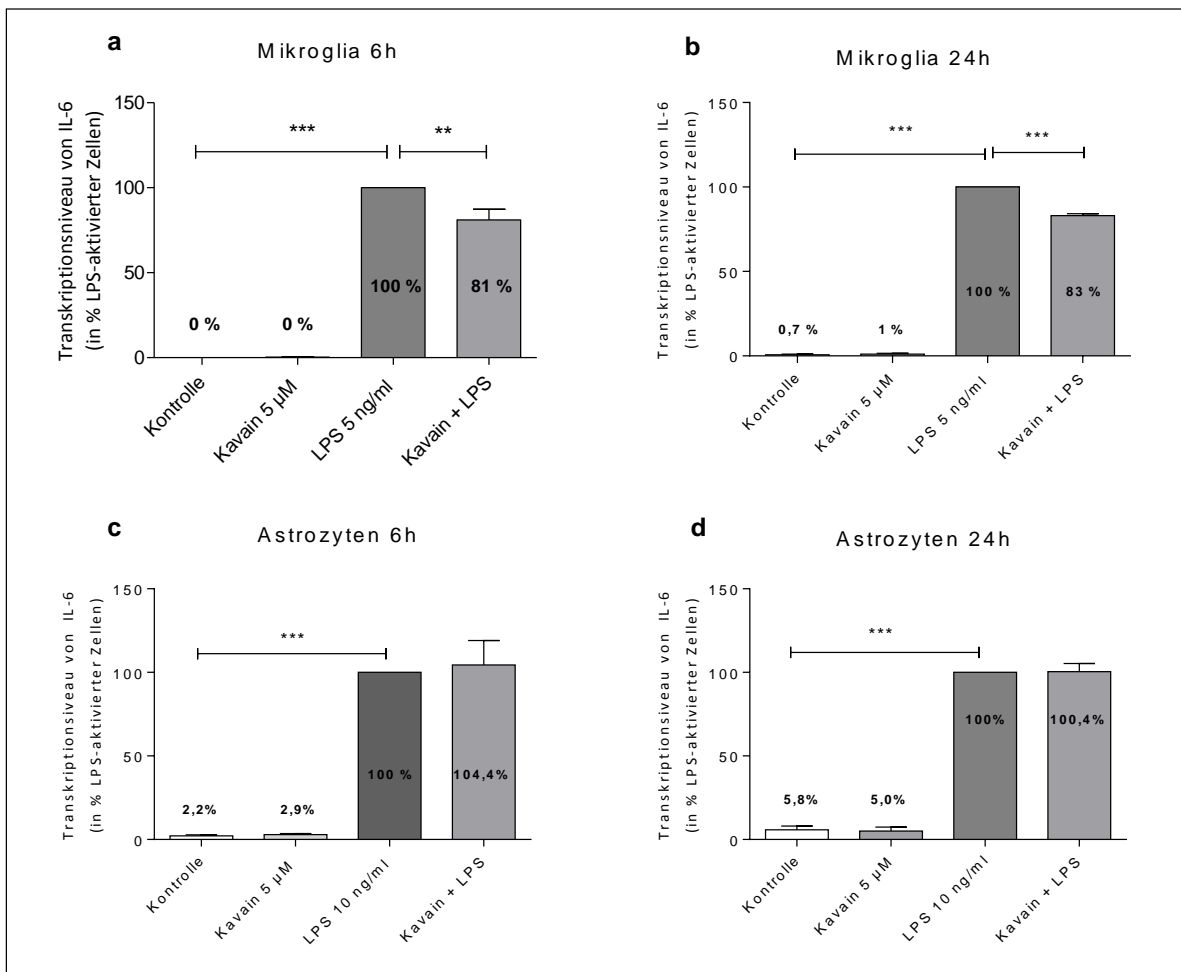


Abb. 3.9: Einfluss von Kavain auf die IL-6-mRNA von Mikroglia und Astrozyten. Kavain (5µM) reduzierte signifikant die Menge der IL-6-mRNA in LPS-aktivierter (5 ng/ml) Mikroglia nach sechs Stunden von 100% auf 81% und nach vierundzwanzig Stunden von 100% auf 83%. In LPS-aktivierten (10 ng/ml) Astrozyten zeigte sich nach sechs Stunden eine geringe Erhöhung der IL-6-mRNA auf 104,4%, nach vierundzwanzig Stunden zeigte sich mit 100,4% ein fast unveränderter Wert. (Daten sind dargestellt als Mittelwert + SEM, n = 4(a), n = 3(b+d), n = 7(c) ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).

3.4.6 Einfluss von Methysticin auf die IL-6-mRNA-Synthese in Mikroglia und Astrozyten

In LPS-aktivierter Mikroglia zeigte sich nach einer sechs- und einer vierundzwanzig-stündigen Koinkubation mit Methysticin eine signifikante Herabregulation der IL-6-mRNA-Synthese im Vergleich zu einer alleinigen Stimulation mit LPS. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle hatte eine Einzelstimulation mit Methysticin bei beiden untersuchten Inkubationszeiten keinen Einfluss auf die Synthese der IL-6-mRNA in Mikroglia. In aktivierten Astrozyten zeigte sich keine Veränderung der IL-6-mRNA nach sechs Stunden, nach vierundzwanzig Stunden zeigte sich eine signifikante Reduktion (Abb 3.10).

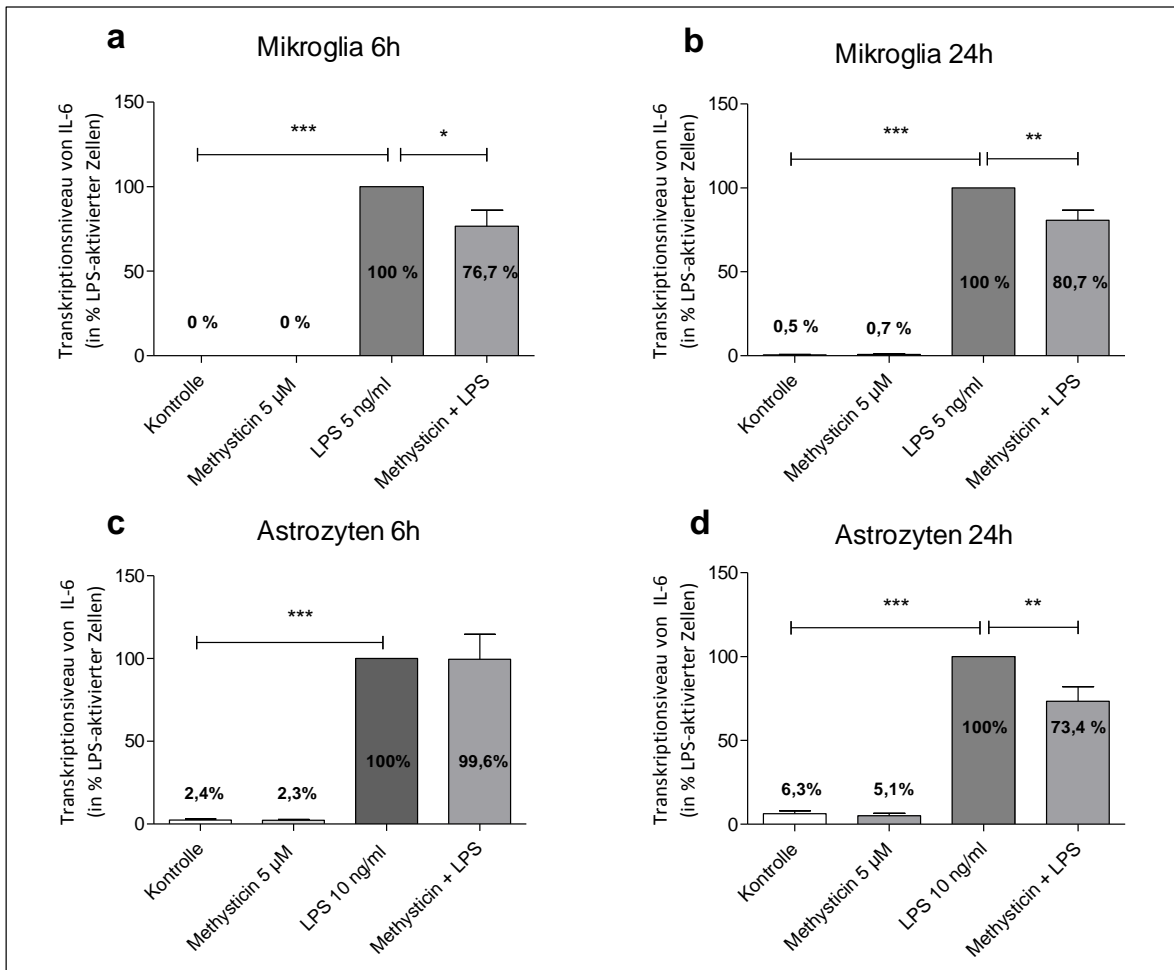


Abb. 3.10: Einfluss von Methysticin auf die IL-6-mRNA von Mikroglia und Astrozyten. Methysticin (5µM) reduzierte signifikant die Menge der IL-6-mRNA in LPS-aktivierter (5 ng/ml) Mikroglia nach sechs Stunden von 100% auf 76,7% und nach vierundzwanzig Stunden von 100% auf 80,7%. In LPS-aktivierten (10 ng/ml) Astrozyten zeigte sich nach sechs Stunden keine Veränderung der IL-6-mRNA-Synthese, nach vierundzwanzig Stunden zeigte sich eine signifikante Reduktion von 100% auf 73,4%. (Daten sind dargestellt als Mittelwert + SEM, n = 3(a), n = 4(b+d), n = 7(c), * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).

3.4.7 Einfluss von Yangonin auf die IL-6-mRNA-Synthese in Mikroglia und Astrozyten

In LPS-aktivierter Mikroglia zeigte sich nach einer sechs- und einer vierundzwanzig-stündigen Koinkubation mit Yangonin eine signifikante Herabregulation der IL-6-mRNA-Synthese im Vergleich zu einer alleinigen Stimulation mit LPS. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle hatte eine Einzelstimulation mit Yangonin bei beiden untersuchten Inkubationszeiten keinen Einfluss auf die Synthese der IL-6-mRNA in Mikroglia. In aktivierten Astrozyten zeigte sich eine signifikante Erhöhung der IL-6-mRNA nach sechs und nach vierundzwanzig Stunden (Abb. 3.11).

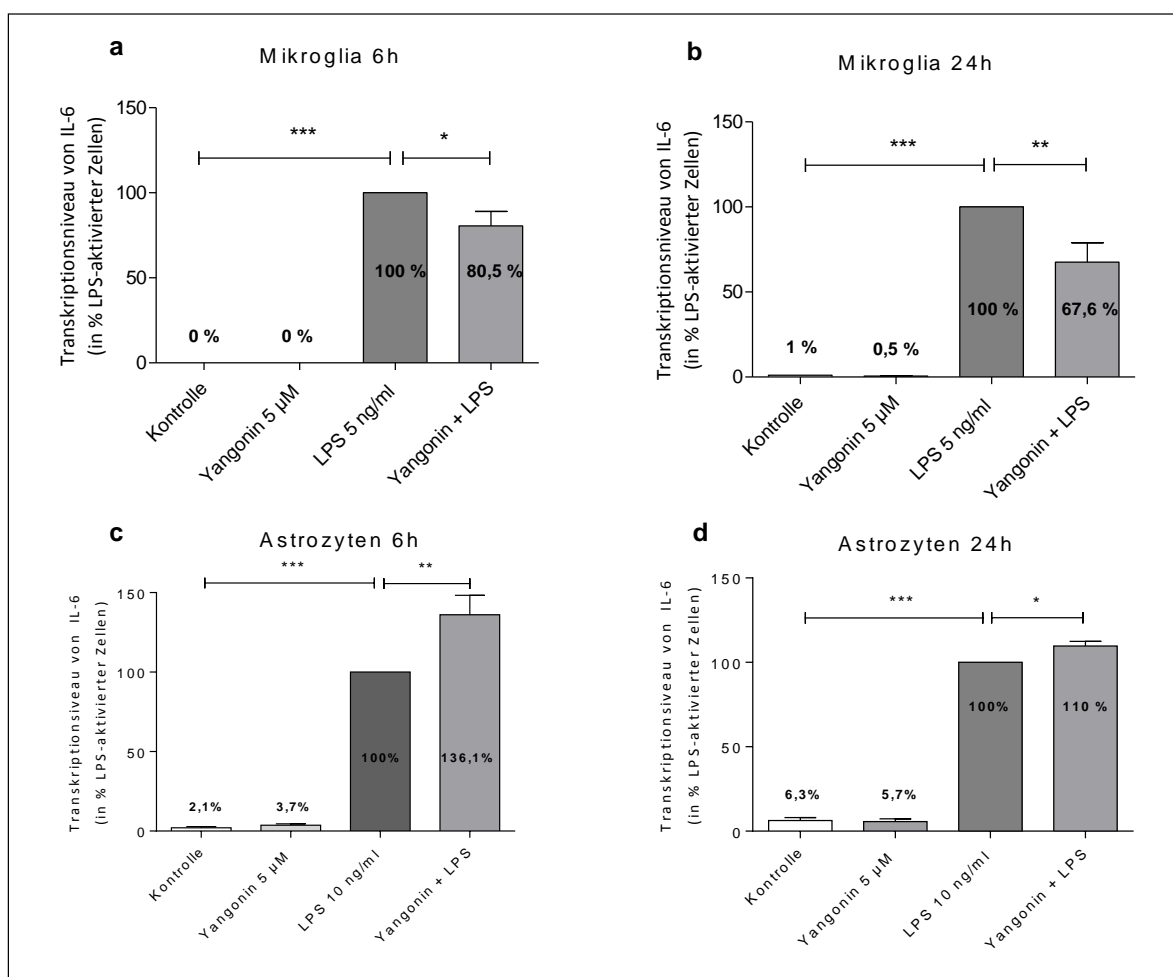


Abb. 3.11: Einfluss von Yangonin auf die IL-6-mRNA-Synthese von Mikroglia und Astrozyten. Yangonin (5 μ M) reduzierte signifikant die Menge der IL-6-mRNA in LPS-aktivierter (5 ng/ml) Mikroglia nach sechs Stunden von 100% auf 80,5% und nach vierundzwanzig Stunden von 100% auf 67,6%. In LPS-aktivierten (10 ng/ml) Astrozyten zeigte sich nach sechs Stunden eine signifikante Erhöhung der IL-6-mRNA-Synthese von 100% auf 136,1%, nach vierundzwanzig Stunden eine signifikante Erhöhung von 100% auf 110%. (Daten sind dargestellt als Mittelwert + SEM, n = 4(a,c,d), n = 5(b), * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).

3.4.8 Einfluss einer Koinkubation von Kavain, Methysticin und Yangonin gemeinsam auf die IL-6-mRNA-Synthese in Mikroglia und Astrozyten

In LPS-aktivierter Mikroglia zeigte sich nach einer sechs- und einer vierundzwanzig-stündigen Koinkubation mit den Kavalaktonen Kavain, Methysticin und Yangonin (KMY) eine signifikante Reduktion der IL-6-mRNA-Synthese im Vergleich zu einer alleinigen Stimulation mit LPS. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle hatte eine Stimulation mit Kavain, Methysticin und Yangonin bei beiden untersuchten Inkubationszeiten keinen Einfluss auf die Synthese der IL-6-mRNA in Mikroglia. In aktivierten Astrozyten zeigte sich keine Veränderung der IL-6-mRNA nach sechs und eine deutliche Reduktion der IL-6-mRNA nach vierundzwanzig Stunden (Abb. 3.12).

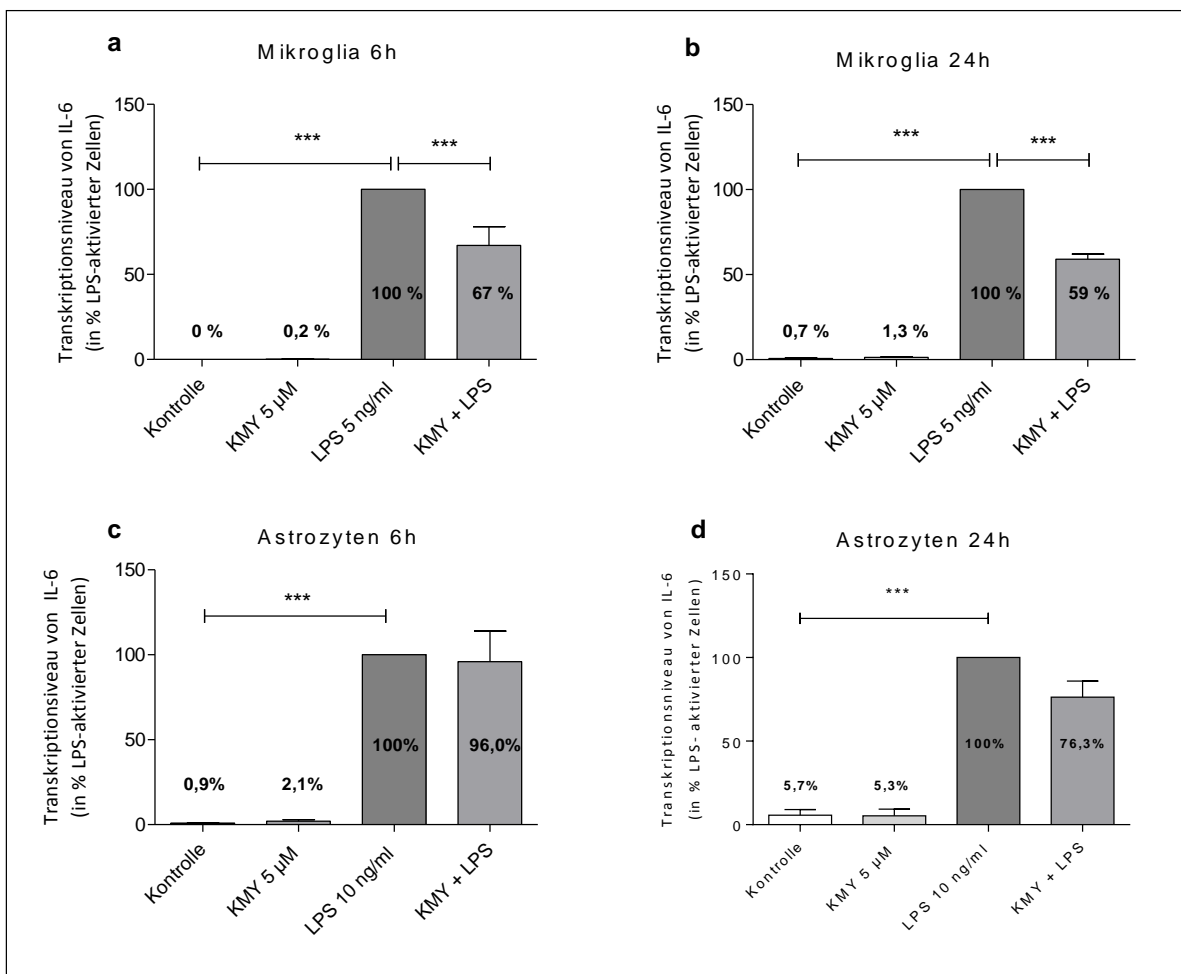


Abb. 3.12: Einfluss einer Koinkubation von Kavain, Methysticin und Yangonin auf die IL-6-mRNA von Mikroglia und Astrozyten. Eine Koinkubation mit Kavain, Methysticin und Yangonin (KMY, je 5µM) reduzierte signifikant die Menge der iNOS-mRNA in LPS-aktivierter (5 ng/ml) Mikroglia nach sechs Stunden von 100% auf 67% und nach vierundzwanzig Stunden von 100% auf 59%. In LPS-aktivierten (10 ng/ml) Astrozyten zeigte sich nach sechs Stunden eine Reduktion der IL-6-mRNA-Synthese von 100% auf 96%, nach vierundzwanzig Stunden auf 76,3%. (Daten sind dargestellt als Mittelwert + SEM, n = 5(a), n = 3(b,d), n = 4(c) * = p < 0,05; *** = p < 0,001).

3.4.9 Einfluss von Kavain auf die IL-1 β -mRNA-Synthese in Mikroglia und Astrozyten

In LPS-aktivierter Mikroglia zeigte sich nach einer sechs- und einer vierundzwanzig-stündigen Koinkubation mit Kavain eine signifikante Herabregulation der IL-1 β -mRNA-Synthese im Vergleich zu einer alleinigen Stimulation mit LPS. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle hatte eine Einzelstimulation mit Kavain bei beiden untersuchten Inkubationszeiten keinen Einfluss auf die Synthese der IL-1 β -mRNA in Mikroglia. In aktivierten Astrozyten zeigte sich eine deutliche Reduktion der IL-1 β -mRNA nach sechs Stunden, nach vierundzwanzig Stunden zeigte sich keine Veränderung (Abb. 3.13).

