

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

# **ANTI-INFLAMMATORISCHE WIRKUNG VON 7,8-DIHYDROXYFLAVON AUF MIKROGLIA**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**REGULA STÖCKEL**

aus Preetz

Kiel 2016

1. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Lucius, Anatomisches Institut
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Alexa Karina Klettner, Klinik für Ophtalmologie

Tag der mündlichen Prüfung: 20.04.2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 20.04.2017

gez: Prof. Dr. Johann Roider  
(Vorsitzender des Prüfungsausschusses)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Zellen des Zentralnervensystems .....	1
1.2 Neuroinflammatorische Vorgänge im ZNS .....	1
1.2.1 Mikroglia als immunkompetente Zellen des ZNS .....	2
1.2.2 Von Mikroglia produzierte pro-inflammatorische Mediatoren .....	4
1.3 Morbus Parkinson als neurodegenerative Erkrankung .....	9
1.3.1 Epidemiologie .....	9
1.3.2 Klassifikation .....	10
1.3.3 Ätiologie des Morbus Parkinson.....	10
1.3.4 Klinisches Bild des Morbus Parkinson .....	12
1.3.5 Neuropathologie.....	13
1.3.6 Neurochemie .....	14
1.3.7 Therapie .....	14
1.4 7,8-Dihydroxyflavon.....	16
1.4.1 Chemische Struktur.....	17
1.4.2 Eigenschaften.....	17
1.5 Zielsetzung.....	18
<b>2 Material.....</b>	<b>19</b>
2.1 Reagenzien.....	19
2.2 Lösungen und Puffer.....	20
2.3 Gebrauchsfertige Kits und Lösungen.....	24
2.4 Enzyme .....	25
2.5 TaqMan®-Assay on Demand (Life Technologies GmbH).....	25
2.6 Primer.....	25
2.7 Antikörper .....	25
2.7.1 Primärantikörper .....	25
2.7.2 Sekundärantikörper .....	25
2.8 Verbrauchsmaterialien .....	26
2.9 Geräte.....	26
2.10 Software .....	27

---

<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>28</b>
3.1	Isolierung und Kultivierung primärer Mikroglia .....	28
3.2	Ernte der Mikroglia.....	28
3.3	Aussaat der Mikroglia.....	29
3.4	Stimulation von Mikroglia.....	29
3.5	MTT-Test.....	29
3.6	Coomassie-Blau-Färbung .....	30
3.7	Indirekte Stickstoffmonoxid (NO)-Messung .....	30
3.8	Proliferationstest .....	31
3.9	Relative quantitative Real-Time PCR (qPCR).....	31
3.9.1	RNA-Isolierung.....	31
3.9.2	cDNA-Synthese .....	32
3.9.3	qPCR.....	33
3.10	Western-Blot-Analyse.....	34
3.10.1	Isolierung von Gesamtproteinen.....	34
3.10.2	Proteinquantifizierung.....	35
3.10.3	Herstellung des Gels .....	35
3.10.4	Elektrophorese .....	35
3.10.5	Blotting .....	35
3.10.6	Immundetektion .....	36
3.11	ELISA .....	36
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>38</b>
4.1	Einfluss von 7,8-DHF auf das Überleben von Mikroglia.....	38
4.2	Einfluss von 7,8-DHF auf die Morphologie primärer Mikroglia.....	40
4.3	Einfluss von 7,8-DHF auf die Radikalbildung .....	42
4.3.1	Einfluss von 7,8-DHF auf die NO-Freisetzung durch Mikroglia .....	42
4.3.2	Einfluss von 7,8-DHF auf die mRNA-Expressionsrate der iNOS.....	43
4.4	Einfluss von 7,8-DHF auf die LPS-induzierte Produktion pro- inflammatorischer Zytokine.....	45
4.4.1	Einfluss von 7,8-DHF auf die TNF- $\alpha$ -mRNA-Synthese in Mikroglia .....	45
4.4.2	Einfluss von 7,8-DHF auf die IL-1 $\beta$ -mRNA-Synthese in Mikroglia .....	47
4.4.3	Einfluss von 7,8-DHF auf die IL-6 mRNA-Synthese von Mikroglia.....	49
4.5	Einfluss von 7,8-DHF auf die mRNA-Expression von COX-2.....	51
4.6	Einfluss von 7,8-DHF auf die Proteinsynthese pro-inflammatorischer Zytokine .....	53
4.6.1	Einfluss von 7,8-DHF auf die TNF- $\alpha$ -Freisetzung durch Mikroglia .....	53
4.6.2	Einfluss von 7,8-DHF auf die IL-6-Freisetzung durch Mikroglia .....	55
4.7	Einfluss von 7,8-DHF auf die Aktivierung von MAP-Kinasen in primären Mikroglia.....	57

---

<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>60</b>
5.1	7,8-DHF .....	60
5.2	Zytotoxizität von 7,8-DHF .....	61
5.3	Stimulation der Mikroglia .....	62
5.4	Einfluss von 7,8-DHF auf die Radikalbildung .....	62
5.5	Einfluss von 7,8-DHF auf die Expression pro-inflammatorische Zytokine .....	63
5.6	Einfluss von 7,8-DHF auf die COX-2-Synthese .....	66
5.7	Einfluss von 7,8-DHF auf die Aktivierung des MAPK-Signalweges in primären Mikroglia .....	66
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>85</b>
<b>9</b>	<b>Curriculum vitae .....</b>	<b>86</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Zusammenfassende Darstellung der mikroglialen Funktionen.....	9
Abb. 1.2: Strukturformel von 7,8-DHF.....	17
Abb. 4.1: Einfluss von 7,8-DHF auf das Zellüberleben der Mikroglia.....	39
Abb. 4.2: Einfluss von 7,8-DHF auf die Morphologie primärer Mikroglia.....	41
Abb. 4.3: Einfluss von 7,8-DHF auf die NO-Freisetzung von Mikroglia nach 24 Stunden.....	42
Abb. 4.4: Einfluss von 7,8-DHF auf die iNOS-mRNA-Expression nach 3, 6 und 24 Stunden.....	44
Abb. 4.5: Einfluss von 7,8-DHF auf die TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression nach 3, 6 und 24 Stunden.....	46
Abb. 4.6: Einfluss von 7,8-DHF auf die IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression nach 3, 6 und 24 Stunden.....	48
Abb. 4.7: Einfluss von 7,8-DHF auf die IL-6-mRNA-Expressionsrate nach 3, 6 und 24 Stunden.....	50
Abb. 4.8: Einfluss von 7,8-DHF auf die COX-2-mRNA-Expressionsrate nach 3, 6 und 24 Stunden.....	52
Abb. 4.9: Einfluss von 7,8-DHF auf die TNF- $\alpha$ -Freisetzung nach 6 und 24 Stunden.....	54
Abb. 4.10: Einfluss von 7,8-DHF auf die IL-6-Freisetzung nach 6 und 24 Stunden.....	56
Abb. 4.11: Einfluss von 7,8-DHF auf die ERK1/2- und p38-Phosphorylierung in Mikroglia nach 30-minütiger Stimulation als repräsentativer Blot.....	57
Abb. 4.12: Densitometrische Auswertung des Einflusses von 7,8-DHF auf die ERK1/2-Phosphorylierung in Mikroglia nach 30-minütiger Stimulation.....	58
Abb. 4.13: Densitometrische Auswertung des Einflusses von 7,8-DHF auf die p38- Phosphorylierung in Mikroglia nach 30-minütiger Stimulation.....	59

## Abkürzungsverzeichnis

7,8-DHF	7,8-Dihydroxyflavon
APC	Antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosintri-phosphat
BDNF	Brain-derived-neurotrophic factor
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
DAMPs	damage-associated molecular patterns

---

DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylethylsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ERK1/2	extrazellulär Signal-regulierte Kinase-Kaskade 1/2
GM-CSF	Granulozyten-/ Monozytenkolonie-stimulierender Faktor
GPI	Globus pallidus internus
HVA	Homovanillinsäure
IL-18	Interleukin-18
IL-1Ra	Interleukin-1 Rezeptor Antagonist
IL-1-RAcP	Interleukin-1-Rezeptor-assoziiertes Protein
IL-1RI	Interleukin-1-Rezeptor I
IL-1RII	Interleukin-1-Rezeptor II
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 beta
IL-2	Interleukin-2
IL-6	Interleukin-6
IL-6-R	membrangebundener Interleukin-6-Rezeptor
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IPS	idiopathisches Parkinson-Syndrom
JNK	c-Jun N terminale-Kinase
L-DOPA	Levodopa
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
LPS	Lipopolysaccharid
MAO	Monoaminoxidase
MAPKAPK-2/MK2	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2
MAPK-Kaskaden	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskaden
M-CSF	Monozytenkolonie-stimulierender Faktor
MEK1/2	dual-specificity protein kinases

---

MKK	MAPK-Kinase
MKKK	MAPK-Kinase-Kinase
MMP3	Matrix-Metallo-Protease 3
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
NGF	Nervenwachstumsfaktor
NLRs	Nod-like receptors
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthasen
OSM	Oncostatin M
p38	p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase 38
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PGE2	Prostaglandin E2
PRRs	Pattern recognition receptors
qPCR	relative quantitative Real-time PCR
RNS	reaktive nitrogene Spezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sIL-6-R	löslicher Interleukin-6-Rezeptor
SN	Substantia Nigra
SNpc	Substantia nigra pars compacta
STN	Nucleus subthalamicus
TACE	TNF- $\alpha$ konvertierendes Enzym
TGF- $\beta$	transformierender Wachstumsfaktor beta
TLRs	Toll-like receptors

---

TNF-R1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1
TNF-R2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TREM2	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2
UTP	Uridintriphosphat
ZNS	Zentralnervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Zellen des Zentralnervensystems

Das Zentralnervensystem (ZNS) gilt als immunprivilegiertes Organ (Galea *et al.*, 2006), da es zum Schutz der Nervenzellen zahlreiche Mechanismen zur strikten Kontrolle und Unterdrückung von Immunreaktionen besitzt, wie beispielsweise die Blut-Hirn-Schranke (Kamimura *et al.*, 2013). Es besteht zu 10% aus Neuronen und zu 90% aus Gliazellen. Letztere Fraktion wird nochmals unterteilt in die Makroglia, zu denen die Oligodendrozyten und Astrozyten zählen, und in die Mikroglia (Lane *et al.*, 2008).

## 1.2 Neuroinflammatorische Vorgänge im ZNS

Neuroinflammation bezeichnet eine lokale Immunantwort des neuronalen Gewebes auf Verletzungen, Infektionen oder toxische Metabolite im ZNS (Chakraborty *et al.*, 2010).

Die Einleitung einer Immunantwort wird von Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern recognition receptors*, PRRs) initiiert, welche auch von Mikroglia und Astrozyten im Gehirn exprimiert werden (Brandenburg *et al.*, 2008) und sowohl membrangebunden (*Toll-like receptors*, TLRs) als auch in einer löslichen Form im Zytoplasma (*Nod-like receptors*, NLRs) vorliegen. Die PRRs erkennen und binden molekulare Strukturen auf der Oberfläche von Pathogenen (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) sowie endogene Moleküle von gestressten oder nekrotischen Zellen (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs) (Singhal *et al.*, 2014). Eine Bindung von PAMPs oder DAMPs an NLRs resultiert in einer Aktivierung zytoplasmatischer Proteinkomplexe, der sogenannten Inflammasome. Diese aktivieren pro-inflammatorische Caspasen, welche die Vorstufen pro-inflammatorischer Zytokine in die aktive Form überführen (Chakraborty *et al.*, 2010). Eine unkontrollierte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine kann zu der Entstehung neurologischer Erkrankungen beitragen (Di Virgilio *et al.*, 2009).

Eine Schlüsselrolle in der Neuroinflammation spielt die Aktivierung der Mikroglia. Diese werden infolge von Entzündungen, Traumata, Ischämie, Tumoren und Neurodegeneration vor anderen Zellpopulationen aktiviert (Kreutzberg, 1996) und sind somit ein pathologischer Sensor.

Die Neuroinflammation spielt in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen (Frank-Cannon *et al.*, 2009) wie Morbus Parkinson (Hirsch *et al.*, 2011) oder Morbus Alzheimer

(Pimplikar, 2014) sowie psychiatrischer Erkrankungen wie der Depression (Walker *et al.*, 2014) eine Rolle.

### 1.2.1 Mikroglia als immunkompetente Zellen des ZNS

Mikroglia wurden 1919 durch Del Rio Hortega identifiziert (del Rio-Hortega, 1932), der daraufhin ein Konzept von Mikroglia entwickelte und als Postulate in einer Serie von Artikeln zwischen 1919 und 1927 veröffentlichte (Kettenmann *et al.*, 2011).

Mikroglia machen 5-15% aller Zellen des Gehirns (Herrero *et al.*, 2015) und 10% der Gliazellen aus (McGeer und McGeer, 2008). Sie entstehen aus Vorläuferzellen aus dem mesodermalen Dottersack und wandern sehr früh in der Embryonalentwicklung vor Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn ein (Alliot *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2007). Als Leitstruktur bei der Migration dienen Gefäße sowie die weiße Substanz des Gehirns. Mikroglia sind abgeleitet aus der Monozyten-Makrophagen-Linie (Ling und Wong, 1993) und spielen als residente, immunkompetente Zellen des ZNS (Di Virgilio *et al.*, 2009) eine Schlüsselrolle bei neuronalen entzündlichen Prozessen. Mikroglia sind in allen Bereichen des Gehirns und Rückenmarks zu finden (Lane *et al.*, 2008), jedoch variiert ihre Dichte zwischen den verschiedenen Gehirnarealen, wobei in der *Substantia nigra* (SN) die größte Dichte vorliegt (Lawson *et al.*, 1990). Jede Zelle besitzt ihr eigenes Überwachungsgebiet (McGeer und McGeer, 2008) und tastet kontinuierlich mit ihren beweglichen Fortsätzen die Umgebung ab (Nimmerjahn *et al.*, 2005). Ihre Hauptaufgabe ist die Bewahrung vor exogenen und endogenen Störeinflüssen und somit die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase und der Gewebsintegrität. Um dieser Funktion gerecht werden zu können, gibt es verschiedene morphologische Subtypen von Mikroglia:

#### a.) Amöboider Typ

Als perinatale Form der Mikroglia wandert dieser Subtyp aus der Peripherie in das Gehirn ein und erfährt eine morphologische Transformation zu dem ramifizierten Subtyp (Kettenmann *et al.*, 2011). Die Voraussetzung für diese morphologische Transformation ist eine Aktivität von Chlorid-Kanälen (Eder *et al.*, 1998). Zu den die Ramifizierung induzierenden Faktoren gehören Purine sowie von Astrozyten freigesetzte Zytokine wie der transformierende Wachstumsfaktor beta (TGF- $\beta$ ), der Monozytenkolonie-stimulierende Faktor (M-CSF) und der Granulozyten-/ Monozytenkolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) (Wollmer *et al.*, 2001).

### b.) Ramifizierter Typ

Morphologisches Kennzeichen dieses ruhenden, aber nicht passiven Subtyps ist ein kleines Soma mit vielen verzweigten Fortsätzen (Wollmer *et al.*, 2001). Funktionell ähnelt der ramifizierte Typ dem M2-Phänotyp von Makrophagen, da er durch die Sekretion von anti-inflammatorischen und immun-regulatorischen Molekülen ebenfalls zu einer Gewebsreparatur und -regeneration beiträgt (Franco und Fernandez-Suarez, 2015).

Das Verbleiben im Ruhezustand ist von der Dichte der von den Neuronen freigesetzten neuronal inhibierenden Liganden abhängig (Perry, 2012). Zu diesen Liganden zählen CD22, der Nervenwachstumsfaktor (NGF), der *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) oder als membrangebundener Mediator CD47 (Biber *et al.*, 2007).

### c.) Aktivierter (reaktiver) Typ

Eine Aktivierung der Mikroglia kann zum Einen durch neuronal exzitatorische Signale von den Neuronen ausgehen. Als lösliche Mediatoren können hierbei Uridintriphosphat (UTP), Adenosintriphosphat (ATP), Glutamat und die Matrix-Metallo-Protease 3 (MMP3) fungieren und als membrangebundener Mediator der *Triggering receptor expressed on myeloid cells 2* (TREM2)-Ligand (Biber *et al.*, 2007). Zum Anderen weisen Chromogranin A, das C-reaktive Protein, Komponenten des Komplementsystems (McGeer und McGeer, 2008) sowie aggregiertes  $\alpha$ -Synuclein (Zhang *et al.*, 2005) einen aktivierenden Einfluss auf. Auch phagozytiertes Neuromelanin wirkt als potenter Trigger der Neuroinflammation, indem es die Bildung pro-inflammatorischer Zytokine induziert und die dopaminergen Neurone inhibiert (Wilms *et al.*, 2003; Hirsch *et al.*, 2011). Morphologisch ist der aktivierte Typ durch eine runde Zellform mit einem vergrößerten Soma ohne Fortsätze gekennzeichnet. Diese amöboidähnliche Form ist beweglich und kann zur Verletzungsstelle wandern, proliferieren und reaktive Prozesse verstärken. Es kommt zudem zu einer vermehrten Expression von HLA-DR, einem Antigen-präsentierenden Glykoprotein (McGeer und McGeer, 2008). Auch eine Expression von MHC-Klasse-II Molekülen und eine damit verbundene Tätigkeit als antigenpräsentierende Zelle (APC) ist möglich (Sedgwick *et al.*, 1993; Kuric und Ruscher, 2014). Mikroglia im aktivierten Zustand sind die größten und effizientesten Aggregat-Fresszellen (Lee *et al.*, 2008) und phagozytieren z.B. auch aggregiertes  $\alpha$ -Synuclein. Sie weisen

funktionell eine Ähnlichkeit mit den M1-Makrophagen auf (Franco und Fernandez-Suarez, 2015), die durch eine vermehrte Expression pro-inflammatorischer Zytokine charakterisiert werden.

### 1.2.2 Von Mikroglia produzierte pro-inflammatorische Mediatoren

Die aktivierten Mikroglia produzieren pro-inflammatorische Zytokine, Chemokine, Komplementfaktoren und Stickstoffmonoxid (NO) (Herrero *et al.*, 2015). Zytokine sind lösliche Proteine, die Wachstum und Zellproliferation von neuronalen Geweben autokrin oder parakrin regulieren und die Antwort auf Infektionen, Verletzungen, Entzündungen sowie Erkrankungen modellieren (Doll *et al.*, 2014). Zu dieser Gruppe gehören Interleukine, Chemokine, Interferone, Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) und Wachstumsfaktoren.

Im Folgenden soll auf die für diese Doktorarbeit relevanten pro-inflammatorischen Mediatoren weiter eingegangen werden.

#### a.) NO und induzierbare NO-Synthase

NO ist ein bioaktives, freies Radikal, welches eine bedeutende Rolle als Neurotransmitter und Neuromodulator im ZNS spielt (Ghasemi und Fatemi, 2014). In niedrigeren Konzentrationen überwiegt die physiologische Funktion wie Bewahrung der synaptischen Plastizität, Kontrolle von Körpertemperatur, Appetit, Neurosekretion und Schlaf, wohingegen es in höheren Konzentrationen in die Pathogenese von diversen neurologischen Erkrankungen wie Schlaganfall und neurodegenerativen oder neuroinflammatorischen Erkrankungen involviert ist (Calabrese *et al.*, 2007).

Die Synthese wird von Calmodulin-abhängigen NO-Synthasen (NOS) katalysiert, welche die Aminosäure L-Arginin zu L-Citrullin und NO umwandeln. Die NOS-Familie besteht aus drei Isoformen: neuronale NOS (nNOS, TypI), endotheliale NOS (eNOS, TypIII) und induzierbare NOS (iNOS, TypII).

Die NOS von Endothelzellen (eNOS) und Neuronen (nNOS) werden konstitutiv exprimiert und durch eine erhöhte intrazelluläre Kalzium-Konzentration aktiviert (Bredt, 2000). Die NF- $\kappa$ B-vermittelte Expression der iNOS in Astroglia und Mikroglia wird hingegen durch einen akuten inflammatorischen Stimulus ausgelöst. Zudem ist die Aktivität Kalzium-unabhängig. Die Expression ist somit nicht konstitutiv, sondern findet unter pathologischen Bedingungen wie Trauma, Ischämie, neurotoxischen oder

inflammatorischen Schäden statt (Galea *et al.*, 1992). Alle drei NOS nutzen NADPH als Elektronendonator (Bredt, 2000).

Infolge einer vermehrten Aktivität von NOS kommt es zu einer Überproduktion von NO, wodurch vermehrt reaktive nitrogene Spezies (RNS) gebildet werden. Vor allem Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>), das am stärksten toxische Derivat von NO, fällt vermehrt an und führt über die Beeinflussung der mitochondrialen Funktion zu oxidativem Stress. Zudem inhibiert es die Ribonukleotid-Reduktase, welche die Umwandlung von RNA zu DNA katalysiert, und führt zu Doppelstrangbrüchen (Ghasemi und Fatemi, 2014).

#### b.) TNF- $\alpha$

Hauptvertreter der TNF-Superfamilie mit 19 Liganden ist TNF- $\alpha$  (Aggarwal, 2003). Die membrangebundene Vorstufe dieses Zytokins hat ein Molekulargewicht von 26 kDa und wird im ZNS als transmembranes Polypeptid von Mikroglia und Astrozyten als Monomer synthetisiert (Naude *et al.*, 2011).

Das TNF- $\alpha$  konvertierende Enzym (TACE) kann das Polypeptid an der Membranoberfläche schneiden, wodurch ein 17 kDa großes TNF- $\alpha$  Protein entsteht, welches sich mit 2 anderen TNF- $\alpha$  Proteinen zu einem 51 kDa großen, bioaktiven, löslichen Homotrimer zusammenlagert (Sriram und O'Callaghan, 2007; Brenner *et al.*, 2015). TNF- $\alpha$  kann an zwei verschiedene Rezeptoren binden: TNF-R1 (p55) und TNF-R2 (p75). TNF-R1 befindet sich auf vielen Zellen und ist durch beide Formen des TNF- $\alpha$  gleichermaßen zu aktivieren (Faustman und Davis, 2010). Hingegen befindet sich TNF-R2 auf Zellen des Immunsystems und Neuronen und besitzt eine größere Affinität für die membrangebundene Form des TNF- $\alpha$  (Lane *et al.*, 2008). Je nach Rezeptorbindung werden unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt (Akassoglou *et al.*, 2003). Eine Exposition von Zellen mit TNF- $\alpha$  kann zu Apoptose oder zu einer Expression der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 mit nachfolgender Aktivierung pro-inflammatorischer Gene führen.

Ein erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentration ist je nach Erkrankung in unterschiedlichen Gehirnregionen bei Meningitis, Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Multipler Sklerose vorzufinden (Sriram und O'Callaghan, 2007). TNF- $\alpha$  spielt jedoch auch bei der Induktion des septischen Schocks (Ali *et al.*, 2015), bei Autoimmunerkrankungen, rheumatoider Arthritis (Feldmann und Maini, 2008) sowie Diabetes (Xu *et al.*, 2015) eine Rolle.

### c.) Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

Die Interleukin-1 Familie besteht aus 11 Mitgliedern, zu denen unter anderem die zwei IL-1-Isoformen IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , der IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1Ra), die IL-1-Rezeptoren (IL-1RI, IL-1RII), das IL-1-Rezeptor-assoziierte Protein (IL-1RAcP) sowie das Interleukin-18 (IL-18) zählen (Dinarello, 2013). Die aktive Form von IL-1 $\beta$  besitzt ein Molekulargewicht von 17,3 kDa und die primären Quellen dieses Zytokins sind Monozyten, Gewebsmakrophagen, dendritische Zellen und Lymphozyten (Joosten *et al.*, 2013), aber IL-1 $\beta$  kann auch von Tumoren, wie z.B. dem Melanom, produziert werden (Dinarello, 2009; Okamoto *et al.*, 2010).

Die Synthese von IL-1 $\beta$  kann auf zwei Wegen induziert werden. Dies kann zum Einen durch Bindung von nicht-TLR-Liganden an ihre Rezeptoren initiiert werden. In diesem Fall wird die IL-1 $\beta$ -mRNA zwar zu Polyribosomen zusammengefügt, erfährt jedoch keine nennenswerte Elongation und wird zum größten Teil intrazellulär abgebaut (Kaspar und Gehrke, 1994). Zum Anderen kann die Synthese *in vivo* und bei Monozyten *in vitro* durch die Bindung von IL-1 $\beta$  an den IL-1RI induziert werden (Dinarello *et al.*, 1987). Die darauffolgende Konformationsänderung des Rezeptors begünstigt eine Anlagerung von IL-1RAcP und somit die Bildung eines Heterodimers.

Nach erfolgter Transkription und Translation wird eine inaktive, ca. 31 kDa große Vorstufe von IL-1 $\beta$  in das Zytosol freigesetzt, welches die Caspase-1 in das reife IL-1 $\beta$  überführt (Dinarello, 2009; Idris *et al.*, 2015).

IL-1 $\beta$  ist physiologischerweise an der Regulierung des niedrigwelligen Schlafes (Krueger *et al.*, 2001), der Körpertemperatur (Repa *et al.*, 2015), der neuroendokrinen Funktion und der peripheren Immunfunktion (Cartmell *et al.*, 2001) beteiligt. Aber auch bei inflammatorischen Prozessen ist IL-1 $\beta$  ein Schlüsselindikator, da die Konzentration nach neurotoxischen Stimuli stark ansteigt (Allan *et al.*, 2005). IL-1 $\beta$  wirkt als Costimulator der T-Zell-Funktion, indem es die Lymphozytenfunktion indirekt über die Induktion der Genexpression sowie die Synthese von Cyclooxygenase-2 (COX-2), induzierbarer NO-Synthase (iNOS), Prostaglandin E2 (PGE2) und NO beeinflusst (Dinarello, 2009). Zudem wirkt IL-1 $\beta$  als potenter Stimulator der IL-6-Freisetzung (Hu *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2015).

#### d.) Interleukin-6 (IL-6)

Die der IL-6-Familie zugehörigen Mitglieder wie IL-6, IL-11, Leukämie inhibierender Faktor (LIF) und Oncostatin M (OSM) weisen das Transmembranprotein gp130 als Rezeptor und Signalverstärkungseinheit auf (Scheller *et al.*, 2011).

Interleukin-6 besitzt ein Molekulargewicht von 20-30 kDa und wird unter anderem von Monozyten, T-Zellen, Fibroblasten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen synthetisiert (Schaper und Rose-John, 2015). Als starke Stimuli für die Synthese von IL-6 gelten eine Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs und das Zytokin IL-1.

IL-6 kann zwei verschiedene Signalwege schalten, zum Einen den klassischen Weg und zum Anderen das *Trans-Signaling*. Beim klassischen Signalweg bindet IL-6 an den membrangebundenen IL-6-R Rezeptor, welcher nur auf Hepatozyten, neutrophilen Granulozyten, Monozyten und CD4-positiven Zellen exprimiert wird und mit gp130 assoziiert ist. Im Gegensatz dazu bindet IL-6 beim *Trans-Signaling* an eine lösliche Form des Rezeptors (sIL-6-R) und der Komplex aus IL-6 und dem Rezeptor bindet nachfolgend an gp130. Als Entstehungsursache des sIL-6-R kommt eine proteolytische Spaltung der membrangebundenen Form oder in 1-10% der Fälle ein alternatives Spleißen der Transmembrandomäne des kodierenden Exons in Betracht (Wolf *et al.*, 2014). Aufgrund der uniformen Expression von gp130 (Schaper und Rose-John, 2015) können alle Zellen mithilfe des *Trans-Signaling* durch IL-6 aktiviert werden.

IL-6 spielt eine entscheidende Rolle bei dem Übergang der angeborenen zur erworbenen Immunabwehr, indem es die Neutrophilen-anlockenden Chemokine unterdrückt und die Monozyten-anlockenden Chemokine verstärkt und somit zu einer verstärkten Rekrutierung von Monozyten führt (Scheller *et al.*, 2011). IL-6 stimuliert jedoch ebenfalls die B-Zell-Differenzierung zu Antikörper-sezernierenden Zellen (Muraguchi *et al.*, 1988), die Differenzierung myeloider Zellen zu Makrophagen, die Hämatopoese, die Expression von Akut-Phase-Proteinen in der Leber sowie die Regulierung des Knochenmetabolismus (Hirano, 1998). Eine Überproduktion von IL-6 kann zu pathologischen Krankheitsbildern führen, wie beispielsweise der rheumatoiden Arthritis, der juvenilen idiopathische Arthritis oder Morbus Crohn (Nishimoto, 2005).

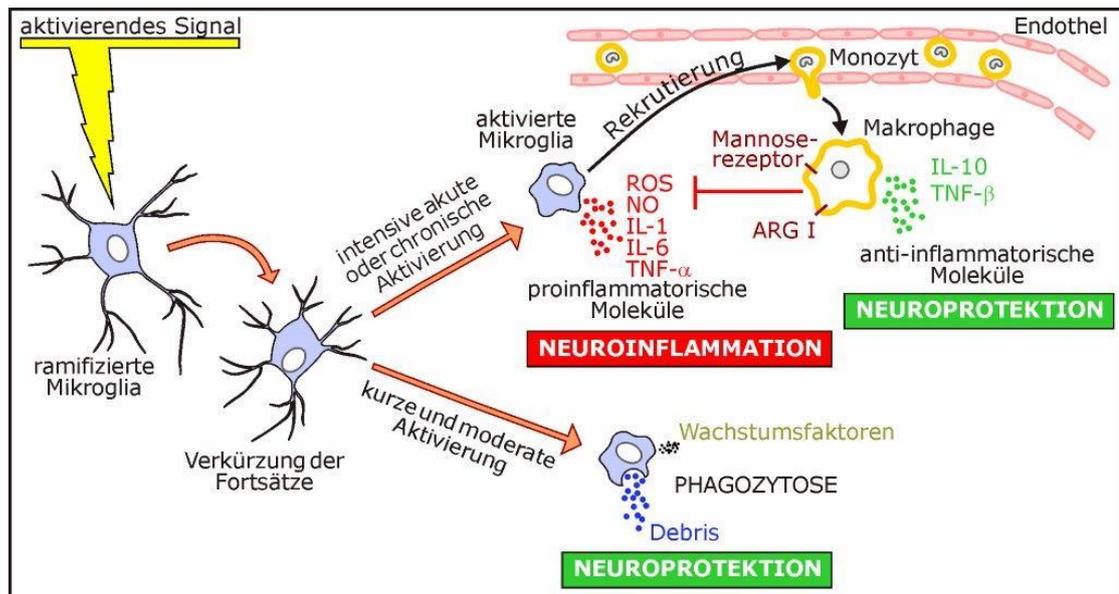
### e.) Cyclooxygenase-2 (COX-2)

Das Enzym Cyclooxygenase katalysiert den ersten Schritt in der Synthese von Prostaglandinen (Hinz und Brune, 2002). Die Cyclooxygenase besitzt zwei Isoformen, die Cyclooxygenase-1 (COX-1) und die COX-2, welche zu 60% homolog sind und von unterschiedlichen Genen transkribiert werden (Weinberg, 2000).

