

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

Antiinflammatorische Wirkung von Honokiol auf Mikroglia und Astrozyten

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

vorgelegt von

Marvin Heimke

aus Greifswald

Kiel 2018

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ralph Lucius
Anatomisches Institut

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Alexa Karina Klettner
Klinik für Ophthalmologie

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2018

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 22.08.2018

gez.: Prof. Dr. Markus Bleich
(Stellv. Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Gewidmet meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Neurodegenerative Erkrankungen	1
1.1.1	Was verstehen wir unter neurodegenerativen Erkrankungen?	1
1.1.2	Welche neurodegenerativen Erkrankungen gibt es?	2
1.1.2.1	Morbus Parkinson	2
1.1.2.2	Morbus Alzheimer	4
1.1.3	Gesundheitsökonomische Bedeutung der neurodegenerativen Erkrankungen	5
1.2	Neuroinflammation	6
1.2.1	Das Immunsystem des Zentralen Nervensystems	7
1.2.2	Die Gliazellen	8
1.2.2.1	Mikroglia	8
1.2.2.2	Astrozyten	11
1.2.3	Mediatoren der Inflammation	12
1.2.4	Neuroinflammation im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen	15
1.2.5	Das Altern als Risikofaktor neurodegenerativer Erkrankungen	16
1.3	Honokiol	17
1.3.1	Herkunft und Anwendung	17
1.3.2	Verfügbarkeit und Kinetik	18
1.3.3	Honokiol überwindet die Blut-Hirn-Schranke	19
1.3.4	Neuroprotektive und neurotrophe Wirkung	19
1.3.5	Antiinflammatorische Eigenschaften	20
1.3.6	Weitere mögliche Indikationen für die Therapie mit Honokiol	21
1.4	Fragestellung	23
2	Material	24
2.1	Geräte und Hilfsmittel	24
2.2	Verbrauchsmaterialien	25
2.3	Chemikalien und Reagenzien	26
2.4	Medien, Lösungen, Puffer, Enzyme, Sonden und Antikörper für die einzelnen Versuche	28

2.5	Computersoftware	34
3	Methoden	35
3.1	Isolierung und Kultivierung primärer Mikroglia und Astrozyten	35
3.2	Zellaussaat	37
3.3	Stimulation	38
3.4	MTT-Test	39
3.5	Untersuchung der Zellmorphologie mittels Coomassie-Blau-Färbung	40
3.6	Zell- und molekularbiologische Methoden	40
3.6.1	Indirekte NO-Messung	41
3.6.2	Untersuchung auf RNA-Ebene	41
3.6.2.1	RNA-Isolierung	41
3.6.2.2	Messung des RNA-Gehalts	43
3.6.2.3	Reverse Transkription	43
3.6.2.4	Quantitative Real-Time-PCR (qPCR)	44
3.6.3	Untersuchungen auf Proteinebene	45
3.6.3.1	ELISA	45
3.6.3.2	Western Blot	46
3.7	Immunfluoreszenzfärbung des Transkriptionsfaktors KLF-4	49
3.8	Statistik	50
4	Ergebnisse	51
4.1	Einfluss von Honokiol auf das Überleben der Mikroglia und Astrozyten	51
4.2	Einfluss von Honokiol auf die Morphologie der Mikroglia und Astrozyten	53
4.3	Einfluss von Honokiol auf die Stickstoffmonoxid-Freisetzung der Mikroglia und Astrozyten	55
4.4	Einfluss von Honokiol auf die iNOS mRNA-Expression in Mikroglia	57
4.5	Modulation der mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine in Mikroglia und Astrozyten durch Honokiol	58
4.5.1	Einfluss von Honokiol auf die IL-6-mRNA-Expression in Mikroglia und Astrozyten	58
4.5.2	Einfluss von Honokiol auf die IL-1 β -mRNA-Expression in Mikroglia und Astrozyten	60

4.5.3	Einfluss von Honokiol auf die TNF- α -mRNA-Expression in Mikroglia und Astrozyten	61
4.5.4	Zusammenfassung der modulatorischen Eigenschaft Honokiols auf die mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine in Mikroglia und Astrozyten	62
4.6	Einfluss von Honokiol auf die mRNA-Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 in Mikroglia und Astrozyten	63
4.7	Modulation der Proteinfreisetzung proinflammatorischer Zytokine in Mikroglia und Astrozyten	65
4.7.1	Einfluss von Honokiol auf die IL-6-Proteinfreisetzung in Mikroglia und Astrozyten	65
4.7.2	Einfluss von Honokiol auf die TNF- α -Proteinfreisetzung in Mikroglia und Astrozyten	67
4.7.3	Zusammenfassung der modulatorischen Eigenschaft Honokiols auf die Proteinfreisetzung proinflammatorischer Zytokine in Mikroglia und Astrozyten	68
4.8	Einfluss von Honokiol auf die MAP-Kinasen ERK1/2 in Mikroglia und Astrozyten	69
4.9	Nachweis von KLF-4 in Mikroglia und Astrozyten durch Immunfluoreszenzfärbung	73
5	Diskussion	75
5.1	In-vitro Versuche an Mikroglia und Astrozyten	77
5.2	Toxizität von Honokiol und mögliche Nebenwirkungen	78
5.3	Einfluss von Honokiol auf die Morphologie und das Genexpressionsprofil der Mikroglia und Astrozyten	81
5.4	Einfluss von Honokiol auf intrazelluläre Signalwege in Mikroglia und Astrozyten	91
5.5	Beteiligte Rezeptoren	93
5.6	Bewertung der Ergebnisse und Ausblick	95
6	Zusammenfassung	97
7	Literaturverzeichnis	99
8	Eidesstattliche Erklärung	117
9	Danksagung	118
10	Curriculum vitae	119

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Prävalenzrate des M. Parkinson und des M. Alzheimer in den unterschiedlichen Altersgruppen	5
Abb. 2	Strukturformel von Honokiol	18
Abb. 3.1	Einfluss von Honokiol auf das Zellüberleben der Mikroglia	51
Abb. 3.2	Einfluss von Honokiol auf das Zellüberleben der Astrozyten	52
Abb. 4.1	Einfluss von Honokiol auf die Morphologie primärer Mikroglia	54
Abb. 4.2	Einfluss von Honokiol auf die Morphologie primärer Astrozyten	54
Abb. 5	Modulation der Stickstoffmonoxid (NO)-Freisetzung durch Honokiol in LPS-stimulierten Mikroglia und Astrozyten	56
Abb. 6	Modulation der induzierbaren NO-Synthase (iNOS)-mRNA-Expressionsrate durch Honokiol in LPS-stimulierten Mikroglia	57
Abb. 7	Modulation der Interleukin (IL)-6-mRNA-Expressionsrate durch Honokiol in LPS-stimulierten Mikroglia und Astrozyten	59
Abb. 8	Modulation der Interleukin (IL)-1 β -mRNA-Expressionsrate durch Honokiol in LPS-stimulierten Mikroglia und Astrozyten	60
Abb. 9	Modulation der Tumornekrosefaktor (TNF)- α -mRNA-Expressionsrate durch Honokiol in LPS-stimulierten Mikroglia und Astrozyten	61
Abb. 10	Modulation der Interleukin (IL)-10-mRNA-Expressionsrate durch Honokiol in LPS-stimulierten Mikroglia und Astrozyten	63
Abb. 11	Modulation der Interleukin (IL)-6-Proteinfreisetzung durch Honokiol in LPS-stimulierten Mikroglia und Astrozyten	65
Abb. 12	Modulation der Tumornekrosefaktor (TNF)- α -Proteinfreisetzung durch Honokiol in LPS-stimulierten Mikroglia und Astrozyten	67
Abb. 13.1	Einfluss von Honokiol auf die Phosphorylierung der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK)1/2 in LPS-stimulierten Mikroglia nach 30- und 60-minütiger Inkubation	69
Abb. 13.2	Einfluss von Honokiol auf die Phosphorylierung der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK)1/2 in LPS-stimulierten Astrozyten nach 30- und 60-minütiger Inkubation	70
Abb. 14.1	Densitometrische Auswertung der Western Blot-Ergebnisse über den Einfluss von Honokiol auf die Phosphorylierung der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK) 1/2 in LPS-stimulierten Mikroglia nach 30- und 60-minütiger Inkubation	71

Abb. 14.2	Densitometrische Auswertung der Western Blot-Ergebnisse über den Einflusses von Honokiol auf die Phosphorylierung der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK)1/2 in LPS-stimulierten Astrozyten nach 30- und 60-minütiger Inkubation	72
Abb. 15.1	Nachweis von Krüppel-like factor (KLF)-4 in Mikroglia mittels Fluoreszenzfärbung	73
Abb. 15.2	Nachweis von Krüppel-like factor (KLF)-4 in Astrozyten mittels Fluoreszenzfärbung	74
Abb. 16	Zusammenfassende Darstellung möglicher neuroprotektiver Mechanismen durch Honokiol in Mikroglia und Astrozyten	90