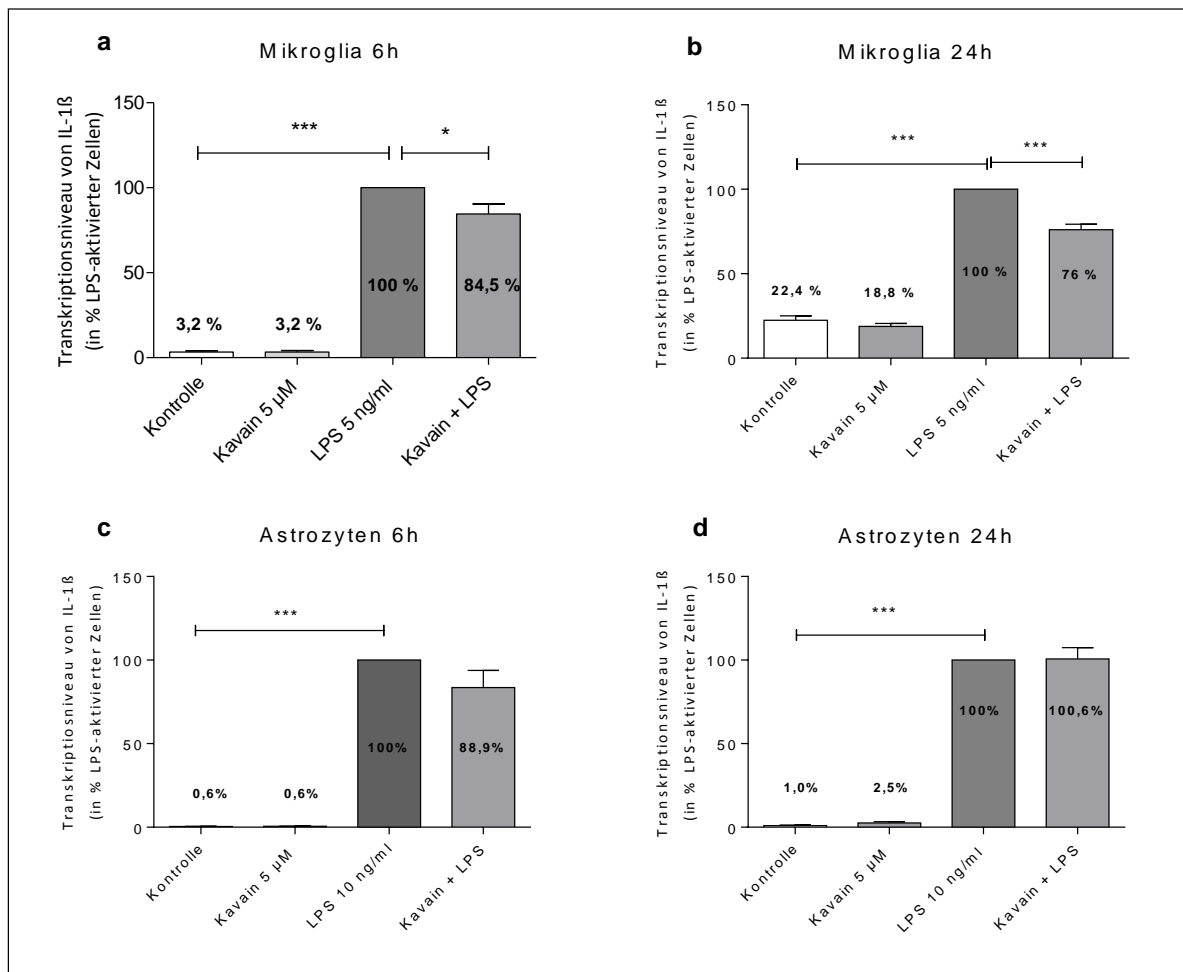


Abb. 3.13: Einfluss von Kavain auf die IL-1 β -mRNA von Mikroglia und Astrozyten. Kavain (5 μ M) reduzierte signifikant die Menge der IL-1 β -mRNA in LPS-aktivierter (5 ng/ml) Mikroglia nach sechs Stunden von 100% auf 84,5% und nach vierundzwanzig Stunden von 100% auf 76%. In LPS-aktivierten (10 ng/ml) Astrozyten zeigte sich nach sechs Stunden eine Reduktion der IL-1 β -mRNA-Synthese von 100% auf 88,9%, nach vierundzwanzig Stunden zeigte sich keine Veränderung. (Daten sind dargestellt als Mittelwert + SEM, n = 5(b,c,d), n = 4(a), * = p < 0,05; *** = p < 0,001).

3.4.10 Einfluss von Methysticin auf die IL-1 β -mRNA-Synthese in Mikroglia und Astrozyten

In LPS-aktivierter Mikroglia zeigte sich nach einer sechs- und einer vierundzwanzig-stündigen Koinkubation mit Methysticin eine signifikante Herabregulation der IL-1 β -mRNA-Synthese im Vergleich zu einer alleinigen Stimulation mit LPS. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle hatte eine Einzelstimulation mit Methysticin bei beiden untersuchten Inkubationszeiten keinen Einfluss auf die Synthese der IL-1 β -mRNA in Mikroglia. In aktivierten Astrozyten zeigte sich eine deutliche Reduktion der IL-1 β -mRNA nach sechs Stunden und eine signifikante Reduktion nach vierundzwanzig Stunden (Abb. 3.14).

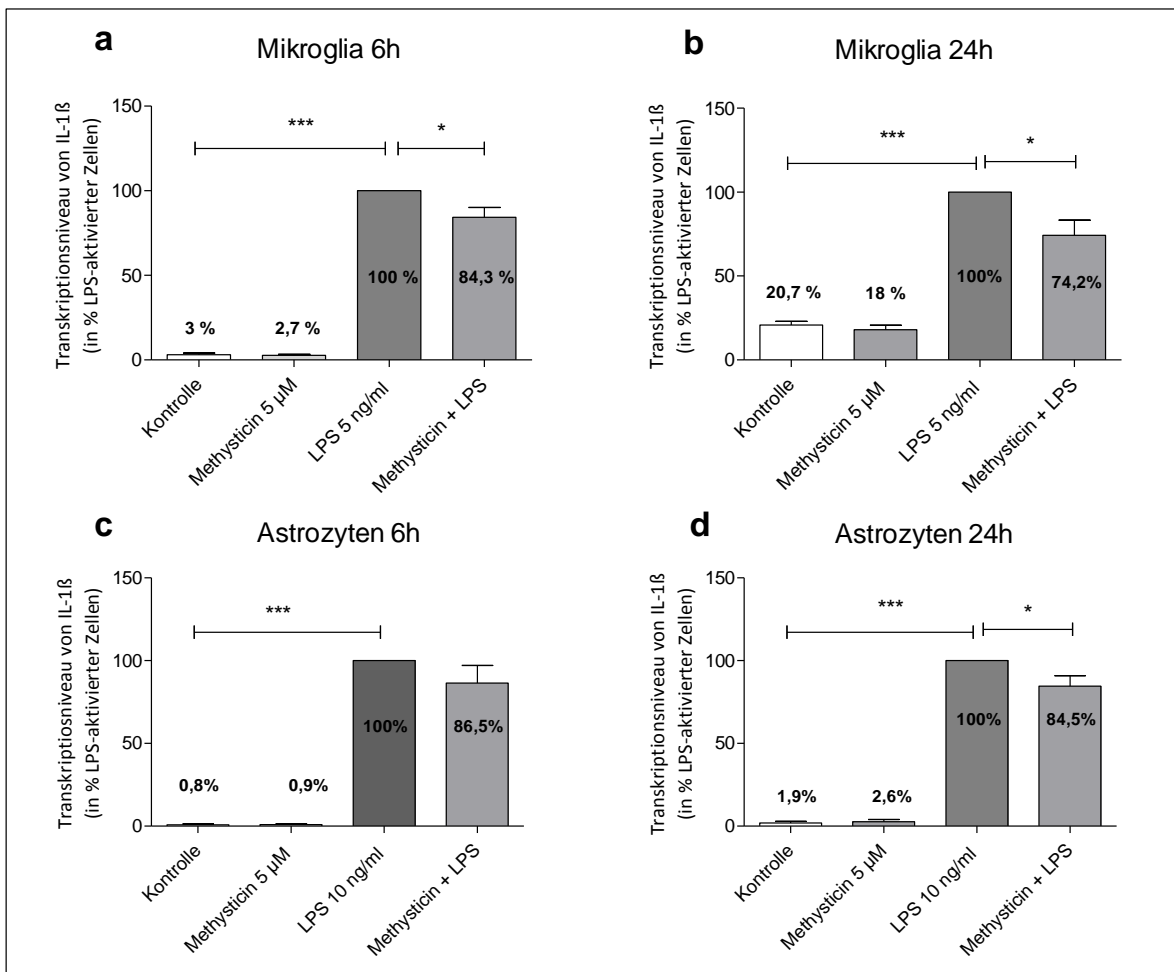


Abb. 3.14: Einfluss von Methysticin auf die IL-1 β -mRNA von Mikroglia und Astrozyten. Methysticin (5 μ M) reduzierte signifikant die Menge der IL-1 β -mRNA in LPS-aktivierter (5 ng/ml) Mikroglia nach sechs Stunden von 100% auf 84,3% und nach vierundzwanzig Stunden von 100% auf 74,2%. In LPS-aktivierten (10 ng/ml) Astrozyten zeigte sich nach sechs Stunden eine Reduktion der IL-1 β -mRNA-Synthese von 100% auf 86,5%, nach vierundzwanzig Stunden ein signifikante Reduktion von 100% auf 84,5%. (Daten sind dargestellt als Mittelwert + SEM, n = 3(a), n = 4(b+d), n = 6(c), * = p < 0,05; *** = p < 0,001).

3.4.11 Einfluss von Yangonin auf die IL-1 β -mRNA-Synthese in Mikroglia und Astrozyten

In LPS-aktivierter Mikroglia zeigte sich nach einer sechs- und einer vierundzwanzig-stündigen Koinkubation mit Yangonin eine signifikante Herabregulation der IL-1 β -mRNA-Synthese im Vergleich zu einer alleinigen Stimulation mit LPS. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle hatte eine Einzelstimulation mit Yangonin bei beiden untersuchten Inkubationszeiten keinen Einfluss auf die Synthese der IL-1 β -mRNA in Mikroglia. In aktivierten Astrozyten zeigte sich eine signifikante Reduktion der IL-1 β -mRNA nach sechs und nach vierundzwanzig Stunden (Abb. 3.15).

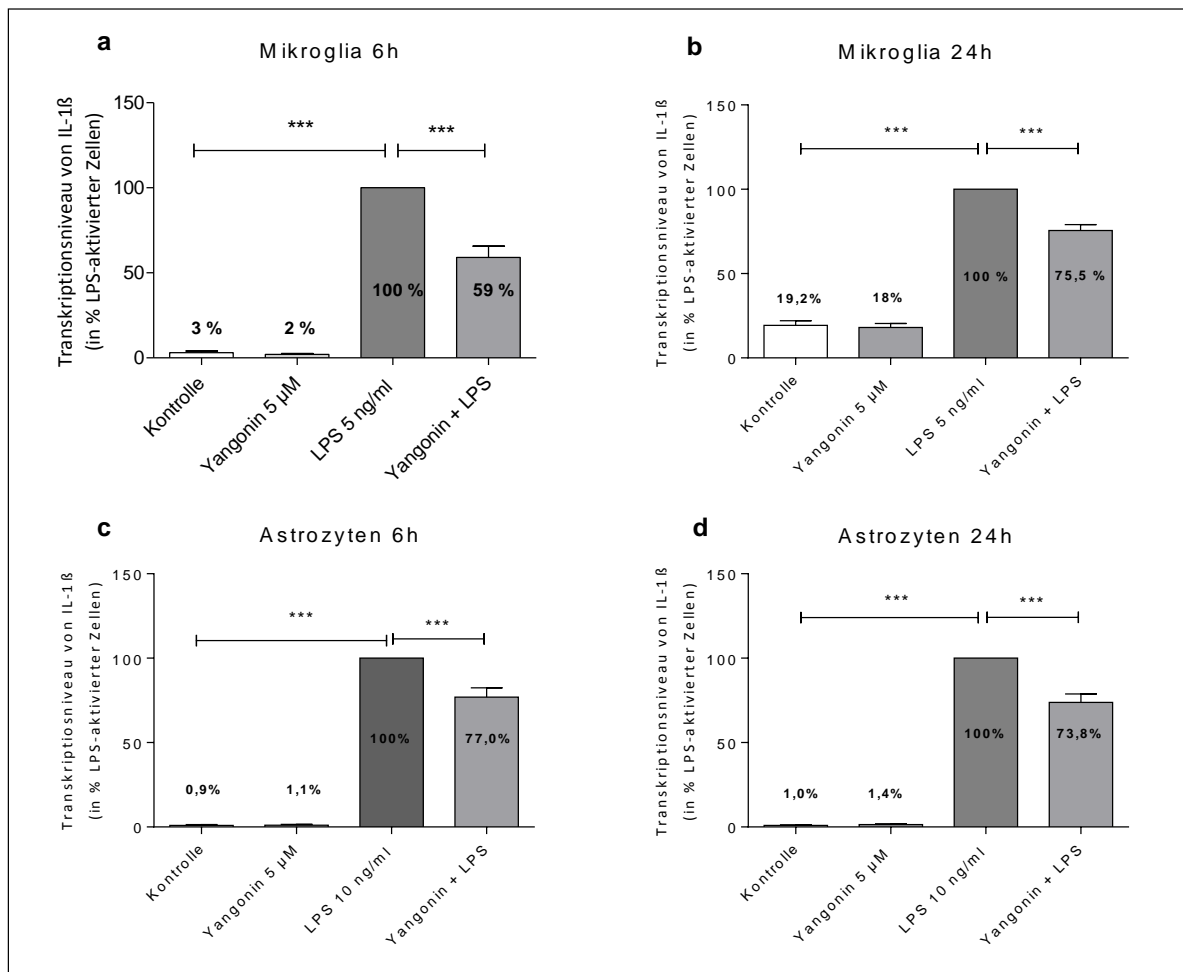


Abb. 3.15: Einfluss von Yangonin auf die IL-1 β -mRNA von Mikroglia und Astrozyten. Yangonin (5 μ M) reduzierte signifikant die Menge der IL-1 β -mRNA in LPS-aktivierter (5 ng/ml) Mikroglia nach sechs Stunden von 100% auf 59% und nach vierundzwanzig Stunden von 100% auf 75,5%. In LPS-aktivierten (10 ng/ml) Astrozyten zeigte sich nach sechs Stunden eine signifikante Reduktion der IL-1 β -mRNA-Synthese von 100% auf 77% und nach vierundzwanzig Stunden von 100% auf 73,8%. (Daten sind dargestellt als Mittelwert + SEM, n = 3(a), n = 4(b+d), n = 5(c), *** = p < 0,001).

3.4.12 Einfluss einer Koinkubation von Kavain, Methysticin und Yangonin gemeinsam auf die IL-1 β -mRNA-Synthese in Mikroglia und Astrozyten

In LPS-aktivierter Mikroglia zeigte sich nach einer sechs-stündigen Koinkubation mit den Kavalaktonen Kavain, Methysticin und Yangonin (KMY) eine signifikante Reduktion der IL-1 β -mRNA-Synthese im Vergleich zu einer alleinigen Stimulation mit LPS, nach vierundzwanzig-stündiger Koinkubation zeigte sich eine deutliche Reduktion. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle hatte eine Stimulation mit Kavain, Methysticin und Yangonin bei beiden untersuchten Inkubationszeiten keinen Einfluss auf die Synthese der IL-1 β -mRNA in Mikroglia. In aktivierten Astrozyten zeigten sich keine Veränderung der IL-1 β -mRNA nach sechs Stunden und eine signifikante Reduktion der IL-1 β -mRNA nach vierundzwanzig Stunden (Abb. 3.16).

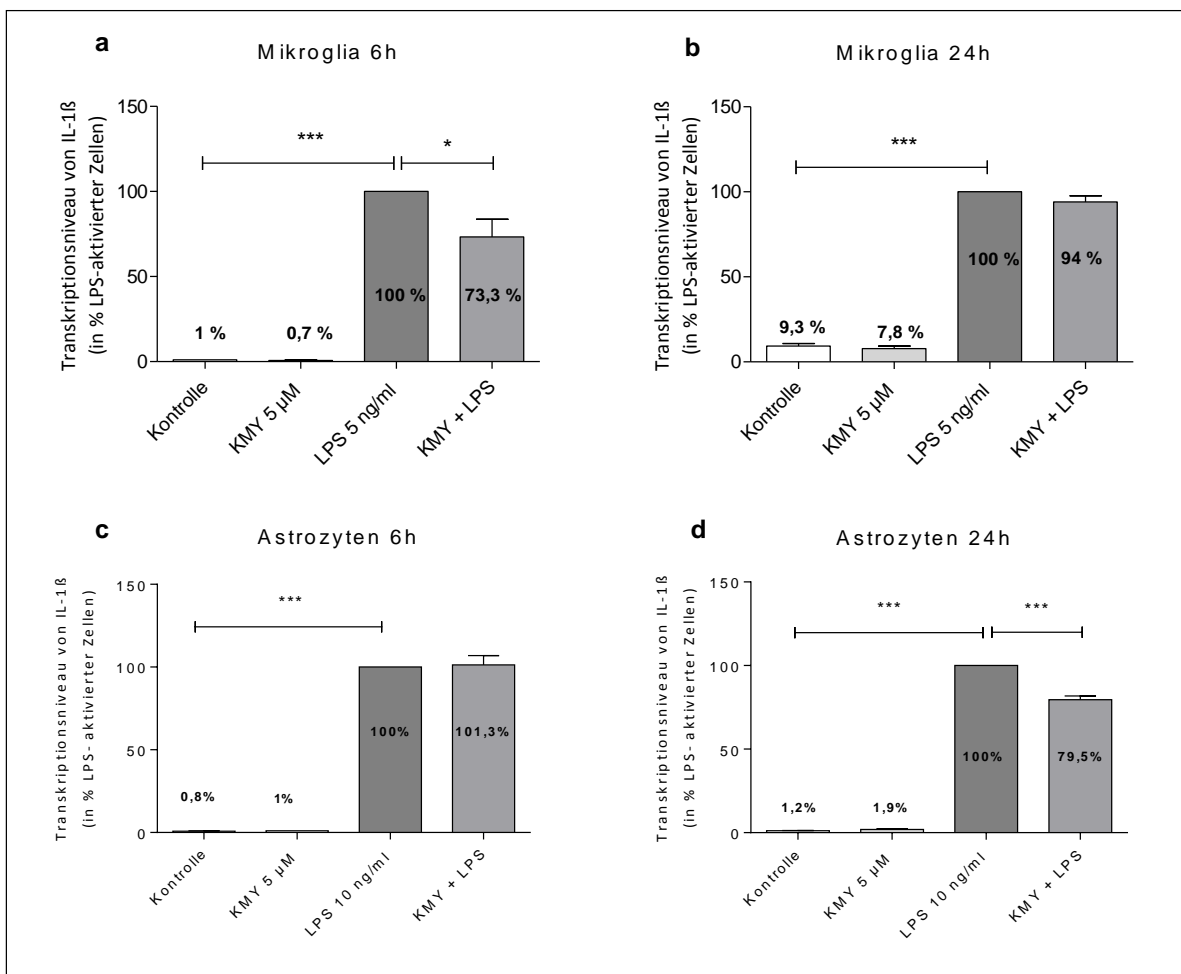


Abb. 3.16: Einfluss einer Koinkubation von Kavain, Methysticin und Yangonin auf die IL-1 β -mRNA von Mikroglia und Astrozyten. Eine Koinkubation mit Kavain, Methysticin und Yangonin (KMY, je 5 μ M) reduzierte signifikant die Menge der IL-1 β -mRNA in LPS-aktivierter (5 ng/ml) Mikroglia nach sechs Stunden von 100% auf 73,3%, nach vierundzwanzig Stunden fand sich eine Reduktion von 100% auf 94%. In LPS-aktivierten (10 ng/ml) Astrozyten zeigte sich nach sechs Stunden keine Veränderung der IL-1 β -mRNA-Synthese, nach vierundzwanzig Stunden fand sich eine signifikante Reduktion von 100% auf 79,5%. (Daten sind dargestellt als Mittelwert + SEM, n = 3(a+c), n = 5(b), * = p < 0,05; *** = p < 0,001).

3.4.13 Einfluss von Kavain auf die TNF- α -mRNA -Synthese in Mikroglia und Astrozyten

In LPS-aktivierter Mikroglia zeigte sich nach einer sechs- und einer vierundzwanzig-stündigen Koinkubation mit Kavain eine signifikante Herabregulation der TNF- α -mRNA-Synthese im Vergleich zu einer alleinigen Stimulation mit LPS. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle hatte eine Einzelstimulation mit Kavain bei beiden untersuchten Inkubationszeiten keinen Einfluss auf die Synthese der TNF- α -mRNA in Mikroglia. In aktivierten Astrozyten zeigte sich eine signifikante Reduktion der TNF- α -mRNA nach sechs Stunden, nach vierundzwanzig Stunden zeigte sich keine Veränderung (Abb. 3.17).