COX-1 wird als „*housekeeping* Enzym“ in nahezu allen Zellen konstitutiv exprimiert und vermittelt physiologische Funktionen, wie beispielsweise eine Zytrotektion des Magens oder eine Blutplättchenaggregation (Kim *et al.*, 2013).

Hingegen wird COX-2 unter inflammatorischen Bedingungen von Makrophagen oder Monozyten infolge eines Stimulus mit IL-1, TNF- $\alpha$ , Lipopolysaccharid (LPS), Interleukin 2 (IL-2), GM-CSF, G-CSF und TGF- $\beta$  exprimiert (Weinberg, 2000; Hinz und Brune, 2002). COX-2 synthetisiert aus Arachidonsäure Prostaglandin H<sub>2</sub>, welches als Substrat für die Herstellung bioaktiver Lipide wie Prostaglandin E<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>, F<sub>2</sub> sowie Prostacyclin und Thromboxan A<sub>2</sub> dient. COX-2 wird in spezifischen neuronalen Populationen exprimiert, wie beispielsweise im *Gyrus dentatus*, der *Amygdala* oder im *piriformen Kortex*.

Es ist noch nicht abschließend geklärt, inwieweit COX-2 zu neuronalen Schädigungen beiträgt. Als Hypothesen wurde die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch die Peroxidase-Aktivität von COX-2, die Produktion von Prostaglandinen mit Aktivierung ihrer Rezeptoren sowie eine Prostaglandin E<sub>2</sub> vermittelte Glutamat-Freisetzung aus Astrozyten diskutiert (Lane *et al.*, 2008).



**Abb. 1.1: Zusammenfassende Darstellung der mikroglialen Funktionen.** Mikroglia verändern infolge eines aktivierenden Signals ihre Morphologie, indem sie ihre Fortsätze verkürzen und ihr Soma vergrößern. Ist das aktivierende Signal von kurzer Dauer, bewirken Mikroglia über eine Phagozytose von Zelldebris und die Freisetzung von Wachstumsfaktoren eine Neuroprotektion. Im Gegensatz dazu bewirkt eine intensive akute oder chronische Aktivierung der Mikroglia eine exzessive Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren. Zusätzlich regen aktivierte Mikroglia die Differenzierung von im Blut zirkulierenden Monozyten zu Makrophagen an, deren Mannoserezeptoren die von den Mikroglia sezernierten pro-inflammatorischen Zytokine binden und dadurch die Freisetzung anti-inflammatorischer Zytokine initiieren können (verändert nach London *et al.*, 2013).

### 1.3 Morbus Parkinson als neurodegenerative Erkrankung

Morbus Parkinson, auch bekannt unter dem Synonym Schüttellähmung, wurde erstmals von James Parkinson in „An Essay on the Shaking Palsy“ beschrieben (Parkinson, 1817). Die Erkrankung manifestiert sich als hypokinetisches-hypertones Syndrom mit den Kardinalsymptomen *Tremor*, *Rigor*, *Akinese*, posturale Instabilität sowie vegetativen Störungen. Pathogenetisch liegt der Krankheit eine chronisch progrediente Degeneration der *nigrostriatalen* dopaminergen Neurone zugrunde (Masuhr und Neumann, 2007; Goedert, 2015).

#### 1.3.1 Epidemiologie

Morbus Parkinson ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung (Goedert, 2015). Die Krankheit manifestiert sich überwiegend im höheren Lebensalter ab der 6. Lebensdekade, nur 5% der Betroffenen sind unter dem 40. Lebensjahr (Herrera *et al.*, 2015). Die Zahl der Erkrankten liegt weltweit bei über 10 Millionen (Abdullah *et al.*, 2014), allein in Deutschland sind 250.000-400.000 Menschen betroffen. Die Prävalenz in Deutschland lag 2012 laut der

Deutschen Gesellschaft für Neurologie bei 100-200 Erkrankten auf 100.000 Einwohner, wobei sie mit zunehmendem Alter ansteigt.

### 1.3.2 Klassifikation

Es treten verschiedene Formen des Morbus Parkinson auf (Gerlach *et al.*, 2007):

1. Idiopathisches Parkinson-Syndrom

Das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS) wird auch als primäre Parkinson-Krankheit bezeichnet und weist eine unklare Genese auf. Auf diese Form des Parkinsons wird im Folgenden weiter eingegangen.

2. Idiopathisches Parkinson-Plus-Syndrom

Diese Form tritt in Kombinationen mit anderen neurologischen Symptomen wie multisystematischer Atrophie, progressiver supranukleärer Blicklähmung, kortikobasaler Degeneration und Lewy-Körperchen-Demenz auf.

3. Sekundäres Parkinson-Syndrom

Beim sekundären Parkinson-Syndrom (Pseudoparkinsonismus) ist die Genese der Erkrankung bekannt, zum Beispiel können als Auslöser Medikamente wie Neuroleptika oder  $\alpha$ -Methyl-Dopa fungieren. Des Weiteren können die Ursachen toxischer oder traumatischer Art sein.

### 1.3.3 Ätiologie des Morbus Parkinson

Bei dieser multifaktoriellen, komplexen Erkrankung ist der neurodegenerative Prozess nicht durch eine alleinige Ursache zu erklären, vielmehr kommt es zu einem Zusammenwirken mehrerer Faktoren, die die Entstehung der Krankheit begünstigen (Gerlach *et al.*, 2007). Folgende Faktoren können in der Krankheitsentstehung von Bedeutung sein:

1. Alterungsprozesse

Als größter Risikofaktor gilt zunehmendes Alter (Schapira und Jenner, 2011). Ein höheres Lebensalter ist mit einer vergrößerten mitochondrialen Dysfunktion assoziiert (Hindle, 2010), durch die vermehrt ROS gebildet werden (Moon und Paek, 2015). Die dadurch bedingte Erhöhung des oxidativen Stresses kann DNA-Mutationen zur Folge haben. Jedoch sinkt mit einem höheren Lebensalter die Fähigkeit, zelluläre Schäden zu tolerieren (Obeso *et al.*, 2010). Ein möglicher Grund hierfür kann die reduzierte Anzahl der antioxidativen Proteine (Peroxiredoxin) sein (Abdullah *et al.*, 2014).

## 2. Oxidativer Stress

Die SN ist prädisponiert für oxidativen Stress. Zum Einen liegt dieses an der erhöhten Konzentration von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Ammoniak ( $NH_3$ ), die aufgrund des hohen Dopaminumsatzes bei der Metabolisierung von Dopamin durch die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) und die Monoaminoxidase (MAO) entsteht. Zum Anderen begünstigt die große Eisenbindungskapazität des Neuromelanins und der dadurch bedingte hohe Eisengehalt der SN die Entstehung von Hydroxylradikalen. Zusätzlich führt eine erniedrigte Komplex-I-Aktivität in der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) zur Bildung von ROS (Janetzky *et al.*, 1994). Infolge der vermehrten Radikalbildung wird weniger ATP produziert und der Energiestoffwechsel gestört. Zudem erfolgt eine Schädigung der mitochondrialen DNA (mtDNA) und infolgedessen verdreifacht sich die 8-Hydroxydeoxyguanosin-Konzentration im *Nucleus caudatus* und der SN. Somit stellt die 8-Hydroxydeoxyguanosin-Konzentration einen geeigneten Marker für das Ausmaß des oxidativen Stresses dar.

## 3. Exogene und endogene Toxine

Auch Toxine wie Pestizide (z.B. Rotenon), Metalle (z.B. Mangan und Blei) oder toxische Lösungsmittel kommen als Auslöser des Morbus Parkinson in Betracht (Hindle, 2010). Es gibt allerdings bisher keine Hinweise darauf, dass ein klassisches Neurotoxin der Auslöser dieser Krankheit ist. Genetisch prädisponierte Patienten zeigen jedoch eine erhöhte Empfindlichkeit auf 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) -ähnliche Verbindungen mit der Folge eines gesteigerten Risikos für das IPS (Jenner, 2001).

## 4. Genetische Prädisposition

Es wird vermutet, dass der familiäre Morbus Parkinson polygenetisch determiniert ist, da eine Mutation an 13 verschiedene Genloci als Auslöser der Erkrankung fungieren kann (Hindle, 2010).

## 5. Neuronale Dysfunktion durch Protein-Aggregate

Infolge einer gestörten Proteolyse mutierter oder geschädigter Proteine in der SN können diese zu Einschlusskörperchen aggregieren (Taylor *et al.*, 2002). Die Entstehung dieser Lewy-Körperchen führt zu einer Dysfunktion mit nachfolgendem Untergang von Neuronen und somit zur Entstehung von Morbus Parkinson.

## 6. Neuroinflammatorische Vorgänge

McGeer und McGeer (McGeer und McGeer, 2008) wiesen erstmalig in der SN von Parkinson-Patienten *post mortem* aktivierte Mikroglia sowie pro-inflammatorische

Zytokine nach. Infolgedessen ist auch die Konzentration von IL-2, IL-4 und IL-6 in der *cerebrospinalen* Flüssigkeit der Parkinson-Patienten erhöht (Hirsch und Hunot, 2009). Da die Entzündungsmediatoren die Blut-Hirn-Schranke schädigen, verliert das Gehirn sein Immunprivileg. Somit können periphere Blutzellen in das Gehirn migrieren mit der Folge einer erhöhten Dichte an CD8- und CD4- positiven T-Zellen im Gehirn an Morbus Parkinson erkrankter Patienten (Brochard *et al.*, 2009). Die neuroinflammatorischen Vorgänge können den neuronalen Zelltod dopaminerger Neurone induzieren (Hernandez-Romero *et al.*, 2008).

### 1.3.4 Klinisches Bild des Morbus Parkinson

Die vier Kardinalsymptome des Morbus Parkinson (*Tremor*, *Rigor*, *Akinese*, posturale Instabilität) sind selten zu Beginn der Erkrankung nachweisbar, da sie erst ab einem neuronalen Verlust von über 50% klinisch manifest werden (Antonini und DeNotaris, 2004). Es können jedoch Frühsymptome wie ein Verlust der Riechfunktion (Sommer *et al.*, 2004) oder eine Farbdiskriminierung (Buttner *et al.*, 1995; Bertrand *et al.*, 2012) auftreten.

Nach einer präklinischen Phase von 5 bis 20 Jahren folgt die klinische Manifestation der bereits genannten Kardinalsymptome, wobei die *Bradykinese* ein obligates Kardinalsymptom darstellt (Schwarz und Storch, 2007) und bei 77-98% der Patienten auftritt (Gelb *et al.*, 1999). Kennzeichnend ist eine Verlangsamung der Initiation von Willkürbewegungen mit einer progressiven Abnahme der Geschwindigkeit und Amplitude bei repetitiven Aktionen. Meist beginnt der Morbus Parkinson im Bereich der Arme, nach 1-2 Jahren kann ein kleinschrittiges Gangbild, eine Starthemmung, eine Unfähigkeit anzuhalten (*Festination*) und eine erhöhte Fallneigung vorliegen. Als Frühsymptom tritt häufig eine Verkleinerung der Schrift auf. Von der *Bradykinese* ist die *Akinese* abzugrenzen, bei der sämtliche willkürliche motorische Entäußerungen sistieren (Gerlach *et al.*, 2007).

Als *Rigor* wird die Erhöhung des Muskeltonus bezeichnet, der in einem fühlbaren wächsernen Widerstand bei passiven Bewegungen resultiert. Typischerweise kommt es zum Auftreten des Zahnradphänomens mit dem Gefühl eines Knarrens oder Stockens durch ein ruckartiges Nachgeben des Muskelwiderstandes infolge einer anhaltenden Kokontraktion der antagonistischen Muskulatur (Gerlach *et al.*, 2007).

Der *Tremor* ist meist ein kleinamplitudiger Ruhetremor von 4-6 Hertz, bei dem es zu einer unwillkürlichen rhythmischen Oszillation eines oder mehrerer Körperteile kommt. Er beginnt häufig einseitig in den distalen Extremitäten und wird an den Händen auch als „Pillendreher-

Tremor“ bezeichnet. Dieses Symptom ist das markanteste Kardinalsymptom (Schwarz und Storch, 2007) und tritt bei 79-90% der Patienten auf (Gelb *et al.*, 1999).

Die posturale Instabilität als Störung der Stell-und Haltereфлекse tritt meist erst in späteren Stadien auf. Hierbei reagiert der Patient unsicher auf Stoßen und neigt zu Ausfallschritten oder Stürzen.

Zusätzlich zu den Kardinalsymptomen können auch andere Symptome vorkommen, wie zum Beispiel psychiatrische Störungen. 30-80% der Parkinson-Patienten leiden unter Depressionen und 20% der Parkinson-Patienten an Demenz (Aarsland *et al.*, 2003)

### 1.3.5 Neuropathologie

Neuropathologisches Korrelat des Morbus Parkinson ist eine Degeneration neuromelaninhaltiger dopaminergener Neurone der SNpc (George *et al.*, 2013). Hierbei ist ein Gradient des Verlustes von *ventral* bzw. *medial* nach *dorsal* bzw. *lateral* zu verzeichnen (Gibb und Lees, 1991).

Ein weiteres neuropathologisches Merkmal des Morbus Parkinson sind Ubiquitin und  $\alpha$ -Synuclein positive, hyaline Einschlusskörperchen (Lewy-Körperchen) in den verbleibenden dopaminergen Neuronen der SNpc (Andersen, 2000). Die frühesten Einschlüsse sind in dem motorischen Kern des *Nervus vagus* sowie dem *Bulbus olfactorius* vorzufinden (Braak *et al.*, 2004), sie können aber auch in der SN und anderen pigmentierten Kerngebieten auftreten. Anhand der Verteilung der Lewy-Körperchen ist eine neuropathologische Stadieneinteilung möglich (Braak *et al.*, 2004):

- I. präsymptomatisches Stadium 1+2: Lewy-Körperchen in der *Medulla oblongata*, im *Bulbus olfactorius* und dem hinteren Vaguskern
- II. symptomatisches Stadium 3+4: Lewy-Körperchen im Mittel- und basalen Vorderhirn
- III. Endstadium 5+6: Lewy-Körperchen im telenzephalen Kortex

Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass der Entstehung von Lewy-Körperchen eine neuronale Dysfunktion und ein neuronaler Zellverlust vorangehen (Milber *et al.*, 2012). Die Lewy-Körperchen in den dopaminergen Neuronen der SN scheinen eine Aggresomen-ähnliche neuroprotektive Wirkung auf die Neurone auszuüben, indem sie toxische Proteinaggregate unschädlich machen (Olanow *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006).

### 1.3.6 Neurochemie

Ein neuronaler Zellverlust korreliert mit einer massiven Erniedrigung der Dopaminkonzentration im *Striatum* (Bernheimer *et al.*, 1973; Ba und Martin, 2015), wobei dieser Dopaminmangel im *Putamen* stärker ausgeprägt ist als im *Nucleus caudatus*. Bis zu einem Verlust von 50% der Neurone kann der Dopaminmangel durch die Plastizität des Gehirns kompensiert werden, indem die funktionstüchtigen Neurone mehr Dopamin produzieren (Brandt, 2007).

Infolge der verringerten Dopaminkonzentration liegen geringere Mengen der Dopaminmetabolite Homovanillinsäure (HVA) und 3,4-Dihydroxyphenylethylsäure (DOPAC) sowie eine verringerte Aktivität der Dopa-Decarboxylase vor. Auch die Dichte der Dopamin-Wiederaufnahmestellen ist reduziert (Gerlach *et al.*, 2007). Hingegen ist die Aktivität cholinergischer striataler Interneurone gesteigert. Das vermehrt ausgeschüttete Acetylcholin bewirkt eine tonisch gesteigerte neuronale Aktivität in den striatalen Projektionsneuronen zum *externen Pallidum*, im *Nucleus subthalamicus* sowie in den Ausgangskernen der *Basalganglien* (Brandt, 2007).

### 1.3.7 Therapie

Man unterscheidet die medikamentöse von der operativen Therapie des Morbus Parkinson.

Die medikamentöse Therapie zielt darauf ab, den Dopaminmangel direkt oder indirekt zu beheben und somit eine Besserung der Symptome zu bewirken. Als erste Anti-Parkinson-Medikamente gelten Anticholinergika, die 1867 von Ordenstein gegen die Salivation bei Parkinson-Patienten eingesetzt wurden (Ordenstein, 1867). Der entscheidende Durchbruch in Form einer rational begründeten medikamentösen Therapie des Morbus Parkinson fand 1969 mit der Levodopa (L-Dopa)-Therapie durch den Amerikaner Cotzias statt (Gerlach *et al.*, 2007).

L-Dopa kann als Aminosäure die Blut-Hirn-Schranke überwinden und wird darauffolgend durch die zentrale Decarboxylase in Dopamin umgewandelt. Für eine Inhibition des Abbaus in der Peripherie wird L-Dopa immer mit einem Dopa-Decarboxylase (DDC)-Inhibitor kombiniert (Schwarz und Storch, 2007). L-Dopa gilt aufgrund der höchsten Ansprechrate und der besten Verträglichkeit momentan als „Goldstandard“, mit Indikationsspektrum vor allem bei älteren, dementen oder multimorbiden Patienten (Jost *et al.*, 2001; Rascol *et al.*, 2015). Es ist allerdings nicht das Mittel der Wahl für die Initialtherapie, da L-Dopa auch Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, orthostatische Hypertonie oder Halluzinationen

verursachen kann (Fahn *et al.*, 2004; Schwarz und Storch, 2007). Als größte Komplikation gilt jedoch, dass bei 10-15 % der Patienten pro Jahr die Motorflexionen und Dyskinesien nach einer Latenzzeit von einigen Jahren zunehmen (Jost *et al.*, 2001).

Dopaminagonisten wie Apomorphin binden direkt an Dopaminrezeptoren, vor allem an D2 und D3, und aktivieren diese (Brandt, 2007). Im Vergleich zu L-Dopa ist die klinische Wirksamkeit und Verträglichkeit geringer. Auch Nebenwirkungen treten häufiger und in ausgeprägterer Form auf (Schwarz und Storch, 2007).

MAO-B-Hemmer oder COMT-Hemmer hemmen metabolisierende Enzyme und verlängern somit die Wirksamkeit von Dopamin im synaptischen Spalt. Sie werden immer als Kombinationstherapie mit L-Dopa gegeben, da ihre symptomatische Wirkung gering ist.

Die operative Therapie ist eine Therapieoption für schwerstbetroffene Patienten, bei denen Medikamente keine Besserung der Symptome bewirken und dadurch die Lebensqualität erheblich eingeschränkt wird (Chapuis *et al.*, 2005; Gerlach *et al.*, 2007).

Die Thermokoagulation ist ein invasives Verfahren, bei dem mithilfe einer heißen Sonde und Hitze bestimmte Areale des Gehirns koaguliert werden. Aufgrund der hohen Komplikationsrate wie Dysarthrie, Gesichtsfelddefekte oder Paresen und der eingeschränkten beidseitigen Anwendbarkeit wird dieses operative Verfahren nur noch bei Sonderindikationen durchgeführt.

Die Neurostimulation (*Deep brain stimulation*) wurde in den 80er Jahren durch Professor Benabid in Grenoble entwickelt. Hierbei wird in der 1. Sitzung eine stereotaktische Implantation der Elektrode bei erhaltenem Bewusstsein durchgeführt. In den letzten Jahren haben sich als Zielorte der Implantation der *Nucleus subthalamicus* (STN) sowie der *Globus pallidus internus* (GPi) etabliert (Udupa und Chen, 2015). Der STN ist Teil eines indirekten Signalweges durch die Basalganglien und weist eine kleinere Größe auf, wohingegen der GPi Teil eines direkten Signalweges durch die Basalganglien ist und einen deutlich größeren Zielort darstellt (Krause *et al.*, 2001). In der 2. Sitzung wird der Impulsgeber infraklavikulär in Intubationsnarkose implantiert. Voraussetzung für diese operative Therapie ist ein positiver L-Dopa-Test zum Ausschluss eines Nicht-IPS und Abschätzung des bestmöglichen Ergebnisses. Kontraindiziert ist dieses Verfahren bei Patienten über 75 Jahren, schwerer Hirnatrophie, Begleiterkrankungen und manischen oder depressiven Störungen (Bronstein *et al.*, 2011). Bei dieser operativen Therapie haben sich die Kardinalsymptome nach 5 Jahren um 50-60% verbessert (Krack *et al.*, 2003). Auch die Dyskinesien konnten um 70-100% reduziert werden (Volkman *et al.*, 2013).

Das Hauptproblem der gegenwärtigen Therapie stellt die reine Behandlung der klassischen Symptome dar, komplexere motorische Formen wie beispielsweise Sturzneigung, *Freezing* oder nichtmotorische Syndrome erfahren durch die aktuellen Therapiekonzepte keine Besserung. Ein weiteres Problem ist die Zunahme der Dyskinesien unter L-Dopa Therapie nach einer Latenzzeit.

Bisher ist noch keine kausale Therapie vorhanden und der Morbus Parkinson gilt somit, mit Ausnahme der sekundären Parkinson-Erkrankung, als unheilbar. Jedoch kann durch eine rechtzeitige, gezielte symptomatische Therapie die Lebensqualität sowie die Lebenserwartung betroffener Patienten bedeutend gesteigert werden.

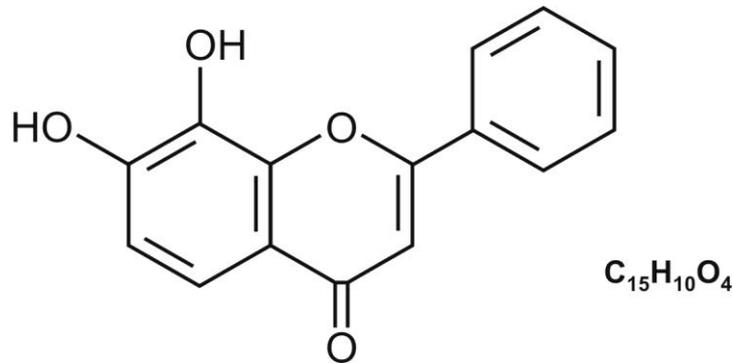
#### **1.4 7,8-Dihydroxyflavon**

Auf der Suche nach einem möglichen Therapeutikum, welches die schädliche lokale Immunreaktion des neuronalen Gewebes unterbindet und somit anti-inflammatorisch wirkt, wurde in dieser Doktorarbeit die Wirkung von 7,8-Dihydroxyflavon auf Mikroglia *in vitro* untersucht. 7,8-Dihydroxyflavon (7,8-DHF), auch bekannt als Vitamin P, gehört zu der Gruppe der Flavonoide. Derzeit sind 8000 verschiedene Vertreter dieser Gruppe bekannt (Iwashina, 2015). Aufgrund ihrer Struktur werden Flavonoide in 6 Gruppen unterteilt: Flavonole, Flavanole, Isoflavone, Anthocyanidine, Flavanone sowie Flavone (Solanki *et al.*, 2015). Flavonoide sind als sekundäre Pflanzenstoffe (Dixon und Steele, 1999) in Tee, Wein, Gemüse und Früchten zu finden (Harborne und Williams, 2000). Ihnen werden anti-allergische, anti-inflammatorische, anti-oxidative und anti-kanzerogene Eigenschaften zugeschrieben.

7,8-DHF wurde im Zuge einer *Screening*-Studie entdeckt, welche das Auffinden kleiner Moleküle mit BDNF-ähnlichen, neurotrophischen Eigenschaften zum Ziel hatte (Jang *et al.*, 2010). Es kommt natürlicherweise in *Godmania aesculifolia*, *Tridax procumbens* und in den Blättern der Primeln vor (Du und Hill, 2015).

### 1.4.1 Chemische Struktur

7,8-Dihydroxyflavon besitzt drei Kohlenstoffringe, bestehend aus zwei aromatischen Phenylringen (A- und B-Ring) und einem zentralen heterozyklischen  $\gamma$ -Pyrone-Ring (C-Ring). Letzterer ist für das basische Verhalten und Salzbildung verantwortlich. An Position 7 und 8 befindet sich eine OH-Gruppe.



**Abb. 1.2: Strukturformel von 7,8-DHF.** (Gezeichnet von Clemens Franke aus dem Anatomischen Institut, Kiel)

### 1.4.2 Eigenschaften

7,8-DHF ist ein kleines Molekül mit einer Molekülmasse von 254 kDa, welches die Blut-Hirn-Schranke passieren kann (Devi und Ohno, 2012). Es ist ein TrkB-Rezeptor-Agonist für Neurone und Motoneurone im Hippocampus.

7,8-DHF unterstützt dosisabhängig das neuronale Wachstum (Tsai *et al.*, 2013) und dämpft die Entwicklung eines depressiven Phänotyps (Zhang, J. C. *et al.*, 2015). Zudem weist 7,8-DHF protektive Funktionen auf. So trägt es zur Vorbeugung von synaptischem Verlust und Gedächtnisdefiziten bei (Devi und Ohno, 2012) und schützt vor Apoptose (Jang *et al.*, 2010). Diese apoptotische Protektion geschieht durch eine Vermeidung von DNA-Schäden wie z.B. DNA-Doppelstrangbrüchen durch Schutz vor  $H_2O_2$  (Zhang *et al.*, 2009). Zusätzlich wird die Phosphorylierung von Histonen verringert und die Anzahl der Annexin-V positiven Zellen gesenkt (Kang *et al.*, 2015). 7,8-DHF wirkt anti-inflammatorisch, indem es die LPS-induzierte Produktion von pro-inflammatorischen Schlüsselmediatoren wie NO, PGE2 und IL-1 $\beta$  über eine sinkende NF- $\kappa$ B Aktivität und Inaktivierung des Signalweges senkt (Park *et al.*, 2012).

## 1.5 Zielsetzung

In dieser Arbeit soll der Einfluss von 7,8-DHF auf primäre Mikroglia *in vitro* unter folgender Fragestellung untersucht werden:

1. Welchen Effekt übt 7,8-DHF auf Mikroglia in Ruhe und nach Stimulation mit LPS, einem anerkannten Aktivator von Mikroglia, aus?
  - Welche Konzentration von 7,8-DHF weist eine größtmögliche Wirkung bei niedriger Toxizität auf?
  - Verändert sich die Morphologie der Mikroglia?
  - Welchen Einfluss hat 7,8-DHF auf die Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$ ?
  
2. Mithilfe der Ergebnisse, die aus den Untersuchungen der obig genannten Fragestellungen gewonnen wurden, soll ein möglicher Einsatz von 7,8-DHF zur Neuroprotektion oder Neuroregeneration und damit eine mögliche Eignung als Therapeutikum bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson diskutiert werden.

## 2 Material

### 2.1 Reagenzien

β-Glycerol-Phosphat	Sigma, St. Louis (USA)
Acrylamid / Bisarylamid (29:1)	Serva, Heidelberg (Deutschland)
Ammoniumpersulfat (APS)	Fisher Scientific, Waltham (USA)
Azeton	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Azetonnitril	Sigma, St. Louis (USA)
Bisbenzimid	Sigma, St. Louis (USA)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg (Deutschland)
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland))
Coomassie Blau	Serva, Heidelberg (Deutschland))
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
Dulbecco's PBS (Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> frei)	PAN Biotech, Aidenbach (Deutschland)
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland))
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
Glutaraldehyd	Merck Schuchardt, Hohenbronn (Deutschland)
Glycin	Appli Chem, Darmstadt (Deutschland)
Glykogen	Sigma, St. Louis (USA)
Griess-Reagenz	Sigma, St. Louis (USA)
Hepes (2-4-2-Hydroxyethyl-1-piperazinyl-Ethansulfonsäure)	Sigma, St. Louis (USA)
Immu-Mount Eindeckmedium	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)

Kaisers-Glyzeringelantine	Merck, Darmstadt (Deutschland)
L-Glutamin	PAN Biotech, Aidenbach (Deutschland)
Lipopolysaccharid (LPS) aus Salmonella typhimurium	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Natriumduodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg (Deutschland)
Natrium-Vanadat	Sigma, St. Louis (USA)
Natrium-Pyrophosphat	Sigma, St.Louis (USA)
Natronlauge (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Penicillin/ Streptomycin	PAN Biotech, Aidenbach (Deutschland)
Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF)	Sigma, St. Louis (USA)
RNase freies A. dest	Anatomisches Institut, Kiel (Deutschland)
Salzsäure (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, St. Louis (USA)
Trishydroxymethyl-aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Trizol	Quiagen, Hilden (Deutschland)
Trypsin	Sigma, St. Louis (USA)
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)

## 2.2 Lösungen und Puffer

Dissoziationslösung	0,024 g	HEPES
	0,020 g	Trypsin
	0,002 g	EDTA
	Ad 10 ml	DMEM (4,5g Glucose /l)
	35 µl	DNase (1 mg/ ml)/ 3 ml Diss-lsg

---

Elektrodenpuffer (Laufpuffer, pH 8,2)	12,2 g	TRIS
	57,6 g	Glycin
	4 g	SDS
	ad 4 l	A. dest
Entfärbelösung für Comassie-Färbung	450 ml	Ethanol
	100 ml	Essigsäure
	ad 450 ml	A. dest
Färbelösung Coomassie	1 g	Coomassie
	450 ml	Methanol
	100 ml	Essigsäure
	450 ml	A. dest
Gelpuffer I für Trenngel (pH 8,8)	45,43 g	Tris HCl (1,5 M)
	1 g	SDS (0,4%)
	ad 250 ml	A. dest
Gelpuffer II für Sammelgel (pH 6,8)	15,1 g	Tris HCl (0,5 M)
	1 g	SDS (0,4%)
	ad 250 ml	A. dest
Kulturmedium zur Stimulation der Mikroglia	500 ml	DMEM (4,5 g Glucose/ ml, 4 nM L-Glutamin)
	60 ml	FKS (bei 56°C inaktiviert)
	6 ml	Penicillin (10000 U/ ml)/ Streptomycin (10 mg/ ml PBS)

---

Kulturmedium für Mikroglia	500 ml	DMEM (4,5 g Glucose/ ml, 4nM L-Glutamin)
	60 ml	FKS (bei 44-53°C inaktiviert)
	5 ml	L-Glutamin (200 mM)
	6 ml	Penicillin (10000 U/ ml)/ Streptomycin (10 mg/ ml PBS)
Lysis-Puffer zur Proteinisolierung	100 mM	NaCl
	50 mM	TRIS (pH 7,5)
	5 mM	EDTA
	1%	Triton x-100
	ad 10 ml	A. dest
	Stammlösung:	
	2 mM	Natrium-Vanadat
	2,5 mM	Natrium-Pyrophosphat
	1 mM	B-Glycerol-Phosphat
	1 mM	PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride)
		In Azetonitril ansetzen
Sammelgel 4,5%	2,6 ml	Gelpuffer II
	1,67 ml	Acrylamid
	5,79 ml	H <sub>2</sub> O
	60 µl	APS (10%)
	30 µl	TEMED

---

SDS-Probenpuffer (pH 8)	0,23 g	SDS
	1,25 ml	Gelpuffer II
	1 ml	Glycerin
	50 mM	DTT (Dithiotreitol)
	ad 10 ml	A. dest
Transferpuffer (pH 9,0)	7,5 g	Tris (25 mM)
	36,03 g	Glycin (192 mM)
	250 ml	Methanol (10%)
	ad 2,5 l	A. dest
Trenngel 10%	2,6 ml	Gelpuffer I
	3,33 ml	Acrylamid
	4,03 ml	H <sub>2</sub> O
	60 µl	APS (10%)
	30 µl	TEMED
Tris-gepufferte Saline Tween (TBS-T) (pH 7,5) in A. dest	20 mM	TRIS
	140 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	0,1%	Tween 20
	ad 2,5 l	A. dest