Abkürzungsverzeichnis

Abin-3	<i>A20-binding inhibitor of NF-κB activation 3</i>
APC	<i>antigen-presenting cell</i> , antigenpräsentierende Zelle
APP	<i>amyloid precursor protein</i> , Amyloid-Vorläufer-Protein
aPTT	<i>activated partial thromboplastin time</i> , aktivierte partielle Thromboplastinzeit
A β	Amyloid- β
Bdnf	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
CB	Cannabinoid-Rezeptor
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
COX-2	Cyclooxygenase 2
CSF-1	<i>colony stimulating factor 1</i> , Kolonie-stimulierender Faktor 1
DPBS	Dulbecco's PBS
ELISA	<i>enzyme-linked-Immunosorbent-Assay</i> , enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i> , extrazellulär regulierte Kinasen
FAS-L	FAS-Ligand
FTDP-17	<i>Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17</i>
GABA	<i>γ-Aminobutyric acid</i> , γ -Aminobuttersäure
GLT-1	Glutamat Transporter 1
HLA	humanes Leukozyten Antigen
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IFN- γ	Interferon γ
IGF 1	<i>insulin-like growth factor 1</i> , Insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IL	Interleukin
IL-10R1	IL-10 Rezeptor 1
IL-1R I	IL-1-Rezeptor I
IL-1RA	IL-1-Rezeptor Antagonist
iNOS	induzierbare NO-Synthase

JNK	Januskinase
KG	Körpergewicht
KLF-4	<i>Krüppel-like factor 4</i>
LD ₅₀	mittlere letale Dosis
LXR	<i>liver X receptor</i> , Leber-X-Rezeptor
M. Alzheimer	Morbus Alzheimer
M. Parkinson	Morbus Parkinson
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen-Kaskade
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i> , Monozytenchemotaktisches Protein 1
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetra-zoliumbromid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
Ncf 1	<i>neutrophil cytosolic factor</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NFTs	<i>neurofibrillary tangles</i> , Neurofibrillen
NGF	<i>nerve growth factor</i> , Nervenwachstumsfaktor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃	Nitrat
NR	<i>nuclear receptor</i> , nukleärer Rezeptor, Kernrezeptor
NSAID	<i>non-steroidal anti-inflammatory drug</i> , nichtsteroidale Antirheumatika
NT-3	<i>Neurotrophin 3</i>
pNF-κB	<i>phosphoNF-κB</i>
PT	Prothrombinzeit
PTZ	Plasmathrombinzeit
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Real-Time PCR (<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion)
RNS	<i>reactive nitrogen species</i> , Reaktive Stickstoffspezies

ROS	<i>reactive oxygen species</i> , Reaktiver Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SDS-Page	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SN	<i>Substantia nigra</i>
SNpc	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
solTNF	<i>soluble TNF</i> , gelöster TNF
TGF- β 1	<i>Transforming Growth Factor β1</i> , Transformierender Wachstumsfaktor β 1
tmTNF	<i>transmembrane TNF</i> , membranständiger TNF
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TNFR	TNF-Rezeptor
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Neurodegenerative Erkrankungen

1.1.1 Was verstehen wir unter neurodegenerativen Erkrankungen?

Unter neurodegenerativen Erkrankungen verstehen wir eine heterogene Gruppe in der Regel langsam fortschreitender Erkrankungen des zentralen Nervensystems, die sowohl sporadisch als auch hereditär auftreten können und mit der Schädigung und dem Untergang von Neuronen verbunden sind.

Der Neuronenverlust ist besonders zu Beginn einer neurodegenerativen Erkrankung selektiv auf die Nervenzellpopulation einer bestimmten funktionellen Einheit beschränkt, wie z. B. auf das dopaminerge nigrostriatale System beim Morbus Parkinson oder auf die Neurone des Hippocampus und des Kortex beim Morbus Alzheimer. Da Neurone postmitotische Zellen sind, ist deren Verlust irreversibel und resultiert je nach betroffenem Areal in unterschiedlichen progredienten neurologischen Symptomen, z. B. einer Demenz oder Bewegungsstörungen, die auch in Kombination auftreten können. Allen neurodegenerativen Erkrankungen gemeinsam ist die starke Abnahme der Lebensqualität sowie die direkt und durch Komorbidität erhöhte Letalität [1, 2].

Die Ursachen für das Auftreten einer neurodegenerativen Erkrankung sind bis heute kaum geklärt. So sind auch noch keine Therapiekonzepte etabliert, die an dem Ursprung der Erkrankungen ansetzen. Es gibt vermehrt wissenschaftliche Belege dafür, dass es sich als Ursache neurodegenerativer Erkrankungen um eine Kombination aus endogenen und exogenen Faktoren handelt [3-6].

So heterogen die Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen auch ist, zeigte die Forschung der vergangenen Jahre die Gemeinsamkeit, dass eine Vielzahl dieser mit zentralnervösen Entzündungsvorgängen einhergeht. Ob diese Entzündungsreaktion Ursache oder Folge einer Neurodegeneration ist, ist bislang unklar. Da sie aber die Erkrankung unterhält, verspricht deren Eindämmung das Krankheitsfortschreiten zu verlangsamen und Symptome zu lindern [6, 7].

1.1.2 Welche neurodegenerativen Erkrankungen gibt es?

Die Anzahl der verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wird heutzutage auf mehrere Hundert geschätzt, wobei sich viele in ihrer klinischen Präsentation sowie Pathologie überlappen. Hinzu kommt, dass einige Erkrankungen als Multisystematrophie unterschiedliche Abschnitte des ZNS betreffen können, mit der Folge unterschiedlicher klinischer Erscheinungen, je nach Kombination der Läsionen [8]. Dementsprechend gestaltet sich eine einheitliche, übersichtliche und klinisch praktikable Klassifikation als schwierig [1]. Neben älteren Klassifikationen, die neurodegenerative Erkrankungen anhand der prädominanten Läsion des ZNS und den führenden klinischen Symptomen einteilen, werden durch neue neuropathologische Untersuchungsmethoden Einteilungen anhand molekularer Charakteristika geschaffen. So lassen sich u. a. folgende Gruppen unterscheiden: Trinukleotid-Repeats (z. B. Morbus Huntington, Spinale Cerebelläre Atrophie, Myotone Dystrophie), Prionen-Erkrankungen (z. B. Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, Gerstmann-Straussler-Scheinker Syndrom), Synukleinopathien (z. B. Morbus Parkinson, Progressive Supranukleäre Lähmung, Diffuse Lewy-Körperchen Demenz) und Tauopathien (z. B. Kortikobasale Degeneration, FTDP-17 (*frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17*)). Da weiterhin Fälle beschrieben sind, die sich sowohl klinisch als auch molekularpathologisch mehreren Gruppen zuordnen lassen, wird von einigen Autoren das Modell eines Kontinuums neurodegenerativer Erkrankungen propagiert [1, 9-11].

Im Folgenden werden die zwei neurodegenerativen Erkrankungen „Morbus Parkinson“ und „Morbus Alzheimer“ kurz vorgestellt.

1.1.2.1 Morbus Parkinson

Der Morbus Parkinson (M. Parkinson, Idiopathisches Parkinson-Syndrom, *Paralysis agitans*), welcher 1817 erstmals von James Parkinson beschrieben wurde, ist die am häufigsten auftretende Bewegungsstörung jenseits des 65. Lebensjahres. Während eine hereditäre Form des M. Parkinson bekannt ist, handelt es sich in 95 % der Fälle um eine sporadische Erkrankung [12]. Sie ist gekennzeichnet durch die Symptome Akinese, Rigor, Ruhetremor und posturale Instabilität. Typischerweise beginnen die Symptome einseitig und breiten sich im Verlauf der Krankheit auch auf die kontralaterale Körperhälfte aus. Starthemmung und Bewegungsblockaden („freezing“), Beeinträchtigung der Artikulation und Phonation,

Hypomimie, vegetative Störungen und depressive Verstimmtheit sind weitere typische Begleitsymptome. Ursache der Erkrankung ist ein langsam progredienter Untergang der neuromelaninhaltigen dopaminergen Neurone in der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) des Mittelhirns. Dabei korreliert das Ausmaß des Dopaminmangels mit der Ausprägung der Akinese. Erste motorische Symptome treten ab einem Neuronenverlust in der SNpc von etwa 50 - 70 % auf [12-14]. Neben dem dopaminergen können auch weitere Neurotransmittersysteme betroffen sein: das noradrenerge (*Locus coeruleus*), das serotonerge (Raphe-Kerne) und das cholinerge (dorsaler Vaguskern und *Nucleus basalis Meynert*) System sowie Neurone des *Bulbus olfactorius* [15].

Ein histopathologisches Merkmal dieser Erkrankung ist das Vorkommen eosinophiler, zytoplasmatischer Einschlusskörperchen in den degenerierten Neuronen. Diese sogenannten Lewy-Körperchen bestehen aus fibrillären, fehlgefalteten Proteinen; u. a. aus ubiquiniertem α -Synuklein, Parkin, Synphilin, Neurofilamenten und Proteinen synaptischer Vesikel [2, 13].

Die Ursache für das Neuronensterben ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Diskutiert wird eine Kombination aus exogenen und endogenen Einflüssen. Als exogene Risikofaktoren gelten v. a. Infektionen und Toxine (z.B. Schwermetalle und Pestizide). Als wichtigster endogener Risikofaktor gilt das Altern. Zusätzlich sind verschiedene genetische Prädispositionen beschrieben, die zu Protein- oder Stoffwechsellanomalien führen, z. B. α -Synuclein-Mutationen oder Mutationen in mitochondrialer DNA mit der Folge der Aggregation und Akkumulation fehlerhafter Proteine. Als Folge wird ein direktes Neuronensterben bedingt durch die Proteinaggregate sowie durch neuroinflammatorische Prozesse und oxidative Stressmechanismen vermutet [16-18].