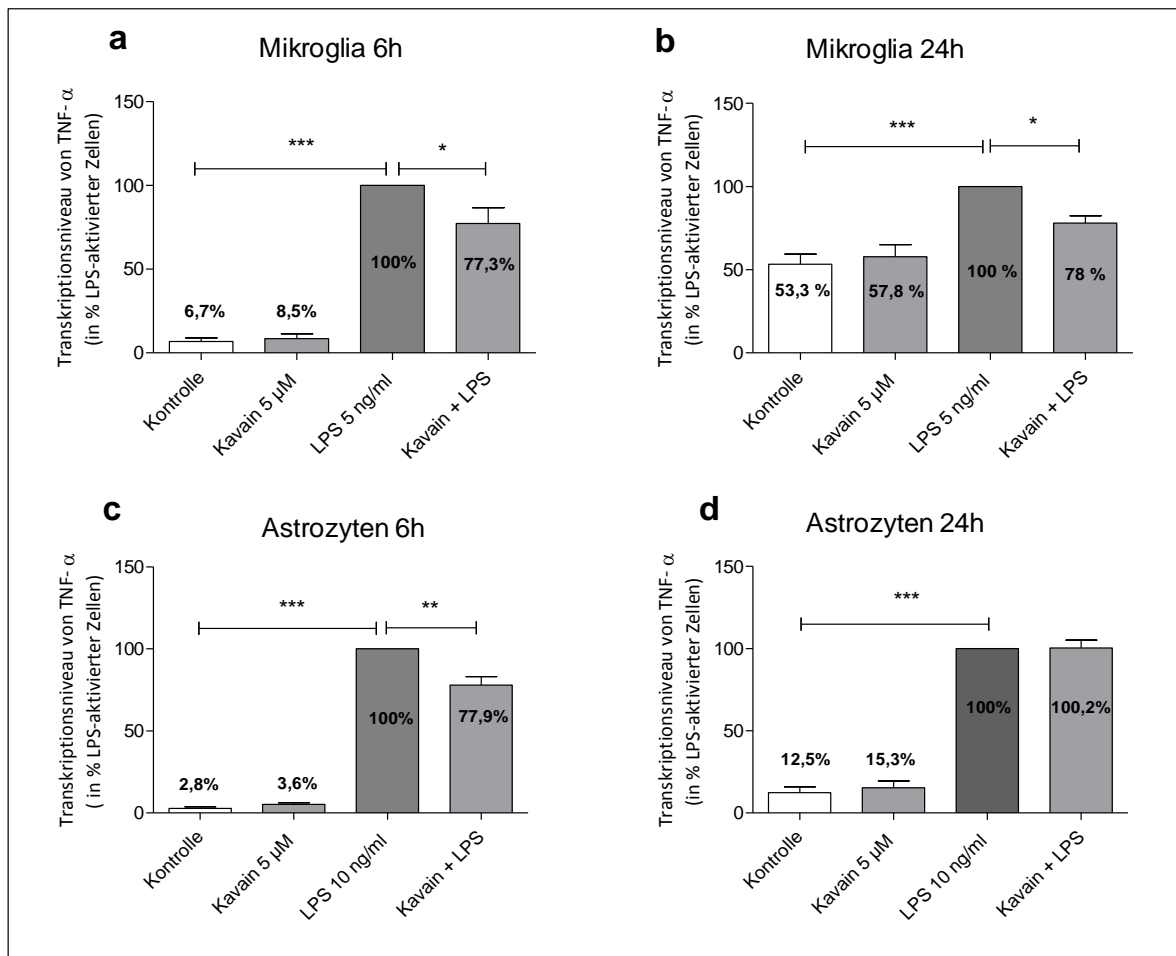


Abb. 3.17: Einfluss von Kavain auf die TNF- α -mRNA von Mikroglia und Astrozyten. Kavain (5 μ M) reduzierte signifikant die Menge der TNF- α -mRNA in LPS-aktivierter (5 ng/ml) Mikroglia nach sechs Stunden von 100% auf 77,3% und nach vierundzwanzig Stunden von 100% auf 78%. In LPS-aktivierten (10 ng/ml) Astrozyten zeigte sich nach sechs Stunden eine signifikante Reduktion der TNF- α -mRNA-Synthese von 100% auf 77,9%, nach vierundzwanzig Stunden zeigte sich keine Veränderung. (Daten sind dargestellt als Mittelwert + SEM, n = 4(a+d), n = 5(c), n = 6(b), * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).

3.4.14 Einfluss von Methysticin auf die TNF- α -mRNA -Synthese in Mikroglia und Astrozyten

In LPS-aktivierter Mikroglia zeigte sich nach einer sechs- und einer vierundzwanzig-stündigen Koinkubation mit Methysticin eine signifikante Herabregulation der TNF- α -mRNA-Synthese im Vergleich zu einer alleinigen Stimulation mit LPS. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle hatte eine Einzelstimulation mit Methysticin bei beiden untersuchten Inkubationszeiten keinen Einfluss auf die Synthese der TNF- α -mRNA in Mikroglia. In aktivierten Astrozyten zeigte sich eine deutliche Reduktion der TNF- α -mRNA nach sechs Stunden, nach vierundzwanzig Stunden zeigte sich eine signifikante Reduktion (Abb. 3.18).

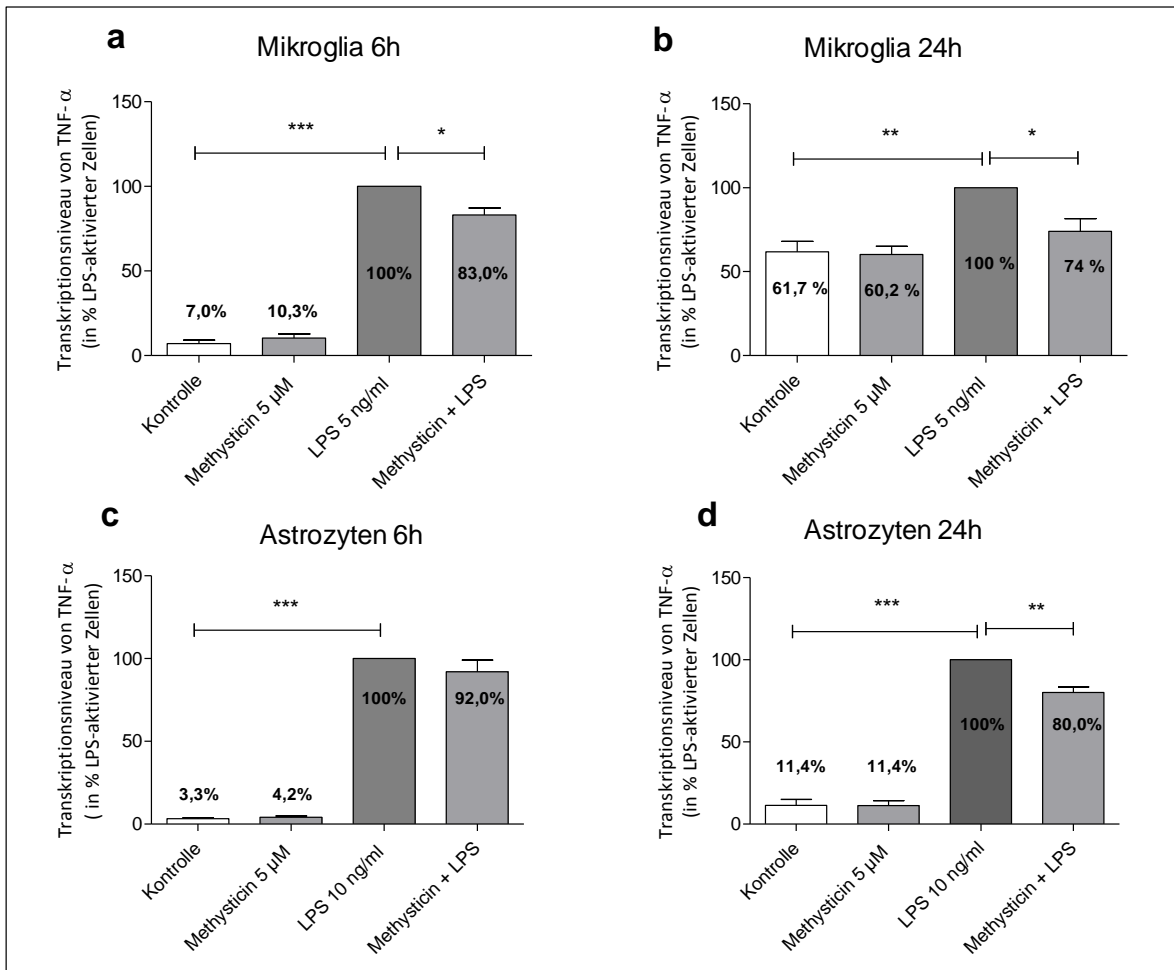


Abb. 3.18: Einfluss von Methysticin auf die TNF- α -mRNA von Mikroglia und Astrozyten. Methysticin (5 μ M) reduzierte signifikant die Menge der TNF- α -mRNA in LPS-aktivierter (5 ng/ml) Mikroglia nach sechs Stunden von 100% auf 83% und nach vierundzwanzig Stunden von 100% auf 74%. In LPS-aktivierten (10 ng/ml) Astrozyten zeigte sich nach sechs Stunden eine Reduktion der TNF- α -mRNA-Synthese von 100% auf 92%, nach vierundzwanzig Stunden zeigte sich eine signifikante Reduktion von 100% auf 80%. (Daten sind dargestellt als Mittelwert + SEM, n = 3(a+d), n = 4(b), n = 7(c), * = p < 0,05; ** = p < 0,05; *** = p < 0,001).

3.4.15 Einfluss von Yangonin auf die TNF- α -mRNA -Synthese in Mikroglia und Astrozyten

In LPS-aktivierter Mikroglia zeigte sich nach einer sechs-stündigen Koinkubation mit Yangonin eine signifikante Herabregulation der TNF- α -mRNA-Synthese im Vergleich zu einer alleinigen Stimulation mit LPS, nach einer vierundzwanzig-stündigen Stimulation zeigte sich eine deutliche Reduktion der TNF- α -mRNA-Synthese. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle hatte eine Einzelstimulation mit Methysticin bei sechs-stündiger Inkubation keinen Einfluss auf die Synthese der TNF- α -mRNA in Mikroglia, nach vierundzwanzig-stündiger Inkubation zeigte die alleinige Stimulation mit Yangonin gegenüber der unstimulierten Kontrolle eine Erhöhung der TNF- α -mRNA-Synthese. In aktivierten Astrozyten zeigte sich eine deutliche Reduktion der TNF- α -mRNA nach sechs Stunden, nach vierundzwanzig Stunden zeigte sich eine signifikante Reduktion (Abb. 3.19).

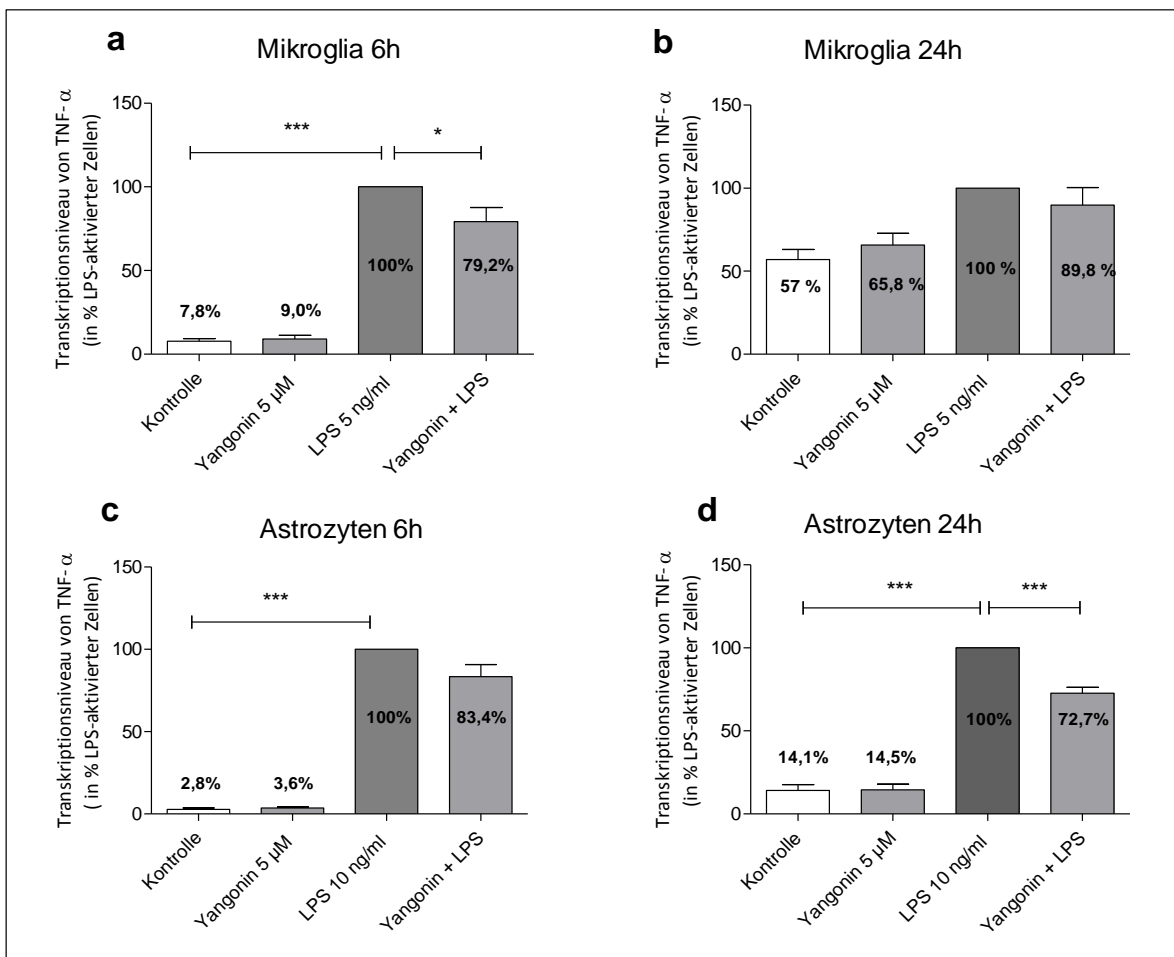


Abb. 3.19: Einfluss von Yangonin auf die TNF- α -mRNA von Mikroglia und Astrozyten. Yangonin (5 μ M) reduzierte signifikant die Menge der TNF- α -mRNA in LPS-aktivierter (5 ng/ml) Mikroglia nach sechs Stunden von 100% auf 79,2%, nach vierundzwanzig Stunden zeigte sich eine Reduktion von 100% auf 89,8%. In LPS-aktivierten (10 ng/ml) Astrozyten zeigte sich nach sechs Stunden eine Reduktion der TNF- α -mRNA-Synthese von 100% auf 83,4%, nach vierundzwanzig Stunden zeigte sich eine signifikante Reduktion von 100% auf 72,7%. (Daten sind dargestellt als Mittelwert + SEM, n = 3(a,d), n = 4(b), n = 7(c), * = p < 0,05; *** = p < 0,001).

3.4.16 Einfluss einer Koinkubation von Kavain, Methysticin und Yangonin gemeinsam auf die TNF- α -mRNA -Synthese in Mikroglia und Astrozyten

In LPS-aktivierter Mikroglia zeigte sich nach einer sechs- und einer vierundzwanzig-stündigen Koinkubation mit den Kavalaktonen Kavain, Methysticin und Yangonin (KMY) eine signifikante Reduktion der TNF- α -mRNA-Synthese im Vergleich zu einer alleinigen Stimulation mit LPS. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle hatte eine Stimulation mit Kavain, Methysticin und Yangonin nach sechs-stündiger Inkubation keinen Einfluss auf die Synthese der TNF- α -mRNA in Mikroglia, nach vierundzwanzig-stündiger Inkubation fand sich eine deutliche Erhöhung gegenüber der unstimulierten Kontrolle. In aktivierten Astrozyten zeigte sich keine Änderung der iNOS-mRNA nach sechs und nach vierundzwanzig Stunden (Abb. 3.20).

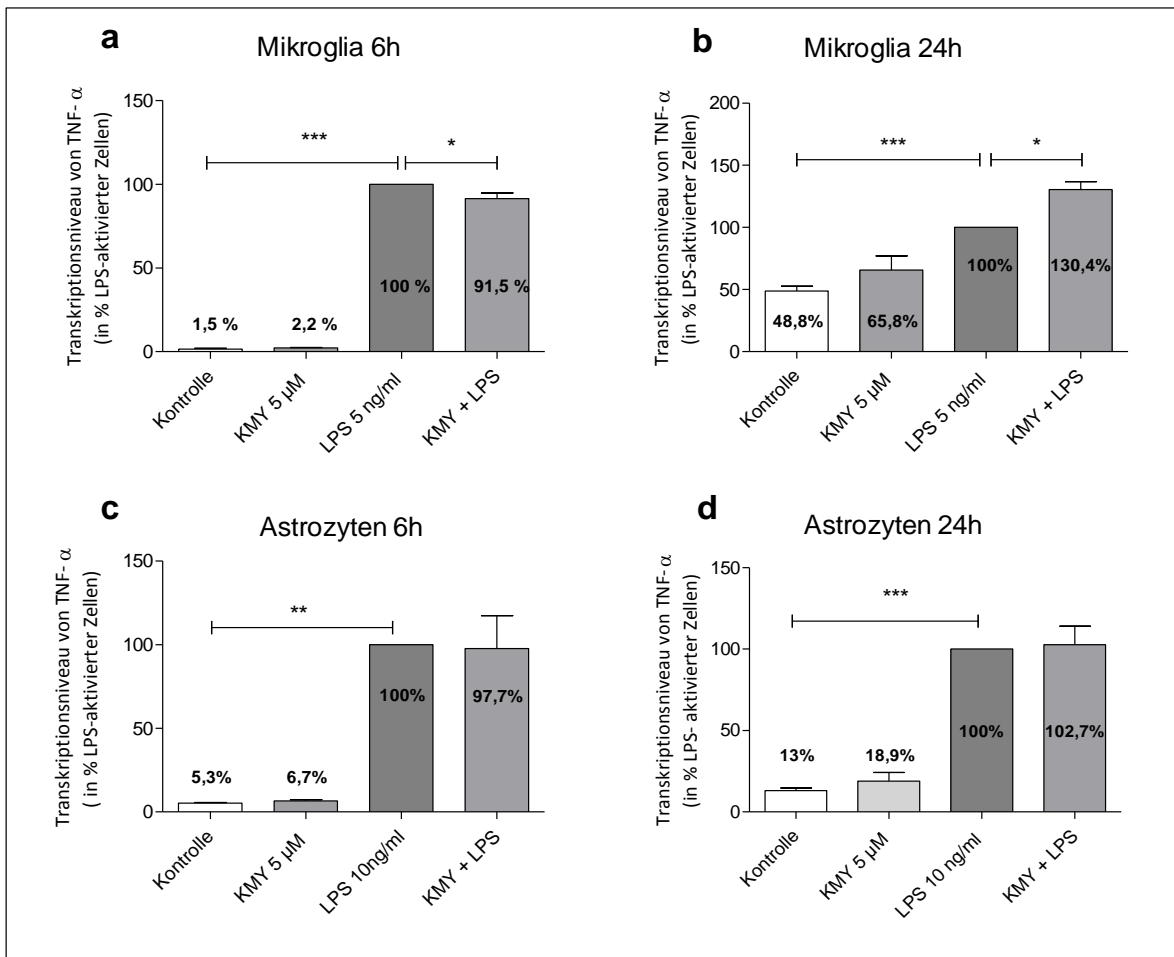


Abb. 3.20: Einfluss einer Koinkubation von Kavain, Methysticin und Yangonin auf die TNF- α -mRNA von Mikroglia und Astrozyten. Eine Koinkubation mit Kavain, Methysticin und Yangonin (KMY, je 5 μ M) reduzierte signifikant die Menge der TNF- α -mRNA in LPS-aktivierter (5 ng/ml) Mikroglia nach sechs Stunden von 100% auf 91,5%, nach vierundzwanzig fand dagegen sich eine signifikante Erhöhung von 100% auf 130,4%. In LPS-aktivierten (10 ng/ml) Astrozyten zeigte sich keine Veränderung der TNF- α -mRNA-Synthese nach sechs und nach vierundzwanzig Stunden. (Daten sind dargestellt als Mittelwert + SEM, n = 3(b+c), n = 5(a), * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).

3.4.17 Zusammenfassende Darstellung der mRNA-Untersuchungen

Die folgenden zwei Tabellen zeigen eine vergleichende Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Abbildungen 3.5 bis 3.20.