Waschpuffer (ELISA)	80 g	NaCl
	11,6 g	Natriumhydrogenphosphat
	2 g	Kaliumhydrogenphosphat
	2 g	Kaliumchlorid
	ad 10 l	A. dest
Zamboni Fixierlösung	8 g	Paraformaldehyd (bei 60 °C lösen)
	35 ml	gesättigte Pikrinsäure (bei 60 °C lösen)
	ad 165 ml	Phosphatpuffer
	Phosphatpuffer:	
	1,66 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
	11,2 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
	Ad 0,5 l	A. dest

### 2.3 Gebrauchsfertige Kits und Lösungen

BD OptEIA™ Rat TNF-α ELISA Set	Biosciences, Portland (USA)
BD OptEIA™ Rat IL-6 Set	Biosciences, Portland (USA)
d-NTP-Mix (10 nm)	5 Prime, Hilden (Deutschland)
ECL-Kit	GE Healthcare, little Chalfont (UK)
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Waltham (USA)
RQ1 RNase-free DNase-Kit	Promega, Fitchburg (USA)
SuperSignal™ West Femto	Thermo Scientific, Waltham (USA)
TaqMan® Universal PCR Mastermix	Life Technologies GmbH, Darmstadt (Deutschland)

## 2.4 Enzyme

Revert Aid™ H Minus Reverse Transkriptase Thermo Scientific, Waltham (USA))

## 2.5 TaqMan®-Assay on Demand (Life Technologies GmbH)

Eukaryotische 18S-rRNA	Hs99999901_s1
induzierbare NO-Synthase (iNOS)	Rn00561646_m1
COX-2	Rn00568225_m1
Interleukin-1 $\beta$	Rn00580432_m1
Interleukin-6	Rn00561420_m1
TNF- $\alpha$	Rn99999017_m1

## 2.6 Primer

Random Hexamer Primer-Gemisch Thermo Scientific, Waltham (USA)

## 2.7 Antikörper

### 2.7.1 Primärantikörper

Phospho-p44/42 MAPK (ppERK1/2)- Antikörper (Thr 202/Tyr 204) XPTM Rabbit mAB	cell signaling Technologies, Danvers (USA)
Anti-MAP Kinase 2/ERK2, Clone 1B3B9	Merck Millipore, Billerica (USA)
p38 MAPK Antibody	cell signaling Technologies, Danvers (USA)
Phospho-p38 MAPK (pp38)-Antikörper (Thr 180/ Tyr 182)	cell signaling Technologies, Danvers (USA)

### 2.7.2 Sekundärantikörper

Goat-anti-rabbit-IgG-HRP linked Antibody	cell signaling Technologies, Danvers (USA)
Donkey-anti-mouse-IgG- HRP	Santa Cruz, Dallas (USA)

## 2.8 Verbrauchsmaterialien

96-PCR-Mikrotiterplatten	Sarstedt, Nürnbergrecht (Deutschland)
Deckgläser (22 mm x 22 mm)	Menzel/ Thermo Scientific
ELISA 96-Mikrotiterplatten	Nunc MaxiSorp™, USA /Sarstedt
Gewebekulturschälchen (60 x 15 mm)	Sarstedt, Nürnbergrecht (Deutschland)
Multiply Reaktionsgefäße (200 µl)	Sarstedt, Nürnbergrecht (Deutschland)
Objektträger (26 x 76 mm)	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnbergrecht (Deutschland)
PVDF-Membran "Hybond P"	Amersham Pharmacia Biotech, little Chalfont (UK)
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml)	Sarstedt, Nürnbergrecht (Deutschland)
Whatmann-Pappe	GE Healthcare, little Chalfont (UK)
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Nürnbergrecht (Deutschland)
Zellkulturplatten (6/12/24 Vertiefungen)	Sarstedt, Nürnbergrecht (Deutschland)
Zellschaber	Sarstedt, Nürnbergrecht (Deutschland)
Zentrifugenröhrchen (10 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nürnbergrecht (Deutschland)

## 2.9 Geräte

Abi fast 7500 Real-Time-PCR-System	Applied Biosystems, Waltham (USA)
Axiocam Fotokamera	Carl-Zeiss, Göttingen (Deutschland)
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, Hercules (USA)
Fusion SL Vilber Lourmat	Vilber Lourmat, Eberhardzell (Deutschland)
Gefrier-/Kühlschrank	Bosch, Gerlingen (Deutschland)
Gefrierschrank (-70 °C)	Heraeus, Hanau (Deutschland)
Gelkammer	Bio-Rad, Hercules (USA)
GENios	Tecan, Männedorf (Schweiz)

Inkubator Hera Cell 150	Heraeus, Hanau (Deutschland)
Mikroskop Axiokop	Zeiss, Jena (Deutschland)
Mikrotiterplatten- Photometer (SLT Reader 340 ATTC)	SLA Laborinstrumente, Karlsruhe (Deutschland)
Neubauer Zählkammer (0,0025 cm <sup>2</sup> , Tiefe 0,1 mm)	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Pipetten (1-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Sicherheitswerkbank HERASafe®	Heraeus, Hanau (Deutschland)
Spannungsquelle Power Pac <sup>200</sup>	Bio-Rad, Hercules (USA)
Thermal Cycler Gene AMP® PCR System 9700	Applied Biosystems, Waltham (USA)
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Tischzentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Trans-Blot Turbo	Biorad, Hercules (USA)
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia (USA)
Präzisionswaage BP 610	Sartorius AG, Göttingen (Deutschland)
Wasserbad	Köttermann, Uetze/ Hänigsen (Deutschland)

## 2.10 Software

ABI fast 7500 Software	Applied Biosystems, Waltham (USA)
Axiovision 4.7	Carl Zeiss, Göttingen (Deutschland)
FusionCapt Advance	Vilber Lourmat, Eberhardzell (Deutschland)
Endnote x7	Thomson Reuters
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software

## 3 Methoden

### 3.1 Isolierung und Kultivierung primärer Mikroglia

Die Isolierung und Kultivierung primärer Mikroglia erfolgte nach der modifizierten Standardmethode von McCarthy und de Vellis (1980) (Hassan *et al.*, 1991).

Zunächst wurden 10-12 postnatale Ratten der Generation p1-p3 dekapitiert und die Hirne nach deren stumpfen Entnahme in Gewebekulturschälchen mit Dulbecco's PBS, supplementiert mit 1% Penicillin/Streptomycin, überführt. Unter einem Binokular wurden die Meningen abgelöst, *Cerebellum*, *Diencephalon*, *Hippocampus* sowie der *Bulbus olfactorius* abpräpariert und verworfen. Die verbliebenen Kortexhälften und Mesencephali wurden in getrennten neuen Gewebekulturschälchen gesammelt und mit jeweils 2 x 13 ml Dulbecco's PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Gewebe mechanisch mit einem Skalpell zerkleinert, die Gewebestückchen von je 4-5 Kortexhälften und je 5-6 *Mesencephali* in 10 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und enzymatisch dissoziiert. Die Dissoziation erfolgte durch Zugabe von je 3 ml einer Dissoziationslösung, versetzt mit 35 µl DNase I und anschließender Inkubation im Inkubator bei 37 C für 30 Minuten. Auf das Abpipettieren der Überstände folgte die Zugabe von jeweils 2 ml FKS-haltigem Zellkulturmedium sowie 50 µl D-Nase zu den dissoziierten Geweben, um die Trypsinaktivität der Dissoziationslösung zu stoppen.

Für die Kultivierung wurden die aus zwei dissoziierten *Mesencephali* oder einer Kortexhälfte gewonnenen Zellen getrennt in 75 cm<sup>2</sup>- Zellkulturflasche in jeweils 10 ml Zellkulturmedium ausgesät und im Inkubator bei 37 C in 8,4% wasserdampfgesättigter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert, wobei ein Wechsel des Mediums alle 48 Stunden erfolgte.

### 3.2 Ernte der Mikroglia

Nach ca. 10 Tagen wurden die Mikroglia erstmals geerntet. Dafür wurden die Mikroglia durch manuelles Schütteln der Zellkulturflaschen vom konfluenten Astrozytenrasen gelöst und die Zellkulturüberstände mit den frei flottierenden Mikroglia in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgte eine 5-minütige Zentrifugation (1000 x g), durch die sich die Mikroglia als Zellpellet am Boden des Zentrifugenröhrchens absetzten. Daraufhin wurden die Überstände dekantiert und die Zellpellets in dem restlichen Zellkulturmedium resuspendiert. Nach Vereinigung aller Zellsuspensionen wurde die Zellzahl bestimmt. Hierfür

wurden 10  $\mu$ l Zellsuspension mit 10  $\mu$ l Trypanblau gemischt und die nicht blau gefärbten, vitalen Zellen in der Neubauer Zählkammer mikroskopisch ausgezählt.

### 3.3 Aussaat der Mikroglia

Je nach Versuch wurden die Mikroglia in den für die jeweiligen Versuche unterschiedlichen Zellkulturplatten und Zelldichten ausgesät und bis zur Zelladhärenz für ca. 24 Stunden im Inkubator gehalten.

MTT-Test: 100.000 Zellen pro Ansatz (96er Mikrotiterplatte mit Flachboden)

qPCR und ELISA: 1.000.000 Zellen pro Ansatz (12er Zellkulturplatte)

Westernblot: 1.000.000 Zellen pro Ansatz (12er Zellkulturplatte)

Coomassie-Färbung: 20.000 Zellen pro Deckglas.

### 3.4 Stimulation von Mikroglia

Nach einer eintägigen Wachstumsphase im Inkubator wurden die Zellen in frischem Kulturmedium mit folgenden Stimulationsansätzen stimuliert:

1. Kontrolle: unstimuliert
2. LPS [5 ng/ml]
3. 7,8-DHF [0,01  $\mu$ M]
4. 7,8-DHF [0,01  $\mu$ M] + LPS [5 ng/ml]
5. 7,8-DHF [50  $\mu$ M]
6. 7,8-DHF [50 $\mu$ M] + LPS [5 ng/ml]

Für alle Ansätze, die 7,8-DHF enthielten, erfolgte eine 30-minütige Vorinkubation mit dieser Substanz in der jeweiligen Konzentration in 1 ml Zellkulturmedium. Die Kontrollansätze erhielten das äquivalente Volumen an Kulturmedium. Die Stimulationsdauer war versuchsabhängig und wird im Ergebnisteil genannt.

### 3.5 MTT-Test

Der MTT-Test dient der Überprüfung experimenteller Wirkstoffe, wie in dieser Arbeit 7,8-DHF, auf eine eventuelle Toxizität.

Nach 24-stündiger Stimulation der Mikroglia erfolgte das Absaugen der Zellüberstände. Zu jedem Ansatz wurden 100  $\mu$ l Mikroglia Kulturmedium und 25  $\mu$ l MTT-Lösung pipettiert. In der daraufhin folgenden 2-stündigen Inkubationszeit im Inkubator wurde in den

Mitochondrien der lebenden Zellen das gelbe, wasserlösliche MTT zu blauen Formazankristallen reduziert. Anschließend wurde 100 µl Solubilisierungslösung zu den Ansätzen hinzugefügt und die Ansätze erneut für 2 Stunden inkubiert. Durch die Solubilisierungslösung wurden die Mikroglia lysiert und die Formazankristalle wurden freigesetzt. Nach Durchmischung jedes Ansatzes mit einem Zellspatel wurden die Formazankristalle vollständig aufgelöst. Danach erfolgte die photometrische Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 540 nm.

### **3.6 Coomassie-Blau-Färbung**

Die Coomassie-Blau-Färbung diente dem Sichtbarmachen der morphologischen Veränderungen der Mikroglia.

Für diesen Versuch wurden die Mikroglia auf Deckgläser ausgesät und stimuliert. Nach der Inkubationszeit im Inkubator wurden die Ansätze dreimal mit DPBS gewaschen und nachfolgend mit 30 µl Glutaraldehyd (2,5%) für 40 Minuten bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen mit DPBS folgte dann die Inkubation in 50 µl Färbelösung Comassie-Blau für 40 Minuten bei RT. Danach wurde die überschüssige Färbelösung durch dreimaliges Spülen mit Dulbecco's PBS entfernt und die Zellen wurden mit je 75 µl Entfärbelösung behandelt. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Spülen mit A. dest, bevor die Zellen mit Kaisers Glyceringelantine auf Objektträgern eingedeckt wurden.

### **3.7 Indirekte Stickstoffmonoxid (NO)-Messung**

Stickstoffmonoxid (NO) dient als Indikator der Mikrogliaaktivierung, weist jedoch eine sehr kurze Halbwertszeit auf. Mithilfe des Griess-Reagenz wurde die Menge an gebildetem Nitrit (NO<sub>2</sub>-), welches das stabile Hauptoxidationsprodukt des NO-Stoffwechsels darstellt, indirekt gemessen.

In eine 96-Mikrotiterplatte mit Flachboden wurden zunächst 100 µl des Kulturüberstandes jedes Versuchsansatzes sowie 100 µl Griess-Reagenz pipettiert und für 15 Minuten bei RT inkubiert.

Das Griess-Reagenz besteht aus zwei Komponenten: Sulfanilsäure, die erste Komponente, bildet mit Nitrit einen Komplex. Dieser Komplex reagiert mit der zweiten Komponente, dem Naphtylamin, zu einem violetten Azofarbstoff. Dieser Farbumschlag wurde als Nitritnachweis am Photometer bei einer Wellenlänge von 540 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen.

### 3.8 Proliferationstest

Mithilfe des Proliferationstestes kann untersucht werden, welchen Einfluss eine Substanz auf das Zellwachstum ausübt.

Nach Färbung der DNA im Zellkern mit Kristallviolett (N-hexamethylpararosanilin) erfolgt die Messung der Extinktionswerte am Spektralphotometer. Die gemessenen Werte entsprechen der DNA- und Zellkernmenge und sind ein indirekter Parameter für die Zellzahl.

Nach der Aussaat von 200.000 Mikroglia in einer 96er-Zellkulturplatte mit Flachboden erfolgte die Stimulation für 24 Stunden. Danach wurden die Zellen durch die Zugabe von 25 µl Glutardialdehydlösung (10%) pro Ansatz für 20 Minuten bei RT sowie leichtes Schütteln am Boden der Platte fixiert. Nach dreimaligem Waschen der Platte unter fließendem, entsalztem Wasser (VE-Wasser) und anschließender Lufttrocknung wurde in jede Vertiefung je 100 µl Kristallviolett (N-hexamethylpararosanilin) (0,1% in VE-Wasser, pH 4,5) zur Färbung der DNA pipettiert und die Platte für 20 Minuten bei RT geschüttelt. Nach erneutem Waschen mit VE-Wasser und Lufttrocknen wurde in jede Vertiefung je 100 µl Essigsäure (10%) pipettiert und die Platte kurz geschüttelt. Anschließend wurden die Extinktionen bei einer Wellenlänge von 595 nm am Spektralphotometer gemessen. Zur Beurteilung der Ergebnisse wurden folgende Standardwerte mitgeführt: 100.000, 200.000, 300.000, 400.000 und 500.000 unstimulierte Mikroglia, wobei anhand der gemessenen Extinktionen eine Standardreihe erstellt wurde und die Versuchsergebnisse hierzu in Bezug gesetzt wurden.

Von allen Versuchen wurden 5-fach Replikate angesetzt.

### 3.9 Relative quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Die qPCR dient der Amplifikation von Nukleinsäuren sowie der Quantifizierung der synthetisierten cDNA. Dazu sind als vorangehende Arbeitsschritte die RNA-Isolierung sowie die Umschreibung der RNA in komplementäre DNA (cDNA) notwendig.

#### 3.9.1 RNA-Isolierung

Die zelluläre RNA wurde mithilfe der Einzelschrittmethod nach Chomczynski und Sacchi mit Trizol isoliert (Chomczynski und Sacchi, 1987). Die Methode basiert auf den unterschiedlichen Löslichkeiten von RNA, DNA und Proteinen in einer zweiphasigen Emulsion. Trizol besteht aus Guanidiniumthiocyanat, welches zu einer Zelllyse führt, und Phenol, in dem sich DNA und Proteine lösen.

Die RNA-Isolierung begann mit der Zellyse. Hierfür wurde der Zellkulturüberstand der Versuchsansätze abgesaugt und die Mikroglia zweimal mit Dulbecco's PBS gewaschen. Nach der Zugabe von 1 ml Trizol pro Ansatz folgte die mechanische Zellablösung mit einem sterilen Zellschaber. Das Lysat wurde nachfolgend in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und für 5 Minuten bei RT inkubiert.

Im Anschluss wurden je 200 µl Chloroform hinzugegeben, für 15 Sekunden per Hand geschüttelt und 2-3 Minuten bei RT inkubiert. Bei der anschließenden 15-minütigen Zentrifugation (12.000 x g, 6 °C) erfolgte eine Phasentrennung in drei Phasen: In eine untere Phenol-Chloroformphase (DNA und Proteine), eine Interphase (DNA und Proteine) und eine obere, farblose, wässrige Phase (RNA). Die obere Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 1 µl Glykogen (70 mg/ml) hinzu pipettiert. Es folgte die Präzipitation der RNA durch Zugabe von 500 µl Isopropylalkohol. Nach einer Inkubation für 10 Minuten bei RT wurden die Proben für 10 Minuten bei 12.000 x g bei 6 °C zentrifugiert. Die RNA befand sich nun als gelartiges Pellet am Boden und an der Seite des Eppendorf-Reaktionsgefäßes. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das RNA-Pellet mit 1 ml Ethanol durch anschließende Zentrifugation für 5 Minuten bei 7.600 x g gewaschen. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet angetrocknet, in 20 µl RNase freiem A. dest gelöst und für 10 Minuten bei 57 °C inkubiert. Die anschließende Quantifizierung der RNA erfolgte photometrisch. Dazu wurden je 2 µl der Proben auf eine „Take 3 Multi Volume Plate“ pipettiert.

Die Reinheit der RNA sollte bei 1,7-2,0 liegen.

Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bis zur cDNA-Synthese bei -70 °C.

### **3.9.2 cDNA-Synthese**

Bei der cDNA-Synthese wird mRNA durch eine Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben (Reverse Transkription). Die cDNA ist eine grundlegende Komponente der in der qPCR stattfindenden Amplifikation von DNA.

Für die Herstellung der cDNA wurde ein hoher Reinheitsgrad der isolierten RNA benötigt, aufgrund dessen wurde zuvor ein zusätzlicher Verdau mit einer DNase durchgeführt, die eventuelle Unreinheiten durch genomische DNA beseitigte.

Für den DNA-Verdau wurde zunächst ein Reaktionsansatz angesetzt, der aus 8 µl Probe (1 µg RNA in 8 µl A. dest), 1 µl DNase Puffer sowie 1 µl RQ1-RNase free-DNase bestand. Es folgte die Inkubation bei 37 °C für 15 Minuten im Thermocycler, wonach die Proben auf Eis

gestellt wurden. Der DNA-Verdau wurde durch Zugabe von 1 µl Stopplösung (EDTA 25 mM) während einer 10-minütigen Inkubation bei 65 °C gestoppt.

Die sich anschließende Reverse Transkription wurde nach Anleitung des cDNA-Synthese-Kits ausgeführt. Den Proben wurde je 1 µl des Random Hexamer Primer-Gemisches hinzugefügt, anschließend erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei 70 °C im Thermocycler. Das Primergemisch besteht aus sechs verschiedenen einzelsträngigen Nukleotidsequenzen, die mit den dazu passenden komplementären Basenpaaren der mRNA hybridisieren und somit den Startpunkt für die Reverse Transkriptase bilden.

Zu jeder Probe wurden 4 µl 5 x Reaktionspuffer, 2 µl dNTP-Mix (10 mM) und 1 µl A. dest hinzugegeben und die Proben wurden 5 Minuten bei 25 °C inkubiert. Abschließend wurde direkt in jede Probe 1 µl der Reversen Transkriptase pipettiert. Im Thermocycler wurden die Proben anschließend für 10 Minuten bei 25 °C (Primer-Annealing), für 60 Minuten bei 42 °C (Reverse Transkription) und für 10 Minuten bei 70 °C (Enzyminaktivierung) inkubiert. Danach wurden die Proben bei -20 °C für höchstens 6 Monate bis zur Verwendung gelagert.

### 3.9.3 qPCR

Die qPCR diente der Untersuchung des Einflusses von 7,8-DHF auf die Regulation der Genexpression pro-inflammatorischer Mediatoren.

Zunächst wurde die cDNA mit A. dest im Verhältnis 1:20 verdünnt und jeweils 4 µl der verdünnten Proben in eine 96-PCR-Mikrotiterplatte pipettiert. Dann folgte die Zugabe von 16 µl Master Mix je Probe.

#### **Master Mix pro Versuchsansatz :**

10 µl TaqMan®-Universal-Master Mix

5 µl RNase-freies A. dest

1 µl TaqMan® Assay on Demand (Primer+Sonden)

Die qPCR wurde im Thermocycler „ABI 7500 fast“ durchgeführt. In der Phase der Denaturierung erfolgte durch ein 15-sekündiges Erhitzen auf 95 °C eine Auftrennung der Einzelstränge. In der darauf folgenden Annealing-Phase wurde die Temperatur für 60 Sekunden auf 50-60 °C abgekühlt und die Primer hybridisierten an die komplementäre Sequenzen der DNA. In der Extensions-Phase lagerte sich die Taq-Polymerase bei 72 °C an

die Primer an und synthetisierte einen neuen DNA-Strang in 3'-5'-Richtung. Dieser dreiphasige Zyklus wurde 40-fach wiederholt.

Die relative Quantifizierung erfolgt mithilfe der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2002), dabei wurde der CT-Wert einer Probe mit dem CT-Wert des internen Standards 18s-rRNA (*housekeeping gene*) verglichen ( $\Delta\text{CT}$ ) und auf den CT-Wert des zu untersuchenden exprimierten Gens bezogen.

### 3.10 Western-Blot-Analyse

Der Western Blot dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen in einem Proteingemisch.

Dabei wird ein Proteingemisch mithilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) in einem Trägergel entsprechend der Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld aufgetrennt. Das SDS ist dafür zuständig, die Eigenladung des Proteins zu maskieren, damit eine Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht stattfinden kann. Nach Beendigung des Laufes sind die Proteine der Größe nach in Banden sortiert.

Daraufhin findet das sogenannte *Blotting* statt, bei dem die Proteine vom Gel auf eine Trägermembran (PVDF-Membran) übertragen werden.

Die Immundetektion der gesuchten Proteine auf dieser Membran erfolgte mittels eines spezifischen Primärantikörpers und eines HRP-konjugierten Sekundärantikörpers (*Horse-radish-peroxidase*, Meerrettichperoxidase). HRP überführt das anschließend zugeführte Luminol in die oxidierte Form und die dabei entstehende Lumineszenz kann detektiert werden.

#### 3.10.1 Isolierung von Gesamtproteinen

Nach der Entfernung des Mediums von den Stimulationsansätzen wurden die Zellen zweimal mit kaltem Dulbecco's PBS gespült und 100  $\mu\text{l}$  Lysispuffer zugegeben. Mithilfe eines sterilen Zellschabers wurden die lysierten Mikroglia mechanisch vom Boden abgelöst. Nach der Homogenisierung durch ein mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurde das Zelllysate (Gesamtprotein) in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die isolierten Proteinmengen bestimmt.

### 3.10.2 Proteinquantifizierung

Die Proteinquantifizierung erfolgte mit einem BCA<sup>TM</sup>Kit. Dafür wurden von jeder Probe in Doppelbestimmung 10 µl je Vertiefung einer 96-Mikrotiterplatte pipettiert. Im nächsten Schritt wurde das Arbeitsreagenz aus 50 Volumenanteilen der Reagenz A und 1 Volumenanteil der Reagenz B des BCA<sup>TM</sup>Kits angesetzt und jeweils 200 µl zu jedem Ansatz hinzu gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde daraufhin in den GENios Tecan eingesetzt, in dem die Absorption bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen wurde. Mithilfe mitgeführter Standards wurden die Messwerte anschließend quantifiziert.

### 3.10.3 Herstellung des Gels

Nach gründlicher Reinigung der Glasplatten mit 70% Alkohol und dem Einbau in die entsprechende Halterung wurde die Lösung für das Trenngel (10%) angesetzt und bis zum grünen Rand des Rahmens eingefüllt und mit Propanol überschichtet.

Nach 15 Minuten war das Trenngel polymerisiert und das Propanol wurde abgesaugt. Dann wurde die Sammelgel-Lösung (4,5%) auf das Trenngel gegossen und ein Taschenkamm eingesetzt. Nach weiteren 15 Minuten wurde der Taschenkamm entfernt. Das Gel wurde ausgespannt und in die mit Laufpuffer befüllte Laufkammer eingebaut.

### 3.10.4 Elektrophorese

Als Vorbereitung für die SDS-Page wurden 5 µg des Proteins mit dem SDS-Probenpuffer auf ein Verhältnis von 2:1 aufgefüllt und für 5 Minuten bei 99 °C denaturiert. In die erste Tasche des Sammelgels wurde 6 µl eines Proteinmarkers pipettiert, in die darauffolgenden Taschen je 20 µl der Protein-Proben. Es wurden immer gleichzeitig 2 Gele in die Elektrophoresekammer eingespannt. Nach dem Aufsetzen des Deckels und der Auswahl des Laufprogramms (2 Gele, 200 V, 340 mA, ca. 45 Minuten) wurde der Lauf gestartet.

### 3.10.5 Blotting

Nach der SDS-Page erfolgte das Blotting. Die hierfür benötigte PVDF Membran wurde vorher 1 Minute in Methanol aktiviert und 15 Minuten in Transferpuffer eingeweicht.

Die PVDF-Membran wurde auf zwei zuvor in Transferpuffer eingeweichte Whatman-Pappen auf die Kathodenplatte gelegt. Auf die PVDF-Membran wurde das Gel platziert und mit zwei weiteren eingeweichten Whatman-Pappen bedeckt. Nach dem Verstreichen von Luftblasen

wurde die mit Transferpuffer angefeuchtete Anodenplatte aufgelegt und der Blottingvorgang im Trans-Blot Turbo gestartet (2 Gele, 25 V, 340 mA, 30 Minuten).

### 3.10.6 Immundetektion

Die Detektion der gesuchten Proteine auf der Membran erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Zunächst wurde die Membran für 1 Stunde in 5% Magermilch inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Danach wurde die Membran mit 5 ml Primärantikörperlösung (anti-pp38 oder anti-pERK1/2 (1:1.000 in TBS-T)) in 50 ml-Röhrchen über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Durch das darauf folgende dreimalige Spülen mit TBS-T für jeweils 15 Minuten wurden schwächer haftende oder nicht gebundene Antikörper von der Membran entfernt.

Es folgte eine Inkubation mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Goat-anti-rabbit IgG-HRP (1:20.000 in 2% Magermilch in TBS-T)) für 1 Stunde bei RT auf dem Rotationsschüttler. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 15 Minuten mit TBS-T gespült. Zur Detektion der Proteine wurde eine Lösung aus 150 µl der Solution A und 150 µl der Solution B des SuperSignal West Femto-Kits™ angesetzt und auf die Membran pipettiert. Nach 1 Minute Inkubation bei RT wurde die Membran in eine Klarsichtfolie gelegt und die detektierten Proteinbanden mit Hilfe des Chemifluoreszenzdetektors Fusion SL Vilber Lourmat sichtbar gemacht. Die Quantifizierung der detektierten Proteinbanden erfolgte mit der zum Detektor gehörenden Software „FusionCapt Advance“.

Um die Antikörper von der Membran zu lösen, wurden diese für 15 Minuten bei RT auf dem Rotationsschüttler mit 0,2 M NaOH inkubiert. Darauf folgend wurde die Membran mit TBS-T gespült und erneut mit 5 ml Primärantikörperlösung (p38 (1:1.000 in TBS-T) oder ERK2 (1:500 in TBS-T)) in 50 ml-Röhrchen über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es folgte wie oben beschrieben die Inkubation mit einem Sekundärantikörper (Goat-anti-rabbit-IgG-HRP oder Donkey-anti-mouse-IgG-HRP (1:2.000 in 2% Magermilch in TBS-T)) für 1 Stunde bei RT, ein dreimaliges Waschen mit TBS-T, das Aufbringen der Detektionslösung für 1 Minute sowie das Sichtbarmachen und Quantifizieren der gesuchten Proteinbanden.

## 3.11 ELISA

Der enzymgekoppelte Adsorptionsassay ELISA (Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay) ist ein spezieller Proteinnachweis und wurde in dieser Doktorarbeit als Sandwich-ELISA zur

Quantifizierung von IL-6 und TNF- $\alpha$  im Kulturmedium der Ansätze verwendet. Die Durchführung erfolgte mit gebrauchsfertigen Kits nach Herstellerangaben.

Zunächst erfolgte die Beschichtung einer 96-ELISA-Platten mit 100  $\mu$ l Fangantikörper je Vertiefung (anti-TNF- $\alpha$  oder anti-IL-6 (1:250 in DPBS)) bei 4 C über Nacht. Nach anschließendem fünfmaligem Waschen mit dem Waschpuffer wurde unspezifische Bindungsstellen mit 200  $\mu$ l Assay Diluent (DPBS + 10% FKS) 1 Stunde bei RT blockiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurde der Zellkulturüberstandes mit Assay Diluent verdünnt (Proben mit LPS 1:50, Proben ohne LPS 1:2) und jeweils 100  $\mu$ l der verdünnten Lösung in Dreifachansatz in jede Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipetiert. Gleichzeitig wurde eine Standard-Konzentrationsreihe in Doppelbestimmung mitgeführt. Nach der nun folgenden 2-stündigen Inkubation (TNF- $\alpha$ -ELISA bei RT, IL-6-ELISA bei 37 C) folgte ein erneuter Waschschrift. Anschließend wurden die an den Fangantikörper gebundenen Zytokine mittels eines biotynelierten Detektionsantikörper (1:250) 1 Stunde unter den beschriebenen Bedingungen inkubiert. Die Entfernung der überschüssigen Detektionsantikörper fand durch einen erneuten Waschschrift statt. Im nun folgenden Schritt wurden 100  $\mu$ l des Meerrettich-Peroxidase-(HRP)-konjugiertem Streptavidin (1:250) in jede Vertiefung pipetiert und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurde durch Zugabe von 100  $\mu$ l TMB-Substrat die Indikatorreaktion gestartet, bei der Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) mit Tetramethylbenzidin (TMB) in einer HRP-gekoppelten Reaktion zu blauem Farbstoff reagierte. Nach 20 Minuten wurde als Stopplösung 50  $\mu$ l Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2N) in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Die Messung der Absorption erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 550 nm).