Da die genaue Ätiologie der Erkrankung nicht verstanden ist, ist bislang kein kausales Therapiekonzept verfügbar. Aktuelle Therapieregime zielen v. a. darauf ab, die Dopaminkonzentration der SNpc zu erhöhen oder agonistisch am Dopamin-D₂-Rezeptor zu wirken. Diese Therapie wird allerdings besonders bei fortgeschrittener Erkrankung von erheblichen Nebenwirkungen begleitet. Durch den weiterhin bestehenden progredienten Neuronenverlust ist ihre Wirksamkeit auch nur auf einige Jahre begrenzt. In manchen Fällen bieten Anticholinergika oder Medikamente, die die Acetylcholin-Freisetzung verringern, eine ergänzende Therapie. Des Weiteren gibt es die Möglichkeit der stereotaktischen Operation,

bei der ein Hirnschrittmacher thalamisch zur Unterbrechung eines dominanten Tremors oder subthalamisch zur symptomatischen Therapie eines Rigors implantiert wird [12, 19].

Durch die Erkenntnis, dass neuroinflammatorische Prozesse maßgeblich am Krankheitsfortschreiten beteiligt sind, liegt die Hypothese nahe, dass antiinflammatorische und antioxidative Medikamente die Progredienz der Erkrankung verlangsamen und Symptome lindern können.

1.1.2.2 Morbus Alzheimer

Der Morbus Alzheimer (M. Alzheimer) wurde 1906 erstmals durch den deutschen Psychiater und Neuropathologen Alois Alzheimer beschrieben [6]. Während seiner ärztlichen Tätigkeit behandelte er eine 51-jährige Patientin mit einer 5-jährigen Krankheitsgeschichte einer progredienten Einschränkung der Merkfähigkeit und kognitiven Leistung in Kombination mit sozialer Auffälligkeit, Wahnvorstellungen und Verwirrtheit. Dieser Symptomkomplex beschreibt die heute nach ihm benannte Alzheimer-Krankheit. Nach dem Tod der Patientin untersuchte Alois Alzheimer ihr Gehirn und beschrieb neben auffallend vielen untergegangenen Nervenzellen extrazelluläre Eiweißablagerungen (Senile Amyloid Plaques) in der Hirnrinde sowie intrazelluläre Bündel von Neurofibrillen (*neurofibrillary tangles*, NFTs) [20]. Die Neurodegeneration beginnt im Temporal- und Parietallappen des zerebralen Kortex und schreitet mit der Zeit in den Hippocampus und die Amygdala fort [21].

Amyloid-Plaques (Amyloid- β -Aggregate, A β -Aggregate) sind extrazelluläre Ablagerungen von β -Amyloid (A β 1-42 und A β 1-40), die durch ein verändertes Zerschneiden des Amyloid-Vorläufer-Proteins (*amyloid precursor protein*, APP) entstehen [6, 22]. Diese treten bereits in einem frühen Stadium der Erkrankung auf, noch bevor sich erste Symptome manifestieren [23]. Neben direkten toxischen Effekten auf die umliegenden Neurone [24], rekrutieren A β -Aggregate die Immunzellen des ZNS, die sogenannten Mikroglia, und aktivieren diese [25]. Die Folge ist die Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO), Reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), proinflammatorischen Zytokinen (u. a. Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interleukin (IL)-1 β , Interleukin (IL)-6), Chemokinen sowie Prostaglandinen [6, 21]. Da die A β -Aggregate im proinflammatorischen Zustand der Mikroglia nicht von diesen beseitigt werden können, entsteht eine chronische Neuroinflammation, die das Krankheitsfortschreiten unterhält [26-29].

NFTs sind hyperphosphorylierte Tau-Proteine, die ihre Funktion der Stabilisierung von Mikrotubuli, welche in hoher Anzahl in Neuronen vorkommen, verloren haben und sich in Bündeln intrazellulär ablagern. Ob das Auftreten von NFTs einen kausalen Zusammenhang mit dem neuronalen Untergang hat, ist bis heute nicht endgültig geklärt. Untersuchungen zeigten jedoch, dass das Krankheitsfortschreiten mit einer zunehmenden Akkumulation der NFTs korreliert [23]. Weiterhin verdichten sich Hinweise, dass sich Mikroglia um die Neurofibrillen sammeln und durch phosphoryliertes Tau ebenfalls in einen proinflammatorischen Zustand versetzt werden [30-32].

Für die Beteiligung neuroinflammatorischer Prozesse beim M. Alzheimer spricht auch der Nachweis einer steigenden Anzahl aktivierter Mikroglia mit der Progression der Krankheit [21].

1.1.3 Gesundheitsökonomische Bedeutung der neurodegenerativen Erkrankungen

Das Altern gilt als größter Risikofaktor um an einem M. Parkinson oder einer Alzheimer-Demenz zu erkranken [33]. Während in der Altersgruppe der 55- bis 69-Jährigen unter 0,1 % von einem M. Parkinson betroffen sind, steigt die Prävalenzrate exponentiell auf 2,2 % der über 85-Jährigen (Abb. 1 A) [18]. Ein noch deutlicher Anstieg lässt es sich beim M. Alzheimer feststellen: In der Altersgruppe der 65- bis 69-Jährigen sind in Europa 0,7 % der Frauen und 0,6 % der Männer betroffen, in der Altersgruppe der über 90-Jährigen hingegen 23,6 % der Frauen und 17,6 % der Männer (Abb. 1 B) [34].

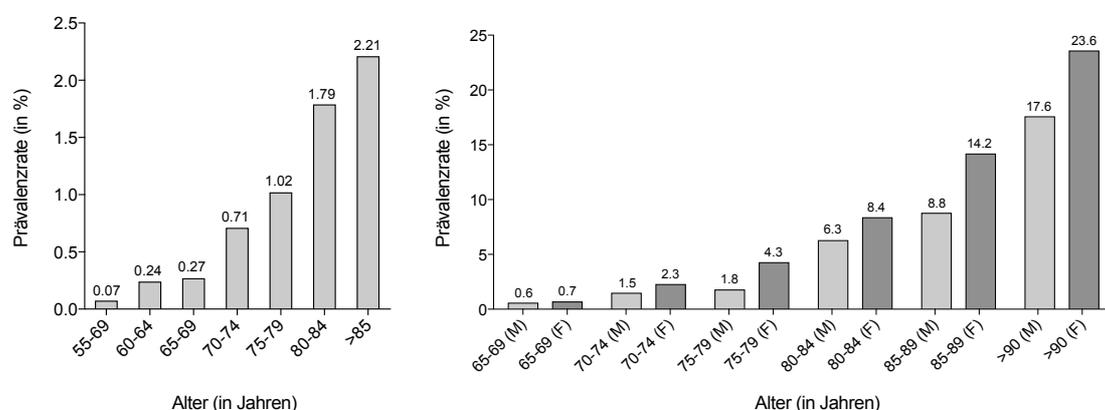


Abb. 1: Prävalenzrate des M. Parkinson und des M. Alzheimer in den unterschiedlichen Altersgruppen. Statistiken zufolge ist sowohl beim M. Parkinson (A, modifiziert nach Gerlach et al. (2007) [18]) als auch beim M. Alzheimer (B, [34]) eine mit dem Alter exponentiell ansteigende Prävalenzrate zu verzeichnen. M = Männer; F = Frauen. Angegeben in Prozent.

Da aktuelle Vorausberechnungen einen demographischen Wandel hin zu einer alternden Bevölkerung in Deutschland prognostizieren, bedeutet dies gleichermaßen eine steigende Prävalenz neurodegenerativer Erkrankungen. Für das Jahr 2060 wird ein Anstieg der Altersschicht der 65- bis unter 80-jährigen in Deutschland je nach Zuwanderungsstärke um 8 bis 14 % vorausgesagt. Die Altersgruppe der über 80-Jährigen soll sich bis 2060 mehr als verdoppeln [35]. Aus diesem Grund wird der Erforschung möglicher Therapien neurodegenerativer Erkrankungen nicht nur eine hohe medizinische, sondern auch eine gesundheitsökonomische Bedeutung beigemessen. Sollten keine effizienten Therapeutika gefunden werden, wird ein Prävalenzanstieg der Alzheimer-Demenz in Deutschland von geschätzten 590 000 bis 710 000 im Jahr 2002 auf 1 480 000 bis 1 780 000 im Jahr 2050 prognostiziert [34].

1.2 Neuroinflammation

Inflammatorische Prozesse spielen eine essentielle Rolle bei der Eliminierung von schädlichen Mikroorganismen sowie dem Abbau nekrotischen Gewebes und abgelagerter Substanzen (z. B. Protein-Aggregaten). Sie stellen eine für den Organismus lebensnotwendige Funktion dar. Eine überschießende oder auch chronische Immunantwort hat jedoch v. a. eine Schädigung des körpereigenen Gewebes zur Folge. Im zentralen Nervensystem kann dies verheerende Auswirkungen haben. Neurone sind empfindliche Zellen, die einen langanhaltenden Einfluss toxischer Moleküle, freigesetzt von aktivierten Immunzellen, nicht standhalten können. Da die Möglichkeit der Regeneration der postmitotischen Zellen begrenzt ist, ist eine Wahrung des Gleichgewichts aus Pro- und Antiinflammation im ZNS von enormer Bedeutung [26, 36]. Auch wenn eine chronische Neuroinflammation vielleicht nicht die primäre Ursache darstellt, ist sie bei einer Vielzahl der neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt. Durch die Selbsterhaltung der für das ZNS schädigenden Entzündungsprozesse tragen diese maßgeblich zum Krankheitsfortschreiten bei [6].