Tab. 3.1: Zusammenfassung der qPCR-Ergebnisse (Abb. 3.5. - 3.20) in Mikroglia. (▲ = Erhöhung > 5%; ▼ = Senkung > 5%; - = Abweichung < 5%; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001]

Mikroglia								
Ansatz	iNOS		IL-6		IL-1 β		TNF- α	
	6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h
LPS vs. Kavain+LPS	▼ **	▼ ***	▼ **	▼ ***	▼ *	▼ ***	▼ *	▼ *
LPS vs. Methisticin+LPS	▼ *	▼ ***	▼ *	▼ **	▼ *	▼ *	▼ *	▼ *
LPS vs. Yangonin+LPS	▼ **	▲ *	▼ *	▼ **	▼ ***	▼ ***	▼ *	▼
LPS vs. KMY+LPS	▲ *	▼ ***	▼ ***	▼ ***	▼ *	▼	▼ *	▲ *

Tab. 3.2: Zusammenfassung der qPCR-Ergebnisse (Abb. 3.5. - 3.20) in Astrozyten. (▲ = Erhöhung > 5%; ▼ = Senkung > 5%; - = Abweichung < 5%; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001)

Astrozyten								
Ansatz	iNOS		IL-6		IL-1 β		TNF- α	
	6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h
LPS vs. Kavain+LPS	▼	-	-	-	▼	-	▼ **	-
LPS vs. Methisticin+LPS	▼	▼		▼ **	▼	▼ *	▼	▼ **
LPS vs. Yangonin+LPS	▲	▲	▲ **	▲ *	▼ ***	▼ ***	▼	▼ ***
LPS vs. KMY+LPS	▼	▲	-	▼	-	▼ ***	-	-

3.5 Einfluss der Kavalaktone Kavain, Methysticin und Yangonin auf die Proteinsynthese proinflammatorischer Mediatoren in Mikroglia

3.5.1 Einfluss der Kavalaktone Kavain, Methysticin und Yangonin auf die Proteinsynthese von IL-6 in Mikroglia

In LPS-aktivierter Mikroglia zeigte sich nach einer vierundzwanzig-stündigen Koinkubation mit Kavain oder Yangonin eine erniedrigte Menge von IL-6 im Vergleich zu einer alleinigen Stimulation mit LPS. Eine vierundzwanzigstündige Koinkubation mit Methysticin reduzierte die Menge von IL-6 signifikant. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle hatte eine Einzelstimulation mit Kavain, Methysticin oder Yangonin keinen Einfluss auf die Menge des IL-6 in Mikroglia.

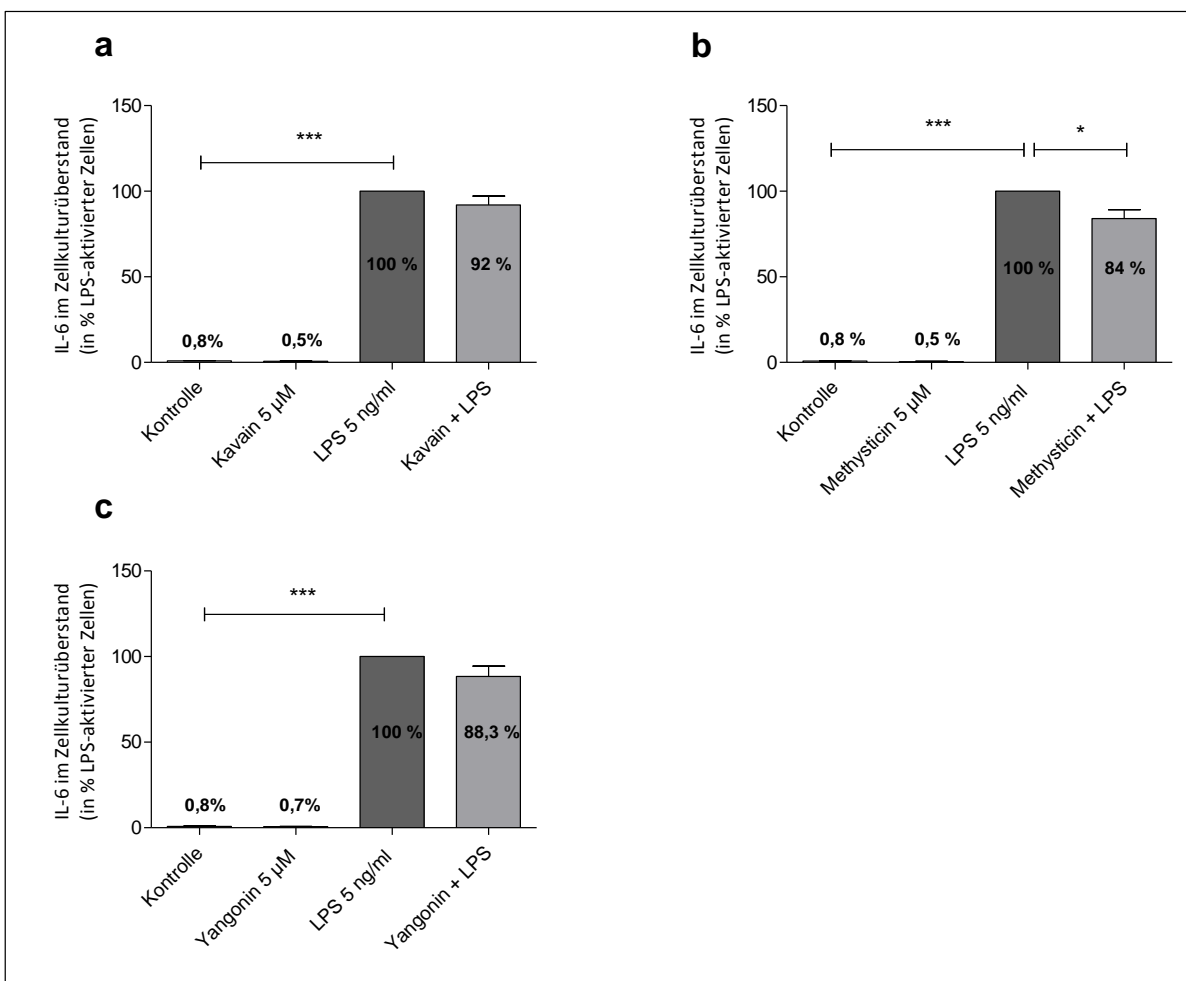


Abb. 3.21: Einfluss von Kavain, Methysticin und Yangonin auf die Proteinsynthese von IL-6 in Mikroglia. Kavain (5µM) reduzierte die Menge des von LPS-aktivierter (5 ng/ml) Mikroglia in den Zellkulturüberstand freigesetzten IL-6 nach vierundzwanzig Stunden von 100% auf 92%, Methysticin reduzierte die Freisetzung von IL-6 signifikant von 100% auf 84%. Yangonin reduzierte die Freisetzung von IL-6 von 100% auf 88,3%. (Daten sind dargestellt als Mittelwert + SEM, n = 3, * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).

3.5.2 Einfluss der Kavalaktone Kavain, Methysticin und Yangonin auf die Proteinsynthese von TNF- α in Mikroglia

In LPS-aktivierter Mikroglia zeigte sich nach einer vierundzwanzigstündigen Koinkubation mit Kavain oder Methysticin eine signifikant erniedrigte Menge von TNF- α im Vergleich zu einer alleinigen Stimulation mit LPS. Eine vierundzwanzigstündige Koinkubation mit Yangonin reduzierte die Menge von TNF- α signifikant. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle hatte eine Einzelstimulation mit Kavain, Methysticin oder Yangonin keinen Einfluss auf die Menge des synthetisierten TNF- α in Mikroglia.

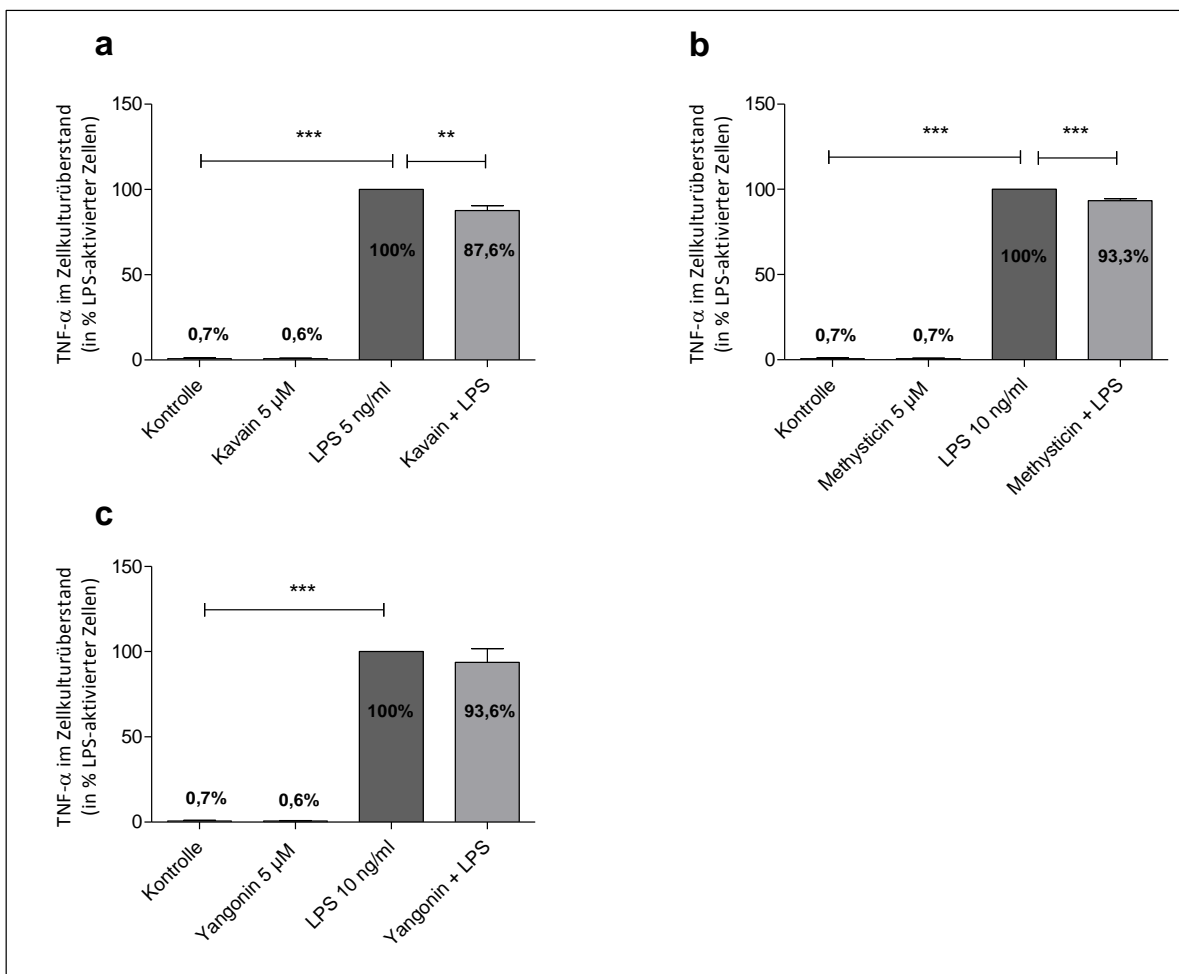


Abb. 3.22: Einfluss von Kavain, Methysticin und Yangonin auf die Proteinsynthese von TNF- α in Mikroglia. Kavain (5 μ M) reduzierte signifikant des von LPS-aktivierter (5ng/ml) Mikroglia in den Zellkulturüberstand freigesetzten TNF- α nach vierundzwanzig Stunden von 100% auf 87,6%, Methysticin reduzierte die Freisetzung signifikant von 100% auf 93,3%. Yangonin reduzierte die Freisetzung von TNF- α von 100% auf 93,6%. (Daten sind dargestellt als Mittelwert + SEM, n = 3, ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).

3.6 Einfluss der Kavalaktone Kavain, Methysticin und Yangonin auf den ERK-Signalweg in Mikroglia

Der Einfluss von Kavain, Methysticin und Yangonin auf die intrazelluläre Signalübertragung via Aktivierung von ERK1/2 in LPS-aktivierter Mikroglia wurde mittels Western Blot analysiert. ERK1/2 aus der Familie der MAP-Kinasen stellt einen wichtigen Baustein in der Übertragung extrazellulärer Signale auf die Zelle hinsichtlich Proliferation, Differenzierung und entzündlicher Aktivierung dar. Nach einer signalbedingten Phosphorylierung wird das nun pERK genannte Protein in den Zellkern transportiert, wo es im folgenden bestimmte Transkriptionsfaktoren aktiviert, und damit die Genexpression verändert. Die repräsentative Abbildung 3.23 zeigt eine starke Aktivierung von pERK1/2 bei Stimulation mit LPS, bei Kostimulation mit Kavain und Methysticin kommt es bereits zu einer leichtgradigen Reduktion, bei Kostimulation mit Yangonin zu einer ausgeprägten Reduktion. Die Kontrolle zeigt eine relative hohe pERK-Aktivierung, nach Inkubation mit Kavain und Methysticin zeigt sich eine nur noch leichte pERK1/2-Aktivierung, nach Inkubation mit Yangonin eine sehr leichte Aktivierung. Die Kontrollbande ERK2 zeigt eine weitgehend homogene Verteilung (Abb. 3.23).

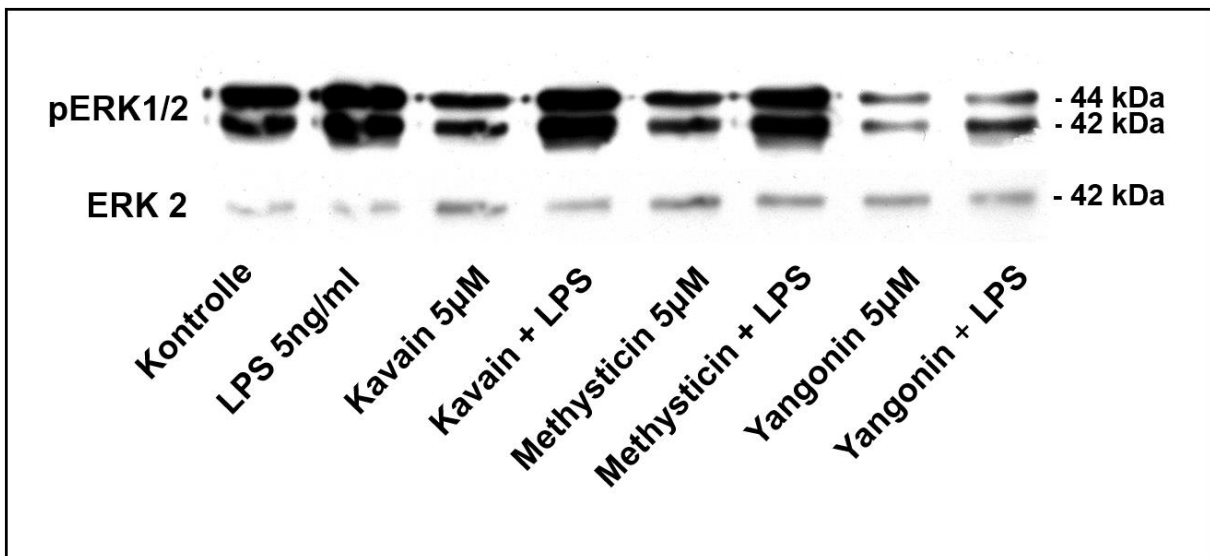


Abb. 3.23: Einfluss von Kavain, Methysticin und Yangonin auf die Menge von pERK1/2 und ERK2 in Mikroglia. (Inkubationsdauer fünfzehn Minuten) In LPS-aktivierter Mikroglia zeigte sich keine deutliche Veränderung der pERK1/2-Menge im Vergleich zu einer alleinigen Stimulation mit LPS nach einer fünfzehnminütigen Koinkubation mit Kavain oder Methysticin. Eine Stimulation mit Yangonin zeigte eine ausgeprägte Reduktion der pERK1/2-Menge. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zeigte sich bei einer Einzelstimulation mit Kavain, Methysticin und Yangonin eine erniedrigte Menge von pERK1/2. Die Ladekontrolle des unphosphorylierten ERK 2 zeigt eine weitgehend homogene Beschickung der Spuren. Die Auswertung erfolgte auch densitometrisch, siehe Abb. 3.24.

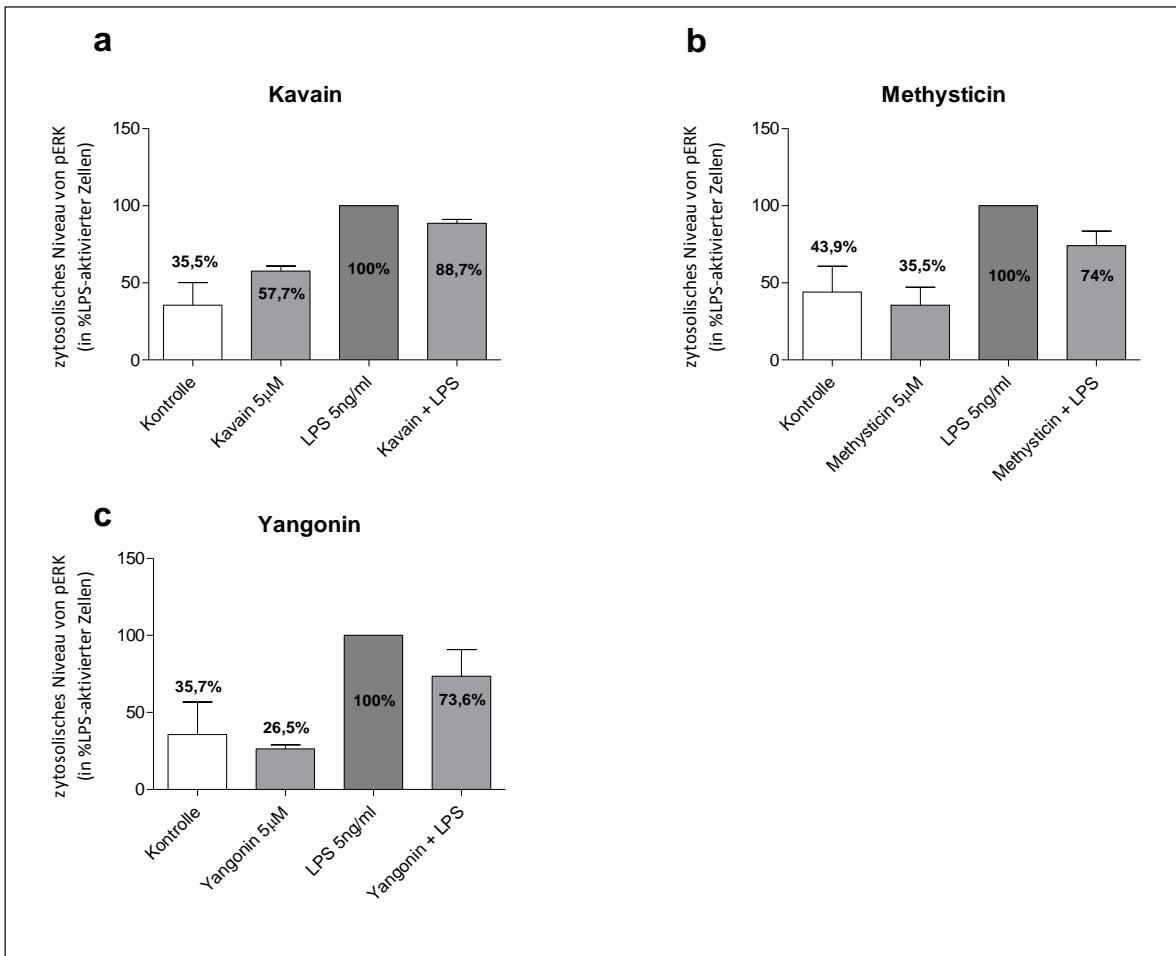


Abb. 3.24: Densitometrische Auswertung des Einflusses von Kavain, Methysticin und Yangonin auf die Menge von pERK1/2 in Mikroglia. Kavain (5 μM) reduzierte die Menge von pERK1/2 in LPS-aktivierter (5 ng/ml) Mikroglia nach fünfzehn Minuten von 100% auf 88,7%, Methysticin reduzierte die Menge von pERK1/2 von 100% auf 74%, Yangonin von 100% auf 73,6%. (Daten sind dargestellt als Mittelwert + SEM, n = 3)

4. Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Dissertation im Kontext des aktuellen Wissensstandes und im Hinblick auf eine mögliche medizinische Relevanz diskutiert.