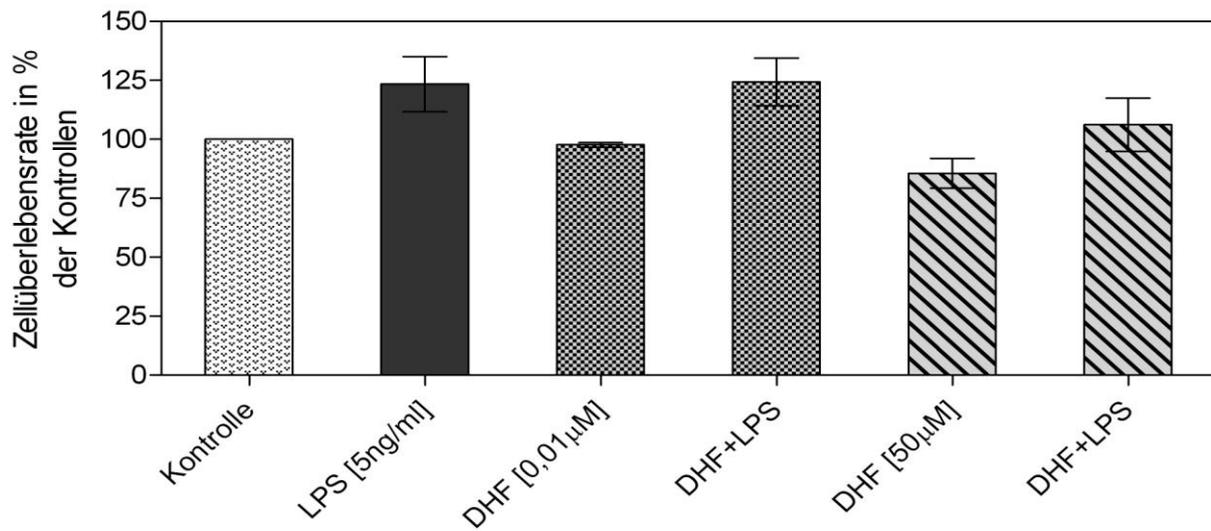
## 4 Ergebnisse

Da aus der Literatur bekannt ist, dass 7,8-DHF konzentrationsabhängig wirkt, wurde in den Vorversuchen für diese Arbeit der Einfluss von 7,8-DHF auf primäre Mikroglia in einem Konzentrationsbereich von 0,01  $\mu\text{M}$  bis 50  $\mu\text{M}$  untersucht. Es zeigte sich, dass 7,8-DHF sowohl in den niedrigsten als auch in den höchsten Konzentrationen die beste Wirkung aufwies, wobei die Ergebnisse mit 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  stark schwankten und keine aussagekräftigen Schlussfolgerungen zuließen. Aus diesem Grund wurde für die nachfolgenden Versuche 7,8-DHF sowohl in einer niedrigeren Konzentration von 0,01  $\mu\text{M}$  als auch in einer höheren Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  eingesetzt.

### 4.1 Einfluss von 7,8-DHF auf das Überleben von Mikroglia

Der Einfluss von 7,8-DHF auf die Überlebensrate von Mikroglia wurde mittels eines MTT-Testes nach 24 Stunden sowohl in Einzel-, als auch in kombinierter Stimulation mit LPS untersucht und grafisch dargestellt (Abb. 4.1), wobei die Messwerte in % der Kontrollen angegeben wurden. Im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen, bei denen die Überlebensrate gleich 100% gesetzt wurde, hatte eine Einzelstimulation mit 7,8-DHF bei einer Konzentration von 0,01  $\mu\text{M}$  nahezu keinen Einfluss auf das Zellüberleben. Im Gegensatz dazu reduzierte sich die Zellüberlebensrate in der höheren Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  7,8-DHF geringfügig. Bei einer simultanen Stimulation von 0,01  $\mu\text{M}$  bzw. 50  $\mu\text{M}$  7,8-DHF und LPS stieg die Zellüberlebensrate an.

Abschließend lässt sich feststellen, dass 7,8-DHF in den verwendeten Konzentrationen keine zytotoxischen Eigenschaften aufwies.



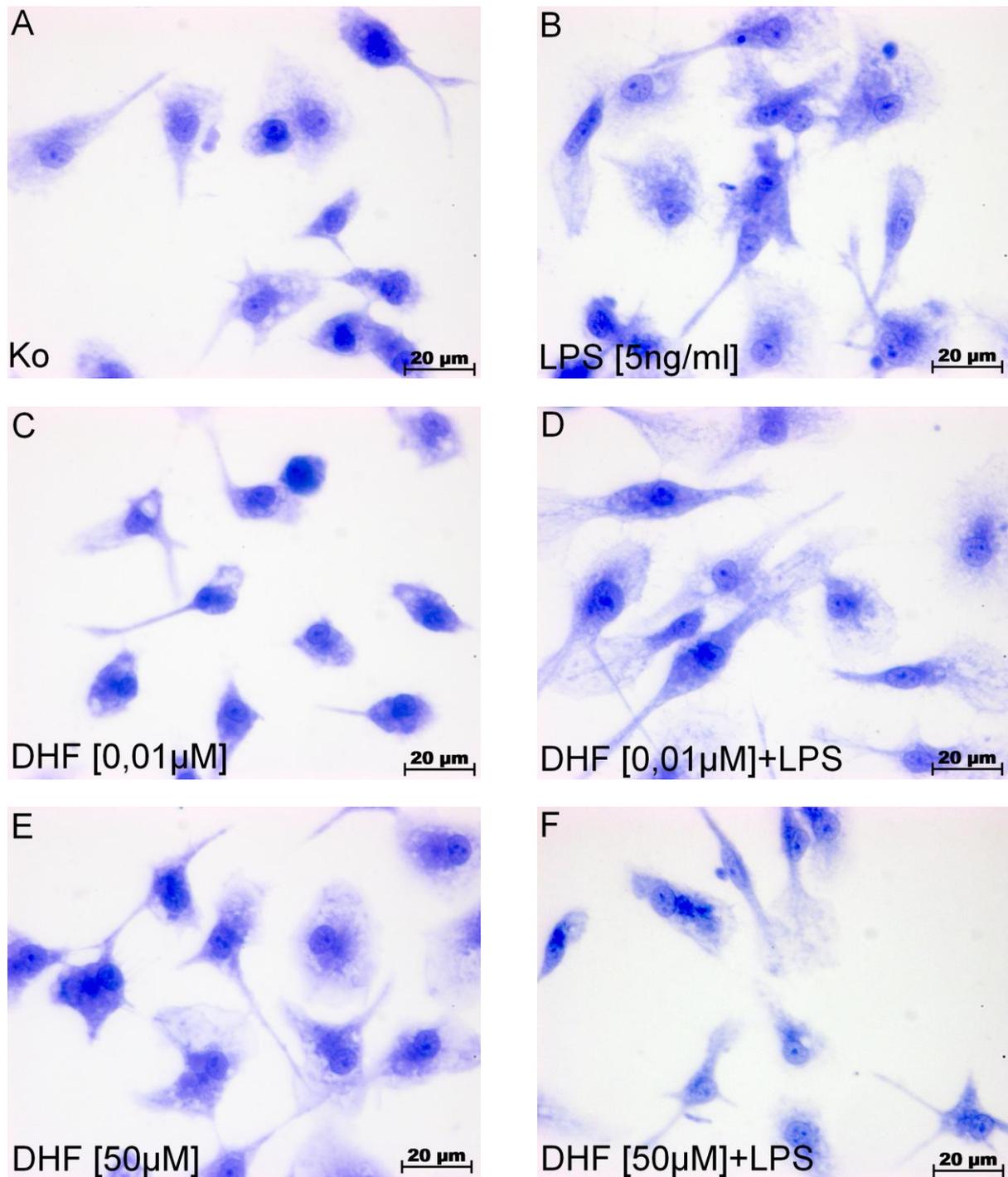
**Abb. 4.1: Einfluss von 7,8-DHF auf das Zellüberleben der Mikroglia.** Nach 24-stündiger Stimulation wurde ein MTT-Test durchgeführt. Die Abbildung 4.1 zeigt, dass die Überlebensrate der Mikroglia bei einer Stimulation mit 0,01 µM 7,8-DHF bei 97,7% lag. Wurden die Mikroglia hingegen simultan mit 0,01 µM 7,8-DHF und LPS stimuliert, stieg die Zellüberlebensrate auf 124,3% an. Bei einer höheren Konzentration von 50 µM 7,8-DHF sank die Zellüberlebensrate bei einzelner Stimulation mit 7,8-DHF auf 85,6%, wohingegen die Überlebensrate der Zellen bei einer simultanen Stimulation mit 7,8-DHF und LPS auf 106,2% anstieg. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n > 3$ ).

## 4.2 Einfluss von 7,8-DHF auf die Morphologie primärer Mikroglia

Wie bereits in der Einleitung beschrieben (→ 1.2.1), kann sich der morphologische Subtyp der Mikroglia je nach Art der externen Stimuli verändern.

In dieser Arbeit wurde deshalb auch der Einfluss von 7,8-DHF auf die Morphologie primärer Mikroglia untersucht. Dafür wurden auf Deckgläser ausgesäte Mikroglia sowohl einzeln mit 0,01  $\mu\text{M}$  bzw. 50  $\mu\text{M}$  7,8-DHF als auch in Kombination mit 5 ng/ml LPS für 6 Stunden stimuliert, fixiert und mit Coomassie-Blau gefärbt. Anschließend erfolgte eine lichtmikroskopische Auswertung, welche die Abbildung 4.2 zeigt. Die unstimulierten Kontrollzellen (Abb. 4.2 A) zeigten einen ramifizierten Subtyp mit kleinem Soma und vielen verzweigten Zellfortsätzen. Nach einer Stimulation mit LPS erfolgte eine morphologische Transformation zu einem amöboidähnlichen Subtyp mit einem vergrößerten Soma sowie zurückgezogenen Fortsätzen (Abb. 4.2 B). Mikroglia, die mit 0,01  $\mu\text{M}$  7,8-DHF stimuliert wurden, wiesen wie die unstimulierten Zellen einen ramifizierten Subtyp auf (Abb. 4.2 C). Auch die höhere Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  7,8-DHF (Abb. 4.2 E) bewirkte keine morphologische Transformation zum amöboiden, aktivierten Typ. Wurden die Mikroglia hingegen simultan mit 7,8-DHF und LPS stimuliert (Abb. 4.2. D+F), waren sowohl aktivierte, amöboidähnliche als auch ruhende, ramifizierte Subtypen der Mikroglia vorzufinden. Dieses ist ein Hinweis darauf, dass 7,8-DHF unter entzündlichen Bedingungen (LPS-Stimulation) die Entwicklung eines ruhenden, ramifizierten Zelltyps begünstigt. Diese Entwicklung scheint eine Konzentrationsabhängigkeit aufzuweisen, da bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  7,8-DHF mehr ramifizierte, ruhende Mikroglia nachzuweisen waren (Abb. 4.2 F) als bei einer Konzentration von 0,01  $\mu\text{M}$  (Abb. 4.2 D).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass 7,8-DHF konzentrationsabhängig einen Teil der durch einen entzündlichen Stimulus (LPS) aktivierten Mikroglia morphologisch in einen ruhenden, ramifizierten Subtyp überführte.



**Abb. 4.2: Einfluss von 7,8-DHF auf die Morphologie primärer Mikroglia.** Für die morphologische Untersuchung der Mikroglia wurden alle Präparate nach einer 6-stündigen Stimulation mit Coomassie-Blau gefärbt und unter dem Lichtmikroskop fotografiert. Abb. 4.2 **A** zeigt unstimulierte, ramifizierte Mikroglia (Ko) mit einem kleinem Soma und vielen Fortsätzen. Abb. 4.2 **B** zeigt die mit LPS stimulierte Mikroglia mit einem aktivierten, amöboidähnlichen Subtyp mit großem Zellsoma sowie retrahierten Fortsätzen. Nach einer Einzelstimulation mit 7,8-DHF (Abb. 4.2 **C+E**), veränderte sich die Morphologie der Mikroglia im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nicht, wohingegen durch eine simultane Stimulation mit 7,8-DHF und LPS (Abb. 4.2 **D+F**) ein Teil der durch den entzündlichen Stimulus aktivierten Mikroglia in einen ruhenden, ramifizierten Subtyp überführt wurde. Bei einer Konzentration von 50 µM 7,8-DHF (Abb. 4.1 **F**) wurden mehr ruhende, ramifizierte Mikroglia detektiert als bei einer Konzentration von 0,01 µM 7,8-DHF (Abb. 4.2 **D**).

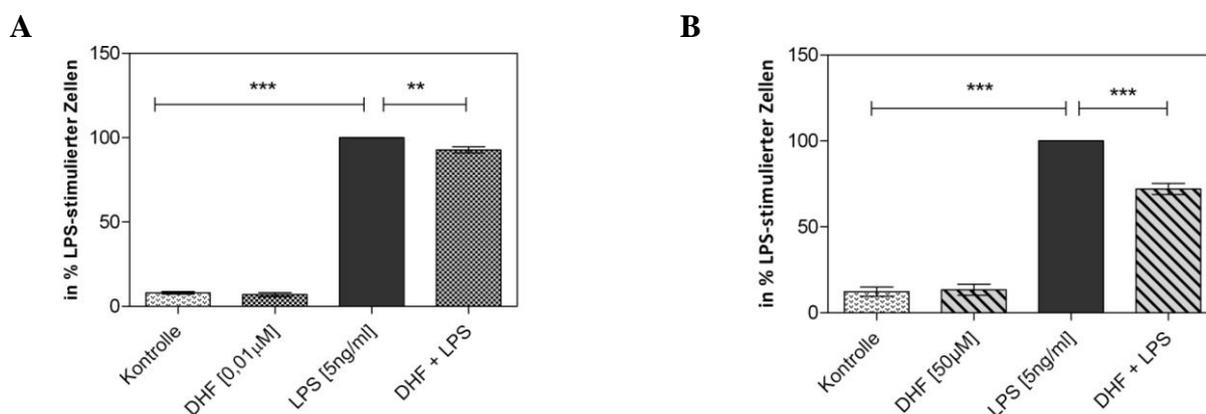
### 4.3 Einfluss von 7,8-DHF auf die Radikalbildung

Als ein wesentlicher ätiologischer Faktor in der Pathogenese des Morbus Parkinsons gilt oxidativer Stress ( $\rightarrow$ 1.3.3.), welcher durch eine überschießende Produktion von ROS sowie RNS entsteht und infolgedessen zu einer nigrostriatalen Neurodegeneration führen kann.

Daher wurde in dieser Arbeit der Einfluss von 7,8-DHF auf die NO-Freisetzung durch Mikroglia und eine mögliche Regulation dieser durch das induzierbare NO-synthetisierende Enzym iNOS untersucht.

#### 4.3.1 Einfluss von 7,8-DHF auf die NO-Freisetzung durch Mikroglia

Der Einfluss von 7,8-DHF auf die NO-Freisetzung wurde durch indirekte Messung in den Überständen der für 24 Stunden stimulierten Mikroglia ermittelt und ist in der Abbildung 4.3. grafisch dargestellt, wobei die Messwerte in % der LPS-stimulierten Mikroglia angegeben sind. Eine Stimulation der Mikroglia mit 0,01  $\mu$ M bzw. 50  $\mu$ M 7,8-DHF führte zu keiner Veränderung der NO-Freisetzung im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen, wohingegen LPS eine starken Erhöhung von NO im Zellkulturüberstand bewirkte. Eine kombinierte Stimulation mit 7,8-DHF und LPS führte zu einer signifikanten Senkung der NO-Freisetzung. So reduzierte 0,01  $\mu$ M 7,8-DHF in LPS-stimulierten Mikroglia NO signifikant auf 92,8% (Abb. 4.3 A), wohingegen 50  $\mu$ M 7,8-DHF die NO-Freisetzung signifikant auf 72,01% senkte. (Abb. 4.3. B). Somit lässt sich feststellen, dass 7,8-DHF konzentrationsabhängig die LPS-induzierte Aktivität von Mikroglia herabregulierte.



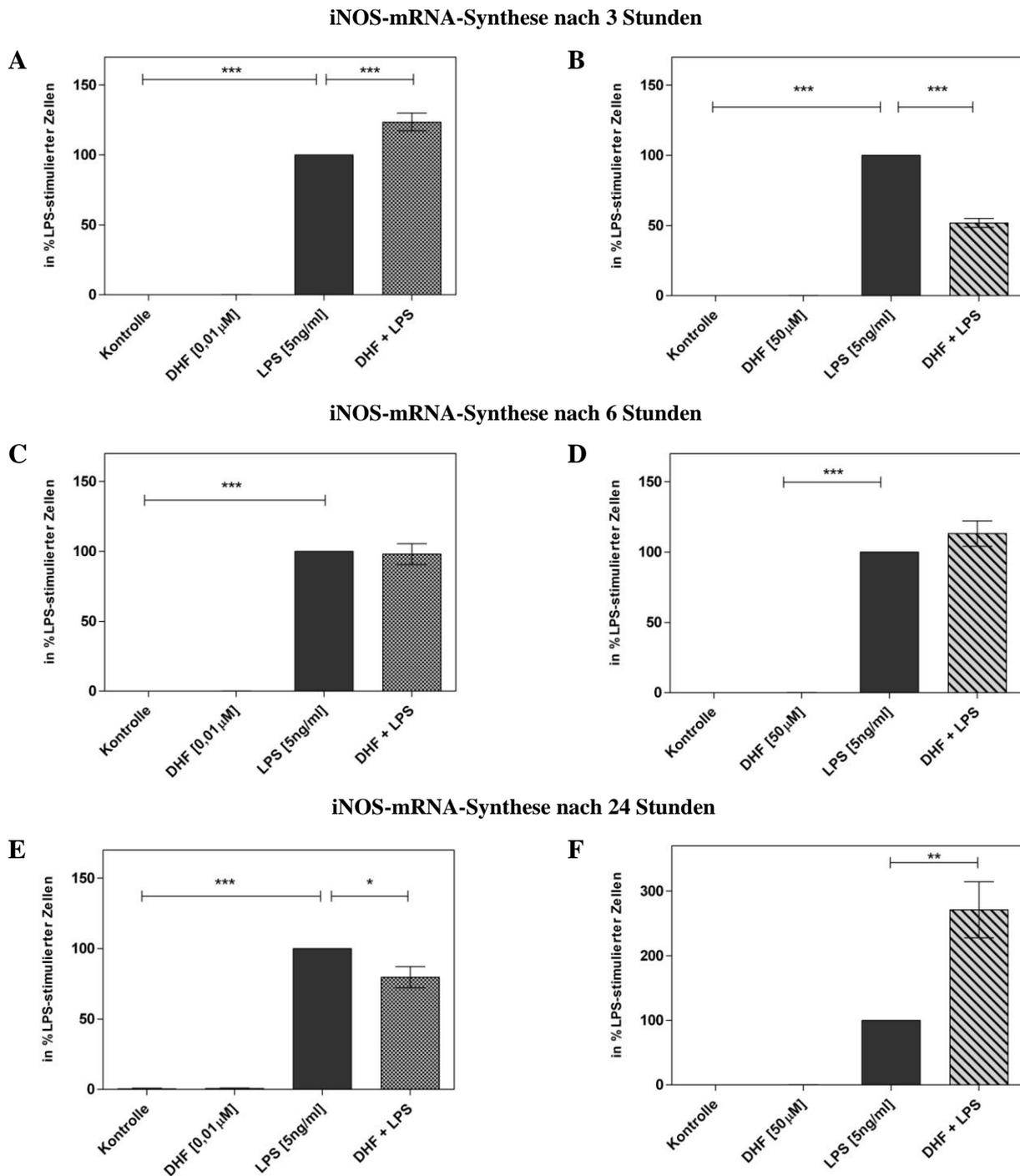
**Abb. 4.3: Einfluss von 7,8-DHF auf die NO-Freisetzung von Mikroglia nach 24 Stunden.** Die NO-Messung in den Versuchsansätzen erfolgte nach 24-stündiger Stimulation indirekt mittels Griess-Reagenz. Infolge einer Stimulation mit LPS war die NO-Produktion im Vergleich zu den unstimulierten Zellen in der Kontrolle stark erhöht und wurde in dieser Abbildung gleich 100% gesetzt. Durch eine simultane Stimulation mit 7,8-DHF und LPS wurde die NO-Freisetzung in Abhängigkeit von der 7,8-DHF-Konzentration signifikant reduziert, bei 0,01  $\mu$ M 7,8-DHF auf 92,8% (Abb. 4.3 A) sowie bei 50  $\mu$ M 7,8-DHF auf 72,01% (Abb. 4.3 B). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n=5$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ ).

### 4.3.2 Einfluss von 7,8-DHF auf die mRNA-Expressionsrate der iNOS

Mikroglia setzen infolge eines inflammatorischen Stimulus durch eine verstärkte Expression von iNOS vermehrt NO frei (→4.3.1).

Der Einfluss von 7,8-DHF auf die iNOS-mRNA-Synthese wurde mittels qPCR nach 3 Stunden (Abb. 4.4 A+B), 6 Stunden (Abb. 4.4 C+D) und 24 Stunden (Abb. 4.4 E+F) ermittelt und grafisch dargestellt, wobei die Messwerte relativ in % LPS-stimulierter Mikroglia angegeben wurden. Eine Stimulation der Mikroglia mit 0,01  $\mu\text{M}$  bzw. 50  $\mu\text{M}$  7,8-DHF führte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte zu einer Veränderung der iNOS-mRNA-Synthese im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen, wohingegen LPS die iNOS-mRNA stark heraufregulierte (Abb. 4.4 A-F). Nach einer 3-stündigen kombinierten Stimulation mit 0,01  $\mu\text{M}$  7,8-DHF und LPS wurde die iNOS-mRNA-Synthese signifikant auf 123,5% gesteigert (Abb. 4.4 A), während eine kombinierte Stimulation mit 50  $\mu\text{M}$  7,8-DHF und LPS diese signifikant auf 51,8% herabregulierte (Abb. 4.4 B). Nach 6 Stunden hatte die kombinierte Stimulation mit 0,01  $\mu\text{M}$  7,8-DHF und LPS keinen Einfluss auf die iNOS-mRNA-Expressionsrate (Abb. 4.4 C), hingegen regulierte 50  $\mu\text{M}$  7,8-DHF diese in den LPS-aktivierten Mikroglia auf 113,2% herauf. Nach 24-stündiger kombinierter Stimulation mit 7,8-DHF und LPS bewirkte das 0,01  $\mu\text{M}$ -konzentrierte 7,8-DHF eine signifikante Reduktion der iNOS-mRNA-Expressionsrate auf 79,7% (Abb. 4.4 E). Im Gegensatz dazu führte 50  $\mu\text{M}$  7,8-DHF in den LPS-aktivierten Mikroglia zu einer signifikanten Steigerung der Expressionsrate auf 271% (Abb. 4.4 F).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass 7,8-DHF sowohl einen konzentrationsabhängigen als auch einen zeitabhängigen Einfluss auf die LPS-induzierte iNOS-mRNA-Expressionsrate aufwies. Nach 3-stündiger kombinierter Stimulation konnte das höher konzentrierte 7,8-DHF (50  $\mu\text{M}$ ) die Expressionsrate signifikant reduzieren, nach 24 Stunden war hingegen das 0,01  $\mu\text{M}$  konzentrierte 7,8-DHF in der anti-inflammatorischen Wirkung überlegen. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den gemessenen Werten der NO-Freisetzung bei der jeweiligen Konzentration, da eine Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  7,8-DHF die iNOS-mRNA-Expressionsrate signifikant steigerte, die NO-Freisetzung jedoch signifikant gesenkt wurde.



**Abb. 4.4: Einfluss von 7,8-DHF auf die iNOS-mRNA-Expression nach 3, 6 und 24 Stunden.** Nach der Isolierung der mRNA und einer Umschreibung in cDNA wurde die iNOS-mRNA-Expressionsrate mithilfe der qPCR relativ quantifiziert. In einer Konzentration von 0,01 µM führte 7,8-DHF nach 3-stündiger Stimulation in den LPS-stimulierten Mikroglia zu einem signifikanten Anstieg der iNOS-mRNA-Expressionsrate auf 123,5% im Vergleich zu den mit LPS stimulierten Zellen (Abb. 4.4 A). Nach 24-stündiger kombinierter Stimulation mit 0,01 µM und LPS wurde die iNOS-mRNA-Expressionsrate signifikant auf 79,7% gesenkt (Abb. 4.4 E). Hingegen bewirkte 7,8-DHF in einer Konzentration von 50 µM bereits nach 3-stündiger kombinierter Stimulation mit LPS eine signifikante Reduktion der iNOS-mRNA-Expressionsrate auf 51,8% (Abb. 4.4 B). Mit steigender Stimulationsdauer von 50 µM 7,8-DHF und LPS stieg die iNOS-mRNA-Expressionsrate im Vergleich zu den mit LPS-stimulierten Zellen an (Abb. 4.4 D+F). Die Werte sind prozentual als Mittelwert ± SEM angegeben (n > 3, \*\*\*p < 0,001, \*\*p < 0,01, \*p < 0,05).

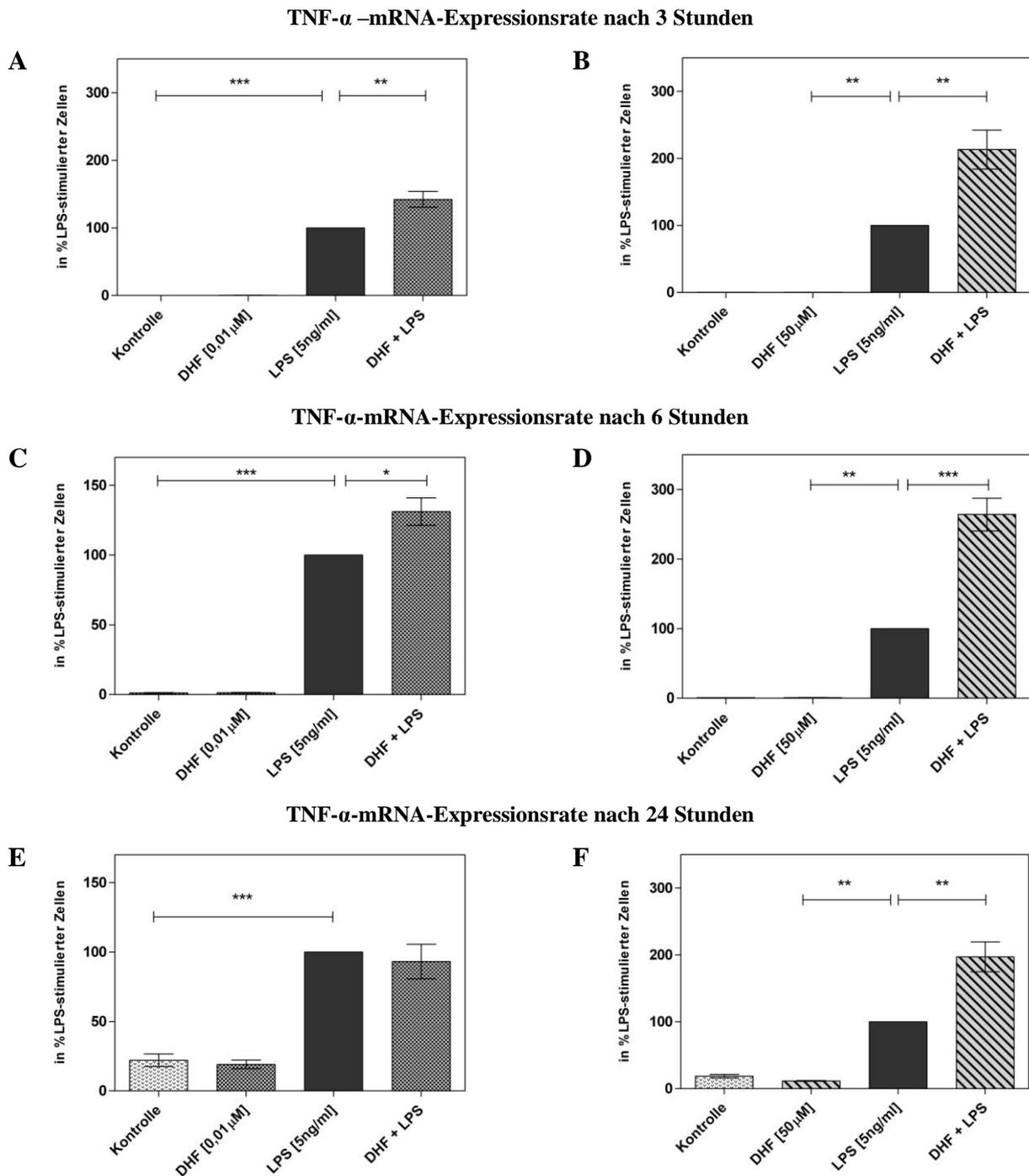
## 4.4 Einfluss von 7,8-DHF auf die LPS-induzierte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine

Eine unkontrollierte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine moduliert die neuronale Zelldegeneration und ist somit ein weiterer ätiologischer Faktor beim Morbus Parkinson (→1.2.2). Aufgrund dessen wurde im Folgenden die Wirkung von 7,8-DHF auf die mRNA-Expressionsrate verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine untersucht.

### 4.4.1 Einfluss von 7,8-DHF auf die TNF- $\alpha$ -mRNA-Synthese in Mikroglia

Der Einfluss von 7,8-DHF auf die TNF- $\alpha$ -mRNA-Synthese wurde mittels qPCR nach 3 Stunden (Abb. 4.5 A+B), 6 Stunden (Abb. 4.5 C+D) und 24 Stunden (Abb. 4.5 E+F) ermittelt und grafisch dargestellt, wobei die Messwerte relativ in % LPS-stimulierter Mikroglia angegeben wurden. Eine Stimulation der Mikroglia mit 0,01  $\mu$ M bzw. 50  $\mu$ M 7,8-DHF führte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte zu einer Veränderung der TNF- $\alpha$ -mRNA-Synthese im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen, wohingegen LPS die TNF- $\alpha$ -mRNA stark heraufregulierte (Abb. 4.5 A-F). Nach einer 3-stündigen kombinierten Stimulation mit 0,01  $\mu$ M 7,8-DHF und LPS wurde die TNF- $\alpha$ -mRNA-Synthese signifikant auf 142,3% heraufreguliert (Abb. 4.5 A). Auch 50  $\mu$ M 7,8-DHF steigerte die Expressionsrate in den mit LPS-stimulierten Mikroglia signifikant auf 213% (Abb. 4.5 B). Nach 6-stündiger kombinierter Stimulation mit 7,8-DHF und LPS bewirkte das 0,01  $\mu$ M-konzentrierte 7,8-DHF einen signifikanten Anstieg der TNF- $\alpha$ -mRNA-Expressionsrate auf 131% (Abb. 4.5 C), ebenso führte 50  $\mu$ M 7,8-DHF zu einer signifikanten Steigerung der Expressionsrate auf 264% (Abb. 4.5 D). Nach 24-stündiger kombinierter Stimulation mit 7,8-DHF und LPS reduzierte das 0,01  $\mu$ M-konzentrierte 7,8-DHF die TNF- $\alpha$ -mRNA-Expressionsrate auf 93,14% (Abb. 4.5 E). Im Gegensatz dazu führte 50  $\mu$ M 7,8-DHF in den mit LPS-stimulierten Mikroglia zu einem signifikanten Anstieg der Expressionsrate auf 197% (Abb. 4.5 F).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass 7,8-DHF einen konzentrations- und zeitabhängigen Einfluss auf die TNF- $\alpha$ -mRNA-Expressionsrate in LPS-stimulierten Mikroglia aufwies. 7,8-DHF regulierte in einer Konzentrationen von 0,01  $\mu$ M nach 3 und 6 Stunden sowie in einer Konzentration von 50  $\mu$ M nach allen Stimulationszeiten die Expressionsrate in den LPS-stimulierten Mikroglia herauf. Im Gegensatz dazu konnte die TNF- $\alpha$ -mRNA-Expressionsrate nach 24-stündiger Stimulation mit 0,01  $\mu$ M 7,8-DHF in den LPS-aktivierten Mikroglia tendenziell gesenkt werden.