Um geeignete therapeutische Angriffspunkte zur Wiederherstellung einer Homöostase aus Pro- und Antiinflammation bei neurodegenerativen Erkrankungen zu finden, ist es wichtig, das Immunsystems des ZNS zu verstehen.

1.2.1 Das Immunsystem des Zentralen Nervensystems

Das Zentrale Nervensystem unterscheidet sich in immunologischer Hinsicht maßgeblich von anderen Organen. Es wird, ähnlich der *Testes* oder der Vorderkammer des Auges, als „immunprivilegiert“ bezeichnet. Unter immunprivilegiert versteht man den Zustand einer reduzierten Aktivierbarkeit des adaptiven und angeborenen Immunsystems. Im ZNS scheint eine immunologische Toleranz gegenüber Fremdartigen deren Elimination überlegen, um einem Kollateralschaden des schlecht regenerationsfähigen Gewebes vorzubeugen [37].

Heutzutage wird das Immunsystem des ZNS als aktives, hochreguliertes System verstanden [36, 38]. Es zeichnet sich durch folgende Eigenschaften aus:

(1) Die Blut-Hirn-Schranke fungiert als eine anatomische und physiologische Barriere, die das ZNS von äußeren, schädlichen Substanzen und Organismen abschirmt und als immunologische Barriere die unbegrenzte Einwanderung von peripheren Leukozyten über den Blutstrom limitiert [36, 38-40].

(2) Das Zentrale Nervensystem zeichnet sich durch das Fehlen von Lymphgefäßen aus. Dennoch erhalten Antigene des ZNS durch die Drainage interstitieller Flüssigkeit über periarterielle Wege des Hirngewebes und der Meningen Anschluss an zervikale Lymphknoten und können dort prozessiert werden [37, 38, 41, 42].

(3) Das Zentrale Nervensystem hat aufgrund eines Mangels an antigenpräsentierenden Zellen (*antigen-presenting cells*, APCs) und der niedrigen Expression von Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) Klasse I und II Molekülen nur eine begrenzte Kapazität Antigene zu prozessieren und zu präsentieren [37, 38, 40, 42, 43]. Da Lymphozyten nur im aktivierten Zustand die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, muss eine Immunantwort peripher initiiert werden [37, 42]. Gleichzeitig ist die Konzentration an Komplementfaktoren in der Extrazellulärflüssigkeit des ZNS sehr gering, wodurch die Möglichkeit Antikörper-vermittelter Entzündungsvorgänge reduziert wird [37].

(4) Periarterielle Astrozyten und Mikroglia bilden eine immunologische Barriere, die die Einwanderung von peripher aktivierten T-Zellen kontrolliert und limitiert. Sobald aktivierte T-Zellen die Blut-Hirn-Schranke überwinden, kommen sie in den Kontakt mit den Fortsätzen dieser Gliazellen und können ein durch FAS/FAS-L-vermitteltes Apoptose-Signal erhalten, bevor sie wieder Anschluss an periphere Lymphorgane erlangen und eine systemische Immunreaktion auslösen [38, 44, 45].

(5) Das ZNS ist gekennzeichnet durch ein immunmodulierendes Milieu. Mikroglia, Astrozyten und Neurone sezernieren Zytokine, die die Immunreaktionen regulieren [40].

Mit der Entdeckung der Gliazellen wurde dieses Konzept in der Hinsicht erweitert, dass das ZNS ein eigenes, aus Pro- und Antiinflammation fein abgestimmtes endogenes Immunsystem aufweist [36].

1.2.2 Die Gliazellen

Eine eigene Zellpopulation des ZNS als abgrenzbare Zellen zu den Neuronen wurde 1856 erstmals durch Rudolf Virchow beschrieben. Zu damaliger Zeit war man sich des Umfangs der Funktionen dieser Zellen zur Aufrechterhaltung der Homöostase des ZNS noch nicht bewusst. So wurde der Name „Gliazellen“, abgeleitet aus dem griechischen Wort „glia“ für „Leim“, eingeführt, da lediglich von einer Stütz- und Haltefunktion ausgegangen wurde. Im Jahr 1919 beschrieb Pio del Rio-Hortega erstmals die Unterscheidung der Gliazellen in drei unterschiedliche Zelltypen: die Mikroglia, die Astrozyten und die Oligodendrozyten [46].

Während die Oligodendrozyten mit ihren zellulären Fortsätzen die Axone der Neurone elektrisch isolieren und somit die Fortleitung der Aktionspotentiale unterstützen, sind die Mikroglia die residenten Gewebsmakrophagen des ZNS. Die Astrozyten sind u.a. für die Aufrechterhaltung des Mikromilieus zuständig, jedoch auch maßgeblich an der Steuerung der Immunreaktionen beteiligt.

1.2.2.1 Mikroglia

Um die Limitation der Immunabwehr durch die o. g. Mechanismen des Immunprivilegs zu kompensieren, besteht das ZNS zu einem großen Anteil aus Mikroglia, den ortsständigen Zellen des mononukleären Phagozytensystems, die gleichzeitig als APCs fungieren. Mit lokalen Schwankungen besteht ihr Anteil an den Zellen des Gehirns im Durchschnitt 12 % [40]. Es gibt keine Region, in der die Mikroglia nicht vorkommen, damit eine schnelle Immunantwort stets gewährleistet ist [47].

Die Aufgaben der Mikroglia übersteigen jedoch bei Weitem die alleinige Beseitigung von eindringenden Mikroorganismen. Sie haben eine große Bedeutung im Rahmen der Geweberegeneration des ZNS, indem sie geschädigte Zellen, die das neuronale Gefüge stören würden, sowie schädlichen Zelldebris phagozytieren. Durch die Freisetzung von Faktoren und

Zytokinen wie dem transformierenden Wachstumsfaktor (*Transforming Growth Factor*, TGF)- β 1 fördern sie die Gewebereparatur, die adulte Neurogenese und das gliale Wachstum [48, 49]. Durch das Beseitigen nicht funktionsfähiger Zellen, Dendriten und Synapsen schaffen sie Platz für neue neuronale Verknüpfungen [36, 49, 50]. Des Weiteren sind die Mikroglia entscheidend an der ZNS-Ontogenese beteiligt, indem sie zum einen Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten in ihrem Wachstum fördern, zum anderen überflüssige Zellen phagozytieren [36, 51-53]. Zusätzlich zeigen Studien, dass die Mikroglia bei einem gestörten Gleichgewicht des ZNS auch eine neuroprotektive Funktion einnehmen können: So exprimieren sie unter bestimmten Voraussetzungen das Glutamat-Wiederaufnahme-Protein Glutamat Transporter (GLT)-1. Glutamat führt bei exzessiver Freisetzung, z. B. im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen, über die Aktivierung der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren der Neurone zu einem toxischen Anstieg des neuronalen intrazellulären Kalziumspiegels und damit konsekutiv zum Zelltod („Exzitotoxizität“) [54-56].

Bereits del Rio-Hortega beschrieb zwei unterschiedliche Zustandsformen der Mikroglia: den ruhenden, ramifizierten und den aktivierten, amöboiden Phänotyp [46]. Unter physiologischen Bedingungen zeigt sich die Mikroglia in ihrer ramifizierten Form, antiinflammatorische und neurotrophe Faktoren produzierend [6]. Sie hat einen kleinen, dunklen Zellkern, umgeben von einer dünnen Schicht Zytoplasma, und lange, komplex geformte Zellfortsätze [46]. Mit diesen „beobachtet“ sie u.a. durch Pinozytose sowie durch Interaktion mit Neuronen ständig ihre Mikroumgebung auf mögliche Pathogene, biochemische Alterationen, geschädigte Neurone und schädlichen Zellebris [6, 48, 57]. Man schätzt, dass die Mikroglia das gesamte ZNS innerhalb weniger Stunden überprüfen können. Sie bauen ihre Zellfortsätze, durch welche sie sich Filopodium-ähnlich fortbewegen können, kontinuierlich um, um dabei das fein verknüpfte Neuronennetzwerk nicht zu stören, in welchem sie eingebettet sind [49]. Nach dem heutigen Stand der Wissenschaft entspricht ihr Zustand einer aktiven, „wachsamen“ Zelle, die auf geringste Änderungen des extrazellulären Milieus reagiert, und keinesfalls einem „ruhenden“ Zustand, wie Hortega sie initial beschrieb [48, 49]. In dieser Form exprimiert sie nur eine geringe Menge der Proteinkomplexe MHC-I und -II sowie der kostimulatorischen Moleküle CD85 und CD40, die für eine effiziente Antigen-Präsentation benötigt werden [53].

Entdeckt die Mikroglia ein Pathogen oder eine Änderung der Homöostase des ZNS, beginnt

die Transformation zum aktivierten Phänotyp [6, 46]. Dieser zeichnet sich durch eine Hypertrophie der Zelle bei Verkürzung und Rarefizierung der Zellfortsätze aus. Das Zytoplasma wird dichter und bildet retikuläre Strukturen. Die verbliebenen kurzen Zellfortsätze werden kräftig und weisen, wie durch Hortega beschrieben, „dornenartige Spitzen“ auf [46].