4.1 Toxizität der Kavalaktone

Zunächst wurden Experimente zur Untersuchung der Toxizität von Kavain, Methysticin und Yangonin gegenüber Mikroglia durchgeführt. Hierbei wurden *in vitro* keine zytotoxischen Wirkungen von Kavain, Methysticin und Yangonin auf Mikroglia in der Konzentration von 5 μ M und auf Astrozyten in der Konzentration von 10 μ M festgestellt. Vielmehr konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich Kavalaktone in einer moderaten und realistischen Dosierung potenziell günstig auf eine Dämpfung der inflammatorische Aktivität von Mikroglia auswirken. Die australische Forschergruppe um Iqbal Ramzan veröffentlichte dagegen kürzlich Hinweise darauf, dass Kavalaktone über die Beeinflussung von Lebermakrophagen zur Apoptose von Hepatozyten beitragen können (Zhang *et al.*, 2012). Sie führten dazu *in vivo*-Versuche an ausgewachsenen männlichen Ratten vom Stamm Sprague-Dawley durch und beurteilten anschließend elektronenmikroskopisch die zellmorphologischen Veränderungen. Dabei setzten sie eine Kavalaktonkonzentration von 43,4 μ M ein, eine Dosis, die mehr als achtmal so hoch war, wie die, welche für die Experimente dieser Arbeit verwendet wurde. Zum Vergleich: Ein 75kg schwerer Mensch, der die international empfohlene Tageshöchstdosis von 250 mg Kavalaktonäquivalent zu sich nimmt, wird bei idealer, d.h. sofortiger und totaler Verteilung höchstens eine Konzentration von etwa 14 μ M Gesamtkavalakton in seinem Körper aufbauen. Zum Thema der Toxizität, insbesondere auf Hepatozyten, herrschte bis zuletzt eine lebhaftete Kontroverse, denn in der Tradition der Kavakultur mit einer wassergebundenen Darreichungsform ist eine Lebertoxizität der Kavalaktone nicht explizit beschrieben (Tang *et al.*, 2011, Teschke *et al.*, 2011, Lasmé *et al.*, 2008). Möglicherweise gehen die toxischen Nebenwirkungen einiger Kavaprodukte vom insbesondere im Stamm der Pflanze enthaltenen Pipermethystin aus, welches in den Wurzeln nur in sehr geringer Konzentration zu finden ist (Lim *et al.*, 2007, Nerurkar *et al.*, 2004). Es wurde in diesem Zusammenhang beschrieben, dass im Zuge der großen Nachfrage nach Kavarohtmaterial Ende der neunziger Jahre nicht nur Wurzelbestandteile, sondern auch überirdische Pflanzenteile wie Stamm und Blätter zur Herstellung von Kavaprodukten verwendet wurden (Dragull *et al.*, 2003).

4.2 Kavalaktone und Mikroglia

Wie beeinflussen Kavalaktone Mikroglia? Welche Rezeptoren kommen in Betracht?

Zunächst einmal ist es angesichts der hohen Lipophilie und des relativ geringen Molekulargewichts der Kavalaktone durchaus denkbar, dass Kavalaktone ihre Wirkung primär intrazellulär entfalten. Diesbezüglich existieren jedoch keine gesicherten Erkenntnisse.

Kavain, Methysticin und in zehnfach geringer Potenz auch Yangonin verstärken die Bindung des antagonistisch wirkenden Bicucullin am ionotropen **GABA-A-Rezeptor**, während die Bindung von Flunitrazepam unverändert bleibt (Boonen und Haberlein, 1998). Bicucullin wird u.a. zur Auslösung von epileptischen Anfällen im Tiermodell verwendet (Johnston 2013). Ein Kavaextrakt erhöhte die Bindung des GABA-Agonisten Muscimol am GABA-A-Rezeptor (Jussofie *et al.*, 1994). Mikroglia exprimieren GABA-B-Rezeptoren (Kuhn *et al.*, 2004), Clonazepam, Midazolam und Diazepam vermindern die iNOS- und TNF- α -Expression sowie die Proliferation LPS-aktivierter Mikroglia in vitro (Wilms *et al.*, 2003). Ob Kavalaktone über einen GABA-ergen, nicht GABA-B-Rezeptor-gebunden Weg antiinflammatorische Effekte auf Mikroglia ausüben, ist unklar.

Mikroglia exprimieren die spannungsabhängigen **Natriumkanäle** Nav1.1, Nav1.5 und Nav 1.6, wobei die Expression von Nav 1.6 in Zellkulturen über die der anderen beiden Kanäle dominiert (Black und Waxman, 2011). Nav 1.6 in Mikroglia sind im MS-Mausmodell der experimentellen autoimmunen Enzephalitis-(EAE) heraufreguliert, eine Blockade mit Phenytoin reduziert sowohl die Mikrogliaaktivität als auch die Klinik der Versuchstiere deutlich (Craner *et al.*, 2005). Phenytoin reduziert die LPS-induzierte mikrogliale Produktion von IL-1 β und TNF- α um 50-60%, während die Produktion von IL-6 unverändert blieb (Black *et al.*, 2009). Kavain und Methysticin inhibieren spannungsabhängige Natriumkanäle (Magura *et al.*, 1997, Gleitz *et al.*, 1996a), Kavain vermindert unter anoxischen Bedingungen ATP-Depletion und exzessiven Calciumeinstrom (Gleitz *et al.*, 1996b). In der Zusammenschau erklären diese Ergebnisse möglicherweise die neuroprotektive Wirkung von Kavalaktonen in Ischamiemodellen. Bereits 1991 hatten Backhauss und Kriegelstein Methysticin und einem aus mehreren Kavalaktonen bestehenden Kavaextrakt die Fähigkeit zur Reduzierung der Infarktgröße in Nagetieren in einem klassischen Ischämiemodell nachgewiesen (Backhauss und Kriegelstein 1991). Sie vermuteten als Mechanismus eine durch Kavalaktonwirkung verminderte neuronale Hypererexzitation. Mittlerweile ist es anerkannt, dass komplexe postischämische Entzündungsreaktionen die Infarktgröße und das Ausmaß der neuronalen Schädigung erhöhen (Shrivastava *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2006, Conolly *et al.*, 1996). Möglicherweise trägt die Natriumkanalhemmung zur antiinflammatorischen und neuroprotektiven Wirkung der Kavalaktone bei.

Eine pharmakologische Blockade von L-Typ **Kalziumkanälen** reduziert die durch IFN- γ induzierte Neurotoxizität von Mikroglia und Astrozyten in vitro (Hashioka *et al.*, 2012). Kavain hemmt die durch muskarinerge Rezeptoren und spannungsabhängige Kalziumkanäle vermittelte Kontraktion glatter Muskelzellen (Martin *et al.*, 2000). Es wurde ein indirekter Effekt

von Kavain und Dihydromethysticin auf neuronale Kalziumkanäle vermutet, die zugrunde liegenden Mechanismen sind aber unklar (Walden *et al.*, 1997). Ob und inwieweit sich diese Ergebnisse auf Mikroglia und Astrozyten übertragen lassen, ist noch nicht geklärt.

Die **Cannabinoidrezeptoren CB-1** und **CB-2** sind 7-transmembranäre G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) (Rom und Persidsky, 2013). CB-1 und CB-2 vermitteln ihre Wirkung via MAP-K, p-38-MAP-K und JNK (Howlett, 2005). CB-2 kann eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) (Shoemaker *et al.*, 2005) und kleiner G-Proteine bewirken (Kurihara *et al.*, 2006). CB-2 wird u.a. von Mikroglia und möglicherweise auch von Astrozyten exprimiert (Carlisle *et al.*, 2002, Molina-Halgado *et al.*, 1998). CB-2 werden klassischerweise antiinflammatorische und immunmodulierende Eigenschaften zugeschrieben, weiter ist eine Involvierung u.a. in Embryonalentwicklung und Knochenstoffwechsel nachgewiesen (Buckley, 2008, Miller und Stella, 2008). CB-2 Agonisten können die LPS-induzierte Expression von IL-1 β und TNF- α in Monozyten vermindern (Gertsch, 2008).

CB-1 kommt in voller Länge und in zwei Spleißvarianten vor (Xiao *et al.*, 2008). Die CB-1-Aminosäuresequenzen von Mensch und Nagetieren überschneiden sich zu etwa 94%. Die Aufteilung in CB-1 und CB-2 scheint phylogenetisch mit der Entwicklung der adaptiven Immunität zu korrelieren, wobei CB-2 der evolutionär jüngere und weniger konservierte Rezeptor ist (Anday und Mercier, 2005). CB-1 bewirkt neben der oben beschriebenen Signaltransduktion über MAP-K, p-38-MAP-K und JNK eine Aktivierung einwärtsgerichteter Kaliumkanäle und eine Inhibition spannungsabhängiger Calciumkanäle (Mackie *et al.*, 1995). CB-1 kann auch an stimulierende G-Proteine binden (Chen *et al.*, 2010, Abadji *et al.*, 1999). Der Cannabinoidrezeptor 1 wird im ZNS von glutamatergen, GABA-ergen und dopaminergen Neuronen (Kim *et al.*, 2005), Astrozyten (Bouabala *et al.*, 1995), Mikroglia (Walter *et al.*, 2003) und Oligodendrozyten (Molina-Halgado *et al.*, 2002) exprimiert. In der Immunperipherie wird CB-1 u.a. von Lymphozyten exprimiert (Kaminski *et al.*, 1992). Cannabinoidrezeptorliganden werden aufgrund ihrer Herkunft als endogen, pflanzlich oder synthetisch und aufgrund ihrer Struktur als klassisch, nicht-klassisch, endogen oder als Aminalkyndol eingeteilt (Kaplan, 2013, Sarfaraz *et al.*, 2008). Cannabinodrezeptordefiziente Mäuse zeigen eine verstärkte T-zelluläre Immunantwort gegen Influenzaviren, welche teilweise auf eine verstärkte Antigenpräsentation über MHC I+II, insbesondere unter Stimulation mit LPS, zurückzuführen ist (Karmaus 2011). Die unselektiven Cannabinoidrezeptoragonisten WIN55,212-2 und HU210 bewiesen im MPTP-Parkinson-Mausmodell eine neuroprotektive Wirkung, welche Mikroglia- und CB-1-abhängig war (Chung *et al.*, 2011). Im einem viral induzierten EAE-Mausmodell bewirkte der CB-1-selektive endogene Agonist Arachidonyl-2-Chlorethylamid (ACEA) eine langdauernde klinische Verbesserung, verringerte Mikrogliaaktivierung und MHCII-Expression

(Arevalo-Martin *et al.*, 2003). Im durch Myelin Oligodendrozyten Glycoprotein (MOG) induzierten EAE-Mausmodell reduziert WIN55,212-2 CB-1-abhängig die erhöhte Expression von iNOS und TNF- α in Hirnstamm und Rückenmark (de Lago *et al.*, 2012).

In einer vorläufigen Strukturaktivitätsbeziehungsanalyse von Ligresti *et al.* zeigte von den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kavalaktonen nur Yangonin eine Cannabinoidrezeptoraffinität mit einer CB-1-Selektivität ($K_i=0,72\mu\text{M}$) gegenüber CB-2 ($K_i=10\mu\text{M}$) (Ligresti *et al.*, 2012). Mikroglia exprimieren mehr CB-2 als CB-1 (Rock *et al.*, 2007). In der Zusammenschau lässt sich ableiten, dass die Wirkung von Yangonin auf Mikroglia zumindest teilweise über CB-1 und CB-2 vermittelt sein kann und dass Kavain und Methysticin diese Fähigkeit wahrscheinlich nicht besitzen. Dies kann den in der vorliegenden Arbeit dargestellten Wirkunterschied zwischen dem Dienolidpyron Yangonin und den Enolidpyronen Kavain und Methysticin auf LPS-aktivierte Mikroglia erklären, bereits Werny und Hänsel hatten den qualitativen Wirkunterschied von Yangonin gegenüber Kavain und Methysticin auf die ungesättigten C-Atome 5 und 6 im Laktoneering der Enolidpyrone zurückgeführt (Werny und Hänsel, 1963). Klohs *et al.* haben eine geringere biologische Aktivität der Kavalaktone des Yangonintyps gegenüber denen des Kavaintyps postuliert (Klohs *et al.*, 1979).

4.3 Einfluss von Yangonin auf Mikroglia und Astrozyten

In der vorliegenden Arbeit zeigte Yangonin bei Koinkubation LPS-aktiverter Mikroglia und Astrozyten eine signifikante Reduktion der IL-1 β -mRNA nach sechs Stunden, um 41% in Mikroglia und um 23% in Astrozyten, und nach vierundzwanzig Stunden, um 25,5% in Mikroglia und um 26,2% in Astrozyten. IL-1 β ist ein hochpotentes Zytokin und eine molekulare Schlüsselstelle systemischer und zellulärer Entzündungsvorgänge (Dinarello 2010). Die therapeutische Blockade von IL-1 durch den Interleukin-1-Rezeptorantagonisten Anakinra, den löslichen IL-1-Rezeptor Rilonacept oder den IL-1-Rezeptorantikörper Canakinumab wird erfolgreich zur Behandlung von Gicht, Morbus Behcet, Morbus Still des Erwachsenenalters, Spondylarthropathie, dem familiärem Mittelmeerfieber und zahlreicher seltenerer autoinflammatorischer Syndrome mit Defekten in IL-1-assoziierten Signalwegen eingesetzt (Moll und Kuemmerle-Deuschner, 2013). Auch im Rahmen der komplexen multifaktoriellen Erkrankung Diabetes Mellitus Typ II (Larsen *et al.*, 2007) und systolischer Herzinsuffizienz (Abbate *et al.*, 2013) scheinen IL-1-Antagonisten einen positiven Effekt zu haben. Weiter reduzierte eine Koninkubation mit Yangonin die IL-6-mRNA in Mikroglia nach sechs und nach vierundzwanzig Stunden, in Astrozyten fand sich hingegen an beiden Zeitpunkten eine signifikante Erhöhung der IL-6-mRNA. Zuletzt soll erwähnt werden, dass Yangonin die TNF- α -mRNA in Astrozyten nach vierundzwanzig Stunden signifikant senkte. Aus den letzten beiden Absätzen lässt sich die Vermutung ableiten, dass Yangonin in Mikroglia und Astrozyten Cannabinoidrezeptorabhängig IL-1 β reduzieren könnte.

4.4 Einfluss von Kavain und Methysticin auf Mikroglia und Astrozyten

Mittels qPCR konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals belegt werden, dass sowohl Kavain als auch Methysticin die Transkription der mRNA von iNOS, IL-6, IL-1 β und TNF- α in LPS-aktivierter Mikroglia signifikant und konsistent senken. Eine reduzierte Expression von IL-6 und TNF- α in LPS-aktivierter Mikroglia konnte per ELISA auch auf Proteinebene gezeigt werden. Ähnliche Ergebnisse liegen für die TNF- α -Sekretion LPS-aktivierter Zellen einer Monozytenleukämie-Zelllinie (THP-1) vor, hier zeigte sich Kavain als potenter Inhibitor, Methysticin zeigte eine geringere inhibierende Wirkung (Polastri *et al.*, 2009). Die Involvierung von IL-6, IL-1 β und TNF- α in neuroinflammatorischen Prozessen wurde in der Einleitung der vorliegenden Arbeit abgehandelt. Eine medikamentöse antiinflammatorische Therapie neurodegenerativer Erkrankungen ist vielversprechend und deren Entwicklung voller Rückschläge (Lyman *et al.*, 2014), die Komplexität der zugrundeliegenden Pathomechanismen ist außerordentlich herausfordernd. TNF- α -Antagonisten wie Etanercept, Infliximab, Adalimumab und Certolizumab werden heute erfolgreich zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis und Unterformen ebendieser, des Morbus Bechterew und des Morbus Crohn verwendet. Eine Vielzahl an weiteren Substanzen, welche gezielt mit TNF- α verwandten Molekülen interagieren, befinden sich für oben genannte und weitere, insbesondere neoplastische und peripher-entzündliche Krankheitsbilder in Zulassungsstudien (Croft *et al.*, 2013).

Dimethylfumarat (DMF) ist ein weiterer hoffnungsvoller Kandidat für die Behandlung neuroinflammatorischer glialer Aktivierung, im LPS-Rattenmodell reduzierte DMF die mikrogliale Produktion von IL-6, IL-1 β und in geringerem Umfang auch von TNF- α (Wilms *et al.*, 2010). DMF ist seit kurzem für Behandlung der schubförmig-remittierenden Multiplen Sklerose in den USA zugelassen und bewirkt eine vergleichsweise gute Schubreduktion bei vorteilhaftem Nebenwirkungsprofil. Der Effekt von DMF wird zumindest in Teilen über den Nrf2-induzierten ARE-Weg und die Inhibition von NF- κ B vermittelt (Fox *et al.*, 2013, Linker und Gold, 2013, Albrecht *et al.*, 2012).

Curcuminoide aus *Curcuma longa* besitzen antiinflammatorische, antioxidative und antimikrobielle Effekte, sie zeigen eine Aktivität gegen verschiedene zentralnervöse Erkrankungen, darunter AD, PD und MS (Villaflores *et al.*, 2012, Ringman *et al.*, 2005).

Resveratrol, ein den Kavalaktonen strukturell ähnliches Stilbenoid wurde 1939 in *Veratrum grandiflorum* entdeckt. Es befindet sich auch in Rotwein und wurde für dessen gesundheitsfördernde Wirkung verantwortlich gemacht (Siemann und Creasy, 1992). Es aktiviert ARE via Nrf2, inhibiert NF- κ B (Carizzo, 2013) und hemmt die LPS-induzierte Produktion von NO, IL-6 und TNF- α in Mikroglia und Astrozyten, sowie von IL-1 β in Mikroglia.

Dabei zeigt sich eine stärkere Wirkung auf Mikroglia als auf Astrozyten, und eine Beteiligung von ERK ist wahrscheinlich (Lu *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2010, Bi *et al.*, 2005).

4.5 Einfluss der Kombination von Kavain, Methysticin und Yangonin auf Mikroglia und Astrozyten

Die Kombination von Kavain, Methysticin und Yangonin verursachte die stärksten Veränderungen überhaupt, diese Effekte waren jedoch inkonsistenter als die durch Inkubation mit Kavain oder Methysticin hervorgerufenen. Insbesondere fand sich eine Reduktion der mikroglialen IL-6-mRNA nach sechs und vierundzwanzig Stunden um 33% und 41% und eine Reduktion der astrozytären IL-1 β -mRNA nach vierundzwanzig Stunden um 20,5%, letzteres möglicherweise als Yangonin-vermittelter Effekt. Weiter fand sich eine Reduktion der mikroglialen iNOS-mRNA nach vierundzwanzig Stunden um 34%. Eine synergistische Wirkung der Inhaltsstoffe von *Piper methysticum* wurde mehrfach beschrieben (Walden *et al.*, 1997, Singh, 2004), aber ob der Effekt durch die gemeinsame Wirkung der verschiedenen Kavalaktone oder gerade durch deren Interaktion mit den weiteren Inhaltsstoffen der Kavapflanze entsteht, ist unvollständig verstanden. Der Wurzelextrakt von *Piper methysticum* enthält diverse Inhaltsstoffe aus mehreren chemischen Stoffklassen, deren Gehalt zusätzlich in Abhängigkeit vom Kultivar und den Lebensbedingungen der Pflanze variiert. Es gibt 18 bekannte natürliche Kavalaktone, die sechs Hauptkavalaktone Kavain, Dihydrokavain, Methysticin, Dihydromethysticin, Yangonin und Desmethoxyyangonin machen etwa 95% des Lipidextrakts der Pflanze und etwa 9-12% des Trockengewichts der Wurzeln aus (Levesque, 1985). Es ist naheliegend, dass die kombinierte Applikation dieser Stoffe den Organismus im allgemeinen und Gliazellen im Speziellen auf andere Weise beeinflussen kann als die eine reine Koinkubation mit Kavain, Methysticin oder Yangonin. Weiterhin ist davon auszugehen, dass die Zusammensetzung der Stoffe maßgeblich durch die Extraktionsmethode beeinflusst wird, insbesondere steht hier die traditionelle Lösung eines Wurzelpulvers in kaltem Wasser der modernen Ethanol- und Acetonextraktion gegenüber (Shimoda *et al.*, 2012, Olsen *et al.*, 2011). Die Überprüfung der Effekte dieser Gesamtextrakte auf aktivierte Mikroglia und Astrozyten kann in diesem Zusammenhang vielversprechend sein. Im Extrakt von *Piper methysticum* finden sich die Alkaloide cinnamoyl- und m-methoxy-Cinnamoylpyrrolinidin (Aschenbach und Karl, 1970), Pipermethistin (Smith 1979), die Ketone Methylen-3,4-dioxy-cinnamylidid-Aceton und cinnamylidid-Aceton (Jossang und Molho, 1967), die Phytosterole Stigmasterol, Stigmastenol, β -sitosterol und Campesterol (Grazca und Ruff, 1986), organische Säuren (Aschenbach und Karl, 1971), aliphatische Alkohole (Grazca und Ruff, 1986) und die Flavonoide Flavokavain A, B und C (Dutta and Ray, 1973), welche ebenfalls antiinflammatorische, krebshemmende und antinozizeptive Eigenschaften aufweisen (Abu *et al.*, 2013).