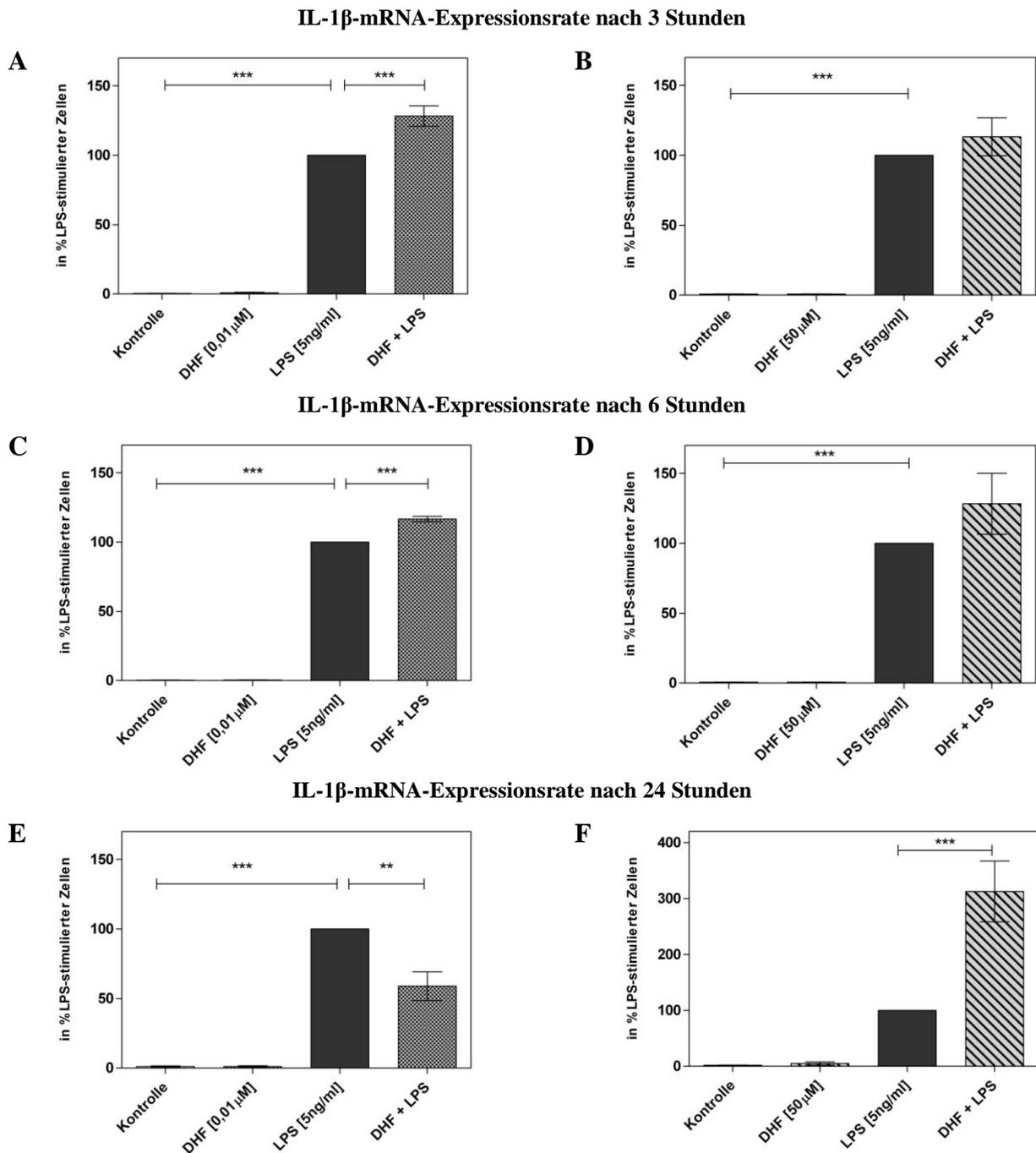


**Abb. 4.5: Einfluss von 7,8-DHF auf die TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression nach 3, 6 und 24 Stunden.** Nach der Isolierung der mRNA und einer Umschreibung in cDNA wurde die TNF- $\alpha$ -mRNA-Expressionsrate mithilfe der qPCR relativ quantifiziert. In einer Konzentration von 0,01  $\mu$ M führte 7,8-DHF nach 3-stündiger Stimulation in den LPS-stimulierten Mikroglia zu einem signifikanten Anstieg der TNF- $\alpha$ -mRNA-Expressionsrate auf 142,3% (Abb. 4.5 A). Nach 24 Stunden kombinierter Stimulation von 0,01  $\mu$ M 7,8-DHF und LPS sank die TNF- $\alpha$ -mRNA-Expressionsrate geringfügig auf 93,14% (Abb. 4.5 E). In einer Konzentration von 50  $\mu$ M führte 7,8-DHF nach 3-, 6- und 24-stündiger Stimulation zu einem signifikanten Anstieg der TNF- $\alpha$ -mRNA-Expressionsrate in LPS-stimulierten Mikroglia (Abb. 4.5 B+D+F). Die Werte sind prozentual als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben ( $n > 3$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ ).

#### 4.4.2 Einfluss von 7,8-DHF auf die IL-1 $\beta$ -mRNA-Synthese in Mikroglia

Der Einfluss von 7,8-DHF auf die IL-1 $\beta$ -mRNA-Synthese wurde mittels qPCR nach 3 Stunden (Abb. 4.6 A+B), 6 Stunden (Abb. 4.6 C+D) und 24 Stunden (Abb. 4.6 E+F) ermittelt und grafisch dargestellt, wobei die Messwerte relativ in % LPS-stimulierter Mikroglia angegeben wurden. Eine Stimulation der Mikroglia mit 0,01  $\mu$ M bzw. 50  $\mu$ M 7,8-DHF führte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte zu einer Veränderung der IL-1 $\beta$ -mRNA-Synthese im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen, wohingegen LPS die IL-1 $\beta$ -mRNA stark heraufregulierte (Abb. 4.6 A-F). Nach einer 3-stündigen kombinierten Stimulation mit 0,01  $\mu$ M 7,8-DHF und LPS wurde die IL-1 $\beta$ -mRNA-Synthese signifikant auf 128,2% heraufreguliert (Abb. 4.6 A). Auch 50  $\mu$ M 7,8-DHF regelte die Expressionsrate in LPS-stimulierten Mikroglia signifikant auf 113,2% hoch (Abb. 4.6 B). Nach 6 Stunden wurde die Expressionsrate bei einer kombinierten Stimulation mit 0,01  $\mu$ M 7,8-DHF und LPS signifikant auf 116% gesteigert, ebenso wie bei 50  $\mu$ M 7,8-DHF und LPS auf 128,2% (Abb. 4.6 C+D). Nach 24-stündiger kombinierter Stimulation mit 7,8-DHF und LPS bewirkte das 0,01  $\mu$ M-konzentrierte 7,8-DHF eine signifikante Reduktion der IL-1 $\beta$ -mRNA-Expressionsrate auf 58,9% (Abb. 4.6 E). Im Gegensatz dazu führten 50  $\mu$ M 7,8-DHF in den LPS-stimulierten Mikroglia zu einer signifikanten Steigerung der Expressionsrate auf 312% (Abb. 4.6 F).

Abschließend ist festzustellen, dass 7,8-DHF sowohl einen konzentrationsabhängigen als auch einen zeitabhängigen Einfluss auf die IL-1 $\beta$ -mRNA-Expressionsrate aufweist. 7,8-DHF regulierte in Konzentrationen von 0,01  $\mu$ M nach 3 und 6 Stunden kombinierter Stimulation mit LPS sowie 50  $\mu$ M nach allen Stimulationszeiten die Expressionsrate herauf, wohingegen eine 24-stündige Stimulation mit 0,01  $\mu$ M 7,8-DHF und LPS die IL-1 $\beta$ -mRNA-Expressionsrate signifikant reduzierte.

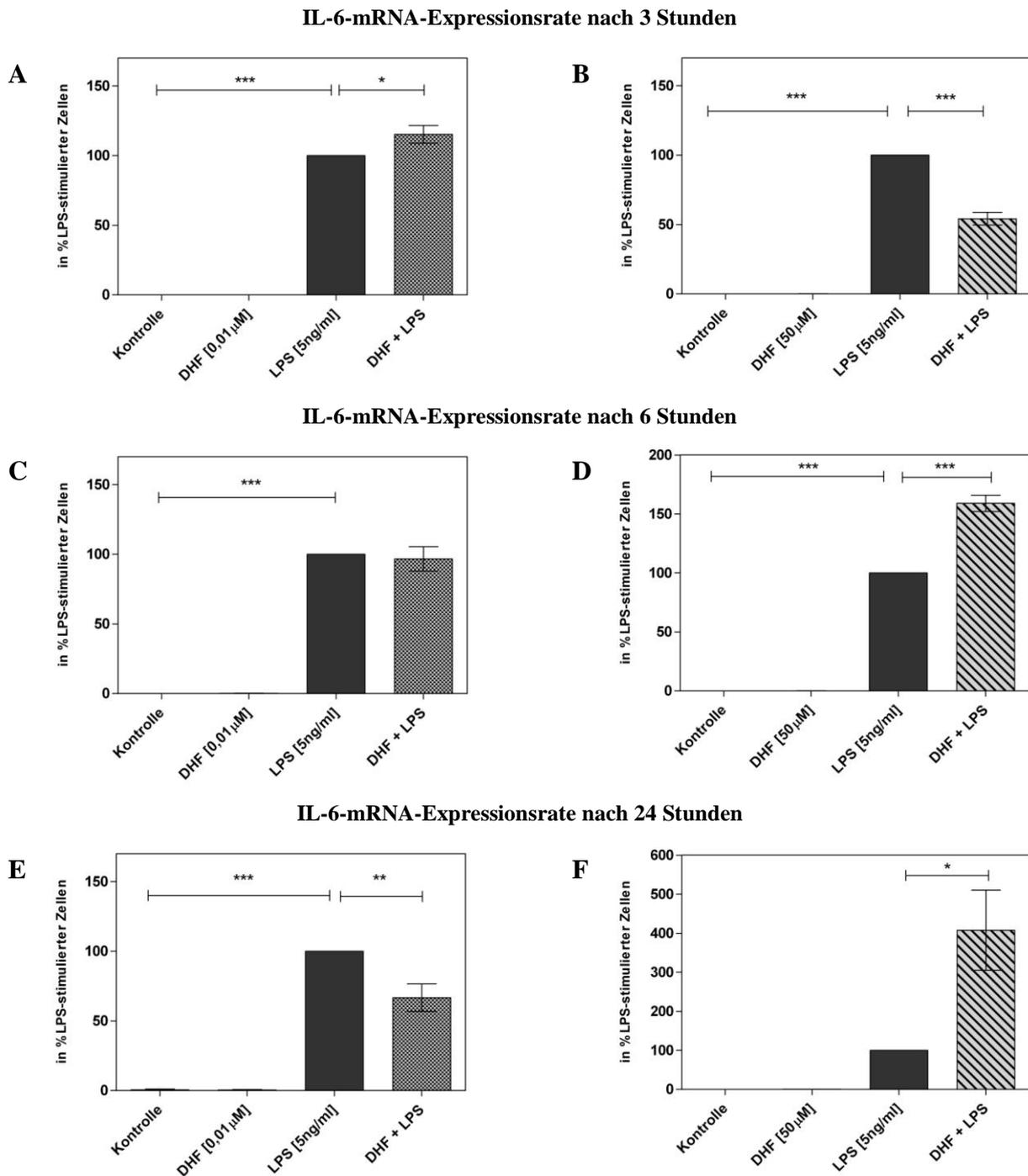


**Abb. 4.6: Einfluss von 7,8-DHF auf die IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression nach 3, 6 und 24 Stunden.** Nach der Isolierung der mRNA und einer Umschreibung in cDNA wurde die IL-1 $\beta$ -mRNA-Expressionsrate mithilfe der qPCR relativ quantifiziert. In einer Konzentration von 0,01  $\mu$ M führte 7,8-DHF nach 3 Stunden sowie nach 6 Stunden in den LPS-stimulierten Mikroglia zu einem signifikanten Anstieg der IL-1 $\beta$ -mRNA-Expressionsrate (Abb. 4.6 A+C). Nach 24-stündiger kombinierter Stimulation mit 0,01  $\mu$ M und LPS sank die Expressionsrate signifikant auf 58,9% (Abb. 4.6 E). In einer Konzentration von 50  $\mu$ M bewirkte 7,8-DHF in LPS-stimulierten Mikroglia einen Anstieg der mRNA-Expressionsrate von IL-1 $\beta$ , der mit Zunahme der Stimulationszeit von Abb. 4.6 B+D+F anstieg. Die Werte sind prozentual als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben ( $n > 3$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ ).

#### 4.4.3 Einfluss von 7,8-DHF auf die IL-6 mRNA-Synthese von Mikroglia

Der Einfluss von 7,8-DHF auf die IL-6-mRNA-Synthese wurde mittels qPCR nach 3 Stunden (Abb. 4.7 A+B), 6 Stunden (Abb. 4.7 C+D) und 24 Stunden (Abb. 4.7 E+F) ermittelt und grafisch dargestellt, wobei die Messwerte relativ in % LPS-stimulierter Mikroglia angegeben wurden. Eine Stimulation der Mikroglia mit 0,01  $\mu\text{M}$  bzw. 50  $\mu\text{M}$  7,8-DHF führte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte zu einer Veränderung der IL-6-mRNA-Synthese im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen, wohingegen LPS die IL-6-mRNA stark heraufregulierte (Abb. 4.7 A-F). Nach einer 3-stündigen kombinierten Stimulation mit 0,01  $\mu\text{M}$  7,8-DHF und LPS wurde die IL-6-mRNA-Synthese signifikant auf 113% hochreguliert (Abb. 4.7 A). Im Gegensatz dazu konnte 50  $\mu\text{M}$  7,8-DHF die Expressionsrate in LPS-stimulierten Mikroglia signifikant auf 54,2% reduzieren (Abb. 4.7 B). Nach 6-stündiger kombinierter Stimulation mit 7,8-DHF und LPS bewirkte das 0,01  $\mu\text{M}$ -konzentrierte 7,8-DHF nahezu keine Veränderung der IL-6-mRNA-Expressionsrate, wohingegen 50  $\mu\text{M}$  7,8-DHF die Expressionsrate signifikant auf 158% hochregulierte (Abb. 4.7 C+D). Nach 24-stündiger kombinierter Stimulation mit 7,8-DHF und LPS führte das 0,01  $\mu\text{M}$ -konzentrierte 7,8-DHF zu einer signifikanten Reduktion der IL-6-mRNA-Expressionsrate auf 67% (Abb. 4.7 E). Auch in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  7,8-DHF kam es infolge einer kombinierten Stimulation mit LPS zu einer signifikanten Steigerung der Expressionsrate auf 407% (Abb. 4.7 F).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass 7,8-DHF einen konzentrations- und zeitabhängigen Einfluss auf die IL-6-mRNA-Expressionsrate in LPS-stimulierten Mikroglia ausübt. Nach einer 3-stündigen Stimulation mit 0,01  $\mu\text{M}$  7,8-DHF und LPS wurde die IL-6-mRNA-Synthese signifikant heraufreguliert, nach 24 Stunden hingegen konnte die Expressionsrate signifikant reduziert werden. Im Gegensatz dazu regulierte 50  $\mu\text{M}$  7,8-DHF nach 6- und 24-stündiger Stimulation mit LPS die IL-6-mRNA-Expression herauf, nach 3-stündiger kombinierter Stimulation mit 50  $\mu\text{M}$  und LPS konnte die Expressionsrate jedoch reduziert werden.



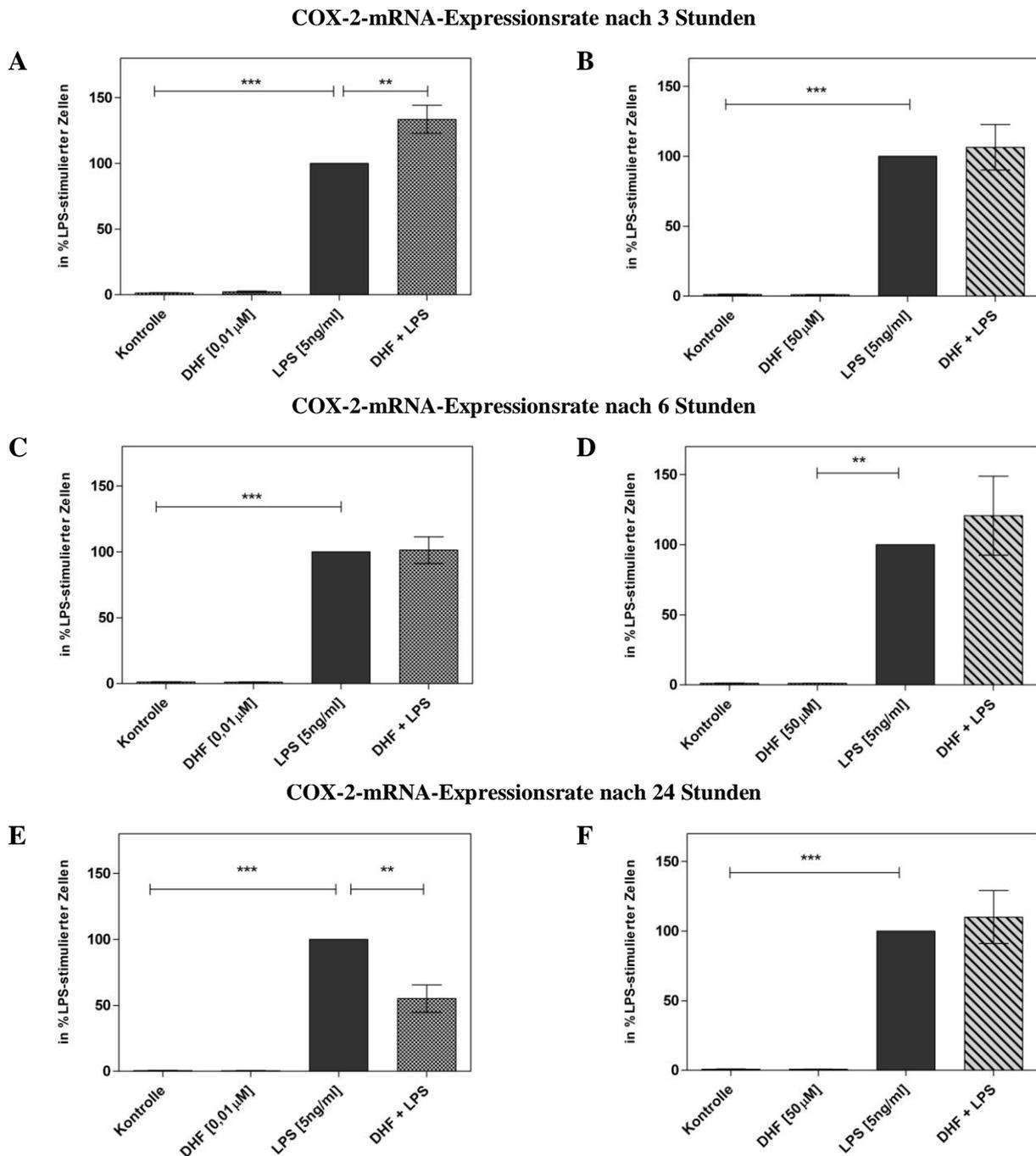
**Abb. 4.7: Einfluss von 7,8-DHF auf die IL-6-mRNA-Expressionsrate nach 3, 6 und 24 Stunden.** Nach der Isolierung der mRNA und einer Umschreibung in cDNA wurde die IL-6-mRNA-Expressionsrate mithilfe der qPCR relativ quantifiziert. In einer Konzentration von 0,01 µM 7,8-DHF bewirkte eine 3-stündige kombinierte Stimulation mit LPS einen signifikanten Anstieg der IL-6-mRNA-Expressionsrate auf 113% (Abb. 4.7 A), wohingegen nach 6 Stunden 0,01 µM 7,8-DHF in den LPS-stimulierten Mikroglia keinen Einfluss ausübte (Abb. 4.7 C). Nach 24 Stunden kombinierter Stimulation mit 0,01 µM 7,8-DHF und LPS sank die IL-6-mRNA-Expressionsrate signifikant auf 67% (Abb. 4.7 E). In einer Konzentration von 50 µM 7,8-DHF wurde die Expressionsrate nach 3 Stunden kombinierter Stimulation mit LPS signifikant auf 52,3% gesenkt (Abb. 4.7 B). Nach 6-stündiger Stimulation und 24-stündiger Stimulation mit 50 µM und LPS kam es hingegen zu einem signifikanten Anstieg der Expressionsrate (Abb. 4.7 D+F). Die Werte sind prozentual als Mittelwert ± SEM angegeben ( $n > 3$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ ).

## 4.5 Einfluss von 7,8-DHF auf die mRNA-Expression von COX-2

Infolge eines inflammatorischen Stimulus wird COX-2 vermehrt in Monozyten und Makrophagen exprimiert und führt nach der Aktivierung zur Herstellung von Prostaglandin H<sub>2</sub>, welches als Vorstufe der an der glialen Entzündungsreaktion beteiligten bioaktiven Lipide wie Prostaglandin E<sub>2</sub> fungiert (→1.2.2).

Der Einfluss von 7,8-DHF auf die COX-2-mRNA-Synthese wurde mittels qPCR nach 3 Stunden (Abb. 4.8 A+B), 6 Stunden (Abb. 4.8 C+D) und 24 Stunden (Abb. 4.8 E+F) ermittelt und grafisch dargestellt, wobei die Messwerte relativ in % LPS-stimulierter Mikroglia angegeben wurden. Eine Stimulation der Mikroglia mit 0,01  $\mu$ M bzw. 50  $\mu$ M 7,8-DHF führte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte zu einer Veränderung der COX-2-mRNA-Synthese im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen, wohingegen LPS die COX-2-mRNA stark herauf regulierte (Abb. 4.8 A-F). Nach einer 3-stündigen kombinierten Stimulation mit 7,8-DHF und LPS wurde die COX-2-mRNA-Synthese heraufreguliert. Bei einer Konzentration von 0,01  $\mu$ M 7,8-DHF stieg diese in den LPS-stimulierten Mikroglia signifikant auf 133,5% (Abb. 4.8 A), wohingegen bei einer kombinierten Stimulation mit 50  $\mu$ M 7,8-DHF und LPS ein tendenzieller Anstieg auf 106% gemessen wurde (Abb. 4.8 B). Nach 6-stündiger kombinierter Stimulation mit 7,8-DHF und LPS bewirkte das 0,01  $\mu$ M-konzentrierte 7,8-DHF nahezu keine Veränderung der COX-2-mRNA-Expressionsrate (Abb. 4.8 C), wohingegen 50  $\mu$ M 7,8-DHF die Expressionsrate in den LPS-stimulierten Mikroglia signifikant auf 120,8% hochregulierte (Abb. 4.8 D). Nach 24-stündiger kombinierter Stimulation mit 7,8-DHF und LPS reduzierte das 0,01  $\mu$ M-konzentrierte 7,8-DHF die COX-2-mRNA-Expressionsrate signifikant auf 55% (Abb. 4.8 E). Im Gegensatz dazu steigerte 50  $\mu$ M 7,8-DHF nach kombinierter Stimulation mit LPS die Expressionsrate auf 110% (Abb. 4.8 F).

Die Ergebnisse zeigen somit, dass 7,8-DHF einen konzentrations- und zeitabhängigen Einfluss auf die COX-2-mRNA-Expressionsrate in LPS-stimulierten Mikroglia ausübt. In Konzentrationen von 0,01  $\mu$ M 7,8-DHF nach 3 und 6 Stunden Stimulation mit LPS sowie 50  $\mu$ M 7,8-DHF und LPS nach allen Stimulationszeiten regulierte 7,8-DHF die Expressionsrate herauf, wohingegen nach einer 24-stündigen Stimulation der Zellen mit 0,01  $\mu$ M 7,8-DHF und LPS die Expressionsrate von COX-2 signifikant reduziert werden konnte.

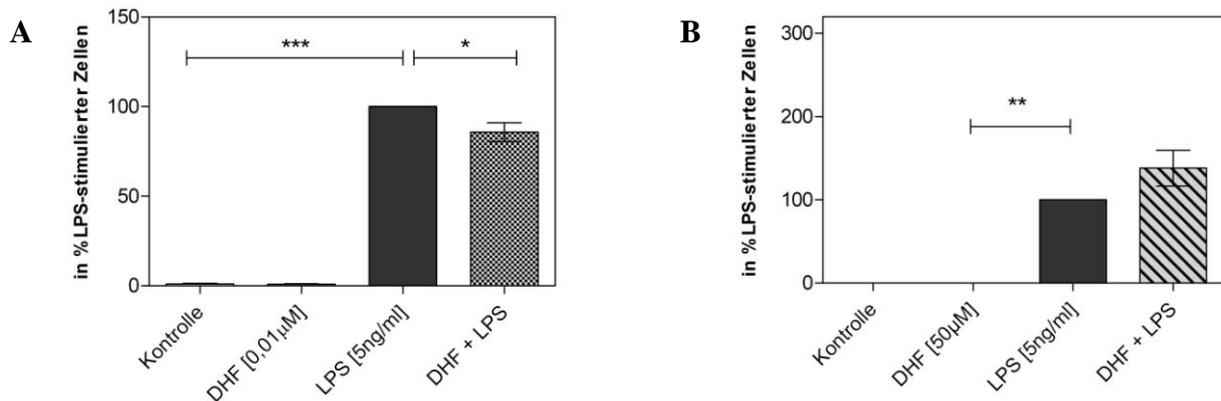
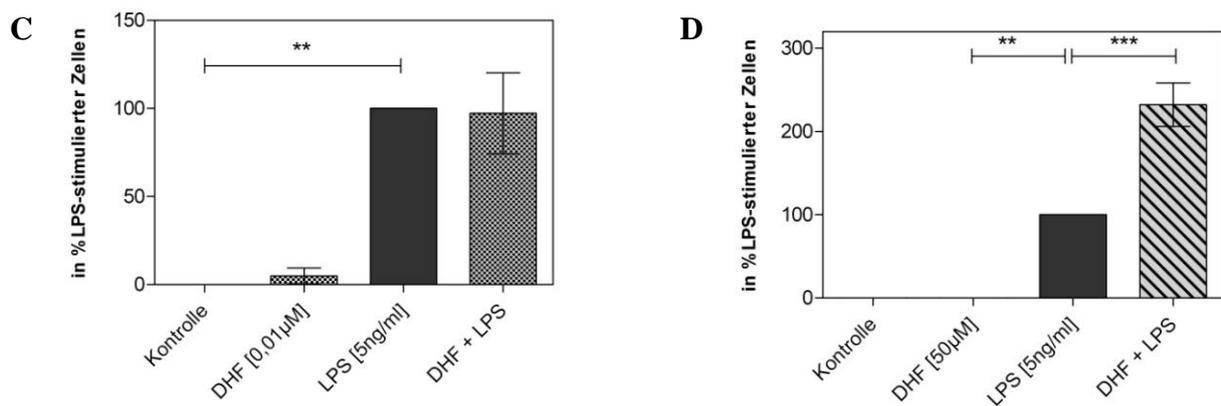


**Abb. 4.8: Einfluss von 7,8-DHF auf die COX-2-mRNA-Expressionsrate nach 3, 6 und 24 Stunden.** Nach der Isolierung der mRNA und einer Umschreibung in cDNA wurde die COX-2-mRNA-Expressionsrate mithilfe der qPCR relativ quantifiziert. In einer Konzentration von 0,01 µM führte 7,8-DHF nach 3-stündiger kombinierter Stimulation mit LPS zu einem signifikanten Anstieg der COX-2-mRNA-Expressionsrate auf 133,5% (Abb. 4.8 A), wohingegen eine 6-stündige kombinierte Stimulation mit 0,01 µM 7,8-DHF und LPS keinen Einfluss auf die COX-2-mRNA-Expressionsrate zeigte. Im Gegensatz dazu lag nach 24 Stunden kombinierter Stimulation mit 0,01 µM und LPS eine signifikante Reduktion der COX-2-mRNA-Expressionsrate auf 55% vor (Abb. 4.8 E). In einer Konzentration von 50 µM bewirkte 7,8-DHF in LPS-stimulierten Mikroglia bei allen drei Stimulationszeiten einen Anstieg der COX-2-Expressionsrate (Abb. 4.8 B+D+F). Die Werte sind prozentual als Mittelwert ± SEM angegeben (n > 3, \*\*\*p < 0,001, \*\*p < 0,01).

## **4.6 Einfluss von 7,8-DHF auf die Proteinsynthese pro-inflammatorischer Zytokine**

### **4.6.1 Einfluss von 7,8-DHF auf die TNF- $\alpha$ -Freisetzung durch Mikroglia**

Der Einfluss von 7,8-DHF auf die TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus Mikroglia wurde mittels ELISA nach 6 Stunden (Abb. 4.9 A+B) und 24 Stunden (Abb. 4.9 C+D) ermittelt und grafisch dargestellt, wobei die Messwerte relativ in % LPS-stimulierter Mikroglia angegeben wurden. Eine Stimulation der Mikroglia mit 0,01  $\mu$ M bzw. 50  $\mu$ M 7,8-DHF führte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte zu einer Veränderung der TNF- $\alpha$ -Proteinfreisetzung im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen, wohingegen LPS die Proteinfreisetzung stark heraufregulierte (Abb. 4.9 A-F). Nach 6-stündiger kombinierter Stimulation mit 7,8-DHF und LPS führte das 0,01  $\mu$ M-konzentrierte 7,8-DHF zu einer signifikanten Reduktion der Proteinfreisetzung auf 85,7% (Abb. 4.9 A), wohingegen 50  $\mu$ M 7,8-DHF die Proteinfreisetzung in den LPS-stimulierten Mikroglia auf 138% hochregulierte (Abb. 4.9 B). Nach 24-stündiger kombinierter Stimulation mit LPS übte 0,01  $\mu$ M 7,8-DHF keinen Einfluss auf die Proteinfreisetzung aus (Abb. 4.9 C), hingegen stieg die Proteinfreisetzung bei einer Konzentration von 50  $\mu$ M 7,8-DHF signifikant auf 232% an (Abb. 4.9 D). Zusammenfassend ist festzustellen, dass 7,8-DHF sowohl einen konzentrationsabhängigen als auch einen zeitabhängigen Einfluss auf die TNF- $\alpha$ -Proteinfreisetzung zeigt. Eine kombinierte Stimulation mit LPS und 7,8-DHF in Konzentrationen von 0,01  $\mu$ M nach 24 Stunden Stimulation sowie 50  $\mu$ M nach allen Stimulationszeiten regulierte die Proteinfreisetzung herauf. Nach einer 6-stündigen Stimulation mit 0,01  $\mu$ M 7,8-DHF und LPS konnte hingegen eine signifikante Senkung der TNF- $\alpha$ -Proteinfreisetzung erreicht werden.