Die Aktivierung der Mikroglia führt zur gesteigerten Proliferation, Motilität, phagozytischen Aktivität sowie zu der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und reaktiven Nitrogen- und Sauerstoffspezies [21, 53, 58]. Weiterhin steigert sie die Expression von MHC-I und -II sowie der kostimulatorischen Moleküle und agiert nun als Schlüsselzelle der angeborenen sowie adaptiven Immunantwort. Durch die Freisetzung von Chemokinen kann sie weitere Immunzellen zum Ort des Geschehens anziehen und ist befähigt sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Zellen zu stimulieren [53]. Dieser Phänotyp der „klassischen Aktivierung“ wird in Anlehnung an die unterschiedlichen Aktivitätsprofile der Makrophagen als proinflammatorischer M1-Typ bezeichnet. Im Gegensatz dazu können Mikroglia auch den „alternativ aktivierten“, immunsuppressiven Phänotyp M2 einnehmen, der sich durch die Expression von Genen auszeichnet, die die Inflammation beenden und die Phagozytose von Zelldebris und fehlgefalteten, aggregierten Proteinen sowie die Gewebereparatur und die Rekonstruktion der extrazellulären Matrix einleiten. Physiologischerweise gehen Mikroglia nach Beseitigung der Pathogene in diesen Zustand über. Er ist gekennzeichnet durch die Expression der antiinflammatorischen Zytokine IL-10, IL-4, IL-13 und TGF- β sowie einiger weiterer antiinflammatorischer Mediatoren [7, 59, 60]. Zusätzlich exprimiert der M2-Phänotyp neuroprotektive Faktoren, wie den insulinähnlichen Wachstumsfaktor (*insulin-like growth factor*, IGF)-1. Der „deaktivierte“ mikrogliale Phänotyp wird ebenfalls dem M2-Typ zugeordnet [60]. Bei dieser Einteilung handelt es sich jedoch um ein simplifiziertes Modell, da die Zellen sowohl Gene, die dem M1-Typ als auch solche, die dem M2-Typ zugeordnet werden, simultan exprimieren können [7].

Mikroglia erkennen eine große Anzahl diverser Moleküle, die zu einer Transformation in den klassisch aktivierten Phänotyp führen. All diesen Molekülen ist gemeinsam, dass sie eine Schädigung der strukturellen und funktionellen Integrität des ZNS anzeigen. So reagieren Mikroglia auf Moleküle, die physiologischerweise nicht im ZNS vorkommen (z. B. mikrobielle Strukturen oder Serumkomponenten), eine kritische Konzentration übersteigen

(z. B. pathologische Neurotransmitterkonzentrationen), einen spezifischen funktionellen Status darstellen (z. B. Immunglobulin-Antigen-Komplexe oder opsonierte Mikroorganismen) oder sich in einer abnormen Konfiguration präsentieren (z. B. β -Amyloid bei M. Alzheimer oder α -Synuclein beim M. Parkinson) [7, 49, 53]. Auch die Astrozyten können die Mikroglia durch Zytokinfreisetzung aktivieren [14, 61, 62].

Durch Stimulation mit den antiinflammatorischen Zytokinen IL-4, IL-13, TGF- β sowie geringen Konzentrationen an Interferon (IFN)- γ , freigesetzt durch umliegende Neurone, Astrozyten oder auch T-Helferzellen, werden die Mikroglia wieder in den neuroprotektiven M2-Typ versetzt, um die Immunreaktion aufzulösen und die Gewebereparatur einzuleiten [49, 53, 62].

In der Regel ist die mikrogliale Aktivität selbstlimitierend [6]. Sie sollte primär als Abwehrmechanismus angesehen werden sowie als Voraussetzung zur Gewebereparatur. Im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen liegt das Gleichgewicht jedoch auf Seite der klassisch aktivierten M1-Mikroglia mit der Folge der überwiegenden Produktion zellschädigender Substanzen [7, 60].

1.2.2.2 Astrozyten

Die sich aus dem Neuralrohr entwickelnden, sternförmig verzweigten Astrozyten bilden die Mehrheit der Gliazellen des ZNS. Mit ihren langen Zellfortsätzen durchsetzen sie jede Lücke zwischen den Perikarya, Axonen und Synapsen der Nervenzellen und bilden mittels *gap junctions* ein gekoppeltes „funktionelles Netzwerk“. Man unterscheidet die Zellen je nach Reichtum an Intermediärfilamenten in fibrilläre und protoplasmatische Astrozyten. Die fibrillären sind v. a. in der weißen Substanz des Gehirns zu finden, die protoplasmatischen in der grauen Substanz. Es sind vielfältige Funktionen der Zellen bekannt. Durch ihre zahlreichen Intermediärfilamente, die bis in die Zellfortsätze reichen, erhalten sie mechanische Stabilität und agieren als Stützzellen des ZNS. Ihre weitere Aufgabe besteht in der Aufrechterhaltung des zentralnervösen Mikromilieus. Sie nehmen Neurotransmitter auf und degradieren diese, konvertieren Nährstoffe und transportieren sie zu den Neuronen, kontrollieren die extrazelluläre Ionenzusammensetzung, metabolisieren neuronale Stoffwechselprodukte und schützen vor oxidativem Stress [7, 63]. Des Weiteren sind sie maßgeblich an der synaptischen Plastizität beteiligt [64]. Bei Verletzungen innerhalb des ZNS

prolifrieren die Zellen und bilden eine Glianarbe. Nicht zuletzt sind sie an der Steuerung der Immunreaktionen mitbeteiligt und sind sogar zur Antigenpräsentation fähig [63, 65]. So ist die zielgerichtete Bewegung der Mikroglia zu dem Ort einer Pathologie von Astrozyten abhängig [49].

Lange Zeit galten Astrozyten als die neuroprotektiven Zellen des ZNS, die Faktoren wie den Nervenwachstumsfaktor (*nerve growth factor*, NGF), den Wachstumsfaktor *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) und Neurotrophin (NT)-3 sowie antioxidative Enzyme exprimieren. Heute ist bekannt, dass sie im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen auch proinflammatorisch agieren [27, 65, 66]. Nach ihrer Aktivierung, z. B. durch IL-1 β oder TNF- α , können sie die gleichen proinflammatorischen Zytokine wie Mikroglia freisetzen und eine neuroinflammatorische Reaktion verstärken [67-71]. Über den Kolonie-stimulierenden Faktor (*colony stimulating factor*, CSF)-1 induzieren sie die Proliferation der Mikroglia [72]. Ob von Astrozyten auch oxidative Stressmechanismen ausgehen, ist umstritten. Einige Autoren beschreiben, dass Astrozyten nach Stimulation mit TNF- α und IL-1 β verstärkt induzierbare NO-Synthase (iNOS) und *neutrophil cytosolic factor* (Ncf) 1 exprimieren. Diese sind essentielle Enzyme für die Produktion von NO und ROS [14]. Durch eine chronische Expression von IL-6 durch Astrozyten verhindern sie sogar eigenständig die ihnen sonst zugeschriebene Neurogenese [66].

1.2.3 Mediatoren der Neuroinflammation

Die Neuroinflammation ist gekennzeichnet durch eine exzessive Produktion von verschiedenen proinflammatorischen Mediatoren, wie z. B. NO und den Zytokinen TNF- α , IL-6 und IL-1 β [6]. Diese werden im Folgenden kurz beschrieben:

(1) Stickstoffmonoxid und induzierbare NO-Synthase: NO ist ein flüchtiges Gas mit einer Halbwertszeit im Sekundenbereich, welches durch NO-Synthasen aus der Aminosäure L-Arginin u. a. durch Endothelzellen, Neurone, Astrozyten und Immunzellen, wie Makrophagen und Mikroglia, synthetisiert wird. Je nach Gewebe und Konzentration sind unterschiedliche Wirkungen von NO bekannt.

Im Bereich der Skelettmuskulatur sowie am Herzen kommt Stickstoffmonoxid v. a. eine vasodilatatorische Wirkung zu. Von Neuronen in geringer Konzentration sezerniert, wirkt es als Neurotransmitter durch rasche Diffusion auf größere Bereiche des ZNS. Des Weiteren

nimmt es Einfluss bei Differenzierungs- sowie Regenerationsprozessen von Neuronen nach einer ZNS-Schädigung [73]. Durch Makrophagen und Mikroglia in 1000fach höherer Konzentration und über einen längeren Zeitraum freigesetzt, dient NO als toxische Substanz der Immunabwehr [74]. Dabei führt NO zur Hemmung der mitochondrialen Atmungskette und somit durch Störung der Energieversorgung zum konsekutiven Zelltod [75]. Weiterhin reagiert NO mit Superoxidanionen (O_2^-), welche ebenfalls von Mikroglia nach ihrer Aktivierung freigesetzt werden, zu reaktiver Stickstoffspezies (*reactive nitrogen species*, RNS), wie dem toxischen Metaboliten Peroxinitrit ($ONOO^-$) [21].