4.6 Einfluss von Kavain, Methysticin und Yangonin auf die Stickoxidproduktion von Mikroglia

In der vorliegenden Arbeit zeigten die Kavalaktone Kavain, Methysticin und Yangonin keinen deutlichen Einfluss auf die NO-Produktion LPS-stimulierter Mikroglia nach 24 Stunden. Kavain zeigte keinen Effekt auf die tracheale NO-Produktion in Ratten, welche im Normalzustand wahrscheinlich über die konstitutiv exprimierten NO-Synthasen eNOS und nNOS und nicht durch die iNOS generiert wird (Ricciardiolo *et al.*, 2004, Martin *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit findet sich eine Diskrepanz zwischen der gleichbleibenden Menge des produzierten NO nach vierundzwanzig Stunden und der erniedrigten Transkription der iNOS nach sechs und nach vierundzwanzig Stunden. Dies könnte sich durch die vergleichsweise kurzfristige Regulation der iNOS erklären, deren zytosolische Halbwertszeit nur etwa zwei Stunden beträgt, im Vergleich beträgt die Halbwertszeit der konstitutiv exprimierten Stickoxidsynthase nNOS zwanzig Stunden und die der eNOS 28 Stunden (Fairchild *et al.*, 2001, Noguchi *et al.*, 2000). Die iNOS erzeugt nach Dimerisierung kalziumunabhängig große Mengen von NO (Kolodziejcki *et al.*, 2004). Kavain und Methysticin reduzierten in den in dieser Arbeit gezeigten Experimenten die Transkription der iNOS. Möglicherweise steigern die in dieser Arbeit verwendeten Kavalaktone zumindest vorübergehend die Aktivität dieses Enzyms, beispielsweise durch eine gesteigerte Effizienz der posttranskriptionellen Prozessierung der iNOS-mRNA, des Häm-Einbaus, der Bindung an Calmodulin oder der Dimerisierung der iNOS-Monomere. Verschiedene natürlich vorkommende Polyphenole, darunter die Flavonoide Quercetin, Daidzein, Biochanin-A und Epicatechin können Peroxynitrit einfangen, ihre Potenz diesbezüglich hängt im Wesentlichen von Konstellation der Hydroxylgruppen ab (Pavlovic und Santaniello, 2007), welche bei den Kavalaktonen an Position 10, 11 und 12 vorkommen.

Wir müssen davon ausgehen, dass es innerhalb der verwendeten Mikrogliapopulation eine Einteilung in funktionelle Subtypen gibt, während in der vorliegenden Arbeit wie auch in der großen Mehrzahl der Publikationen nur die Gesamtaktivität sehr vieler Zellen erfasst wurde (Hanisch, 2012). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass nur eine mikrogliale Subpopulation von etwa 30% bei neugeborenen und von bis zu 75% in jungen erwachsenen Ratten auf einen LPS-Stimulus hin TNF- α produzieren (Scheffel *et al.*, 2012).

4.7 Besonderheiten von Astrozyten

Astrozyten können pro- und antiinflammatorisch wirken, ihr Beitrag zur Pathogenese von PD ist nur wenig verstanden. Astrozyten reagieren zeitlich anders als Mikroglia auf chemische Noxen (Hirsch *et al.*, 2009). Die RNA-Untersuchungen per realtime-rt-PCR wurden in dieser Arbeit auch mit Astrozyten durchgeführt, die Konzentration des verwendeten LPS in den

Astrozyten betrug 10ng/ml, bei sämtlichen dargestellten Mikrogliaexperimenten wurden 5ng/ml verwendet. Die Ergebnisse der Experimente mit Astrozyten waren weniger eindeutig als die der Mikroglia, die gemessenen Veränderungen der Entzündungsmediatoren weniger stark, aber nicht minder interessant: Kavain vermochte hierbei die LPS-induzierte Erhöhung der RNA von iNOS, IL-1 β und TNF- α nur kurzfristig (sechs Stunden) zu senken, ansonsten verhielt es sich inert. Methysticin zeigte sich als konsistentester Inhibitor der untersuchten RNAs in Astrozyten. Yangonin hingegen rief eine Erhöhung der RNAs von iNOS und IL-6 hervor, erzeugte aber andererseits die stärksten Reduktionen von IL-1 β in Astrozyten, ein Effekt, der sich ganz ähnlich bereits bei den Mikrogliaversuchen gezeigt hatte. Astrozyten spielen eine wichtige Rolle bei zentralnervösen Entzündungsvorgängen (Darlington 2005), in Bezug auf Experimente mit Astrozytenkulturen muss jedoch immer eine gewisse Kontamination mit Mikroglia angenommen werden, welche erhebliche Verfälschungen hervorrufen kann (Saura, 2007). LPS-aktivierte Mikroglia hemmen die Astroglisereaktion und fördern die astrozytäre Transkription von IL-6 (Röhl *et al.*, 2007). In unserer Forschungsgruppe werden daher OX-42-Kontrollen durchgeführt, mit deren Hilfe der Mikrogliaanteil in den Astrozytenkulturen überprüft wird. Saura fasst weiter zusammen, dass Astrozyten zwar zweifelsohne iNOS exprimieren können, dies jedoch in einem sehr viel geringeren Umfang als Mikroglia. Die iNOS-Expression von Astrozyten kann allerdings unter bestimmten Bedingungen erhöht werden, insbesondere durch Stimulation mit LPS+IFN γ +TGF- β (Hamby *et al.*, 2006). Diese Einschränkung darf bei der Bewertung der in dieser Arbeit gezeigten astrozytären iNOS-realtime-Untersuchungen nicht vergessen werden. Diese waren nicht signifikant.

4.8 Einfluss von Kavalaktonen auf intrazelluläre Signalwege

Shaik *et al.* konnten nachweisen, dass Methysticin ein potenter NF- κ B-Inhibitor ist (Shaik *et al.*, 2009). Kavain, Methysticin und Yangonin inhibieren die Bindung von NF- κ B an die DNA (Folmer *et al.*, 2006). In Übereinstimmung konnte in der vorliegenden Arbeit mittels Western Blot eine Hemmung der stromaufwärts liegenden Phosphorylierung von ERK durch Kavain, Methysticin und Yangonin im Rahmen des MAP-Kinase-Signalweges gezeigt werden. Wahrscheinlich ist eine Hemmung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B via ERK zumindest für einen Teil der Veränderungen in der Transkription von iNOS, IL-6, IL-1 β und TNF- α in den vorangegangenen Experimenten verantwortlich. Die Inhibition von MAP-Kinasen und der konsekutiven Aktivierung von NF- κ B zeigte einen neuroprotektiven Effekt *in vitro* und *in vivo* (Wilms *et al.*, 2009).

4.9 Translationeller Ansatz - Klinische Relevanz von Kavalaktonen

Es ist offensichtlich, dass die Inkubation von selektierten Zellpopulationen mit isolierten und gereinigten LPS eine stark simplifizierte Modell der hochkomplexen Entzündungsreaktionen im menschlichen ZNS darstellt. Im Tierversuch erfolgreiche Substanzen scheitern in der Mehrzahl auf dem Weg zur gezielten klinischen Anwendung im Menschen. Doch so abwegig ist der Gedanke im Fall der Kavalaktone nicht, denn eine große Anzahl Menschen erfreut sich traditionell und regelmäßig des Genusses von Kavazubereitungen und im Hinblick auf pharmazeutische Eigenschaften wie Zellpermeabilität, Plasmaproteinbindung und chemischer Stabilität erwies sich Kavain als vielversprechend (Polastri *et al.*, 2009). Insofern ist das translationelle Potential der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Grundlagenexperimente nicht zu vernachlässigen. Es besteht theoretisch jederzeit die Möglichkeit, klinische Studien an Konsumenten und epidemiologische Studien in Regionen, in denen traditionell Kava konsumiert wird, durchzuführen und es kann sehr aufschlussreich sein, Liquorproben von regelmäßigen Kavakonsumenten auf die in dieser Arbeit untersuchten Entzündungsmediatoren zu untersuchen und die Morbidität dieser Kohorte hinsichtlich neurodegenerativer Erkrankungen, aber auch Schlaganfällen und deren Outcome, prospektiv zu erfassen.

5. Zusammenfassung

Chronische Neuroinflammation, eine chronische exzessive Aktivierung der Zellen des angeborenen Immunsystems im ZNS, trägt zum Fortschreiten bedeutender neurodegenerativer Krankheiten wie PD und AD bei. Innerhalb der hochkomplexen und bisher unvollständig verstandenen molekularen Abläufe scheinen Mikroglia eine zentrale Rolle einzunehmen. Dies begründet die Suche nach Substanzen, die dämpfend auf die inflammatorische Aktivität von Gliazellen und in der Folge protektiv auf Neuronen wirken. Kavalaktone sind Inhaltsstoffe von *Piper methysticum*, einer Pflanze die in Teilen Ozeaniens kultiviert, und deren Wurzeln dort rituell und traditionell als Wasseremulsion konsumiert werden. Kavalaktone wirken anxiolytisch, sedativ, muskelrelaxierend, antikonvulsiv, neuroprotektiv, entzündungshemmend, fungizid und antikanzerogen. Es gibt sechs mengenmäßige Hauptkomponenten im Extrakt der Pflanze, darunter Kavain, Methysticin und Yangonin. Die Wirkung der Kavalaktone auf den menschlichen Organismus ist bisher unzureichend erforscht, in dieser Arbeit wurde der Effekt der Kavalaktone auf ein in-vitro-Modell von Neuroinflammation untersucht. Dabei wurden Mikroglia- und Astrogliazellen neugeborener Ratten mit LPS aktiviert und wahlweise mit o.g. Kavalaktonen koinkubiert. Es resultierte eine signifikant verminderte Transkription von iNOS, IL-6, IL-1 β und TNF- α in Mikroglia, die zusätzlich mit Kavain oder Methysticin behandelt worden waren. Yangonin bewirkte eine hochsignifikante Reduktion der IL-1 β -RNA. Veränderungen der Expression von IL-6 und TNF- α und der Produktion von NO wiesen in dieselbe Richtung. Seit dem Ende der neunziger Jahre wird die Sicherheit der Kavalaktone kontrovers diskutiert, in der vorliegenden Arbeit zeigten Kavain, Methysticin und Yangonin keine toxische Wirkung auf Mikroglia und Astrozyten, wobei in den zugrunde liegenden Experimenten eine Konzentration gewählt wurde, die an eine hohe therapeutische Dosierung angelehnt ist. Weiterhin konnte eine Beeinflussung der intrazellulären MAP-Kinase-Signalkaskade durch Kavain, Methysticin und Yangonin nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen das antiinflammatorische und dadurch mögliche neuroprotektive Potential der Kavalaktone Kavain und Methysticin und empfehlen die Untersuchung eines komplexen Kavaextrakts auf ebendiese Effekte.

6. Literaturverzeichnis

Abadji v, Lucas-Lenard JM, Chin C, Kendall DA (1999) Involvement of the carboxyl terminus of the third intracellular loop of the cannabinoid CB1 receptor in constitutive activation of Gs. *J Neurochem.* 72(5):2032-8.

Abbate A, Van Tassell BW, Biondi-Zoccai G, Kontos MC, Grizzard JD, Spillman DW, Oddi C, Roberts CS, Melchior RD, Mueller GH, Abouzaki NA, Rengel LR, Varma A, Gambill ML, Falcao RA, Voelkel NF, Dinarello CA, Vetrovec GW (2013) Effects of interleukin-1 blockade with anakinra on adverse cardiac remodelling and heart failure after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 111(10):1394-400.

Abu N, HoWY, Yeap SK, Akhtar MN, Puad M, Omar AR, Alithen NB (2013) The flavokawains: uprising medicinal chalcones. *Cancer Cell Int.* 13(1):102.

Albrecht P, Bouchachia I, Goebbels N, Henke N, Hofstetter HH, Issberner A, Kovacs Z, Lewerenz J, Lisak D, Maher P, Mausberg AK, Quasthoff K, Zimmermann C, Hartung HP, Methner A (2012) Effects of dimethyl fumarate on neuroprotection and immunomodulation. *J Neuroinflammation.* 9:163.

Allan SM, Tyrell PJ, Rothwell NJ (2005) Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol.* (8):629-40.

Allen IC, Scull MA, Moore CB, Holl EK, McElvania-TeKippe E, Taxman DJ, Guthrie EH, Pickles RJ, Ting JP (2009) The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity.* 30(4):556-65.

Anday JK, Mercier RW (2005) Gene ancestry of the cannabinoid receptor family. *Pharmacol Res.* 52(6):463-6.

Aschenbach H, Karl W (1970) Über die Isolierung von zwei neuen Pyrolliniden aus Rauschpfeffer (*Piper methysticum* Forst.). *Chem Ber.* 103:2535-2540.

Aschenbach H, Karl W (1971) Untersuchung der Säuren des Rauschpfeffers (*Piper methysticum* Forst.). *Chem Ber.* 104:1468-1477.

Aschenbach H, Regel W (1973) Inhaltstoffe des Rauschpfeffers. VI. Kernresonanzspektrometrische Untersuchungen an Kawalactonen. *Chem Ber.* 106: 2648-2653.

Asea A, Rehli M, Kabinqu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK (2002) Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR)2 and TLR4. *J Biol Chem.* 277(17):15028-34.

Backhauss C, Krieglstein J (1992) Extract of kava (*Piper methysticum*) and its methysticin constituents protect brain tissue against ischemic damage in rodents. *Eur J Pharmacol.* 215(2-3):265-9.

Bach JP, Ziegler U, Deuschl G, Dodel R, Doblhammer-Reiter G (2011) Projected numbers of people with movement disorders in the years 2030 and 2050. *Mov Disord.* (12):2286-90.

Baker JD (2011) Tradition and toxicity: evidential cultures in the kava safety debate. *Soc Stud Sci.* 41(3):361-84.

Barnum CJ, Tansey MG (2010) Modeling neuroinflammatory pathogenesis of parkinson's disease. *Prog Brain Res.* 184:113-32.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87(4):1620-4.

Beechey FW (1831) Narrative of a voyage to the pacific and bering's strait, Colburn and Bentley, London. Reprinted 1968 N. Israel, Amsterdam. 2:120-122.

Beumer W, Gibney SM, Drexhage RC, Pont-Lezica L, Doorduyn J, Klein HC, Steiner J, Connor TJ, Harkin A, Versnel MA, Drexhage HA (2012) The immune theory of psychiatric diseases: a key role for activated microglia and circulating monocytes. *J Leukoc Biol*. 92(5):959-75.

Bi XL, Yang JY, Dong YX, Wang JM, Cui YH, Ikeshima T, Zhao YQ, Wu CF (2005) Resveratrol inhibits nitric oxide and TNF-alpha production by lipopolysaccharide-activated microglia. *Int Immunopharmacol*. 5(1):185-93.

Biragyn A, Ruffini PA, Leifer Cam Klyushnenkova E, Shakhov A, Chertov O, Shirakawa AK, Farber JM, Segal DM, Oppenheim JJ, Kwak LW (2002) Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science*. 298(5595):1025-9.

Black JA, Liu S, Waxman SG (2009) Sodium channel activity modulates multiple functions in microglia. *Glia*. 57(10):1072-81.

Black JA, Waxman SG (2011) Sodium channels and microglial function. *Exp Neurol*. 234(2):302-15.

Blenis J (1993) Signal transduction via MAP kinases: proceed at your own RSK. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90:5889-5892.

Boerner RJ, Sommer H, Berger W, Kuhn U, Schmidt u, Mannel M (2003) Kava-Kava extract LI150 is as effective as opipramol and buspirone in generalised anxiety disorder. *Phytomedicine*. 10 Suppl 4:38-49.

Boje KM, Arora PK (1992) Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res*. 587:250-56.

Boka G, Anglade P, Wallach D, Javoy-Aqid F, Aqid Y, Hirsch EC (1994) Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 172(1-2):151-4.

Boonen G, Häberlein H (1998) Influence of genuine kavapyrone enantiomers on the GABA-A binding site. *Planta Med*. 64:504-506.

Borsche W, Peitzsch W (1930) Untersuchungen über die Bestandteile der Kawawurzel. X. Über Kawain und Dihydro-kawain. *Chem Ber*. 63:2414-2417.

Bouaboula M, Bourrie B, Rinaldi-Carmona M, Shire D, Le Fur G, Casellas P (1995) Stimulation of cannabinoid receptor CB1 induces krox-24 expression in human astrocytoma cells. *J Biol Chem*. 270(23):13973-80.

Bowman CC, Rasley A, Tranquch SL, Mariott I (2003) Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia*. 43(3):281-91.

Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E (2003) Staging of brain pathology related to sporadic parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 24(2):197-211.

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- Brunton R (1989) *The abandoned narcotic: kava and cultural instability in melanesia.* Cambridge University Press, Cambridge.
- Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM (2002) Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* 61(11):1013-21.
- Buckley NE (2008) The peripheral cannabinoid receptor knockout mice: an update. *Br J Pharmacol.* 153(2):309-318.
- Calabrese C, Sultana R, Scapagini G, Guigliano E, Sapienza M, Bella R, Kanski J, Pennisi G, Mancuso C, Stella AM, Butterfield DA (2006) Nitrosative stress, cellular stress response, and thiol homeostasis in patients with alzheimer's disease. *Antiox Redox Signal.* (8)11-12:1975-86.
- Carbonell WS, Mandell JW (2003) Transient neuronal but persistent astroglial activation of ERK/MAP kinase after focal brain injury in mice. *J Neurotrauma.* 20(4):327-36
- Carlisle SJ, Marciano-Cabral F, Staab A, Ludwick C, Cabral GA (2002) Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *Int Immunopharmacol.* 2(1):69-82.
- Carrizzo A, Forte M, Damato A, Trimarco V, Salzano F, Bartolo M, Maciaq A, Puca AA, Vecchione C (2013) Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. *Food Chem Toxicol.* 61:215-226.
- Chakraborty S, Kaushik DK, Gupta M, Basu A (2010) Inflammosome signalling at the heart of central nervous system pathology. *J Neurosci Res.* 88(8):1615-31.
- Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA (2003) Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targets for therapeutic intervention. *Leukemia* 17(7):1263-93.
- Chen XP, Yang, Fan Y, Luo JS, Hong K, Wang Z, Yan JF, Chen X, Lu JX, Benovic JL, Zhou NM (2010) *Br J Pharmacol.* 161(8):1817-34.
- Chung YC, Bok E, Huh SH, Park JY, Yoon SH, Kim SR, Kim YS, Maeng S, Park SH, Jin BK (2011) Cannabinoid receptor type 1 protects nigrostriatal dopaminergic neurons against MPTP neurotoxicity by inhibiting microglial activation. *J Immunol.* 187(12):6508-17.
- Coqswell JP, Godlevski MM, Wisely GB, Clay WC, Leesnitzer LM, Ways JP, Gray JG (1994) NF-kappa B regulates IL-1 beta transcription through a consensus NF-kappa B binding site and a nonconsensus CRE-like site. *J Immunol.* 153(2):712-23.
- Choi DK, Pennathur S, Perier C, Tieu K, Teismann P, Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, Vonsattel JP, Heinecke JW, Przedborski S (2005) Ablation of the inflammatory enzyme myeloperoxidase mitigates features of parkinson's disease in mice. *J Neurosci.* 25(28):6594-600.
- Collart MA, Baeuerle P, Vassalli P (1990) Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa-B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Mol Cell Biol.* 10(4):1498-506.