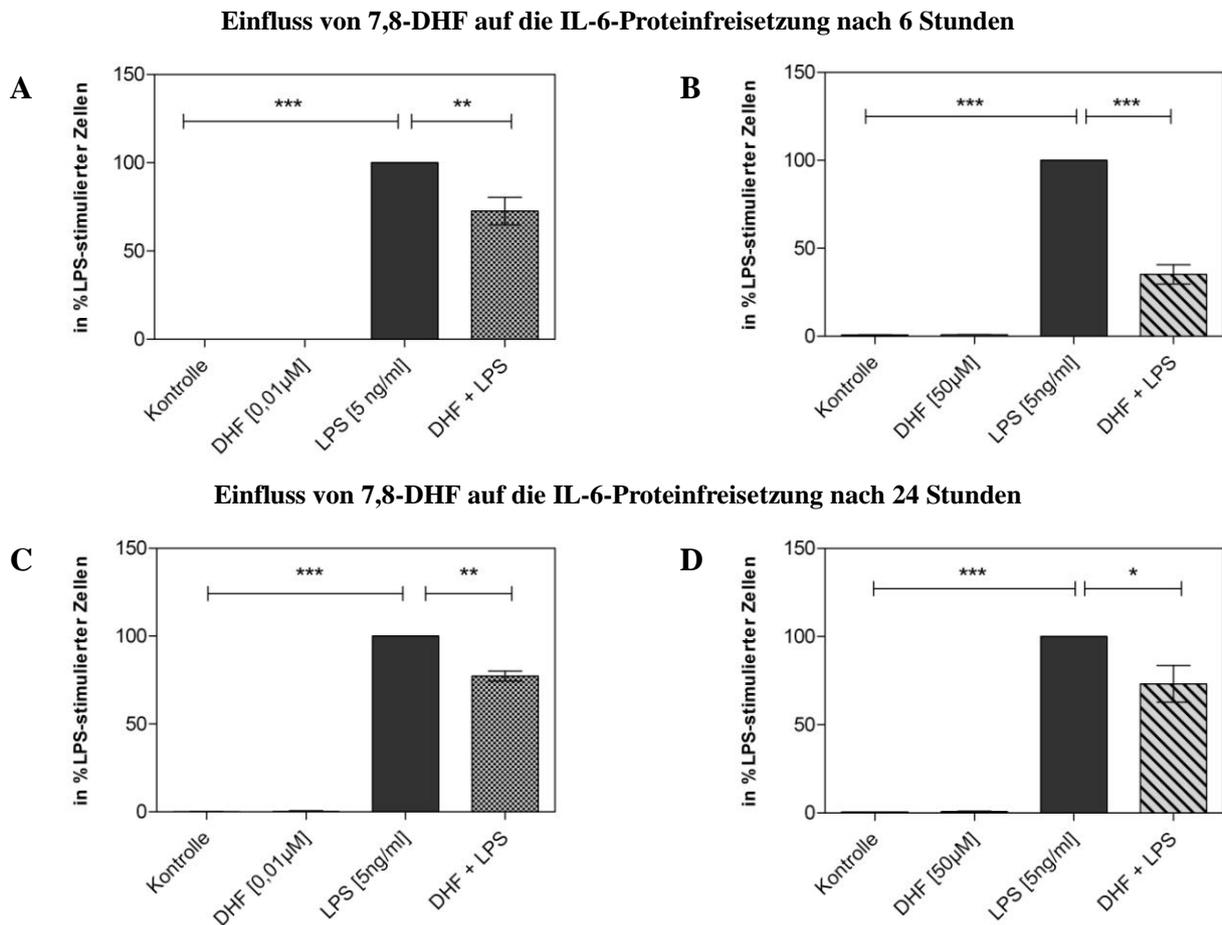
Einfluss von 7,8-DHF auf die TNF- $\alpha$ -Proteinfreisetzung  $\alpha$  nach 6 StundenEinfluss von 7,8-DHF auf die TNF- $\alpha$ -Proteinfreisetzung nach 24 Stunden

**Abb. 4.9: Einfluss von 7,8-DHF auf die TNF- $\alpha$ -Freisetzung nach 6 und 24 Stunden.** Die TNF- $\alpha$ -Freisetzung wurde durch ELISA ermittelt. In einer Konzentration von 0,01  $\mu$ M verringerte 7,8-DHF nach 6-stündiger kombinierter Stimulation mit LPS signifikant die TNF- $\alpha$ -Freisetzung auf 85,7% (Abb. 4.9 A). Nach 24-stündiger kombinierter Stimulation mit 0,01  $\mu$ M und LPS wurde die Proteinexpressionsrate nicht beeinflusst (Abb. 4.9 C). 50  $\mu$ M 7,8-DHF bewirkte nach 6 Stunden in den LPS-aktivierten Mikroglia einen Anstieg der TNF- $\alpha$ -Freisetzung im Vergleich zu den mit LPS-stimulierten Zellen auf 138%, wobei die Proteinfreisetzung nach 24 Stunden kombinierter Stimulation mit 50  $\mu$ M 7,8-DHF und LPS noch weiter auf 232% anstieg (Abb. 4.9 B+D). Die Werte sind prozentual als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben ( $n > 3$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ ).

#### 4.6.2 Einfluss von 7,8-DHF auf die IL-6-Freisetzung durch Mikroglia

Der Einfluss von 7,8-DHF auf die IL-6-Freisetzung aus Mikroglia wurde mittels ELISA nach 6 Stunden (Abb. 4.10 A+B) und 24 Stunden (Abb. 4.10 C+D) ermittelt und grafisch dargestellt, wobei die Messwerte relativ in % LPS-stimulierter Mikroglia angegeben wurden. Eine Stimulation der Mikroglia mit 0,01  $\mu\text{M}$  bzw. 50  $\mu\text{M}$  7,8-DHF führte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte zu einer Veränderung der IL-6-Proteinfreisetzung im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen, wohingegen LPS die Proteinfreisetzung stark heraufregulierte (Abb. 4.10 A-F). Nach kombinierter Stimulation mit 7,8-DHF und LPS konnte die Proteinexpressionsrate reduziert werden. Nach 6 Stunden wurde die IL-6-Freisetzung bei einer Konzentration von 0,01  $\mu\text{M}$  7,8-DHF in den LPS-stimulierten Mikroglia signifikant auf 72,7% gesenkt (Abb. 4.10 A), wurde die 7,8-DHF-Konzentration auf 50  $\mu\text{M}$  erhöht, konnte die Expressionsrate nach kombinierter Stimulation mit LPS signifikant auf 35% gesenkt werden (Abb. 4.10 B). Nach 24-stündiger kombinierter Stimulation mit 7,8-DHF und LPS verringerte sich die IL-6-Freisetzung bei einer Konzentration von 0,01  $\mu\text{M}$  7,8-DHF auf 76% (Abb. 4.10 C) und bei 50  $\mu\text{M}$  7,8-DHF konnte ebenfalls eine Reduktion der Proteinfreisetzung auf 73% erreicht werden (Abb. 4.10 D).

Abschließend lässt sich festhalten, dass 7,8-DHF in beiden Konzentrationen und Stimulationszeiten die IL-6-Proteinfreisetzung signifikant senkte.

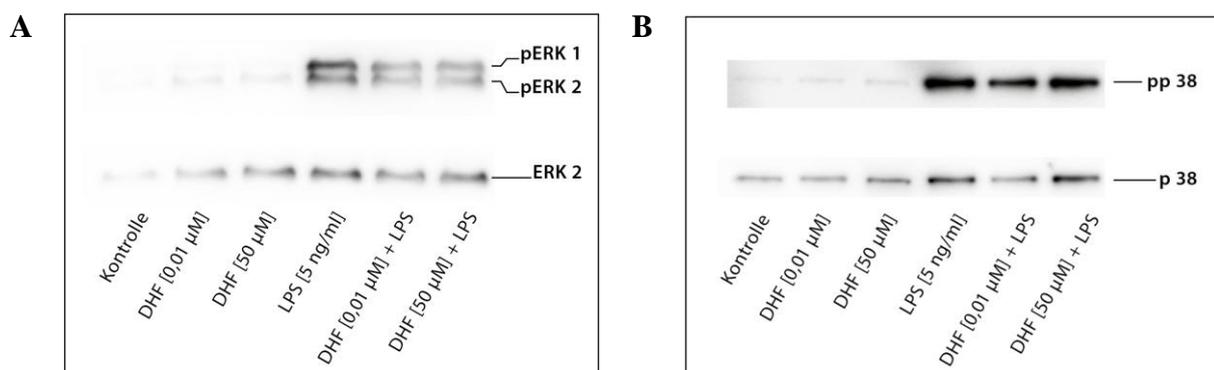


**Abb. 4.10: Einfluss von 7,8-DHF auf die IL-6-Freisetzung nach 6 und 24 Stunden.** Die IL-6-Freisetzung wurde durch ELISA ermittelt. In einer Konzentration von 0,01 µM verringerte 7,8-DHF nach 6-stündiger kombinierter Stimulation mit LPS die IL-6-Freisetzung signifikant auf 72,7% (Abb. 4.10 **A**). Nach 24-stündiger kombinierter Stimulation mit 0,01 µM und LPS wurde die Proteinexpressionsrate ebenfalls auf 76% reduziert (Abb. 4.10 **C**). 50 µM 7,8-DHF bewirkte nach 6 Stunden in den LPS-aktivierten Mikroglia eine Senkung der TNF- $\alpha$ -Freisetzung im Vergleich zu den mit LPS-stimulierten Zellen auf 35% (Abb. 4.10 **B**). Auch nach 24-stündiger kombinierter Stimulation mit 50 µM 7,8-DHF und LPS reduzierte sich die IL-6-Proteinfreisetzung auf 73% (Abb. 4.10 **D**). Die Werte sind prozentual als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben ( $n > 3$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ ).

## 4.7 Einfluss von 7,8-DHF auf die Aktivierung von MAP-Kinasen in primären Mikroglia

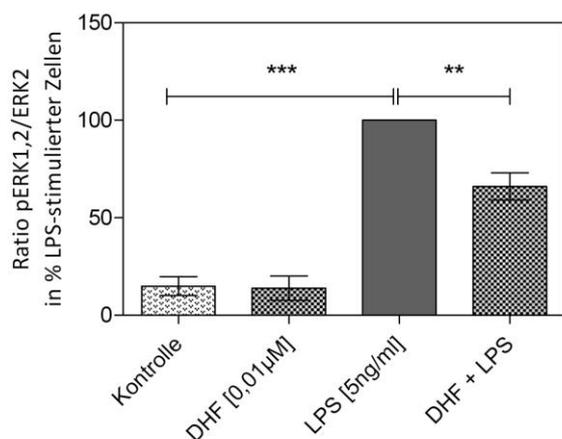
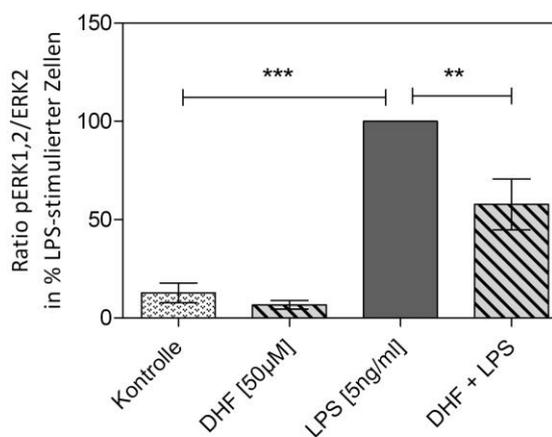
Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskaden (MAPK-Kaskaden) sind intrazelluläre Signaltransduktionswege, bei denen sich verschiedene MAPK durch Phosphorylierung nacheinander aktivieren, um nachfolgend als aktivierte Proteine Transkriptionsfaktoren zu aktivieren oder als solche zu fungieren. So kann eine Aktivierung der extrazellulär Signal-regulierten Kinasen-Kaskade 1/2 (ERK1/2) sowie der p38-Mitogen-aktivierten Proteinkinasen 38 (p38) die Expression von Wachstumsfaktoren und Zytokinen regulieren und somit sowohl Wachstums- und Differenzierungsprozesse in Zellen als auch deren Apoptose beeinflussen.

Der Einfluss von 7,8-DHF auf die Aktivierung von MAPK in Mikroglia wurde in dieser Arbeit mittels Western Blot-Analysen untersucht und grafisch dargestellt (Abb. 4.11). Nach einer 30-minütigen Stimulation zeigte sich eine starke Zunahme der Bandenintensität in den LPS-aktivierten Mikroglia im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen, die aus einer starken Heraufregulation der Menge an phosphoryliertem ERK1/2 (pERK1/2) (Abb. 4.11 A) als auch an phosphoryliertem p38 (pp38) (Abb. 4.11 B) resultierte und somit mit einer Aktivierung dieser Signalkaskaden in Zusammenhang gebracht werden konnten. Diese Effekte wurden durch eine simultane Stimulation mit 7,8-DHF und LPS deutlich reduziert. Hingegen wies eine alleinige Stimulation mit 0,01  $\mu\text{M}$  7,8-DHF oder 50  $\mu\text{M}$  7,8-DHF keine Veränderung im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen auf.



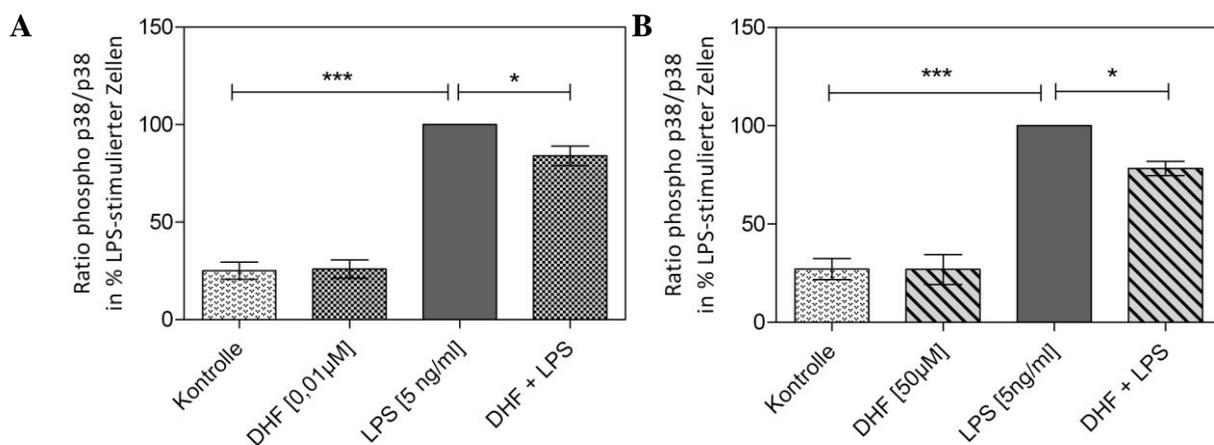
**Abb. 4.11: Einfluss von 7,8-DHF auf die ERK1/2- und p38-Phosphorylierung in Mikroglia nach 30-minütiger Stimulation als repräsentativer Blot.** Die Menge an pERK1/2 (A) und pp38 (B) im Verhältnis zu den jeweils unphosphorylierten Kinasen (ERK2 bzw. p38) wurde durch eine Western Blot-Analyse bestimmt und aufgrund der unterschiedlichen Bandenintensitäten verglichen. Eine Stimulation der Mikroglia mit LPS führte zu einem starken Anstieg von pERK1/2 sowie von pp38 verglichen mit den unstimulierten Kontrollen. Erfolgte hingegen eine simultane Stimulation mit LPS und 7,8-DHF, reduzierte sich der Anteil an pERK1/2 und pp38 im Vergleich zu den LPS-stimulierten Mikroglia.

Um diese Aussagen statistisch zu bestätigen, wurden die Blots densitometrisch ausgewertet. Dafür wurde zunächst der Quotient aus der Bandenintensität der phosphorylierten und unphosphorylierten Proteine gebildet und die Ergebnisse relativ in % LPS-stimulierter Mikroglia angegeben. Abbildung 4.12 A zeigt, dass eine Stimulation der Mikroglia mit 0,01  $\mu\text{M}$  7,8-DHF keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von ERK1/2 im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen ausübte, wohingegen eine Stimulation der Mikroglia mit LPS eine signifikante Heraufregulation dieser bewirkte. Nach einer simultanen Stimulation der Mikroglia mit LPS und 0,01  $\mu\text{M}$  7,8-DHF wurde die LPS-induzierte verstärkte ERK1/2-Phosphorylierung hingegen auf 66,1% herunterreguliert. Dieser Effekt verstärkte sich bei einer Stimulation von LPS-aktivierten Mikroglia mit 50  $\mu\text{M}$  7,8-DHF, sodass die ERK1/2-Phosphorylierung auf 57,8% sank (Abb. 4.12 B).

**A****B**

**Abb. 4.12: Densitometrische Auswertung des Einflusses von 7,8-DHF auf die ERK1/2-Phosphorylierung in Mikroglia nach 30-minütiger Stimulation.** Eine Stimulation mit 7,8-DHF in Konzentrationen von 0,01  $\mu\text{M}$  sowie 50  $\mu\text{M}$  hatte keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von ERK1/2 im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen, wohingegen eine Stimulation der Mikroglia mit LPS einen starken Anstieg von pERK1/2 bewirkte (A und B). Erfolgte hingegen eine simultane Stimulation mit LPS und 7,8-DHF, wurde pERK1/2 im Vergleich zu den mit LPS stimulierten Zellen herabreguliert, wobei die höhere Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  7,8-DHF eine größere Reduktion von pERK1/2 bewirkte. Die Werte sind prozentual als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben ( $n > 3$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ ).

Abbildung 4.13 zeigt, dass eine Stimulation der Mikroglia mit 0,01  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  7,8-DHF keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von p38 im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen ausübte, wohingegen eine Stimulation der Mikroglia mit LPS eine signifikante Heraufregulation dieser bewirkte. Nach einer simultanen Stimulation der Mikroglia mit LPS und 0,01  $\mu\text{M}$  7,8-DHF wurde die LPS-induzierte verstärkte p38-Phosphorylierung hingegen auf 84,6% herunterreguliert (Abb. 4.13 A). Dieser Effekt verstärkte sich bei einer Stimulation von LPS-aktivierten Mikroglia mit 50  $\mu\text{M}$  7,8-DHF, sodass die p38-Phosphorylierung auf 78,32% sank (Abb. 4.13 B).



**Abb. 4.13: Densitometrische Auswertung des Einflusses von 7,8-DHF auf die p38-Phosphorylierung in Mikroglia nach 30-minütiger Stimulation.** Eine Stimulation mit 7,8-DHF in Konzentrationen von 0,01  $\mu\text{M}$  sowie 50  $\mu\text{M}$  hatte keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von p38 im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen, wohingegen eine Stimulation der Mikroglia mit LPS zu einem starken Anstieg von pp38 führte (A und B). Erfolgte hingegen eine simultane Stimulation mit LPS und 7,8-DHF, wurde pp38 im Vergleich zu den mit LPS stimulierten Zellen herabreguliert, wobei eine höhere Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  7,8-DHF eine größere Reduktion von pp38 bewirkte (Abb. 4.13 B). Die Werte sind prozentual als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben ( $n > 3$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ ).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass 7,8-DHF konzentrationsabhängig in LPS-aktivierten Mikroglia sowohl die Aktivierung des ERK1/2- als auch des p38-Signalweges beeinflusste.

## 5 Diskussion

Morbus Parkinson weist als ein Charakteristikum eine chronische Neuroinflammation im Gehirn auf (McGeer und McGeer, 2008), deren Rolle in neurodegenerativen Krankheiten kontrovers diskutiert wird (Marchetti und Abbraccio, 2005). Zum Einen kann die Neuroinflammation eine Neuroprotektion bewirken, indem Mikroglia zytotoxische Moleküle wie Superoxide, NO oder freie Radikale sezernieren und diese Pathogene, virusinfizierte Zellen oder Tumorzellen abtöten. Zudem phagozytieren die Mikroglia Zelldebris und produzieren neurotrophische Faktoren (Gao *et al.*, 2003). Zum Anderen können Mikroglia durch eine exzessive Produktion pro-inflammatorischer Zytokine ortsansässige Neurone abtöten und somit die Inflammationsreaktion potenzieren (Raghavendra *et al.*, 2004). Die bisherige angewandte medikamentöse Therapie bei Morbus Parkinson zielt auf eine Unterbindung der pro-inflammatorischen Antwort ab (Tansey und Goldberg, 2010), wodurch die neuroprotektive Wirkung der Neuroinflammation ebenfalls gehemmt wird. Dies hat zur Folge, dass der Zelldebris nicht weggeräumt wird und als Trigger der Inflammation zu weiteren Zellschäden führt (Lauber *et al.*, 2004). Auf lange Sicht ist die aktuelle Behandlung somit nicht die effektivste Strategie (Marchetti und Abbraccio, 2005), da die nützlichen Effekte der pro-inflammatorischen Antwort ebenfalls unterbunden werden. Das Ziel einer zukünftigen medikamentösen Therapie sollte demnach eine Balance zwischen der vorteilhaften und schädlichen Wirkung der Neuroinflammation sein, indem die Immunantwort durch eine Immunmodulation zugunsten der Neuroprotektion bzw. –regeneration verschoben wird (Polazzi und Monti, 2010) und somit vermehrt ein neuroprotektiver Phänotyp der Mikroglia aquisiert wird (Polazzi und Contestabile, 2002).

Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit 7,8-DHF auf eine mögliche anti-inflammatorische Wirkung auf Mikroglia im Sinne einer Neuromodulation untersucht und somit die Eignung als zukünftiges Therapeutikum bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson überprüft.

### 5.1 7,8-DHF

7,8-DHF, auch bekannt als Vitamin P, fördert in zahlreichen Untersuchungen das neuronale Überleben von dopaminergen Neuronen bei Morbus Parkinson (Jang *et al.*, 2010; Sconce *et al.*, 2015), Motoneuronen (Tsai *et al.*, 2013) sowie primären kortikalen Neurone bei Morbus Alzheimer (Castello *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014) und weist somit sowohl *in vivo* als auch

*in vitro* neuroprotektive Eigenschaften auf (Du und Hill, 2015). Zudem fördert es die Neurogenese (Briones und Woods, 2013) und dämpft die Entwicklung eines depressiven Phänotyps (Zhang, J. C. *et al.*, 2015).

7,8-DHF ist der Gruppe der fettlöslichen Vitamine zugehörig und weist dementsprechend eine Licht- und Sauerstoffempfindlichkeit auf. Diese Instabilität des Wirkstoffes 7,8-DHF ist auf eine Catechol-Gruppe zurück zu führen, durch die der Wirkstoff für eine Beseitigung im zirkulatorischen System infolge von Oxidation, Glucuronidierung, Sulfatierung und Methylierung anfällig wird (Liu *et al.*, 2012). Infolgedessen kommt es zu einer First-Pass Metabolisierung in der Leber oder im Gastrointestinaltrakt (Wong *et al.*, 2008), welches eine geringe orale Bioverfügbarkeit von 5% zur Folge hat (Zhang *et al.*, 2014). Die Catechol-Gruppe wird allerdings auch als TrkB-Agonist für die Bindung an den TrkB-Rezeptor benötigt (Liu *et al.*, 2010). Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit und Instabilität ist eine pharmakologische Applikation von 7,8-DHF limitiert (Koirala *et al.*, 2014). Die Arbeitsgruppen von Liu *et al.* versucht daher, das pharmakologische Profil von 7,8-DHF durch eine Modifikation der 7,8-Dihydroxygruppe mit Phosphaten, Carbamaten oder Estern zu verbessern und somit die orale Bioverfügbarkeit zu erhöhen (Liu *et al.*, 2016).

Die zunächst schwankenden Ergebnisse der Vorversuche für diese Arbeit konnten deshalb auf obig genannten Eigenschaften von 7,8-DHF zurückgeführt werden und es erwies sich als essenziell, dass der Wirkstoff 7,8-DHF zum Einen dunkel gelagert und zum Anderen immer frisch vor Versuchsbeginn angesetzt wurde.

## 5.2 Zytotoxizität von 7,8-DHF

Aus der Literatur ist bekannt, dass 7,8-DHF in verschiedenen Wirkspektren wirkt (Jang *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011).

Die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen von 0,01  $\mu\text{M}$  sowie 50  $\mu\text{M}$  wiesen im MTT-Test keine zytotoxischen Eigenschaften auf (Abb. 4.2). Erst in einer höheren Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  sank in den für diese Arbeit durchgeführten Vorversuchen die Überlebensrate der Mikroglia auf 65%, welches in der Tendenz auch in den Versuchen von Chen *et al.* und Tsai *et al.* bestätigt wurde (Chen *et al.*, 2011; Tsai *et al.*, 2013). Dies deutet darauf hin, dass die Zytotoxizität von 7,8-DHF eine Konzentrationsabhängigkeit aufweist, d.h. je höher die Konzentration von 7,8-DHF, desto geringer fällt die Zellüberlebensrate aus. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Versuchen von Choi *et al.* (Choi *et al.*, 2015).

### 5.3 Stimulation der Mikroglia

Als anerkannter inflammatorischer Stimulus der Mikroglia fungierte in dieser Arbeit LPS, ein Endotoxin aus der Wand gramnegativer Bakterien (Martich *et al.*, 1993), welches bereits in vielen Tiermodellen von inflammationsvermittelten neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt wurde (Carvey *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004). LPS bindet als Komplex mit dem LPS-bindenden Protein und CD14 an den membrangebundenen Rezeptor TLR4 auf Mikroglia (Lehnardt *et al.*, 2003) und aktiviert somit die Mikroglia (Qin *et al.*, 2005). Infolgedessen kommt es über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zu einer vermehrten Genexpression der pro-inflammatorischen Zytokine (Srinivasan *et al.*, 2004). Die Reduktion der LPS-stimulierten pro-inflammatorischen Mediatoren ist somit ein Maßstab für das anti-inflammatorische Potenzial einer Substanz (Innamorato *et al.*, 2008).

In dieser Arbeit wurde LPS aus *Salmonella typhimurium* in einer Konzentration von 5 ng/ml eingesetzt. Diese Konzentration bewirkte eine starke Aktivierung der Mikroglia, was sowohl morphologisch (Abb. 4.2) als auch auf mRNA-Ebene (Abb. 4.4-4.8) und Protein-Ebene (Abb. 4.9+4.10) gezeigt werden konnte.

### 5.4 Einfluss von 7,8-DHF auf die Radikalbildung

NO ist einerseits ein intrazellulärer Messenger mit biologischen Funktionen wie Vasodilatation, Neurotransmission, Inflammation und neuronale Erregbarkeit (Tripathy *et al.*, 2015). NO kann jedoch andererseits bei einer exzessiven Freisetzung mit dem vorhandenen Sauerstoff zu Peroxynitrit (RNS) reagieren und über eine Zellschädigung zu neurodegenerativen Erkrankungen beitragen (Saha und Pahan, 2006; Brown und Neher, 2010). Entscheidend über eine protektive oder toxische Wirkung von NO ist somit die Konzentration (Laranjinha *et al.*, 2012).

In dieser Arbeit stieg die NO-Konzentration infolge eines Stimulus mit LPS stark an. Wurden die Mikroglia hingegen für 24 Stunden simultan mit 7,8-DHF und LPS stimuliert, konnte die NO-Konzentration in Abhängigkeit von der Konzentration des Wirkstoffes signifikant gesenkt werden, wobei bei einer höheren Konzentration von 7,8-DHF eine größere Reduktion erzielt werden konnte (Abb. 4.3 A+B). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Versuchen von Park *et al.* (Park *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2014), in denen nach einer einstündigen Vorinkubation der murinen Makrophagen mit 50  $\mu$ M 7,8-DHF die NO-Konzentration um 60% herunterreguliert wurde (Park *et al.*, 2012). Eine mögliche Erklärung dieser Ergebnisse kann sein, dass die Hydroxylgruppen von 7,8-DHF als Elektronendonatoren

fungieren und somit freie Radikale abfangen können (Woldu und Mai, 2012), wodurch 7,8-DHF eine starke antioxidative Wirkung aufweist (Chen *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2013; Ryu *et al.*, 2014). Die antioxidative Wirkung von 7,8-DHF scheint nicht nur durch die Konzentration von 7,8-DHF, sondern auch durch die Dauer der Vorinkubation der Zellen mit dem Wirkstoff beeinflusst zu werden.

NO ist auch ein Maß für die Mikrogliaaktivierung, da das NO-bildende Enzym iNOS in Abhängigkeit von der Mikrogliaaktivierung induziert wird. Im Gegensatz zu dem starken Anstieg der iNOS-mRNA-Expressionsrate nach einer Stimulation mit LPS, war der Einfluss von 7,8-DHF bei einer simultanen Stimulation mit LPS sowohl Stimulationszeit- als auch konzentrationsabhängig. In einer Konzentration von 0,01  $\mu\text{M}$  7,8-DHF konnte die iNOS-mRNA-Expressionsrate nach 24-stündiger simultaner Stimulation mit LPS gesenkt werden, bei 50  $\mu\text{M}$  7,8-DHF wurde dieser Effekt nach einer 3-stündigen simultanen Stimulation erreicht. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Versuchen von Park *et al.*, bei denen mit einer höheren Konzentration von 7,8-DHF nach 24-stündiger simultaner Stimulation mit LPS eine stärkere Reduzierung der iNOS-mRNA-Expressionsrate erreicht werden konnte (Park *et al.*, 2014). Eine mögliche Begründung dafür kann sein, dass Park *et al.* in ihren Versuchen mit BV2-Mikroglia, also murinen, mit rekombinanten Retroviren immortalisierten Zelllinien, arbeiteten, wohingegen die Versuche in dieser Arbeit mit primären Mikroglia der Generation p1-p3 durchgeführt wurden. Zusätzlich stehen diese Ergebnisse im Kontrast zu der stärker reduzierten NO-Konzentration nach 24 Stunden Stimulation mit 50  $\mu\text{M}$  7,8-DHF und LPS im Vergleich zu 0,01  $\mu\text{M}$  7,8-DHF und LPS. Dieses kann daran liegen, dass die aufgrund des inflammatorischen Stimulus vermehrt gebildete iNOS-mRNA wegen eines L-Arginin-Substratmangels nicht mehr zu einem Protein prozessiert wird und die bereits vorhandene iNOS durch den Substratmangel weniger aktiv ist (Lee *et al.*, 2003; Kagemann *et al.*, 2007).

## **5.5 Einfluss von 7,8-DHF auf die Expression pro-inflammatorische Zytokine**

Bei Morbus Parkinson-Patienten ist die Anzahl der aktivierten Mikroglia im *Putamen* und der SN erhöht (Rocha *et al.*, 2015). Diese sezernieren pro-inflammatorische Mediatoren wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6, die bei Astrozyten eine sekundäre inflammatorische Antwort induzieren und somit zu neuronalem Zellverlust führen (Saijo *et al.*, 2009).