Im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen führt die exzessive Freisetzung von NO gemeinsam mit ROS zu einem verheerenden Ungleichgewicht zwischen oxidativen Stressmechanismen und antioxidativen Prozessen („oxidative Stresshypothese“). Die Proteinnitrierung durch Peroxinitrit [76, 77] sowie die Oxidation von Proteinen, Lipiden und DNA durch ROS [78-80] sind wesentliche Mechanismen für die Zelldysfunktion und das neuronale Sterben beim M. Parkinson und M. Alzheimer [81, 82]. Folglich werden Antioxidantien und Moleküle, die die Bildung von NO und ROS unterbinden, als präventive Mechanismen der neuronalen Degeneration angesehen [83].

Im menschlichen Organismus sind drei verschiedene Hauptgruppen der NO-Synthasen bekannt: die konstitutiv exprimierte endotheliale NO-Synthase (eNOS) und neuronale NO-Synthase (nNOS) sowie die induzierbare NO-Synthase (iNOS). Die iNOS kommt vor allem in Mikroglia und Astrozyten vor. Ihre Aktivität ist im Gegensatz zu den anderen NO-Synthasen nicht regulierbar. Ihre Expression, die v. a. durch den Transkriptionsfaktor *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B) vermittelt wird, führt zu einer langanhaltend hohen Konzentration an NO [80, 84]. Studien zeigten eine erhöhte iNOS-Expression in aktivierten Mikroglia bei neurodegenerativen Erkrankungen, sodass dieses Enzym ein Schlüsselement der oxidativen Stressmechanismen im Rahmen der Neurodegeneration darstellt [85].

(2) Proinflammatorische Zytokine IL-6, IL-1 β und TNF- α : Dem Zytokin IL-6 kommen nicht nur vielfältige Funktionen im Rahmen von Entzündungsprozessen zu, es fungiert auch als Botenstoff in der Hämatopoese, dem Knochenstoffwechsel, dem endokrinen System und vielen weiteren Stoffwechselprozessen des menschlichen Organismus [86, 87]. Im ZNS wird IL-6 von Mikroglia, Astrozyten und Neuronen v. a. nach einem schädigenden Ereignis u. a.

durch NF- κ B vermittelt exprimiert [88]. Die Funktionen des Zytokins im ZNS sind dichotom: Neben der Regulation inflammatorischer Prozesse ist IL-6 ein essentielles Zytokin für regenerative Prozesse im ZNS [71, 89]. Die langanhaltend chronische Exposition mit dem Zytokin, wie sie im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen vorkommt, verhindert hingegen die Neurogenese [66].

IL-1 β ist ein Schlüsselmediator im Rahmen des inflammatorischen Geschehens und in erhöhter Konzentration beim M. Parkinson und M. Alzheimer nachweisbar [90, 91]. Es wird nach Induktion der Immunreaktion im ZNS v. a. durch Mikroglia und Astrozyten freigesetzt. Als zentrales proinflammatorisches Zytokin aktiviert IL-1 β u. a. über NF- κ B und die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade (MAPK) die Expression von iNOS, TNF- α , IL-6 und weiteren proinflammatorischen Mediatoren in Mikroglia und Astrozyten [88, 92-97]. Zusätzlich erhöht IL-1 β durch Aktivierung von Tyrosinkinase die NMDA-Rezeptor-Funktion in Neuronen und damit deren Vulnerabilität gegenüber der Glutamat-induzierten Exzitotoxizität [98]. In Neuronen-Gliazell-Kokulturen wurde über Aktivierung des IL-1-Rezeptors (IL-1R) I der Astrozyten direkt die Induktion der Caspase-abhängigen Apoptose von Neuronen nachgewiesen [97]. Weiterhin führt eine länger bestehende IL-1 β Expression im ZNS zu einer Permeabilitätssteigerung der Blut-Hirn-Schranke und durch Induktion der Expression von Adhäsionsmolekülen (interzelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM)-1, E-Selectin, P-Selectin) und Chemokinen (CCL2) in Endothelzellen zur Rekrutierung von Leukozyten [99, 100].

In geringer Konzentration und begrenzter Dauer freigesetzt, werden IL-1 β hingegen neuroprotektive Effekte zugeschrieben: Zum einen wird durch IL-1 β die Expression neurotropher Faktoren (z. B. NGF) in Astrozyten gefördert und zum anderen die Aktivität GABA-erger Neurone hochreguliert [96, 100].

Das Zytokin TNF- α hat vielfältige Funktionen im ZNS, die u. a. vom beteiligten TNF-Rezeptor und von der Dynamik der Freisetzung abhängig sind. Unter physiologischen Bedingungen fördert es die Neurogenese und Regeneration der Nervenzellen und reguliert die Homöostase der synaptischen Verbindungen („*synaptic scaling*“) [70, 101]. Gleichzeitig ist es als ein zentrales proinflammatorisches Zytokin an der Regulation inflammatorischer Prozesse im ZNS beteiligt. So führt TNF- α zur Proliferation und Migration von Immunzellen und kann andere Zellen in Apoptose versetzen. Im ZNS wird TNF- α , wie die zuvor beschriebenen

Zytokine, hauptsächlich von Mikroglia und Astrozyten freigesetzt [70]. Bei einer Vielzahl neurodegenerativer Erkrankungen finden sich erhöhte TNF- α -Spiegel im ZNS, die teilweise mit dem Krankheitsfortschreiten korrelieren [70, 90, 102]. Dabei ist neben der Förderung der Neuroinflammation auch ein direkt toxischer Effekt auf Neurone beschrieben [103, 104].

(3) Antiinflammatorisches Zytokin IL-10: Das Immunsystem hat viele regulatorische Mechanismen entwickelt, um einen Schutz vor einer potentiell toxischen Immunantwort in Abwesenheit einer Pathologie zu gewährleisten. Zu diesen Regulatoren gehört u. a. das antiinflammatorische und neuroprotektive Zytokin IL-10. Die Erhöhung der zerebralen IL-10-Konzentration stellt einen therapeutischen Ansatzpunkt dar, um einer Neurodegeneration entgegenzuwirken [105].

IL-10 wird im ZNS von Mikroglia, Astrozyten und Neuronen exprimiert [106, 107]. Es sind verschiedene Rezeptoren beschrieben, die die IL-10-Expression induzieren. In Mikroglia sind dies v. a. die TLRs. Diese führen zu einer Aktivierung von NF- κ B und der MAP-Kinasen, woraus neben der Expression proinflammatorischer Zytokine auch die Expression von IL-10 resultiert. Dabei wird die IL-10-Expression allein durch die p55-Untereinheit von NF- κ B induziert, während die Transkription der proinflammatorischen Zytokine durch die p65-Untereinheit vermittelt wird. Nach Aktivierung der IL-10-Rezeptoren führen diverse Proteine zu einer Inhibierung der p65-Untereinheit und Aktivierung der p55-Untereinheit mit der Folge der weiteren Expression von IL-10 bei reduzierter Expression der proinflammatorischen Zytokine [107, 108].

Neben den antiinflammatorischen Eigenschaften von IL-10 sind auch neuroprotektive Effekte beschrieben [109-111].

1.2.4 Neuroinflammation im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen

Als Ursache einer entgleisten Entzündungsreaktion werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Sie kann durch einen persistierenden Stimulus bedingt sein sowie durch das Versagen der Auflösung eines pathologischen Zustandes. Ein Beispiel für einen persistierenden Stimulus sind die fehlgefalteten A β -Aggregate beim M. Alzheimer, die vom Immunsystem als „fremd“ oder „gefährlich“ interpretiert werden [26, 112]. In der Folge werden Mikroglia aktiviert, die das ZNS mit proinflammatorischen Mediatoren überschwemmen, weitere Immunzellen anziehen und Astrozyten aktivieren [27]. Die Kombination

von TNF- α oder IL-1 β mit IFN- γ induziert die weitere Bildung von A β -Aggregaten, welche selbst neurotoxische Eigenschaften aufweisen und die Bildung von freien Radikalen induzieren [81, 113, 114]. Im klassisch aktivierten Phänotyp M1 ist es den Mikroglia nicht möglich die A β -Aggregate zu beseitigen [28, 60]. Es resultiert daraus eine sich selbst verstärkende Schleife, die bei anhaltender Inflammation die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke erhöht, mit der Folge des Verlustes des Immunprivilegs und der Migration peripherer Immunzellen [53, 100]. Die oben beschriebenen proinflammatorischen Mediatoren führen zur Ischämie, Demyelinisierung und letztendlich zum Zelltod der umgebenen Neurone [112]. Diese werden auch über direkte Zellkontakte mit den Mikroglia in Apoptose versetzt [115, 116].

Auch beim M. Parkinson zeigen sich abgelagerte Proteine als möglicher Auslöser der Neuroinflammation: das α -Synuclein der Lewy-Körperchen [7]. *Post-mortem* Untersuchungen der Gehirne von Patienten mit M. Parkinson zeigten eine Ansammlung reaktiver, humanes Leukozyten Antigen (HLA)-DR- und CD11b-exprimierender Mikroglia um die Lewy-Körperchen in der SNpc [117].