- Conolly ES, Winfree CJ, Springer TA, Naka Ym Liao H, Yan SD, Stern DM, Solomon RA, Gutierrez-Ramos JC, Pinsky DJ (1996) Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. *J.Clin. Invest.* 97:209-216.
- Cook J (1785) A voyage to the pacific ocean by the command of his majesty for making discoveries in the southern hemisphere. Nicoll and Cadell, London.
- Cuzent G (1861) Composition chimique de la kavahine. *C R Seances Acad Sc.* 52:205-206.
- Craner MJ, Damarjian TG, Liu S, Hains BC, Lo AC, Black JA, Newcombe J, Cuzner J, Cuzner ML, Waxman SG (2005) Sodium channels contribute to microglia/macrophage activation and function in EAE and MS. *Glia.* 49(2):220-9.
- Cribbs DH, Berchtold NC, Perreau V, Coleman PD, Rogers J, Tenner AJ, Cotman CW (2012) Extensive innate immune gene activation accompanies brain aging, increasing vulnerability to cognitive decline in neurodegeneration: a microarray study. *J Neuroinflammation.* 9:179.
- Croft M, Benedict CA, Ware CF (2013) Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. *Nat Rev Drug Discov.* 12(2):147-68.
- Davidson C (1899) Hawaiian medicine. *Medical Age.* 373-381.
- Darlington CL (2005) Astrocytes as targets for neuroprotective drugs. *Curr Opin Investig Drugs.* 6(7):700-3.
- De Castro IP, Martins LM, Loh SH (2011) Mitochondrial quality control and parkinson's disease: a pathway unfolds. *Mol Neurobiol.* 43(2):80-6.
- De Lau LM, Breteler MM (2006). Epidemiology of parkinson's disease. *Lancet Neurol* 5:525-35.
- DeSalvo MK, Mayer N, Mayer F, Bainton RJ (2011). Physiologic and anatomic characterization of the brain surface glia barrier of drosophila. *Glia.* 59(9):1322-40.
- Di Monte DA, Lavasani M, Manning-Bog AB (2002) Environmental factors in parkinson's disease. *Neurotoxicology* 23(4-5):487-502.
- Dinarello CA (2010) IL-1: discoveries, controversies and future directions. *Eur J Immunol.* 40(3):599-606.
- Dick FD, De Palma G, Ahmadi A, Scott NW, Prescott GJ, Benett J, Semple S, Dick S, Counsell C, Mozzoni P, Haites N, Bezzina Wettinger S, Mutti A, Otelea M, Seaton A, Söderkvist P, Felice A (2007) Environmental risk factors for parkinson's disease and parkinsonism. The geoparkinson study. *Occup Environ Med.* 64(10):666-672.
- Dutta CP, Ray LPK (1973) Further studies on the structure of flavokawain-C. A new chalcone isolated from piper methysticum. *Indian Science Congress Association Proceedings.* 60:121-122.
- Duyckaerts C, Sazdovitch V, Seilhean D (2010) Update on the pathophysiology of parkinson' disease. *Bull Acad Nat Med.* 194(7):1287-303.
- Dragull K, Yoshida WY, Tang CS (2003) Piperidine alkaloids from piper methysticum. *Phytochemistry.* 63(2):193-8.

- Fairchild TA, Fulton D, Fontana JT, Gratton JP, McCabe TJ, Sessa WC (2001) Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu(298)--> Asp variant of human endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 276(28):26674-9.
- Fernandes-Alnemri T, Wu J, Yu JW, Datta P, Miller B, Jankowski W, Rosenberg S, Zhang ES, Alnemri (2007) The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimmers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death Differ.* 14:1590-1604.
- Ferrari CC, Pott Godoy MC, Tarelli R, CHertoff M, Depino AM, Pitossi FJ (2006) Progressive neurodegeneration and motor disabilities induced by chronic expression of IL-1-beta in the substantia nigra. *Neurobiol Dis* 24:183-93
- Folmer F, Blasius R, Morceau F, Tabudravu J, Dicato M, Jaspars M, Diederich M (2006) Inhibition of TNFalpha-induced activation of nuclear factor kB by kava (piper methysticum) derivatives. *Biochem Pharmacol.* 71(8):1206-18.
- Fox RJ, Kita M, Cohan SL, Henson LJ, Zambrano J, Scannevin RH, O'Gorman J, Novas M, Dawson KT, Theodore Phillips J (2013) BG-12 (dimethyl fumarate): a review of mechanism of action, efficacy, and safety. *Curr Med Res Opin.* 30(2):251-62.
- Frater AS (1958) Medical aspects of yaqona. *Transactions and Proceedings of the Fiji Society,* 5(2):31-39.
- Furchgott RF, Cherry PD, Zawadzki JV, Jothianandan D (1984) Endothelial cells as mediators of vasodilatation of arteries. *J Cardiovasc Pharmacol.* 6 Suppl 2:S336-43.
- Galiano M, Liu ZQ, Kalla R, Bohatschek M, Koppius A, Gschwendtner A, Xu Sm Werner A, Kloss CU, Jones LL, Bluethmann H, Raivich G (2001) Interleukin-6 (IL6) and cellular response fo facial nerve injury: effects on lymphocyte recruitment, early microglial activation and axonal outgrowth in IL-6-deficient mice. *Eur J Neurosci.* 14(2):237-41.
- Gerhardt A, Pavese N, Hotton G, Turkheimer F, Es M, Hammers A, Eggert K, Oertel Wm Banati RB, Brooks DJ (2006) In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 21(2):404-12.
- Gertsch J (2008) Anti-inflammatory cannabinoids in diet: towards a better understanding of CB(2) receptor action? *Commun Integr Biol.* 1(1)26-8.
- Gleitz J, Gottner N, Ameri A, Peters T (1996a) Kavain inhibits non-stereospecifically vertridine-activated Na-channels. *Planta Med.* 62:580-581.
- Gleitz J, Tosch C, Beile A, Peters T (1996b) The protective action of tetrodotoxin and (+/-)kavain on anaerobic glycolysis, ATP content and intracellular Na⁺ and Ca²⁺ of anoxic brain vesicles. *Neuropharmacology.* 35(12):1743-52.
- Gobley M (1860) Recherches chimiques sur la racine de kava. *Journal de Pharmacie et de Chimie.* 37:19-23.
- Godoy MC, Tarelli R, Ferrari CC, Sarchi MI, Pitossi FJ. (2008) Central and systemic IL-1 exacerbates neurodegeneration in an animal model of parkinson's disease. *Brain.* 131(7):1880-1894.
- Goldfeld AE, Doyle C, Maniatis T (1990) Human tumor necrosis factor alpha gene regulation by virus and lipopolysaccharide (1990) *Proc Natl Acad Sci USA.* 87(24):9769-73.

Grazca L, Ruff P (1986) Über die höheren Alkohole von Piperis methystini rhizoma: Aliphatic and alicyclic alcohols of Piperis methystici rhizome. Arch Pharm. 319, 475-477.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. Anal Biochem. 126(1):131-8.

Hänzel R (1968) Characterization and physiological activity of some kawa constituents. Pac Sci. 22,293-313.

Hakansson A, Westberg L, Nilsson S, Buervenich S, Carmine A, Holmberg B, Sydow O, Olson L, Johnels B, Eriksson E, Nissbrandt H (2005) Interaction of polymorphisms in the genes encoding interleukin-6 and estrogen receptor beta on the susceptibility to parkinson's disease. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 133B(1):88-92.

Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, Fitzgerald KA, Latz E, Moore KJ, Golenbock DT (2008) The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. Nat Immunol. 9(8):857-65.

Halliday GM, Stevens CH (2011) Glia: initiators and progressors of pathology in parkinson's disease. Mov Disord. 26(1):6-17.

Hamby ME, Hewett JA, Hewett SJ (2006) TGF-beta1 potentiates nitric oxide production by expanding the population of astrocytes that express NOS-2. Glia. 54(6):566-577.

Hanamsagar R, Hanke ML, Kielian T (2012) Toll-like receptor (TLR) and inflammasome actions in the central nervous system. Trends Immunol. 33(7):333-42.

Hashimoto T, Suganuma M, Fujiki H, Yamada M, Kohno T, Asakawa Y (2003) Isolation and synthesis of TNF- α release inhibitors from fujian kawa (piper methysticum). Phytomedicine. 10:309-317.

Hashioka S, Klegeris A, McGeer PL (2012) Inhibition of human astrocyte and microglia neurotoxicity by calcium channel blockers. Neuropharmacology. 63(4):685-91.

Henderson BE, Kolonel LN, Dworshy R, Kerford D, Mori E, Singh K *et al.* (1995) Cancer incidence in the islands of the pacific. National Cancer Institute Monograph. 69:3-81.

Herx LM, Yong VW (2001) Interleukin-1 beta is required for the early evolution of reactive astrogliosis following CNS lesion. J Neuropathol Exp Neurol. 60(10):961-71.

Hirsch E, Hunot S (2009) Neuroinflammation in parkinson's disease: a target for neuroprotection? Lancet Neurol. 8(4):382-97

Hise AG, Tomalka J, Ganesan S, Patel K, Hall BA, Brown GD, Fitzgerald KA (2009) An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen candida albicans. Cell Host Microbe. 5(5):487-97.

Hocart AM (1929) Lau Islands, Fiji. Bernice Bishop Museum Press, Honolulu.

Howlet AC (2005) Cannabinoid receptor signaling. Handb Exp Pharmacol. (168):53-79.

Hunot S, Boissiere F, Faucheux B, Brugg B, Moouatt-Prigent A, Aqid Y, Hirsch EC (1996) Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in parkinson's disease. Neuroscience. 72(2):355-63.

Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debre P, Aqid Y, Dugas B, Hirsch EC (1999) FcepsilonRII/CD23 is expressed in parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. *J Neurosci.* 19(9):3440-7.

Iannaccone S, Cerami C, Alessio M, Garibotto V, Panzacchi A, Olivieri S, Gelsomino G, Moresco RM, Perani D (2013) In vivo microglia activation in very early dementia with lewy bodies, comparison with parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 19(1):47-52.

Inoue K, Nakajima K, Morimoto T, Kikuchi Y, Koizumi S, Illes P, Kohsaka S (1998) ATP stimulation of Ca²⁺-dependent plasminogen release from cultured microglia. *Br J Pharmacol.* 123(7):1304-10.

Irani DN, Lin KI, Griffin DE (1996) Brain-derived gangliosides regulate the cytokine production and proliferation of activated T cells. *J Immunol.* 157(10):4333-40.

Itagaki S, McGeer PL, Akiyama H, Zhu S, Selkoe D (1989) Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of alzheimer disease. *J Neuroimmunol* 24:173-182.

Jaffrey SR, Snyder SH (1995) Nitric oxide: a neural messenger. *Annu Rev Cell Biol.* 11:417-40.

Jeon YJ, Han SH, Lee YW, Lee M, Yang KH, Kim HM (2000) Dexamethasone inhibits IL-1 beta gene expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by blocking NF-kappa B/Rel and AP-1 activation. *Immunopharmacology.* 48(2):173-83.

Jin C, Flavell RA (2010) Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *J Clin Immunol.* 30(5):628-31.

John GR, Lee SC, Brosnan CF (2003) Cytokines: powerful regulators of glial activation. *Neuroscientist.* 9(1):10-22.

Johnson TE, Hermanson D, Wang L, Kassie F, Upadhyaya P, O`Sullivan MG, Hecht SS, Lu J, Xing C (2011) Lung tumorigenesis suppressing effects of a commercial kava extract and its selected compounds in A/J mice. *Am J Chin. Med.* 39(4):727-42.

Johnston GA (2013) Advantages of an antagonist: bicuculline and other GABA antagonists. *Br J Pharmacol.* 169(2):328-36.

Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M (2010) Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem.* 345(1-2):91-104.

Jossang P, Molho D (1967) Chromatographie sur couches epaisses non liees des constituents du rhizome de piper methysticum: Isolement de deux nouvelles cetonas, cinnamalacetone et methylene dioxy-3,4 cinnamalacetone. *J Chromatogr.* 31:375-383.

Jussof A, Schmiz A, Hiemke C (1994) Kavapyrone enriched extract from piper methysticum as modulator of the GABA binding site in different regions of rat brain. *Psychopharmacology.* 116(4):469-74.

Kalyanaraman B (2013) Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol.* 1(1):244-257.

Kaminski NE, Abood ME, Kessler FK, Martin BR, Schatz AR (1992) Identification of a functionally relevant cannabinoid receptor on mouse spleen cells that is involved in cannabinoid-mediated immune modulation. *Mol Pharmacol.* 42(5):736-742.

- Kaplan BL (2013) The role of CB1 in immune modulation by cannabinoids. *Pharmacol Ther.* 137(3):365-74.
- Kim SR, Lee DY, Chung ES, Oh UT, Kim SU, Jin BK (2005) Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates cell death of mesencephalic neurons in vivo and in vitro. *J Neurosci.* 25(3):662-71.
- Kim YC, Park TY, Baik E, Lee SH (2012) Fructose-1,6-bisphosphate attenuates induction of nitric oxide synthase in microglia stimulated with lipopolysaccharide. *Life Sci.* 90(9-10):365-72.
- Kimelberg HK (2010) Functions of mature mammalian astrocytes: a current view. *Neuroscientist.* 16(1):79-106.
- Klohs MW (1979) Chemistry of kava. In: Efron DH, Holmstedt B, Kline NS (Hrsg.), *Ethopharmacologic search for psychoactive drugs*, 126-132, Raven Press, New York.
- Klohs MW, Keller F, Williams E, Toekes MI, Cronheim GE (1959) A chemical and pharmacological investigation of piper methysticum. *Lloydia*, 26(1):1-15.
- Knott C, Stern G, Wilkin GP (2000) Inflammatory regulators in parkinson's disease: iNOS, lipocortin, and cyclooxygenases-1 and -2. *Mol Cell Neurosci.* 16(6):724-39.
- Kolbus A, Herr I, Schreiber M, Debatin KM, Wagner EF, Angel P (2000) C-Jun-dependent CD95-L expression is a rate-limiting step in the induction of apoptosis by alkylating agents. *Mol Cell Biol.* 20(2):575-82.
- Kolodziejewski PJ, Koo JS, Eissa TN (2004) Regulation of inducible nitric oxide synthase by rapid cellular turnover and cotranslational down-regulation by dimerization inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(52):18141-6.
- Kretzschmer R, Meyer J, Teschendorf HJ, Zöllner B (1969) Antagonistische Wirkung natürlicher 5,6-hydrierter Kawa-Pyrone auf die Strychninvergiftung und experimentellen Tetanus. *Arch Int Pharmacodyn.* 182(2):251-268.
- Krüger R, Hardt C, Tschentscher F, Jäckel S, Kuhn W, Müller T, Werner J, Weitalla D, Berg D, Kühnl N, Fuchs GA, Santos EJ, Pruntzek H, Epplen JT, Schöls L, Riess O (2000) Genetic analysis of immunomodulating factors in sporadic parkinson's disease. *J Neural Transm.* 107(5):553-62.
- Küper C, Beck FX, Neuhofer W (2012) Toll-like receptor 4 activates NF- κ B and MAP kinase pathways to regulate expression of proinflammatory COX-2 in renal medullary collecting duct cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 302(1):F38-46.
- Kuhn SA, van Landeghem FK, Zacharias R, Färber K, Rappert A, Pavlovic S, Hoffmann A, Nolte C, Kettenmann H (2004) Microglia express GABA(B) receptors to modulate interleukin release. *Mol Cell Neurosci.* 25(2):312-22.
- Kurihara R, Tohyama Y, Matsusaka S, Naruse H, Kinoshita E, Tsujioka T, Katsumata y, Yamamura H (2006) Effects of peripheral cannabinoid receptor ligands on motility and polarization in neutrophil-like HL60 cells and human neutrophils. *J Biol Chem.* 281(18):12908-18.
- Kyosseva SV (2004) Mitogen-activated protein kinase signalling. *Int Rev Neurobiol.* 59:201-20.

Larsen CM, Faulenbach M, Vaaq A, Volund A, Ehses JA, Seifert B, Mandrup-Poulsen T, Donath MY (2007) Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 356(15):1517-26.

Lasme P, Davrieux F, Montet D, Lebot V (2008) Quantification of kavalactones and determination of kava (*Piper methysticum*) chemotypes using near-infrared reflectance spectroscopy for quality control in vanuatu. *J Agric Food Chem.* 56(13):4976-81.

Lebot V, Cabalion P (1988) Kavas of vanuatu: cultivars of *Piper methysticum* forst. *South Pacific Commission.* 195:3-53.

Lebot V, Merlin M, Lindstrom L (1992) *Kava: the pacific drug.* Yale University Press, New Haven CT.

Lee H, Lee S, Cho IH, Lee SJ (2013) Toll-like receptors: sensor molecules for detecting damage to the nervous system. *Curr Protein Pept Sci.* 14(1):33-42.

Lees AJ, Hardy J, Revesz T (2009) Parkinson's disease. *Lancet.* 373(9680):2055-66.

Levesque J (1985) Rapport preliminaire sur l'etude chimique d'echantillons de Kava (*Piper methysticum*) selectionees par la Station d'Agriculture de Tagabe, Republique de Vanuatu. Universite de Poitiers, Poitiers.

Lewin L (1886) *Über Piper methysticum (kawa-kawa).* August Hirschwald, Berlin.

Ligresti A, Villano R, Allara M, Ujvary I, Di Marco V (2012) Kavalactones and the endocannabinoid system: The plant-derived yangonin is a novel CB-1 receptor ligand. *Pharmacol Res.* 66(2):163-9.

Lijia Z, Zhao S, Wang X, Wu C, Yang J (2012) A self-propelling cycle mediated by reactive oxide species and nitric oxide exists in LPS-activated microglia. *Neurochem Int.* 61(7):1220-30.

Lim ST, Dragull K, Tang CS, Bittenbender HC, Efird JT, Nerurkar PV (2007) Effects of kava alkaloid, pipermethystine, and kavalactones on oxidative stress and cytochrome P450 in F-344 rats. *Toxicol Sci.* 97(1):214-21.

Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F (1993) GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *260(5111):1130-2.*

Lindstrom L (2004) In: Singh YN (Hrsg.) *Kava: From ethnology to pharmacology*, 38, 10-28, CRC Press, Boca Raton.

Linker RA, Gold R (2013) Dimethyl fumarate for treatment of multiple sclerosis: mechanism of action, effectiveness, and side effects. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 13(11):394

Long-Smith CM, Sullivan AM, Nolan YM (2009) The influence of microglia on the pathogenesis of parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 89(3):277-87.

Lu X, Ma L, Ruan L, Kong Y, Mou H, Zhang Z, Wang Z, Wang JM (2010) Resveratrol differentially modulates inflammatory responses of microglia and astrocytes. *J Neuroinflammation.* 7:46.

Lyman M, Lloyd DG, Ji X, Vizcaychipi MP, Ma D (2014) Neuroinflammation: The role and consequences. *Neurosci Res.* 79C:1-12.

- Mackie K, Lai Y, Westenbroeck R, Mitchell R (1995) Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci.* 15(10):6552-61.
- Magura EI, Kopanitsa MV, Gleitz J, Peters T, Krishtal OA (1997) Kava extract ingredients, (+)-methysticin and (+/-)kavain inhibit voltage-operated Na(+)-channels in rat CA1 hippocampal neurons. *Neuroscience.* 81(2):345-51.
- Malipiero U, Koedel U, Pfister HW, Leveen P, Bürki K, Reith W, Fontana A (2006) TGFbeta receptor II gene deletion in leucocytes prevents cerebral vasculitis in bacterial meningitis. *Brain.* 129(9):2404-15.
- Maquire-Zeiss KA, Federoff HJ (2010) Future directions for immune modulation in neurodegenerative disorders: focus on parkinson's disease. *J Neural Transm.* 117(8):1019-25.
- Martin HB, Stofer DS, Eichinger MR (2000) Kavain inhibits murine airway smooth muscle contraction. *Planta Med.* 66:601-606.
- Mathews JD, Riley MD, Fejo L, Munoz E, Milns NR, Gardner ID (1988) Effects of the heavy usage of kava on physical health: summary of a pilot survey in an aboriginal community. *Med J Aust.* 148:548-555.
- Matsumoto Y, Ohmori K, Fujiwara M (1992) Microglial and astroglial reactions to inflammatory lesions of experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat central nervous system, *J Neuroimmunol* 37:23-33.
- McGeer PI, McGeer EG (2008) Glial reactions in parkinson's disease. *Mov Disord.* 23(4):474-83.
- McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG (1988) Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of parkinson's and alzheimer's disease brains. *Neurology.* 38(8):1285-91.
- McGeer PL, Yasojima K, McGeer EG (2002) Association of interleukin-1-beta polymorphisms with idiopathic parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 326(1):67-9.
- Medzhitov R (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev. Immunol.* 1(2):135-45.
- Meixenberger K, Pache F, Eitel J, Schmeck B, Hippenstiel S, Slevogt H, N'Guessan P, Witzentrath M, Netea MG, Chakraborty T, Suttrop N, Opitz B (2010) *Listeria monocytogenes*-infected human peripheral blood mononuclear cells produce IL-1beta, depending on listeriolysin O and NLRP3. *J Immunol.* 184(2):922-30.
- Mesequer E, Taboada R, Sanchez V, Mena MA, Campos V, Garcia De Yébenes J (2002) Life-threatening parkinsonism induced by kava-kava. *Mov Disord.* 17(1):195-6.
- Meyer HJ (1979) Pharmacology of kava. In: Efron DH, Holmstedt B, Kline NS (Hrsg.) *Ethnopharmacologic Search for Psychoactive Drugs*, 131-40, Raven Press, New York.
- Miller AM, Stella N (2008) CB2 receptor-mediated migration of immune cells: it can go either way. *Br J Pharmacol.* 153(2):299-308.
- Miller YI, Viriyakosol S, Binder CJ, Feramisco JR, Kirkland TN, Witztum JL (2003) Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells. *J Biol Chem.* 278(3):1561-8.