TNF- $\alpha$  ist ein kritisches, regulatorisches Zytokin, welches sowohl in homöostatische als auch pathophysiologische Prozesse des ZNS involviert ist (Montgomery und Bowers, 2011). So spielt es zum Einen eine Rolle in der physiologischen Entwicklung des ZNS (Zhao *et al.*, 2001), in der synaptischen Übertragung und Plastizität (Steinmetz und Turrigiano, 2010) sowie in der Reduzierung der Neurogenese (Ekdahl *et al.*, 2003). Zum Anderen weist TNF- $\alpha$  eine pathologische Rolle in neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer oder Multiple Sklerose auf (Montgomery und Bowers, 2011).

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Einfluss von 7,8-DHF auf die durch einen inflammatorischen Stimulus (LPS) stark erhöhte TNF- $\alpha$ -mRNA-Expressionsrate nach 3, 6 und 24 Stunden untersucht und es konnte gezeigt werden, dass 0,01  $\mu$ M und 50  $\mu$ M 7,8-DHF die TNF- $\alpha$ -mRNA-Expressionsrate in LPS-induzierten Mikroglia noch weiter erhöhten. Einzig nach einer 24-stündigen Stimulation mit 0,01  $\mu$ M 7,8-DHF wurde kein Einfluss auf die TNF- $\alpha$ -mRNA-Expressionsrate nachgewiesen. Dieses Ergebnis ist konträr zu den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen. So zeigten B. Wang *et al.*, dass 7,8-DHF in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulierten Endothelzellen die TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression signifikant senkte (Wang, B. *et al.*, 2015). Auch in den Versuchen der Arbeitsgruppe von Park *et al.* senkte 7,8-DHF konzentrationsabhängig die TNF- $\alpha$ -mRNA-Expressionsrate in BV2-Mikroglia (Park *et al.*, 2014).

Die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Proteinfreisetzung wurde in dieser Arbeit hingegen nach einer 6-stündigen Stimulation mit 0,01  $\mu$ M 7,8-DHF gesenkt, wohingegen nach 24-stündiger Stimulation kein Einfluss nachzuweisen war. Somit zeigte sich in diesem Versuchsansatz erneut die Konzentrationsabhängigkeit von 7,8-DHF, da 50  $\mu$ M 7,8-DHF sowohl nach 6-stündiger als auch nach 24-stündiger Stimulation die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Proteinfreisetzung weiter erhöhte. Dieses Ergebnis steht weitestgehend im Einklang mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der LPS-induzierten TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression.

Ein weiteres Zytokin, welches von aktivierten Mikroglia und Astrozyten als Antwort auf diverse Stimuli freigesetzt wird, ist IL-1 $\beta$  (Wang, W. Y. *et al.*, 2015). Neurone weisen eine besondere Empfänglichkeit für die IL-1 $\beta$ -vermittelte Toxizität bei einer chronischen Expression auf (Leal *et al.*, 2013) und gehen daraufhin in der SN zugrunde (Pott Godoy *et al.*, 2010).

Die in dieser Arbeit infolge eines inflammatorischen Stimulus mit LPS stark erhöhte IL-1 $\beta$ -mRNA-Expressionsrate wurde nur nach einer simultanen, 24-stündigen Stimulation mit 0,01  $\mu$ M 7,8-DHF und LPS reduziert. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu den Versuchen von Park *et al.* an murinen Makrophagen, bei denen eine 24-stündige Stimulation mit 7,8-DHF nach inflammatorischem Stimulus die IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression umso stärker herunterregulierte, je höher die Konzentration von 7,8-DHF war (Park *et al.*, 2012).

IL-6 ist ein vielseitiges Zytokin, welches sowohl physiologische Funktionen wie die Hämatopoese, Akut-Phase-Antwort, Leberregeneration, Knochenumbau, Astrogliogenesis und neuronale Differenzierung besitzt, als auch in neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Autoimmunerkrankungen wie Morbus Crohn, rheumatoide Arthritis und Diabetes verwickelt ist (Spooren *et al.*, 2011). Es wird von aktivierten Mikroglia bei Morbus Parkinson-Patienten sezerniert (Imamura *et al.*, 2003) und es besteht eine reziproke Beziehung zwischen dem Schweregrad des Morbus Parkinson und der Höhe des IL-6-Levels (Nagatsu *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit zeigte sich, dass die IL-6-mRNA-Expressionsrate bei einer simultanen Stimulation mit 0,01  $\mu$ M 7,8-DHF und LPS für 24 Stunden sowie 50  $\mu$ M 7,8-DHF und LPS nach 3-stündiger Stimulation gesenkt werden konnte. Da IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  die größten Aktivatoren der IL-6-Expression sind (Lan *et al.*, 2015) und deren mRNA-Expressionsrate in den Versuchen dieser Arbeit nach einer 24-stündigen Stimulation mit 0,01  $\mu$ M 7,8-DHF ebenfalls herabreguliert wurden, kann dies als Erklärungsansatz für die Reduktion der IL-6-mRNA Expressionsrate nach einer simultanen Stimulation mit 0,01  $\mu$ M 7,8-DHF für 24 Stunden fungieren. Die Proteinfreisetzung von IL-6 wurde bei simultaner 6- und 24-stündiger Stimulation mit 0,01  $\mu$ M bzw. 50  $\mu$ M 7,8-DHF und LPS gesenkt. Ein möglicher Grund hierfür kann sein, dass die Prozessierung der mRNA bis zum freigesetzten Protein zeitlich verzögert abläuft.

Abschließend ist festzustellen, dass jedes Zytokin eine andere Kinetik aufweist. Zudem konnte in dieser Arbeit bei der Diskussion des Einflusses von 7,8-DHF auf pro-inflammatorische Zytokine festgestellt werden, dass eine Korrelation zwischen der Dosierung, der Stimulationsdauer, dem Zelltyp und dem Einfluss des Wirkstoffes auf den jeweiligen Zelltyp besteht. Dieses wurde in den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zu Flavenoiden bestätigt (Schroeter *et al.*, 2002; Tuñón *et al.*, 2009).

## 5.6 Einfluss von 7,8-DHF auf die COX-2-Synthese

COX-2 wird konstitutiv in den glutamergen Neuronen des *Hippocampus* und Kortex exprimiert, um die synaptische Plastizität zu bewahren (Yagami *et al.*, 2015). Allerdings spielt COX-2 auch eine pathophysiologische Rolle in einigen Erkrankungen wie beispielsweise Morbus Parkinson (Teismann, 2012), Multipler Sklerose (Palumbo und Bosetti, 2013) und der amyotrophen Lateralsklerose (Yiangou *et al.*, 2006), da COX-2 unter inflammatorischen Bedingungen hochreguliert wird. COX-2 katalysiert die Bildung von PGE<sub>2</sub> aus Arachidonsäure (Ma und Quirion, 2008). PGE<sub>2</sub> hingegen aktiviert Mikroglia, welche über die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen den neuronalen Zelltod bewirken.

In dieser Arbeit konnte, im Vergleich zu der stark erhöhten COX-2-mRNA-Expressionsrate infolge eines Stimulus mit LPS, nur bei einer simultanen 24-stündigen Stimulation mit 0,01 µM 7,8-DHF und LPS die COX-2-mRNA-Expressionsrate gesenkt werden. Als eine mögliche Ursache hierfür kann die Beeinflussung der COX-2 Transkription durch die vermehrten Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF-α und IL-1β angeführt werden (Regulski *et al.*, 2015), welche in den Versuchen dieser Arbeit ebenfalls nur durch eine simultane, 24-stündige Stimulation mit LPS und 0,01 µM 7,8-DHF herunterreguliert wurden. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Erkenntnissen der Arbeitsgruppe von Park *et al.* nach Versuchen an murinen Makrophagen, bei denen eine Stimulation mit 7,8-DHF die COX-2-Expression umso stärker reduzierte, je höher die Konzentration von 7,8-DHF war (Park *et al.*, 2012).

Zusammenfassend reduzierte 7,8-DHF in einer Konzentration von 0,01 µM in den Versuchen dieser Arbeit die COX-2-mRNA-Expression nur nach 24-stündiger Stimulation. Dies muss für die Eignung von 7,8-DHF als mögliches Therapeutikum beim Morbus Parkinson allerdings nicht von Nachteil sein, da mehrere Studien zu dem Schluss kamen, dass eine pharmakologische Hemmung von COX-2 die Antwort auf einen neuroinflammatorischen Stimulus verstärkt sowie die physiologischen Funktionen des Enzyms unterbindet (Bertolini *et al.*, 2002; Blais *et al.*, 2005; Aid und Bosetti, 2011).

## 5.7 Einfluss von 7,8-DHF auf die Aktivierung des MAPK-Signalweges in primären Mikroglia

Die MAP-Kinasen-Familie besteht aus Serin-/ Threonin-Proteinkinasen und ist in drei Untergruppen aufgegliedert: extrazellulär Signal-regulierte Kinase-Kaskade 1/2 (ERK1/2),

c-Jun N terminale-Kinasen (JNK1/2/3) sowie die p38 MAP-Kinasen (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ ) (Borders *et al.*, 2009). MAP-Kinasen gehören neben NF- $\kappa$ B zu den wichtigsten Signalmolekülen in neuroinflammatorischen Prozessen und spielen eine Schlüsselrolle in der Produktion proinflammatorischer Zytokine (Zeng *et al.*, 2014). MAP-Kinasen fungieren als Signalmechanismus in Eukaryoten, indem sie über eine Phosphorylierung ihrer Substrate eine angemessene Antwort auf Umweltinformationen vermitteln (Meng und Zhang, 2013; Pitzschke, 2014). Im Gegensatz zu anderen Proteinkinasen spielen die MAP-Kinasen keine generelle Rolle in sensorischen Funktionen, sondern werden nur infolge eines Stimulus aktiviert (Crown, 2011). Infolge eines Stimulus wird zunächst die MAPK-Kinase-Kinase (MKKK) aktiviert, welche über eine Phosphorylierung die MAPK-Kinase (MKK) aktiviert. Diese wandelt sich nachfolgend in eine MAP-Kinase um und phosphoryliert als terminale Proteinkinase in der Signalkaskade Substrate wie Transkriptionsfaktoren, -regulatoren oder *Splicing*-Faktoren (Opdenakker *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2015). Diese Phosphorylierung der Substrate zeigt sich im Western Blot durch einen Bandenwechsel (Zhang, T. *et al.*, 2015).

Die ERK-Kaskade spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Proliferation, Differenzierung und dem Zellüberleben (Wortzel und Seger, 2011), aber kann ebenfalls Prozesse beeinflussen wie Apoptose (Cagnol und Chambard, 2010) und onkogenetische Transformation (Shaul und Seger, 2007). Die ERK-Kaskade wird durch G-Proteine wie Ras aktiviert, die daraufhin die Raf-Aktivierung initiieren (Wellbrock *et al.*, 2004). Dies wiederum aktiviert die *dual-specificity protein kinases* (MEK1 und MEK2), welche durch eine duale Phosphorylierung ERK1/2 aktivieren (Shaul und Seger, 2007). Die durch die Phosphorylierung ausgelöste Konformationsänderung bewirkt eine Translokation von ERK1/2 vom Zytoplasma in den Kern oder in andere Zellorganellen (Wainstein und Seger, 2016). Bisher wurden mehr als 150 Substrate von ERK1/2 gefunden (Yoon und Seger, 2006), von denen mehr als die Hälfte als Transkriptionsfaktoren im Kern der Zelle vorliegen (Wainstein und Seger, 2016).

In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zu dem Einfluss von 7,8-DHF auf die Phosphorylierung von ERK1/2 konnte gezeigt werden, dass 7,8-DHF in Konzentrationen von 0,01  $\mu$ M und 50  $\mu$ M in LPS-aktivierten Mikroglia nach 30-minütiger Stimulation die stark angestiegene ERK1/2-Phosphorylierung signifikant herunterregulierte, wobei die höhere Konzentration eine stärkere Reduktion von pERK1/2 bewirkte. In der Literatur wird der Einfluss von 7,8-DHF auf die ERK1/2-Phosphorylierung konträr diskutiert. So kam die Arbeitsgruppe von Jang *et al.* zu dem Ergebnis, dass 7,8-DHF in den Neuronen des

Hippocampus die ERK1/2-Phosphorylierung *in vitro* steigerte (Jang *et al.*, 2010). Park *et al.* wiesen hingegen nach, dass 7,8-DHF die Phosphorylierung von ERK1/2 in murinen Makrophagen *in vitro* inhibierte (Park *et al.*, 2012). Im Gegensatz dazu postulierten Wu *et al.*, dass 7,8-DHF die ERK1/2-Phosphorylierung *in vivo* nicht beeinflusste (Wu *et al.*, 2014). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Tsai *et al.*, deren Arbeitsgruppe keinen Einfluss von 7,8-DHF auf die ERK1/2-Phosphorylierung in kultivierten Motoneuronen feststellte (Tsai *et al.*, 2013). Die Vielfalt an unterschiedlichen Ergebnissen weist darauf hin, dass die Phosphorylierung von ERK1/2 sowohl von der Konzentration von 7,8-DHF, als auch vom Zelltyp und vom Versuchsablauf *in vivo* oder *in vitro* abhängig ist.

Eine Aktivierung der p38-MAPK korreliert häufig mit einer neuronalen Degeneration (Stanciu *et al.*, 2000), da p38 zum Einen als ein Induktor der Apoptose fungiert und zum Anderen einen zentralen Akteur der Neuroinflammation darstellt (Gurgis *et al.*, 2014). Die p38-MAPK reguliert die Aktivität von mehr als 60 Substraten (Tremplec *et al.*, 2013). Eines davon ist die *Mitogen-activated protein kinase (MAPK)–activated protein kinase 2* (MAPKAPK-2 oder MK2), welche durch eine Regulation der Biosynthese von Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-6 auf posttranskriptionaler Ebene eine Schlüsselrolle in der Neuroinflammation spielt (Kotlyarov *et al.*, 1999; Ronkina *et al.*, 2010). Die Expression von MK2 ist in Mikroglia im Vergleich zu Astrozyten und Neuronen erhöht und wird durch eine Aktivierung dieser infolge eines entzündlichen Stimulus hochreguliert (Culbert *et al.*, 2006). Durch die Vielzahl der von p38 aktivierten Substrate weist die p38-MAPK ebenfalls physiologische Funktionen wie beispielsweise eine Beeinflussung des Zellzyklus, der Zelldifferenzierung und der Zellmotilität auf (Cuadrado und Nebreda, 2010). Somit kann eine vollständige Hemmung der p38-MAP-Kinase zu unerwünschten Nebenwirkungen führen (Tremplec *et al.*, 2013).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von 7,8-DHF auf die p38-Phosphorylierung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass 7,8-DHF in Konzentrationen von 0,01  $\mu$ M und 50  $\mu$ M in LPS-aktivierten Mikroglia nach 30-minütiger Stimulation die stark angestiegene p38-Phosphorylierung signifikant herunterregulierte, wobei die höhere Konzentration eine stärkere Reduktion von pp38 bewirkte. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Ergebnissen von Park *et al.*, bei denen 7,8-DHF die Phosphorylierung von p38 in murinen Makrophagen inhibierte (Park *et al.*, 2012).

Zusammenfassend zeigten die Versuche dieser Arbeit, dass 7,8-DHF in beiden Konzentrationen sowohl die Phosphorylierung von ERK1/2, als auch von p38 nach einem

---

entzündlichen Stimulus herunterregulierte, ohne die Phosphorylierung vollständig zu unterbinden und mögliche Nebenwirkungen zu riskieren.

## 6 Zusammenfassung

Die Inzidenz von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson wird mit der durch den demographischen Wandel in Deutschland bedingten Überalterung der Gesellschaft zunehmend ansteigen. Den unter großem Leidensdruck stehenden Betroffenen ist zurzeit nur eine rein symptomatische Therapie zugänglich, da bisher keine kausale Therapie zur Vermeidung des Unterganges dopaminergener Neurone in der SN gefunden wurde. Einen wichtigen Ansatz für eine mögliche medikamentöse kausale Therapie stellen die Mikroglia dar, da diese bei einer exzessiven Produktion pro-inflammatorischer Zytokine maßgeblich zum Untergang der Neuronen beitragen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit 7,8-DHF auf eine mögliche anti-inflammatorische Wirkung auf Mikroglia untersucht und die Eignung als zukünftiges Therapeutikum bei neurodegenerativen Erkrankungen diskutiert.

7,8-DHF, auch bekannt als Vitamin P, gehört zu der Gruppe der Flavenoide und kommt natürlicherweise in *Godmania aesculifolia*, *Tridax procumbens* und in den Blättern der Primeln vor. 7,8-DHF wirkt anti-oxidativ und anti-inflammatorisch, schützt vor Apoptose und unterstützt das neuronale Wachstum. Gegenstand bisheriger Forschungen anderer Arbeitsgruppen war die konzentrationsabhängige Wirkung von 7,8-DHF auf verschiedene Zellarten *in vitro* und *in vivo*, wobei in dieser Arbeit erstmalig der Einfluss von 7,8-DHF auf primäre Mikroglia *in vitro* untersucht wurde. Dafür wurden primäre Mikrogliaulturen aus den Hirnen postnataler Ratten angelegt und der zeit- und konzentrationsabhängige Einfluss von 7,8-DHF auf nicht aktivierte und auf LPS-stimulierte Mikroglia untersucht. 7,8-DHF wies in den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen keine Zytotoxizität auf. Zudem bewirkte es eine Reduktion der Radikalbildung und verminderte die Mikrogliaaktivierung. Die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$  wurde durch 7,8-DHF in Abhängigkeit von der Stimulationszeit und Konzentration signifikant gesenkt, welches in dieser Arbeit erstmals an primären Ratten-Mikroglia nachgewiesen werden konnte. Weiterhin senkte 7,8-DHF die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 sowie p38. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen das anti-inflammatorische und dadurch neuroprotektive Potential von 7,8-DHF. Um einen möglichen Einsatz als Therapeutikum bei Morbus Parkinson zu erforschen, sollten weiterführende Versuche durchgeführt werden, beispielsweise wie die orale Bioverfügbarkeit gesteigert werden kann oder welchen Einfluss 7,8-DHF auf Mikroglia *in vivo* ausübt.

## 7 Literaturverzeichnis

Aarsland, D., Andersen, K., Larsen, J. P., Lolk, A., Kragh-Sorensen, P. (2003): Prevalence and characteristics of dementia in Parkinson disease: an 8-year prospective study. Archives of neurology, 60, 387-392

Abdullah, R., Basak, I., Patil, K. S., Alves, G., Larsen, J. P., Moller, S. G. (2014): Parkinson's disease and age: The obvious but largely unexplored link. Experimental gerontology, 68, 33-38

Aggarwal, B. B. (2003): Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nature reviews. Immunology, 3, 745-756

Aid, S., Bosetti, F. (2011): Targeting cyclooxygenases-1 and -2 in neuroinflammation: Therapeutic implications. Biochimie, 93, 46-51

Akassoglou, K., Douni, E., Bauer, J., Lassmann, H., Kollias, G., Probert, L. (2003): Exclusive tumor necrosis factor (TNF) signaling by the p75TNF receptor triggers inflammatory ischemia in the CNS of transgenic mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100, 709-714

Ali, M., Saroha, A., Pewzner-Jung, Y., Futerman, A. H. (2015): LPS-mediated septic shock is augmented in ceramide synthase 2 null mice due to elevated activity of TNFalpha-converting enzyme. FEBS letters, 589, 2213-2217

Allan, S. M., Tyrrell, P. J., Rothwell, N. J. (2005): Interleukin-1 and neuronal injury. Nature reviews. Immunology, 5, 629-640

Alliot, F., Godin, I., Pessac, B. (1999): Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. Brain research. Developmental brain research, 117, 145-152

Andersen, J. K. (2000): What causes the build-up of ubiquitin-containing inclusions in Parkinson's disease? Mechanisms of ageing and development, 118, 15-22

Antonini, A., DeNotaris, R. (2004): PET and SPECT functional imaging in Parkinson's disease. Sleep medicine, 5, 201-206

Ba, F., Martin, W. R. (2015): Dopamine transporter imaging as a diagnostic tool for parkinsonism and related disorders in clinical practice. Parkinsonism & related disorders, 21, 87-94

Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K., Seitelberger, F. (1973): Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. Journal of the neurological sciences, 20, 415-455

Bertolini, A., Ottani, A., Sandrini, M. (2002): Selective COX-2 inhibitors and dual acting anti-inflammatory drugs: critical remarks. Current medicinal chemistry, 9, 1033-1043

Bertrand, J. A., Bedetti, C., Postuma, R. B., Monchi, O., Genier Marchand, D., Jubault, T., Gagnon, J. F. (2012): Color discrimination deficits in Parkinson's disease are related to cognitive impairment and white-matter alterations. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society, 27, 1781-1788

Biber, K., Neumann, H., Inoue, K., Boddeke, H. W. (2007): Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. Trends in neurosciences, 30, 596-602

- Blais, V., Turrin, N. P., Rivest, S. (2005): Cyclooxygenase 2 (COX-2) inhibition increases the inflammatory response in the brain during systemic immune stimuli. Journal of neurochemistry, 95, 1563-1574
- Borders, A. S., de Almeida, L., Van Eldik, L. J., Watterson, D. M. (2009): The p38alpha mitogen-activated protein kinase as a central nervous system drug discovery target. BMC neuroscience, 9 Suppl 2, S12
- Braak, H., Ghebremedhin, E., Rub, U., Bratzke, H., Del Tredici, K. (2004): Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. Cell and tissue research, 318, 121-134
- Brandenburg, L. O., Varoga, D., Nicolaeva, N., Leib, S. L., Wilms, H., Podschun, R., Wruck, C. J., Schroder, J. M., Pufe, T., Lucius, R. (2008): Role of glial cells in the functional expression of LL-37/rat cathelin-related antimicrobial peptide in meningitis. Journal of neuropathology and experimental neurology, 67, 1041-1054
- Brandt, T. (2007): Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen. 5., vollst. überarb. und erw. Aufl., S. Kohlhammer, Stuttgart
- Bredt, D. S. (2000): Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. Free radical research, 31, 577-596
- Brenner, D., Blaser, H., Mak, T. W. (2015): Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. Nature reviews. Immunology, 15, 362-374
- Briones, T. L., Woods, J. (2013): Chronic binge-like alcohol consumption in adolescence causes depression-like symptoms possibly mediated by the effects of BDNF on neurogenesis. Neuroscience, 254, 324-334
- Brochard, V., Combadiere, B., Prigent, A., Laouar, Y., Perrin, A., Beray-Berthaut, V., Bonduelle, O., Alvarez-Fischer, D., Callebert, J., Launay, J. M., Duyckaerts, C., Flavell, R. A., Hirsch, E. C., Hunot, S. (2009): Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. The Journal of clinical investigation, 119, 182-192
- Bronstein, J. M., Tagliati, M., Alterman, R. L., Lozano, A. M., Volkmann, J., Stefani, A., Horak, F. B., Okun, M. S., Foote, K. D., Krack, P., Pahwa, R., Henderson, J. M., Hariz, M. I., Bakay, R. A., Rezaei, A., Marks, W. J., Jr., Moro, E., Vitek, J. L., Weaver, F. M., Gross, R. E., DeLong, M. R. (2011): Deep brain stimulation for Parkinson disease: an expert consensus and review of key issues. Archives of neurology, 68, 165
- Brown, G. C., Neher, J. J. (2010): Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. Molecular neurobiology, 41, 242-247
- Buttner, T., Kuhn, W., Muller, T., Patzold, T., Heidbrink, K., Przuntek, H. (1995): Distorted color discrimination in 'de novo' parkinsonian patients. Neurology, 45, 386-387
- Cagnol, S., Chambard, J.-C. (2010): ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. The FEBS journal, 277, 2-21
- Calabrese, V., Mancuso, C., Calvani, M., Rizzarelli, E., Butterfield, D. A., Stella, A. M. (2007): Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. Nature reviews. Neuroscience, 8, 766-775
- Cartmell, T., Luheshi, G. N., Hopkins, S. J., Rothwell, N. J., Poole, S. (2001): Role of endogenous interleukin-1 receptor antagonist in regulating fever induced by localised inflammation in the rat. The Journal of physiology, 531, 171-180

- Carvey, P. M., Chang, Q., Lipton, J. W., Ling, Z. (2003): Prenatal exposure to the bacteriotoxin lipopolysaccharide leads to long-term losses of dopamine neurons in offspring: a potential, new model of Parkinson's disease. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library, 8, s826-837
- Castello, N. A., Nguyen, M. H., Tran, J. D., Cheng, D., Green, K. N., LaFerla, F. M. (2014): 7,8-Dihydroxyflavone, a small molecule TrkB agonist, improves spatial memory and increases thin spine density in a mouse model of Alzheimer disease-like neuronal loss. PLoS one, 9, e91453
- Chakraborty, S., Kaushik, D. K., Gupta, M., Basu, A. (2010): Inflammasome signaling at the heart of central nervous system pathology. Journal of neuroscience research, 88, 1615-1631
- Chan, W. Y., Kohsaka, S., Rezaie, P. (2007): The origin and cell lineage of microglia: new concepts. Brain research reviews, 53, 344-354
- Chapuis, S., Ouchchane, L., Metz, O., Gerbaud, L., Durif, F. (2005): Impact of the motor complications of Parkinson's disease on the quality of life. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society, 20, 224-230
- Chen, J., Chua, K. W., Chua, C. C., Yu, H., Pei, A., Chua, B. H., Hamdy, R. C., Xu, X., Liu, C. F. (2011): Antioxidant activity of 7,8-dihydroxyflavone provides neuroprotection against glutamate-induced toxicity. Neuroscience letters, 499, 181-185
- Choi, J. W., Lee, C. W., Lee, J., Choi, D. J., Sohng, J. K., Park, Y. I. (2015): 7,8-Dihydroxyflavone inhibits adipocyte differentiation via antioxidant activity and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocyte cells. Life sciences,
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical biochemistry, 162, 156-159
- Crown, E. D. (2011): The role of mitogen activated protein kinase signaling in microglia and neurons in the initiation and maintenance of chronic pain. Experimental neurology, 234, 330-339
- Cuadrado, A., Nebreda, A. R. (2010): Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. The Biochemical journal, 429, 403-417
- Culbert, A. A., Skaper, S. D., Howlett, D. R., Evans, N. A., Facci, L., Soden, P. E., Seymour, Z. M., Guillot, F., Gaestel, M., Richardson, J. C. (2006): MAPK-activated protein kinase 2 deficiency in microglia inhibits pro-inflammatory mediator release and resultant neurotoxicity. Relevance to neuroinflammation in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. The Journal of biological chemistry, 281, 23658-23667
- del Rio-Hortega, P. (1932): Microglia: cytology & cellular pathology of the nervous system. New York, N.Y., Hanfer Pub: 483-534.
- Devi, L., Ohno, M. (2012): 7,8-dihydroxyflavone, a small-molecule TrkB agonist, reverses memory deficits and BACE1 elevation in a mouse model of Alzheimer's disease. Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 37, 434-444
- Di Virgilio, F., Ceruti, S., Bramanti, P., Abbracchio, M. P. (2009): Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system. Trends in neurosciences, 32, 79-87
- Dinarello, C. A. (2009): Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. Annual review of immunology, 27, 519-550

- Dinareello, C. A. (2013): Overview of the interleukin-1 family of ligands and receptors. Seminars in immunology, 25, 389-393
- Dinareello, C. A., Ikejima, T., Warner, S. J., Orencole, S. F., Lonnemann, G., Cannon, J. G., Libby, P. (1987): Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 139, 1902-1910
- Dixon, R. A., Steele, C. L. (1999): Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. Trends in plant science, 4, 394-400
- Doll, D. N., Barr, T. L., Simpkins, J. W. (2014): Cytokines: their role in stroke and potential use as biomarkers and therapeutic targets. Aging and disease, 5, 294-306
- Du, X., Hill, R. A. (2015): 7,8-Dihydroxyflavone as a pro-neurotrophic treatment for neurodevelopmental disorders. Neurochemistry international,
- Eder, C., Klee, R., Heinemann, U. (1998): Involvement of stretch-activated Cl<sup>-</sup> channels in ramification of murine microglia. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 18, 7127-7137
- Ekdahl, C. T., Claassen, J. H., Bonde, S., Kokaia, Z., Lindvall, O. (2003): Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100, 13632-13637
- Fahn, S., Oakes, D., Shoulson, I., Kieburtz, K., Rudolph, A., Lang, A., Olanow, C. W., Tanner, C., Marek, K. (2004): Levodopa and the progression of Parkinson's disease. The New England journal of medicine, 351, 2498-2508
- Faustman, D., Davis, M. (2010): TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. Nature reviews. Drug discovery, 9, 482-493
- Feldmann, M., Maini, S. R. (2008): Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics. Immunological reviews, 223, 7-19
- Franco, R., Fernandez-Suarez, D. (2015): Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. Progress in neurobiology, 131, 65-86
- Frank-Cannon, T. C., Alto, L. T., McAlpine, F. E., Tansey, M. G. (2009): Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? Molecular neurodegeneration, 4, 47
- Galea, E., Feinstein, D. L., Reis, D. J. (1992): Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 89, 10945-10949
- Galea, I., Bechmann, I., Perry, V. H. (2006): What is immune privilege (not)? Trends in immunology, 28, 12-18
- Gao, H. M., Liu, B., Zhang, W., Hong, J. S. (2003): Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. Trends in pharmacological sciences, 24, 395-401
- Gelb, D. J., Oliver, E., Gilman, S. (1999): Diagnostic criteria for Parkinson disease. Archives of neurology, 56, 33-39
- George, S., Rey, N. L., Reichenbach, N., Steiner, J. A., Brundin, P. (2013): alpha-Synuclein: the long distance runner. Brain pathology (Zurich, Switzerland), 23, 350-357
- Gerlach, M., Reichmann, H., Riederer, P., Dietmaier, O. (2007): Die Parkinson-Krankheit. Grundlagen, Klinik, Therapie. 4., überarb. und erw. Aufl., S. Springer, Wien [u.a.]