1.2.5 Das Altern als Risikofaktor neurodegenerativer Erkrankungen

Der größte Risikofaktor eine neurodegenerative Erkrankung zu entwickeln - dies gilt insbesondere für die Alzheimer-Demenz und den Morbus Parkinson - ist das hohe Lebensalter [33]. Als Ursache ist u. a. eine mit dem Altern einhergehende Verlagerung des immunologischen Gleichgewichts in Richtung Proinflammation beschrieben [27]. So ist im gealterten ZNS eine erhöhte Anzahl aktivierter, IL-1 β -exprimierender Mikroglia nachweisbar [118]. Die DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B ist im gealterten ZNS erhöht, während die Aktivität der antiinflammatorischen IL-10-, IL-4- und IL-13-vermittelten Signalwege reduziert ist [60, 119]. Die Folge ist eine verstärkte Expression proinflammatorischer Mediatoren wie IL-6 und TNF- α , die besonders in Kombination mit IFN- γ toxisch auf Neurone wirken. Zusätzlich beeinflussen diese die Metabolisierung von Proteinen, die in der Folge akkumulieren und die neuroinflammatorische Kaskade verstärken (z. B. A β -Aggregate) [27, 60]. Die Expression der antiinflammatorischer Zytokine, wie beispielsweise IL-10, ist herabgesetzt [60, 119]. Die gesteigerte mikrogliale Aktivität wird als Resultat einer lebenslangen Akkumulation proinflammatorischer Ereignisse gewertet [21].

Des Weiteren sind mit dem steigenden Alter zelluläre Änderungen im ZNS beschrieben, die denen der Parkinson- oder Alzheimer-Krankheit ähneln. Hierzu zählen u. a. Veränderungen des Ionen-Milieus sowie die verstärkte Expression von ROS mit der Folge erhöhten oxidativen Stresses [120, 121]. Gleichzeitig nehmen die antioxidativen Reserven der Neurone im höheren Alter ab [120]. Auch ein physiologischer Untergang dopaminerger Neurone in der SNpc von etwa 5 - 10 % pro Dekade ist beschrieben [122]. Diese Degeneration betrifft jedoch eine andere Lokalisation innerhalb SNpc, sodass keine typische Parkinson-Symptomatik entsteht [15, 122, 123].

Zusammenfassend steigt durch Alterungsprozesse die Empfänglichkeit des ZNS eine neurodegenerative Erkrankung zu entwickeln.

1.3 Honokiol

1.3.1 Herkunft und Anwendung

Die in dieser Arbeit untersuchte Substanz Honokiol (3',5-di-2-propenyl-1,1'-biphenyl-2,4'-diol, C₁₈H₁₈O₂) ist eine in der Natur vorkommende Phenolverbindung, welche erstmals 1972 von Fujita *et al.* aus der Rinde des Baumes *Magnolia obovata* Thunb isoliert wurde [124]. Honokiol wurde nach *Honoki*, dem japanischen Name der Magnolie, benannt [125].

Die Rinde des Baumes wird bereits seit einigen Jahrhunderten in der traditionellen chinesischen Medizin als Medikament „Karakoboku“ sowie in der japanischen traditionellen Medizin als Medikament „Wakoboku“ für die Behandlung einer Vielzahl von Erkrankungen verwendet, obwohl die eigentlichen bioaktiven Inhaltsstoffe erst in den letzten Jahren bekannt wurden [126]. In der traditionellen chinesischen Medizin findet die Rinde der *Magnolia obovata* sowie der *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils., welche ebenfalls in einer hohen Konzentration Honokiol enthält, Anwendung zur Behandlung von Fieber- und Kopfschmerzerkrankungen sowie thrombotischer Schlaganfälle [125, 127]. In der japanischen Medizin wird die Rinde der Magnolie - meist mit weiteren getrockneten Pflanzen zu einem Sud verarbeitet - vor allem zur Behandlung psychischer Erkrankungen, wie beispielsweise Angststörungen, Depressionen, Schlafstörungen und Neurosen, aber auch zur Behandlung gastrointestinaler Beschwerden eingesetzt. 1998 wurde Honokiol, neben seinem Isomer Magnolol, als hauptverantwortliches anxiolytisches Agens einer dieser Mixturen, der „Saiboku-to“, identifiziert [128]. Seitdem Honokiol als Inhaltsstoff der vielseitig eingesetzten

Magnolie identifiziert wurde, befassen sich Arbeitsgruppen aus verschiedenen medizinischen Fachgebieten mit den biologischen Eigenschaften und Wirkungen dieses pleiotropen Lignans [129].

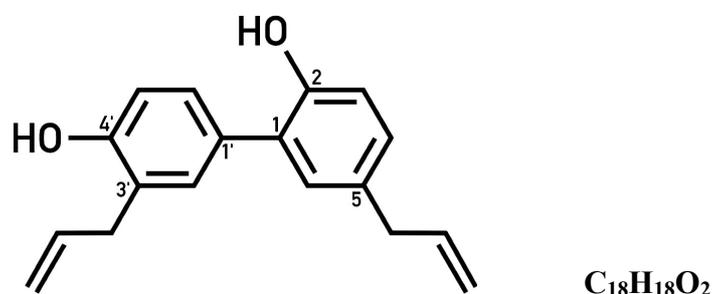


Abb. 2: Strukturformel von Honokiol. Die hydrophobe Substanz Honokiol besteht aus zwei Phenolringen. Sie weist strukturelle Ähnlichkeit mit dem Narkotikum Propofol auf [129]. Die Hydroxygruppe an Position 4' und die Allylgruppe an Position 5 seien essentiell für die neurotrophe Aktivität Honokiols [130].

1.3.2 Verfügbarkeit und Kinetik

Honokiol ist momentan als Supplement zur oralen Einnahme von diversen Anbietern frei erhältlich. Angeboten wird es u. a. als Magnolien-Extrakt in Form von Kapseln, Pulvern oder Tinkturen mit einem je nach Anbieter variablen Anteil an Honokiol. Das mit der höchsten Konzentration beworbene Supplement wird mit einem Anteil von 98 % angegeben. Ebenfalls erhältlich sind Magnolien-Tees und geschnittene Baumrinde zur eigenen Weiterverarbeitung. Zu beachten ist Honokiols starke Hydrophobie, sodass es in Fett gelöst werden sollte, um eine höhere orale Bioverfügbarkeit zu erzielen. Aktuelle Studien befassen sich mit der Möglichkeit, die orale Bioverfügbarkeit durch Liposomen- und Mizellen-Bildung oder durch die Herstellung von Nanosuspensionen zu erhöhen [131, 132].

Die Halbwertszeit von Honokiol im Plasma von Ratten nach intravenöser Applikation wurde je nach Arbeitsgruppe zwischen etwa 40 Minuten [133] und 50 Minuten [134] angegeben. Pharmakokinetische Studien zeigten nach intravenöser Gabe einen linearen Abbau Honokiols nach der Kinetik 1. Ordnung im Zwei-Kompartiment-Modell [134].

1.3.3 Honokiol überwindet die Blut-Hirn-Schranke

Therapeutische Optionen zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen sind stets durch die Blut-Hirn-Schranke limitiert. Lin *et al.* sowie Wang *et al.* haben nachgewiesen, dass

Honokiol das Potential aufweist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, ohne zu einer allgemeinen Permeabilitätserrhöhung der Barriere zu führen [133, 135]. *In-vivo* Versuche an Ratten zeigten nach intravenöser Gabe von 20 mg Honokiol pro kg Körpergewicht (KG) eine hohe Anflutung Honokiols im Rattenhirn. Das Permeabilitätsmaximum der Blut-Hirn-Schranke wurde nach 30 Minuten erreicht, woraufhin sich zunächst ein *steady-state* der Permeabilität einstellte. Dies lässt vermuten, dass Honokiol mit hoher Wahrscheinlichkeit aktiv über spezifische Transporter die Barriere überwindet, die nach 30 Minuten eine Substratsättigung erreichen. Auch nach 120 Minuten - dies entspricht etwa drei Halbwertszeiten Honokiols - konnte noch eine hohe Konzentration der Substanz im Rattenhirn nachgewiesen werden [133]. Somit weist Honokiol eine hohe Bioverfügbarkeit im ZNS auf. Dies ist die Grundvoraussetzung eines zentralwirksamen Therapeutikums zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen.

1.3.4 Neuroprotektive und neurotrophe Wirkung

In mehreren Arbeiten konnte eine neuroprotektive Wirkung für Honokiol nachgewiesen werden. *In-vitro* Versuche mit Neuronen, die einem Glukoseentzug ausgesetzt wurden, zeigten ein höheres Zellüberleben nach Stimulation mit Honokiol. Der gleiche Effekt wurde auf Neurone festgestellt, die der Exzitotoxizität durch Glutamat und NMDA oder der H₂O₂-induzierten Neurotoxizität ausgesetzt wurden [136]. Versuche mit exzitatorischen Aminosäuren zeigten eine hemmende Wirkung Honokiols auf den NMDA- sowie den Glutamat-induzierten Ca²⁺-Influx. Zusätzlich wird eine blockierende Wirkung auf die spannungsabhängigen Kalzium-Kanäle vermutet. Somit ist der neuroprotektive Effekt Honokiols u. a. auf die Reduktion der durch exzitatorische Aminosäuren bedingten Störung der Ionenhomöostase zurückzuführen [137]. Zusätzlich sind antioxidative Eigenschaften von Honokiol bekannt [136].