- Minghetti L (2005) Role of inflammation in neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurol.* 18(3):315-21.
- Mocada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43(2):109-42.
- Mogi M, Harada M, Riederer P, Narabayashi H, Fujita K, Nagatsu T (1994) Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci Lett.* 165(1-2):208-10.
- Molina-Holgado E, Vela JM, Arevalo-Martin A, Almazan G, Molina-Holgado F, Borrell J, Guaza C (2002) Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J Neurosci.* 22(22):9742-53.
- Molina-Halgado F, Molina-Halgado E, Guaza C (1998) The endogenous cannabinoid anandamide potentiates interleukin-6 production by astrocytes infected with theiler's murine encephalomyelitis virus by a receptor-mediated pathway. *FEBS Lett.* 433(1-2):139-42.
- Moll M, Kuemmerle-Deuschner JB (2013) Inflammasome and cytokine blocking strategies in autoinflammatory disorders. *Clin Immunol.* 147(3):242-75.
- Montgomery SI, Bowers WJ (2011) Tumor necrosis factor-alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol.* 7(1):42-59.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65(1-2):55-63.
- Müller T, Blum-Degen D, Pruntzek H, Kuhn W (1998) Interleukin-6 levels in cerebrospinal fluid inversely correlate to severity of parkinson's disease. *Acta Neurol Scand.* 98(2): 142-4.
- Munoz-Planillo R, Franchi L, Miller LS, Nunez G (2009) A critical role for hemolysins and bacterial lipoproteins in staphylococcus aureus-induced activation of the Nlrp3 inflammasome. *J Immunol.* 183(6):3942-8.
- Nerurkar PV, Dragull K, Tang CS (2004) In vitro toxicity of kava alkaloid, pipermethystine, in HepG2 cells compared to kavalactones. *Toxicol Sci.* 79(1):106-11.
- Newell NH (1947) Kava ceremony in tonga. *J Polyn Soc.* 56:364-417.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science.* 308(5726):1314-8.
- Nölting E, Kopp A (1874) Sur la racine de kawa. *Moniteur Scientifique.* 920-923.
- Noguchi S, JianmankolS, Bender AT, Kamady Y, Demady DR, Osawa Y (2000) Guanabenz-mediated inactivation and enhanced proteolytic degradation of neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem,* 275(4):2376-80.
- Norton SA, Ruze P (1994) Kava dermatopathy. *J Am Acad Dermatol.* 31(1):89-97.
- Ohshima H, Sawa T, Akaike T (2006) 8-nitroguanine, a product of nitrative DNA damage caused by reactive nitrogen species: formation, occurrence and implications in inflammation and carcinogenesis. *Antiox Redox Signal.* 8(5-6):1033-45.

Olsen LR, Grillo MP, Skonberg C (2011) Constituents in kava extracts potentially involved in hepatotoxicity: a review. *Chem Res Toxicol.* 24(7):992-1002.

O'Rourke M (1860) *C R Hebd Seances Acad Sci.* 50:598.

Park C, Lee S, Cho IH, Lee HK, Kim D, Choi SY, Oh SB, Park K, Kim JS, Lee SJ (2006) TLR3-mediated signal induces proinflammatory cytokine and chemokine expression in astrocytes : differential signaling mechanisms of TLR3-induced IP-10 and IL-8 gene expression. *Glia.* 53(3):248-56.

Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, Abraham E (2004) Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem.* 279(9):7370-7.

Park KM, Bowers WJ (2010) Tumor-necrosis-factor-alpha mediated signalling in neuronal homeostasis and dysfunction. *Cell Signal.* 22(7):977-83.

Pavlovic R, Santaniello E (2007) Peroxynitrite and nitrosperoxycarbonate, a tightly connected oxidizing-nitrating couple in the reactive nitrogen-oxygen species family: new perspectives for protection from radical-promoted injury by flavonoids. *J Pharm Pharmacol.* 59(12):1687-95.

Pelegri P, Surprenant A (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J.* 25(21):5051-82.

Peyssonnaud C, Provot S, Felder-Schmittbuhl MP, Calothy G, Eychene A (2000) Induction of postmitotic neuroretina cell proliferation by distinct Ras downstream signalling pathways. *Mol Cell Biol.* 20(19):7068-79.

Pils A, Winklhofer KF (2012) Parkin, PINK1 and mitochondrial integrity: emerging concepts of mitochondrial dysfunction in parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 123(2):173-88.

Polastri MP, Whitty A, Merrill JC, Ashton TD, Amar S (2009) Identification and characterization of kava-derived compounds mediating TNF- α suppression. *Chem Biol Drug Des.* 74(2):121-128.

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B (1998) Defective LPS signalling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in the Tlr4 gene. *Science.* 282(5396):2085-8.

Pouyssegur J, Volmat V, Lenormand P (2002) Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol.* 64(5-6):755-63.

Proell M, Riedl SJ, Fritz JH, Rojas AM, Schwarzenbacher R (2008) The Nod-like receptor (NLR) family: a tale of similarities and differences. *PLoS One.* 3(4):2119.

Pryor WA, Jin X, Squadrito GL (1994) One- and two-electron oxidations of methionine by peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91:11173-11177.

Przedborski S, Ischiropoulos H (2005) Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of parkinson's disease. *Antiox Redox Signal.* 7(5-6):685-93.

Qian L, Flood PM, Hong JS (2010) Neuroinflammation is a key player in parkinson's disease and a prime target for therapy. *J Neural Transm.* 117(8):971-9.

- Ransohoff RM, Brown MA (2012) Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest.* 122(4):1164-71.
- Rasmussen AK, Scheline RR, Solheim E, Hänsel R (1979) Metabolism of some kava pyrones in the rat. *Xenobiotica.* 9(1):1-16.
- Reynolds A, Laurie C, Mosley RL, Gendelman HE (2007) Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Int Rev Neurobiol.* 82:297-325.
- Riccardiolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G (2004) Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev.* 84(3):731-65.
- Ringman JM, Frautschy SA, Cole GM, Masterman DL, Cummings JL (2005) A potential role of the curry spice curcumin in alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2(2):131-136.
- Robinson AP, White TM, Mason DW (1986) Macrophage heterogeneity in the rat as delineated by two monoclonal antibodies MRC OX-41 and MRC OX-42, the latter recognizing complement receptor type 3. *Immunology.* 57(2):239-47.
- Röhl C, Lucius R, Sievers J (2007) The effect of activated microglia on astrogliosis parameters in astrocyte cultures. *Brain Res.* 1129(1):43-52.
- Rom S, Persidsky Y (2013) Cannabinoid receptor 2: potential role in immunomodulation and neuroinflammation. *J Neuroimmune Pharmacol.* 8(3):608-20.
- Roodveldt C, Christodoulou J, Dobson CM (2008) Immunological features of alpha-synuclein in parkinson's disease. *J Cell Mol Med.* 12(5b):1820-9.
- Roskoski R Jr. (2012) ERK 1/2 MAP kinases: structure, function and regulation. *Pharmacol Res.* 66(2):105-43.
- Rowe A, Zhang LY, Ramzan I (2011) Toxicokinetics of kava. *Adv Pharmacol Sci.* 326724.
- Sarfraz S, Adhami VM, Syed DN, Afaq F, Mukhtar H (2008) Cannabinoids for cancer treatment: progress and promise. *Cancer Res.* 68(2):339-42.
- Sarkar A, Duncan M, Hart J, Hertlein E, Guttridge DC, Wewers MD (2006) ASC directs NF-kappaB activation by regulating receptor interacting protein-2 (RIP2) caspase-1 interactions. *J Immunol.* 176(8):4979-86.
- Saura J (2007) Microglial cells in astroglial cultures: a cautionary note. *J Neuroinflammation.* 4;26.
- Schapira AH, Jenner P (2011) Etiology and pathogenesis of parkinson's disease. *Mov Disord.* 26(6):1049-55.
- Schmidt N, Ferger B (2001) Neuroprotective effects of kavain in the MPTP mouse model of parkinson's disease. *Synapse.* 40(1):47-54.
- Shaik AA, Hermansson DL, Chengguo X (2009) Identification of methysticin as a potent and non-toxic NF-kB inhibitor from kava, potentially responsible for kava's chemopreventive activity. *Bioorg Med Chem Lett.* 19(19):5732-5736.
- Shi H, Koekeva MV, Inouye K, Tzamelis I, Yin H, Flier JS (2006) TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest.* 116(11):3015-25.

- Shimoda LMN, Park C, Stokes AJ, Gomes HH, Turner H (2012) Pacific island 'awa (kava) extracts, but not isolated lavalactones, promote proinflammatory responses in model mast cells. *Phytother Res.* 26:1934-1941.
- Shoemaker JL, Ruckle MB, Mayeux PR, Prather PL (2005) Agonist-directed trafficking of response by endocannabinoids acting at CB2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 315(2):828-38.
- Shrivastava K, Chertoff M, Llovera G, Recasens M, Acarin L (2012) Short and long-term analysis and comparison of neurodegeneration and inflammatory cell response in the ipsilateral and contralateral hemisphere of the neonatal mouse brain after hypoxia/ischemia. *Neurol Res Int.* 781512.
- Shulgin AT (1973) The narcotic pepper: the chemistry and pharmacology of piper methysticum and related species. *Bull on Narcotics.* 25:59-74.
- Sidoryk-Wegrzynowicz M, Wegrzynowicz M, Lee M, Bowman AB, Aschner M (2011) Role of astrocytes in brain function and disease. *Toxicol Pathol.* 39(1):115-23.
- Siegel RH, (1976) Herbal intoxication. *JAMA.* 236:473-476.
- Siemann EH, Creasy LL (1992) Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am J. Enol. Vitic.* 43:49-52.
- Singh YN (1992) Kava: an overview. *J Ethnopharmacol.* 37:13-45.
- Singh YN (2004) In: Singh YN (Hrsg.) Kava: From ethnology to pharmacology, 38:1-9, CRC Press, Boca Raton.
- Singh YN (2004) In: Singh YN (Hrsg.) Kava: From ethnology to pharmacology, 38:104-139, CRC Press, Boca Raton.
- Singh YN, Singh NN (2002) Therapeutic potential of kava in the treatment of anxiety disorders. *CNS Drugs.* 16(11):731-43.
- Smith RM (1979) Pipermethystine, a novel pyrone alkaloid from piper methysticum. *Tetrahedron* 35:437-439.
- Song YJ, Halliday GM, Holton JL, Lashley T, O'Sullivan SS, McCann H, Lees AJ, Ozawa T, Williams DR, Lockhart PJ, Revesz TR (2009) Degeneration in different parkinsonian syndromes relates to astrocyte type and astrocyte protein expression. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* 68(10):1073-83.
- Srinivasan D, Yen JH, Joseph DJ, Friedman W (2004) Cell type-specific interleukin-1beta signaling in the CNS. *J Neurosci.* 24(29):6482-8.
- Steiner GG (2000) The correlation between cancer incidence and kava consumption. *Hawaii Med J.* 59(1):420-2.
- Streit WJ (1996) The role of microglia in brain injury. *Neurotoxicology.* 17(3-4):671-8.
- Strle K, Zhou JH, Shen WH, Broussard SR, Johnson RW, Freund GG, Dantzer R, Kelley KW (2001) Interleukin-10 in the brain. *Crit Rev Immunol.* 21(5):427-49.
- Stuehr DJ (1999) Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta.* 1411(2-3):217-30.

Tansey MG, Frank-Cannon TC, McCoy MK, Lee JK, Martinez TN, McAlpine FE, Ruhn KA, Tran TA (2008) Neuroinflammation in parkinson's disease: is there sufficient evidence for mechanism-based interventional therapy? *Front Biosci.* 13;709-17.

Tanaka A, Hamada N, Fujita Y, Itoh T, Nozawa Y, Iinuma M, Ito M (2010) A novel kavalactone derivative protects against H2O2-induced PC12 cell death via Nrf2/ARE activation. *Bioorg Med Chem.* 18(9):3133-9.

Teschke R, Qiu SX, Xuan TD, Lebot V (2011) Kava and kava hepatotoxicity: requirements for novel experimental, ethnobotanical and clinical studies based on a review of the evidence. *Phytother Res.* 25:1263-1274.

Thomson BH (1908) *The Fijians: A study of the decay of custom.* Heinemann, London. 341-351.

Tang J, Dunlop RA, Rowe A, Rodgers KJ, Ramzan I (2011) Kavalactones yangonin and methysticin induce apoptosis in human hepatocytes (HepG2) in vitro. *Phytother Res.* 25(3):417-23.

Titcomb M (1948) Kava in hawaii. *J Polyn Soc.* 57:105-171.

Tobon-Velasco JC, Carmona-Aparicio L, Ali SF, Santamaria A (2010) Biomarkers of cell damage induced by oxidative stress in parkinson's disease and related models. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* 10(4):278-86.

Triolet J, Shaik AA, Gallagher DD, O'Sullivan MG, Xing C (2012) Reduction in colon cancer risk by consumption of kava or kava fractions in carcinogen-treated rats. *Nutr Cancer.* 64(6):838-46.

Trostchansky A, Bonilla L, Gonzalez-Perilli L, Rubbo H (2013) Nitro-Fatty acids: formation, redox signalling, and therapeutic potential. *Antiox Redox Signal.* 19(11):1257-65.

Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT (2009) Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol.* 7(1):65-74.

Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Häcker H, Wagner H (2001) Endocytosed HSP60s use toll receptor 2(TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signalling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem.* 276(33):31332-9.

Vanden Berghe W, Vermeulen L, De Wilde G, De Bosscher K, Boone E, Haegemann G (2000) Signal transduction by tumor necrosis factor and gene regulation of the inflammatory cytokine interleukin-6. *Biochem Pharmacol.* 60(8):1185-95.

Villaflores OB, Chen YJ, Chen CP, Yeh JM, Wu TY (2012) Curcuminoids and resveratrol as anti-alzheimer agents. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 51(4):515-25.

Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MA, Nacken W, Foell D, van der Poll T, Sorg C, Roth J (2007) Mrp 8 and Mrp 14 are endogenous activators of toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med.* 13(9):1042-9.

Wahner AD, Sinsheimer JS, Bronstein JM, Ritz B (2007) Inflammatory cytokine gene polymorphisms and increased risk of parkinson disease. *Arch Neurol.* 64(6): 836-40.

- Walden J, von Wegerer J, Winter U, Berger M, Grunze H (1997) Effects of kawain and dihydromethysticin on field potential changes in the hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 21(4):697-706.
- Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, Mackie K, Stella N (2003) Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci*. 23(4):1398-405.
- Wang Q, Xian NT, Yenari MA (2007) The inflammatory response in stroke. *Journal of Neuroimmunology*. 184:53-68.
- Werny F, Hänsel R (1963) Die Hydrierung von 6-Styryl- α -Pyronen zu Wirkstoffen vom Typus der Kawa-Laktone (aus Piper Methysticum). *Naturwissenschaften*. 50:355.
- Wilms H, Claasen J, Röhl C, Sievers J, Deuschl G, Lucius R (2003) Involvement of benzodiazepine receptors in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases: evidence from activated microglial cells in vitro. *Neurobiol Dis*. 14(3):417-24.
- Wilms H, Hartmann D, Sievers J (1997) Ramification of microglia, monocytes and macrophages in vitro: influences of various epithelial and mesenchymal cells and their conditioned media. *Cell Tissue Res* 287:447-458.
- Wilms H, Rosenstiel P, Romero-Ramos M, Arlt A, Schäfer H, Seegert D, Kahle PJ, Odoy S, Claasen JH, Holzknacht C, Brandenburg LO, Deuschl G, Schreiber S, Kirik D, Lucius R (2009) Suppression of MAP kinases inhibits microglial activation and attenuates neuronal cell death induced by alpha-synuclein protofibrils. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 22(4):897-909.
- Wilms H, Sievers J, Rickert U, Rostami-Yazdi M, Mrowietz U, Lucius R (2010) Dimethylfumarate inhibits microglial and astrocytic inflammation by suppressing the synthesis of nitric oxide, IL-1 β , TNF- α and IL-6 in an in-vitro model of brain inflammation. *J Neuroinflammation*. 7:30.
- Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J (2011) Epidemiology and etiology of parkinson's disease : a review of evidence. *Eur J Epidemiol*. 26(1):S1-58.
- Wruck CJ, Götz ME, Herdegen T, Varoga D, Brandenburg LO, Pufe T (2008) Kavalactones protect neural cells against amyloid β peptide-induced neurotoxicity via extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent nuclear factor erythroid factor 2 activation. *Mol. Pharmacology*. 73:1785-1795.
- Wu YR, Feng IH, Lyu RK, Chang KH, Lin YY, Chan H, Hu FJ, Lee-chen GJ, Chen CM (2007) Tumor necrosis factor- α promoter polymorphism is associated with the risk of parkinson's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 144b(3):300-4.
- Wyss-Coray T, Mucke L (2002) Inflammation in neurodegenerative diseases—a double-edged sword. *Neuron*. 35(3):419-32.
- Xiao JC, Jewell JP, Lin LS, Haqmann Wk, Fong TM, Shen CP (2008) Similar in vitro pharmacology of human cannabinoid CB1 receptor variants expressed in CHO cells. *Brain Res*. 1238:36-43.
- Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Trose T, Nathan C (1992) Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*. 256(5054):225-8.

- Xilouri M, Stefanis L (2010) Autophagy in the central nervous system: implications for neurodegenerative disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 9(6):701-19.
- Xu S, Robbins D, Frost J, Dang A, Lange-Carter C, Cobb MH (1995) MEKK 1 phosphorylates MEK1 and MEK2 but does not cause activation of mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92(15):6808-12.
- Xuan TD, Elzaawely AA, Fukuta M, Tawata S. (2006) Herbicidal and fungicidal activities of lactones in kava (*piper methysticum*). *J Agric Food Chem*. 54(3):720-5.
- Yan J, Roy S, Appolloni A, Lane A, Hancock JF (1996) Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*. 273(37):24052-6.
- Yang H, Young DW, Gusovsky F, Chow JC (2000) Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated toll-like receptor 4. MD-2 is required for activation of mitogen-activated protein kinases and Elk-1. *J Biol Chem*. 275(27):20861-6.
- Zecca L, Wilms H, Geick S, Claasen JH, Brandenburg LO, Holzknacht C, Panizza ML, Zucca FA, Deuschl G, Sievers J, Lucius R (2008) Human neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat substantia nigra: implications for parkinson's disease. *Acta Neuropathol*. 116(1):47-55.
- Zhang F, Liu J, Shi JS (2010) Anti-inflammatory activities of resveratrol in the brain: role of resveratrol in microglial activation. *Eur J Pharmacol*. 636(1-3):1-7.
- Zhang L, Rowe A, Braet F, Ramzan I (2012) Macrophage depletion ameliorates kavalactone damage in the isolated perfused rat liver. *J Toxicol Sci*. 37(2):447-53.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst und selbständig angefertigt habe, dass ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe und dass ich die Arbeit gemäß den Regeln zur guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft angefertigt habe. Weiter erkläre ich, dass ich nicht mit demselben Thema zeitgleich an einer anderen Hochschule oder Fakultät die Zulassung zur Promotion beantragt habe oder werde, ich an keiner anderen Hochschule oder an keiner anderen Fakultät dieser Hochschule ein Promotionsverfahren endgültig nicht bestanden habe und dass mir noch kein akademischer Grad entzogen wurde.

Jan Neumann Hamburg, den

Danksagung

Mein großer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. R. Lucius für die Überlassung des Themas, die exzellente Betreuung und auch für die Geduld. Ich danke Frau Dr. U. Rickert für den wertvollen wissenschaftlichen Rat und die Korrekturtätigkeit. Ich danke meinen Mentoren Herrn Prof. Dr. J. Sievers und Herrn Prof. Dr. J. Aldenhoff für Lehre und Bestärkung. Ich danke Frau R. Sprang, Frau R. Worm und Frau M. Grell sehr für die praktische Anleitung und Unterstützung im Labor. Mein außerordentlicher Dank gilt meiner Mutter und meinem Vater für ihre bedingungslose Unterstützung. Nicht zuletzt danke ich allen Korrekturlesern für ihre Mühe und ihre wertvollen Anregungen.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name Jan Neumann
 Geburtsdatum 29.01.1985
 Geburtsort Kiel

Ausbildung

1991 – 1995 Grundschule
 1995 – 2004 Kippenberg-Gymnasium, Bremen
 2004 Abschluss: Abitur
 2004 - 2005 Zivildienst im Krankenhaus Burg auf Fehmarn
 2005 - 2007 Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der CAU Kiel
 2007 Physikum
 2008 - 2012 Klinisches Studium der Humanmedizin an der CAU Kiel
 seit 2008 Promotion am Anatomischen Institut der CAU Kiel
 2011 – 2012 Praktisches Jahr
 1.Tertial: Psychiatrie, Institut für integrative Psychiatrie
 Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Kiel
 2.Tertial: Chirurgie, Städtisches Klinikum Kiel
 3.Tertial Innere Medizin, Krankenhaus Eckernförde
 2012 Zweites Staatsexamen

Ärztliche Tätigkeit

seit Januar 2013 Assistenzarzt für Neurologie im Krankenhaus Pinneberg

Veröffentlichungen

18.12.2012 Posterpräsentation im Rahmen der Studierendentagung Life Sciences, Kiel.
 28.02.-2.03.2013 Posterpräsentation im Rahmen des 3. Venusberg Meeting über Neuroinflammation, Bonn.