- Ghasemi, M., Fatemi, A. (2014): Pathologic role of glial nitric oxide in adult and pediatric neuroinflammatory diseases. Neuroscience and biobehavioral reviews, 45, 168-182
- Gibb, W. R., Lees, A. J. (1991): Anatomy, pigmentation, ventral and dorsal subpopulations of the substantia nigra, and differential cell death in Parkinson's disease. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry, 54, 388-396
- Goedert, M. (2015): NEURODEGENERATION. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled A $\beta$ , tau, and alpha-synuclein. Science (New York, N.Y.) 349, 1255555 DOI: 10.1126/science.1255555
- Gurgis, F. M. S., Ziaziaris, W., Munoz, L. (2014): Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in neuroinflammation, heat shock protein 27 phosphorylation, and cell cycle: role and targeting. Mol Pharmacol, 85, 345-356
- Han, X., Zhu, S., Wang, B., Chen, L., Li, R., Yao, W., Qu, Z. (2013): Antioxidant action of 7,8-dihydroxyflavone protects PC12 cells against 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity. Neurochemistry international, 64, 18-23
- Harborne, J. B., Williams, C. A. (2000): Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry, 55, 481-504
- Hassan, N. F., Rifat, S., Campbell, D. E., McCawley, L. J., Douglas, S. D. (1991): Isolation and flow cytometric characterization of newborn mouse brain-derived microglia maintained in vitro. Journal of leukocyte biology, 50, 86-92
- Hernandez-Romero, M. C., Arguelles, S., Villaran, R. F., de Pablos, R. M., Delgado-Cortes, M. J., Santiago, M., Herrera, A. J., Cano, J., Machado, A. (2008): Simvastatin prevents the inflammatory process and the dopaminergic degeneration induced by the intranigral injection of lipopolysaccharide. Journal of neurochemistry, 105, 445-459
- Herrera, A. J., Espinosa-Oliva, A. M., Carrillo-Jimenez, A., Oliva-Martin, M. J., Garcia-Revilla, J., Garcia-Quintanilla, A., de Pablos, R. M., Venero, J. L. (2015): Relevance of chronic stress and the two faces of microglia in Parkinson's disease. Frontiers in cellular neuroscience, 9, 312
- Herrero, M. T., Estrada, C., Maatouk, L., Vyas, S. (2015): Inflammation in Parkinson's disease: role of glucocorticoids. Frontiers in neuroanatomy, 9, 32
- Hindle, J. V. (2010): Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease. Age and ageing, 39, 156-161
- Hinz, B., Brune, K. (2002): Cyclooxygenase-2--10 years later. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 300, 367-375
- Hirano, T. (1998): Interleukin 6 and its receptor: ten years later. International reviews of immunology, 16, 249-284
- Hirsch, E. C., Hunot, S. (2009): Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? The Lancet. Neurology, 8, 382-397
- Hirsch, E. C., Vyas, S., Hunot, S. (2011): Neuroinflammation in Parkinson's disease. Parkinsonism & related disorders, 18 Suppl 1, 210-212
- Hu, D.-N., Chen, M., Zhang, D. Y., Ye, F., McCormick, S. A., Chan, C.-C. (2011): Interleukin-1 $\beta$  increases baseline expression and secretion of interleukin-6 by human uveal melanocytes in vitro via the p38 MAPK/NF- $\kappa$ B pathway. Invest Ophthalmol Vis Sci, 52, 3767-3774

- Idris, A., Ghazali, N. B., Koh, D. (2015): Interleukin 1beta-A Potential Salivary Biomarker for Cancer Progression? Biomarkers in cancer, 7, 25-29
- Imamura, K., Hishikawa, N., Sawada, M., Nagatsu, T., Yoshida, M., Hashizume, Y. (2003): Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. Acta neuropathologica, 106, 518-526
- Innamorato, N. G., Rojo, A. I., Garcia-Yague, A. J., Yamamoto, M., de Ceballos, M. L., Cuadrado, A. (2008): The transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 181, 680-689
- Iwashina, T. (2015): Contribution to flower colors of flavonoids including anthocyanins: a review. Natural product communications, 10, 529-544
- Janetzky, B., Hauck, S., Youdim, M. B., Riederer, P., Jellinger, K., Pantucek, F., Zochling, R., Boissl, K. W., Reichmann, H. (1994): Unaltered aconitase activity, but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease. Neuroscience letters, 169, 126-128
- Jang, S. W., Liu, X., Yepes, M., Shepherd, K. R., Miller, G. W., Liu, Y., Wilson, W. D., Xiao, G., Bianchi, B., Sun, Y. E., Ye, K. (2010): A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107, 2687-2692
- Jenner, P. (2001): Parkinson's disease, pesticides and mitochondrial dysfunction. Trends in neurosciences, 24, 245-247
- Joosten, L. A., Netea, M. G., Dinarello, C. A. (2013): Interleukin-1beta in innate inflammation, autophagy and immunity. Seminars in immunology, 25, 416-424
- Jost, W. H., Berg-Mantkowski, A., Baas, H., Gemende, I., Glass, J., Kogan, E., Schneider, E., Storch, A. (2001): Workshop III: late motor complications of Parkinson's disease. Journal of neurology, 247 Suppl 4, Iv/38-39
- Kagemann, G., Sies, H., Schnorr, O. (2007): Limited availability of L-arginine increases DNA-binding activity of NF-kappaB and contributes to regulation of iNOS expression. Journal of molecular medicine (Berlin, Germany), 85, 723-732
- Kamimura, D., Yamada, M., Harada, M., Sabharwal, L., Meng, J., Bando, H., Ogura, H., Atsumi, T., Arima, Y., Murakami, M. (2013): The gateway theory: bridging neural and immune interactions in the CNS. Frontiers in neuroscience, 7, 204
- Kang, J. S., Choi, I. W., Han, M. H., Kim, G. Y., Hong, S. H., Park, C., Hwang, H. J., Kim, C. M., Kim, B. W., Choi, Y. H. (2015): The cytoprotective effects of 7,8-dihydroxyflavone against oxidative stress are mediated by the upregulation of Nrf2-dependent HO-1 expression through the activation of the PI3K/Akt and ERK pathways in C2C12 myoblasts. International journal of molecular medicine, 36, 501-510
- Kaspar, R. L., Gehrke, L. (1994): Peripheral blood mononuclear cells stimulated with C5a or lipopolysaccharide to synthesize equivalent levels of IL-1 beta mRNA show unequal IL-1 beta protein accumulation but similar polyribosome profiles. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 153, 277-286
- Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M., Verkhratsky, A. (2011): Physiology of microglia. Physiological reviews, 91, 461-553

- Kim, H. S., Kim, T., Kim, M. K., Suh, D. H., Chung, H. H., Song, Y. S. (2013): Cyclooxygenase-1 and -2: molecular targets for cervical neoplasia. Journal of cancer prevention, 18, 123-134
- Koirala, N., Pandey, R. P., Parajuli, P., Jung, H. J., Sohng, J. K. (2014): Methylation and subsequent glycosylation of 7,8-dihydroxyflavone. Journal of biotechnology, 184, 128-137
- Kotlyarov, A., Neininger, A., Schubert, C., Eckert, R., Birchmeier, C., Volk, H. D., Gaestel, M. (1999): MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis. Nat Cell Biol, 1, 94-97
- Krack, P., Batir, A., Van Blercom, N., Chabardes, S., Fraix, V., Ardouin, C., Koudsie, A., Limousin, P. D., Benazzouz, A., LeBas, J. F., Benabid, A. L., Pollak, P. (2003): Five-year follow-up of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. The New England journal of medicine, 349, 1925-1934
- Krause, M., Fogel, W., Heck, A., Hacke, W., Bonsanto, M., Trenkwalder, C., Tronnier, V. (2001): Deep brain stimulation for the treatment of Parkinson's disease: subthalamic nucleus versus globus pallidus internus. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry, 70, 464-470
- Kreutzberg, G. W. (1996): Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends in neurosciences, 19, 312-318
- Krueger, J. M., Obal, F. J., Fang, J., Kubota, T., Taishi, P. (2001): The role of cytokines in physiological sleep regulation. Annals of the New York Academy of Sciences, 933, 211-221
- Kuric, E., Ruscher, K. (2014): Dynamics of major histocompatibility complex class II-positive cells in the postischemic brain--influence of levodopa treatment. Journal of neuroinflammation, 11, 145
- Lan, T., Chang, L., Wu, L., Yuan, Y.-F. (2015): IL-6 Plays a Crucial Role in HBV Infection. J Clin Transl Hepatol, 3, 271-276
- Lane, T. E., Carson, M., Bergmann, C., Wyss-Coray, T. (2008): Central nervous system diseases and inflammation. S. 1, Springer, New York
- Laranjinha, J., Santos, R. M., Lourenco, C. F., Ledo, A., Barbosa, R. M. (2012): Nitric oxide signaling in the brain: translation of dynamics into respiration control and neurovascular coupling. Annals of the New York Academy of Sciences, 1259, 10-18
- Lauber, K., Blumenthal, S. G., Waibel, M., Wesselborg, S. (2004): Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. Molecular cell, 14, 277-287
- Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P., Gordon, S. (1990): Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. Neuroscience, 39, 151-170
- Leal, M. C., Casabona, J. C., Puntel, M., Pitossi, F. J. (2013): Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha: reliable targets for protective therapies in Parkinson's Disease? Frontiers in cellular neuroscience, 7, 53
- Lee, H. G., Zhu, X., Takeda, A., Perry, G., Smith, M. A. (2006): Emerging evidence for the neuroprotective role of alpha-synuclein. Experimental neurology, 200, 1-7
- Lee, H. J., Suk, J. E., Bae, E. J., Lee, S. J. (2008): Clearance and deposition of extracellular alpha-synuclein aggregates in microglia. Biochemical and biophysical research communications, 372, 423-428

- Lee, J., Ryu, H., Ferrante, R. J., Morris, S. M., Jr., Ratan, R. R. (2003): Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100, 4843-4848
- Lehnardt, S., Massillon, L., Follett, P., Jensen, F. E., Ratan, R., Rosenberg, P. A., Volpe, J. J., Vartanian, T. (2003): Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100, 8514-8519
- Ling, E. A., Wong, W. C. (1993): The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. Glia, 7, 9-18
- Liu, C., Chan, C. B., Ye, K. (2016): 7,8-dihydroxyflavone, a small molecular TrkB agonist, is useful for treating various BDNF-implicated human disorders. Translational neurodegeneration, 5, 2
- Liu, X., Chan, C. B., Jang, S. W., Pradoldej, S., Huang, J., He, K., Phun, L. H., France, S., Xiao, G., Jia, Y., Luo, H. R., Ye, K. (2010): A synthetic 7,8-dihydroxyflavone derivative promotes neurogenesis and exhibits potent antidepressant effect. Journal of medicinal chemistry, 53, 8274-8286
- Liu, X., Chan, C. B., Qi, Q., Xiao, G., Luo, H. R., He, X., Ye, K. (2012): Optimization of a small tropomyosin-related kinase B (TrkB) agonist 7,8-dihydroxyflavone active in mouse models of depression. Journal of medicinal chemistry, 55, 8524-8537
- Liu, X., Ye, F., Xiong, H., Hu, D.-N., Limb, G. A., Xie, T., Peng, L., Zhang, P., Wei, Y., Zhang, W., Wang, J., Wu, H., Lee, P., Song, E., Zhang, D. Y. (2015): IL-1 $\beta$  induces IL-6 production in retinal Müller cells predominantly through the activation of p38 MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway. Exp Cell Res, 331, 223-231
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2002): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. Methods (San Diego, Calif.), 25, 402-408
- London, A., Cohen, M., Schwartz, M. (2013): Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. Frontiers in cellular neuroscience 7, 34 DOI: 10.3389/fncel.2013.00034
- Ma, W., Quirion, R. (2008): Does COX2-dependent PGE2 play a role in neuropathic pain? Neuroscience letters, 437, 165-169
- Marchetti, B., Abbracchio, M. P. (2005): To be or not to be (inflamed)--is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders? Trends in pharmacological sciences, 26, 517-525
- Martich, G. D., Boujoukos, A. J., Suffredini, A. F. (1993): Response of man to endotoxin. Immunobiology, 187, 403-416
- Masuhr, K. F., Neumann, M. (2007): Neurologie. 128 Tabellen. 6. Aufl, S. 199, Thieme, Stuttgart
- McGeer, P. L., McGeer, E. G. (2008): Glial reactions in Parkinson's disease. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society, 23, 474-483
- Meng, X., Zhang, S. (2013): MAPK cascades in plant disease resistance signaling. Annual review of phytopathology, 51, 245-266

- Milber, J. M., Noorigian, J. V., Morley, J. F., Petrovitch, H., White, L., Ross, G. W., Duda, J. E. (2012): Lewy pathology is not the first sign of degeneration in vulnerable neurons in Parkinson disease. Neurology, 79, 2307-2314
- Montgomery, S. L., Bowers, W. J. (2011): Tumor necrosis factor-alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology, 7, 42-59
- Moon, H. E., Paek, S. H. (2015): Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. Experimental neurobiology, 24, 103-116
- Muraguchi, A., Hirano, T., Tang, B., Matsuda, T., Horii, Y., Nakajima, K., Kishimoto, T. (1988): The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. The Journal of experimental medicine, 167, 332-344
- Nagatsu, T., Mogi, M., Ichinose, H., Togari, A. (2000): Cytokines in Parkinson's disease. Journal of neural transmission. Supplementum, 143-151
- Naude, P. J., den Boer, J. A., Luiten, P. G., Eisel, U. L. (2011): Tumor necrosis factor receptor cross-talk. The FEBS journal, 278, 888-898
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Helmchen, F. (2005): Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science (New York, N.Y.), 308, 1314-1318
- Nishimoto, N. (2005): Cytokine signal regulation and autoimmune disorders. Autoimmunity, 38, 359-367
- Obeso, J. A., Rodriguez-Oroz, M. C., Goetz, C. G., Marin, C., Kordower, J. H., Rodriguez, M., Hirsch, E. C., Farrer, M., Schapira, A. H., Halliday, G. (2010): Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. Nature medicine, 16, 653-661
- Okamoto, M., Liu, W., Luo, Y., Tanaka, A., Cai, X., Norris, D. A., Dinarello, C. A., Fujita, M. (2010): Constitutively active inflammasome in human melanoma cells mediating autoinflammation via caspase-1 processing and secretion of interleukin-1beta. The Journal of biological chemistry, 285, 6477-6488
- Olanow, C. W., Perl, D. P., DeMartino, G. N., McNaught, K. S. (2004): Lewy-body formation is an aggregates-related process: a hypothesis. The Lancet. Neurology, 3, 496-503
- Opdenakker, K., Remans, T., Vangronsveld, J., Cuypers, A. (2012): Mitogen-Activated Protein (MAP) kinases in plant metal stress: regulation and responses in comparison to other biotic and abiotic stresses. International journal of molecular sciences, 13, 7828-7853
- Ordenstein, L. (1867): Sur la paralysie agitante et la sclérose en plaques généralisée. Paris, Impr. E. Martinet.
- Palumbo, S., Bosetti, F. (2013): Alterations of brain eicosanoid synthetic pathway in multiple sclerosis and in animal models of demyelination: role of cyclooxygenase-2. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids, 89, 273-278
- Park, H. Y., Kim, G. Y., Hyun, J. W., Hwang, H. J., Kim, N. D., Kim, B. W., Choi, Y. H. (2012): 7,8-Dihydroxyflavone exhibits anti-inflammatory properties by downregulating the NF-kappaB and MAPK signaling pathways in lipopolysaccharide-treated RAW264.7 cells. International journal of molecular medicine, 29, 1146-1152
- Park, H. Y., Park, C., Hwang, H. J., Kim, B. W., Kim, G. Y., Kim, C. M., Kim, N. D., Choi, Y. H. (2014): 7,8-Dihydroxyflavone attenuates the release of pro-inflammatory mediators and

cytokines in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells through the suppression of the NF-kappaB and MAPK signaling pathways. International journal of molecular medicine, 33, 1027-1034

Parkinson, J. (1817): An Essay on the Shaking Palsy. London, Wittingham and Rowland for Sherwood, Neely and Jones.

Perry, V. H. (2012): Innate inflammation in Parkinson's disease. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 2, a009373 DOI: 10.1101/cshperspect.a009373

Pimplikar, S. W. (2014): Neuroinflammation in Alzheimer's disease: from pathogenesis to a therapeutic target. Journal of clinical immunology, 34 Suppl 1, 64-69

Pitzschke, A. (2014): Modes of MAPK substrate recognition and control. Trends in plant science, 20, 49-55

Polazzi, E., Contestabile, A. (2002): Reciprocal interactions between microglia and neurons: from survival to neuropathology. Reviews in the neurosciences, 13, 221-242

Polazzi, E., Monti, B. (2010): Microglia and neuroprotection: from in vitro studies to therapeutic applications. Progress in neurobiology, 92, 293-315

Pott Godoy, M. C., Ferrari, C. C., Pitossi, F. J. (2010): Nigral neurodegeneration triggered by striatal AdIL-1 administration can be exacerbated by systemic IL-1 expression. Journal of neuroimmunology, 222, 29-39

Qin, L., Li, G., Qian, X., Liu, Y., Wu, X., Liu, B., Hong, J. S., Block, M. L. (2005): Interactive role of the toll-like receptor 4 and reactive oxygen species in LPS-induced microglia activation. Glia, 52, 78-84

Raghavendra, V., Tanga, F. Y., DeLeo, J. A. (2004): Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. The European journal of neuroscience, 20, 467-473

Rascol, O., Perez-Lloret, S., Ferreira, J. J. (2015): New treatments for levodopa-induced motor complications. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society,

Regulski, M., Regulska, K., Prukała, W., Piotrowska, H., Stanis, B., Murias, M. (2015): COX-2 inhibitors: a novel strategy in the management of breast cancer. Drug Discov Today,

Repa, A., Bertsias, G. K., Petraki, E., Choulaki, C., Vassou, D., Kambas, K., Boumpas, D. T., Goulielmos, G., Sidiropoulos, P. (2015): Dysregulated production of interleukin-1beta upon activation of the NLRP3 inflammasome in patients with familial Mediterranean fever. Human immunology, 76, 488-495

Rocha, N. P., de Miranda, A. S., Teixeira, A. L. (2015): Insights into Neuroinflammation in Parkinson's Disease: From Biomarkers to Anti-Inflammatory Based Therapies. BioMed research international, 2015, 628192

Ronkina, N., Menon, M. B., Schwermann, J., Tiedje, C., Hitti, E., Kotlyarov, A., Gaestel, M. (2010): MAPKAP kinases MK2 and MK3 in inflammation: complex regulation of TNF biosynthesis via expression and phosphorylation of tristetraprolin. Biochem Pharmacol, 80, 1915-1920

Ryu, M. J., Kang, K. A., Piao, M. J., Kim, K. C., Zheng, J., Yao, C. W., Cha, J. W., Chung, H. S., Kim, S. C., Jung, E., Park, D., Chae, S., Hyun, J. W. (2014): 7,8-Dihydroxyflavone protects human keratinocytes against oxidative stress-induced cell damage via the ERK and

PI3K/Akt-mediated Nrf2/HO-1 signaling pathways. International journal of molecular medicine, 33, 964-970

Saha, R. N., Pahan, K. (2006): Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. Antioxidants & redox signaling, 8, 929-947

Saijo, K., Winner, B., Carson, C. T., Collier, J. G., Boyer, L., Rosenfeld, M. G., Gage, F. H., Glass, C. K. (2009): A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. Cell, 137, 47-59

Schaper, F., Rose-John, S. (2015): Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. Cytokine & growth factor reviews,

Schapira, A. H., Jenner, P. (2011): Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society, 26, 1049-1055

Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., Rose-John, S. (2011): The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. Biochimica et biophysica acta, 1813, 878-888

Schroeter, H., Boyd, C., Spencer, J. P. E., Williams, R. J., Cadenas, E., Rice-Evans, C. (2002): MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. Neurobiol Aging, 23, 861-880

Schwarz, J., Storch, A. (2007): Parkinson-Syndrome. Grundlagen, Diagnostik und Therapie. 1. Aufl., S. Kohlhammer, Stuttgart

Sconce, M. D., Churchill, M. J., Moore, C., Meshul, C. K. (2015): Intervention with 7,8-dihydroxyflavone blocks further striatal terminal loss and restores motor deficits in a progressive mouse model of Parkinson's disease. Neuroscience, 290, 454-471

Sedgwick, J. D., Schwender, S., Gregersen, R., Dorries, R., ter Meulen, V. (1993): Resident macrophages (ramified microglia) of the adult brown Norway rat central nervous system are constitutively major histocompatibility complex class II positive. The Journal of experimental medicine, 177, 1145-1152

Shaul, Y. D., Seger, R. (2007): The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. Biochimica et biophysica acta, 1773, 1213-1226

Singhal, G., Jaehne, E. J., Corrigan, F., Toben, C., Baune, B. T. (2014): Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: a focused review. Frontiers in neuroscience, 8, 315

Solanki, I., Parihar, P., Mansuri, M. L., Parihar, M. S. (2015): Flavonoid-based therapies in the early management of neurodegenerative diseases. Advances in nutrition (Bethesda, Md.), 6, 64-72

Sommer, U., Hummel, T., Cormann, K., Mueller, A., Frasnelli, J., Kropp, J., Reichmann, H. (2004): Detection of presymptomatic Parkinson's disease: combining smell tests, transcranial sonography, and SPECT. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society, 19, 1196-1202

Spooren, A., Kolmus, K., Laureys, G., Clinckers, R., De Keyser, J., Haegeman, G., Gerlo, S. (2011): Interleukin-6, a mental cytokine. Brain research reviews, 67, 157-183

Srinivasan, D., Yen, J. H., Joseph, D. J., Friedman, W. (2004): Cell type-specific interleukin-1beta signaling in the CNS. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 24, 6482-6488

- Sriram, K., O'Callaghan, J. P. (2007): Divergent roles for tumor necrosis factor-alpha in the brain. Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology, 2, 140-153
- Stanciu, M., Wang, Y., Kentor, R., Burke, N., Watkins, S., Kress, G., Reynolds, I., Klann, E., Angiolieri, M. R., Johnson, J. W., DeFranco, D. B. (2000): Persistent activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures. The Journal of biological chemistry, 275, 12200-12206
- Steinmetz, C. C., Turrigiano, G. G. (2010): Tumor necrosis factor-alpha signaling maintains the ability of cortical synapses to express synaptic scaling. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 30, 14685-14690
- Tansey, M. G., Goldberg, M. S. (2010): Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. Neurobiology of disease, 37, 510-518
- Taylor, J. P., Hardy, J., Fischbeck, K. H. (2002): Toxic proteins in neurodegenerative disease. Science (New York, N.Y.), 296, 1991-1995
- Teismann, P. (2012): COX-2 in the neurodegenerative process of Parkinson's disease. BioFactors (Oxford, England), 38, 395-397
- Trempelec, N., Dave-Coll, N., Nebreda, A. R. (2013): SnapShot: p38 MAPK signaling. Cell, 152, 656-656.e651
- Tripathy, D., Chakraborty, J., Mohanakumar, K. P. (2015): Antagonistic pleiotropic effects of nitric oxide in the pathophysiology of Parkinson's disease. Free radical research, 49, 1129-1139
- Tsai, T., Klausmeyer, A., Conrad, R., Gottschling, C., Leo, M., Faissner, A., Wiese, S. (2013): 7,8-Dihydroxyflavone leads to survival of cultured embryonic motoneurons by activating intracellular signaling pathways. Molecular and cellular neurosciences, 56, 18-28
- Tuñón, M. J., García-Mediavilla, M. V., Sánchez-Campos, S., González-Gallego, J. (2009): Potential of flavonoids as anti-inflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways. Curr Drug Metab, 10, 256-271
- Udupa, K., Chen, R. (2015): The mechanisms of action of deep brain stimulation and ideas for the future development. Progress in neurobiology,
- Volkman, J., Albanese, A., Antonini, A., Chaudhuri, K. R., Clarke, C. E., de Bie, R. M., Deuschl, G., Eggert, K., Houeto, J. L., Kulisevsky, J., Nyholm, D., Odin, P., Ostergaard, K., Poewe, W., Pollak, P., Rabey, J. M., Rascol, O., Ruzicka, E., Samuel, M., Speelman, H., Sydow, O., Valldeoriola, F., van der Linden, C., Oertel, W. (2013): Selecting deep brain stimulation or infusion therapies in advanced Parkinson's disease: an evidence-based review. Journal of neurology, 260, 2701-2714
- Wainstein, E., Seger, R. (2016): The dynamic subcellular localization of ERK: mechanisms of translocation and role in various organelles. Curr Opin Cell Biol, 39, 15-20
- Walker, A. K., Kavelaars, A., Heijnen, C. J., Dantzer, R. (2014): Neuroinflammation and comorbidity of pain and depression. Pharmacological reviews, 66, 80-101
- Wang, B., Zhang, Q., Yao, R., Liu, X., Qu, Z. (2015): 7, 8-Dihydroxyflavone Protects an Endothelial Cell Line from H2O2 Damage. PloS one, 10, e0135345

- Wang, T., Qin, L., Liu, B., Liu, Y., Wilson, B., Eling, T. E., Langenbach, R., Taniura, S., Hong, J. S. (2004): Role of reactive oxygen species in LPS-induced production of prostaglandin E2 in microglia. Journal of neurochemistry, 88, 939-947
- Wang, W. Y., Tan, M. S., Yu, J. T., Tan, L. (2015): Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. Annals of translational medicine, 3, 136
- Weinberg, J. B. (2000): Nitric oxide synthase 2 and cyclooxygenase 2 interactions in inflammation. Immunologic research, 22, 319-341
- Wellbrock, C., Karasarides, M., Marais, R. (2004): The RAF proteins take centre stage. Nat Rev Mol Cell Biol, 5, 875-885
- Wilms, H., Rosenstiel, P., Sievers, J., Deuschl, G., Zecca, L., Lucius, R. (2003): Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 17, 500-502
- Woldu, A. S., Mai, J. (2012): A novel relationship between the radical-scavenging activity of flavonoids and enthalpy of formation revealed with Hartree-Fock computations and thermochemical deduction. Redox report : communications in free radical research, 17, 115-130
- Wolf, J., Rose-John, S., Garbers, C. (2014): Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. Cytokine, 70, 11-20
- Wollmer, M. A., Lucius, R., Wilms, H., Held-Feindt, J., Sievers, J., Mentlein, R. (2001): ATP and adenosine induce ramification of microglia in vitro. Journal of neuroimmunology, 115, 19-27
- Wong, Y. C., Zhang, L., Lin, G., Zuo, Z. (2008): Intestinal first-pass glucuronidation activities of selected dihydroxyflavones. International journal of pharmaceutics, 366, 14-20
- Wortzel, I., Seger, R. (2011): The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. Genes Cancer, 2, 195-209
- Wu, C.-H., Hung, T.-H., Chen, C.-C., Ke, C.-H., Lee, C.-Y., Wang, P.-Y., Chen, S.-F. (2014): Post-injury treatment with 7,8-dihydroxyflavone, a TrkB receptor agonist, protects against experimental traumatic brain injury via PI3K/Akt signaling. PLoS one, 9, e113397
- Xu, Y., Huang, Q., Zhang, W., Wang, Y., Zeng, Q., He, C., Xue, J., Chen, J., Hu, X., Xu, Y. (2015): Decreased expression levels of Nurr1 are associated with chronic inflammation in patients with type 2 diabetes. Molecular medicine reports,
- Yagami, T., Koma, H., Yamamoto, Y. (2015): Pathophysiological Roles of Cyclooxygenases and Prostaglandins in the Central Nervous System. Molecular neurobiology,
- Yiangou, Y., Facer, P., Durrenberger, P., Chessell, I. P., Naylor, A., Bountra, C., Banati, R. R., Anand, P. (2006): COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. BMC neurology, 6, 12
- Yoon, S., Seger, R. (2006): The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. Growth Factors, 24, 21-44
- Zeng, K. W., Yu, Q., Song, F. J., Liao, L. X., Zhao, M. B., Dong, X., Jiang, Y., Tu, P. F. (2014): Deoxysappanone B, a homoisoflavone from the Chinese medicinal plant *Caesalpinia sappan* L., protects neurons from microglia-mediated inflammatory injuries via inhibition of

IkappaB kinase (IKK)-NF-kappaB and p38/ERK MAPK pathways. European journal of pharmacology, 748, 18-29

Zhang, J. C., Wu, J., Fujita, Y., Yao, W., Ren, Q., Yang, C., Li, S. X., Shirayama, Y., Hashimoto, K. (2015): Antidepressant effects of TrkB ligands on depression-like behavior and dendritic changes in mice after inflammation. The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP), 18,

Zhang, R., Kang, K. A., Piao, M. J., Ko, D. O., Wang, Z. H., Chang, W. Y., You, H. J., Lee, I. K., Kim, B. J., Kang, S. S., Hyun, J. W. (2009): Preventive effect of 7,8-dihydroxyflavone against oxidative stress induced genotoxicity. Biological & pharmaceutical bulletin, 32, 166-171

Zhang, T., Chen, S., Harmon, A. C. (2015): Protein-protein interactions in plant mitogen-activated protein kinase cascades. Journal of experimental botany,

Zhang, W., Wang, T., Pei, Z., Miller, D. S., Wu, X., Block, M. L., Wilson, B., Zhou, Y., Hong, J. S., Zhang, J. (2005): Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 19, 533-542

Zhang, Z., Liu, X., Schroeder, J. P., Chan, C. B., Song, M., Yu, S. P., Weinshenker, D., Ye, K. (2014): 7,8-dihydroxyflavone prevents synaptic loss and memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 39, 638-650

Zhao, X., Bausano, B., Pike, B. R., Newcomb-Fernandez, J. K., Wang, K. K., Shohami, E., Ringger, N. C., DeFord, S. M., Anderson, D. K., Hayes, R. L. (2001): TNF-alpha stimulates caspase-3 activation and apoptotic cell death in primary septo-hippocampal cultures. Journal of neuroscience research, 64, 121-131

## 8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Lucius für die Möglichkeit, diese Arbeit zu schreiben, die Auswahl des Themas sowie die Anregung zu der kritischen Auseinandersetzung mit der experimentellen Forschung und meinen Versuchsergebnissen. Ich bedanke mich sehr herzlich für die mir entgegengebrachte Geduld, die Möglichkeit der freien zeitlichen Planung der Arbeitsstunden für diese Arbeit sowie die hervorragende Betreuung.

Frau Dr. rer. nat. Uta Rickert danke ich vielmals für wiederholte Anregungen bezüglich der Rahmenbedingungen der Versuche, wissenschaftliche Ratschläge und die sehr wertvolle Korrekturtätigkeit.

Ein großer Dank richtet sich an Frau Monika Grell, Frau Gaby Steinkamp, Frau Marion Kölln und Frau Katrin-Neblung-Masuhr, die mich in das praktische Arbeiten im Labor einwiesen, mich bei der Versuchsdurchführung betreuten und mir mit zahlreichen Ratschlägen zur Seite standen und immer ein offenes Ohr hatten.

Außerdem möchte ich Herrn Clemens Franke für die technische Unterstützung bei der Anfertigung zweier Schaubilder danken.

Ein großes Dankeschön möchte ich an meine Eltern und meinen Freund richten, die mich immer unterstützten, mir neuen Mut zusprachen, für mich da waren und mir mit ihren Ideen, Ratschlägen und ihrem Wissen immer zur Seite standen.

Mein letzter Dank gilt all denjenigen, die sich die Zeit genommen haben, meine Arbeit Korrektur zu lesen und mich mit Anregungen und Kritik zu unterstützen.

## 9 Curriculum vitae

### Persönliche Daten

Geburtsdatum:	06.01.1990
Geburtsort:	Preetz
Familienstand:	ledig

### Schulische Ausbildung

08/1996-07/2000	Hermann-Ehlers-Grundschule, Preetz
08/2000-07/2009	Friedrich-Schiller-Gymnasium, Preetz
07/2009	Abitur

### Universitäre Ausbildung

10/2009-07/2015	Studium der Zahnmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
09/2010	naturwissenschaftliche Vorprüfung (Vorphysikum)
3/2012	zahnärztliche Vorprüfung (Physikum)
07/2015	Staatsexamen, Gesamtnote „sehr gut“ und Approbation als Zahnärztin

### Zahnärztliche Tätigkeit

11/2015 bis heute	Tätigkeit als Assistenz Zahnärztin in einer Praxis in Eckernförde
-------------------	---

### Promotion

03/2013 bis heute	Aufnahme der Doktorarbeit am Anatomischen Institut der CAU in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lucius
-------------------	--

### Veröffentlichung

03/2015	Posterpräsentation im Rahmen des DGPT 2015 Kongresses in Kiel
---------	---