Neben der neuroprotektiven Wirkung konnte in der Zellkultur auch ein wachstumsfördernder Effekt des Lignans auf Neurone gezeigt werden. Nach Inkubation mit Honokiol zeigte sich eine signifikante Verlängerung der Neuriten sowie eine verstärkte Anfärbbarkeit der Somata im Vergleich zu unstimulierten primären Rattenneuronen. Dieser Effekt wurde dosisabhängig beschrieben und entspräche bei Stimulation mit 10 µM Honokiol der Stimulation mit dem Wachstumsfaktor *basic fibroblast growth factor* (bFGF) [40 ng/ml] [138].

Neurotrophe Faktoren wie bFGF sind aufgrund ihrer potenten Wirkung Bestandteil intensiver Forschung als mögliches Therapeutikum für eine Vielzahl neurologischer Erkrankungen. Da diese jedoch nicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, stehen sie derzeit noch nicht in medikamentöser Form zur Verfügung. Somit besteht großes Interesse, Moleküle mit neurotropher Wirkung zu finden, die die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, oder solcher, die die Freisetzung neurotropher Faktoren im ZNS fördern. Bei genauerer Untersuchung des neurotrophen Wirkungsmechanismus Honokiols wurde festgestellt, dass Honokiol in Neuronen über die Aktivierung von Phospholipase C eine Kaskade in Gang setzt, die letztendlich zu einer Phosphorylierung der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK) 1/2 führt. Diese wiederum induziert zum einen direkt das Neuronenwachstum, zum anderen werden dadurch neurotrophe Faktoren durch Neurone freigesetzt [139].

1.3.5 Antiinflammatorische Eigenschaften

In unterschiedlichen Studien wurde in den vergangenen Jahren eine mögliche antiinflammatorische Wirkung von Honokiol erforscht. LPS-aktivierte dendritische Zellen zeigten nach Stimulation mit Honokiol eine verminderte Expression von MHC-II-Molekülen sowie der Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6, während die Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 hochreguliert wurde [140]. In LPS-aktivierten Makrophagen wurde eine Reduktion der TNF- α -Expression sowie eine verminderte NO-Freisetzung nach Honokiol-Inkubation nachgewiesen. Dabei inhibiert Honokiol in den Immunzellen die LPS-induzierte Phosphorylierung der MAP-Kinasewege p38, Januskinase (JNK) 1/2 und ERK 1/2. Weiterhin wird in diesen Zellen die Phosphorylierung sowie Translokation von Proteinkinase C und die Aktivität von NF κ B gehemmt [141]. Neueste Studien an murinen (BV-2)- und Ratten- (HAPI) Mikrogliazelllinien zeigten eine Reduktion der IFN- γ -ERK1/2-vermittelten ROS-Produktion durch Honokiol [127]. In einem Sepsis-Modell an Mäusen wurden antioxidative Eigenschaften durch Honokiol *in-vivo* beschrieben [142].

An BV-2-Zellen konnte eine Reduktion der LPS-induzierten erhöhten Expression der proinflammatorischen Mediatoren iNOS, Cyclooxygenase (COX)-2, Monozytenchemotaktisches Protein (*Monocyte chemoattractant protein*, MCP)-1, IL-6 und TNF- α nachgewiesen werden [143]. Dabei ergaben sich Hinweise, dass diese über die Reduktion der

Transkriptionsfaktoren phosphoNF- κ B (pNF- κ B) und *Krüppel-like factor* (KLF)-4 vermittelt ist. KLF-4 ist ein Zink-Finger-Transkriptionsfaktor, der ebenso wie pNF- κ B in LPS-aktivierten Mikroglia verstärkt exprimiert wird und die Expression von TNF- α , IL-6, COX-2, MCP-1, iNOS, NO und ROS vermittelt. Der genaue Signaltransduktionsweg über KLF-4 ist bislang nicht verstanden. Es wird vermutet, dass KLF-4 ein Bindungspartner von pNF- κ B ist und nach dessen Aktivierung derselbe Signaltransduktionsweg initiiert wird. Eine Reduktion dieses Transkriptionsfaktors führt zu einer Minderung der Expression proinflammatorischer Mediatoren in Mikroglia [143, 144].

1.3.6 Weitere mögliche Indikationen für die Therapie mit Honokiol

Die Baumrinde der unterschiedlichen Magnolienarten wird in der traditionellen chinesischen und japanischen Medizin u. a. zur Behandlung von Angststörungen und Depressionen eingesetzt. 1998 wurde Honokiol als hauptverantwortliches Substrat der anxiolytischen Wirkung des Magnolienextrakts identifiziert [128, 145]. Schon 1983 wiesen Watanabe *et al.* eine langanhaltende zentral dämpfende Wirkung Honokiols nach, die sich sowohl muskelrelaxierend als auch sedierend an Ratten darstellte [146].

In neueren Studien stellte sich heraus, dass Honokiols anxiolytische Wirkung bereits bei einer 100-fach geringeren Konzentration einsetzt, als die von Watanabe *et al.* festgestellte zentral dämpfende Wirkung. Bereits eine Dosis von 0,2 bis 1,0 mg/kg KG Honokiol pro Tag über eine Zeitspanne von 7 Tagen erwies sich im *Elevated Plus-Maze*-Test als anxiolytisch nahezu gleich potent wie das Benzodiazepin Diazepam bei einer Dosisierung von 1 mg/kg KG. Bei dieser Konzentration ließen sich jedoch keine Benzodiazepin-typischen unerwünschten Nebenwirkungen wie Sedierung, Muskelrelaxation, Amnesie oder gar physische Abhängigkeit, feststellen [129, 147, 148]. Somit besteht das Interesse, Honokiol als Therapeutikum in der Anästhesie sowie für die Behandlung von Depressionen und Angststörungen v. a. älterer Patienten, bei denen die sedierende und muskelrelaxierende Nebenwirkung der Benzodiazepine mit einer hohen Komorbidität behaftet ist, einzusetzen [129].

Neben der anxiolytischen Eigenschaft Honokiols wurde *in-vivo* eine Erhöhung der NMDA-induzierten Krampfanfall-Reizschwelle durch Inhibition der Aktivität der NMDA-Rezeptoren

festgestellt, sodass weiter untersucht wird, ob Honokiol auch als Antikonvulsivum einsetzbar wäre [137].

Darüber hinaus ergeben sich Hinweise auf einen tumorlytischen Effekt durch Honokiol, besonders im Rahmen von Hirntumoren. Eine Intensivierung der konventionellen Chemotherapie zur Verbesserung des *Outcomes* der Patienten geht bekanntlich mit gravierenden Langzeitkomplikationen einher, wie beispielsweise Sensibilitätsstörungen, Hörverlust, kardiale Dysfunktion, Infertilität und Zweittumoren. Somit besteht das Bestreben, effektivere Chemotherapeutika bei geringerer Toxizität zu finden. *In-vitro* Versuche mit Neuroblastomzellen zeigten, dass diese nach Honokiol-Applikation durch verstärkte Expression des proapoptotischen Proteins Bax in Apoptose versetzt werden. Gleichzeitig zeigt Honokiol eine hohe Anflutung im ZNS, die die der Chemotherapeutika Cisplatin oder Placitaxel weit überschreitet. Weiterhin wird Honokiol nicht, bzw. zu weit geringerem Maße als Vincristin und Cyclosporin A, durch das P-Glykoprotein aus den Tumorzellen hinausgeschleust. Somit muss die Möglichkeit weiter erforscht werden, Honokiol additiv zu gängigen Chemotherapeutika einzusetzen [133, 135].

1.4 Fragestellung

In dieser Arbeit wird der Einfluss der Substanz Honokiol auf primäre Mikroglia und Astrozyten *in-vitro* als möglicher Immunmodulator untersucht.

Speziell sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Welche Konzentration Honokiols lässt sich einsetzen, ohne toxisch auf diese Zellen zu wirken?
- Lassen sich morphologische Veränderungen der Zellen nach Stimulation mit Honokiol feststellen?
- Hat Honokiol Einfluss auf die Expression proinflammatorischer und antiinflammatorischer Mediatoren in Mikroglia bzw. Astrozyten in Ruhe und nach Stimulation mit LPS?
- Lassen sich Signaltransduktionswege identifizieren, welche Honokiol beeinflusst?

Schließlich soll anhand dieser Ergebnisse und der aktuellen Literatur diskutiert werden, ob Honokiol als Therapeutikum bei neurodegenerativen Erkrankungen geeignet wäre.

2 Material

2.1 Geräte und Hilfsmittel

ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Waltham (USA)
ABI PRISM® 7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Waltham (USA)
Axiocam Fotokamera	Carl Zeiss, Jena
Binokular STEMI SV8	Carl Zeiss, Göttingen
Digitalkamera 429k	Herolab, Wiesloch
Elektrodenkammer	Bio-Rad, München
Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss, Jena
Fusion SL Vilber Lourmat	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Gefrier-/Kühlschrank	Privileg, Hamburg
Gefrierschrank (-70 °C)	Heraeus, Hanau
Gelkammer	Bio-Rad, München
GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer, Waltham (USA)
Inkubator Hera Cell 150	Heraeus, Hanau
Kühlschrank	Bosch, Gerlingen
Laborschüttler REAX 2000	Heidolph Instruments, Schwabach
Mikroskop Axioskop	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop Wilovert	Hund, Wetzlar
Mikrotiterplatten-Photometer SLT Reader 340 ATTC	SLA Laborinstrumente, Karlsheim
Neubauer Zählkammer (0,0025 mm ² Raster, Tiefe 0,1 mm)	Carl Roth, Karlsruhe
Photometer Ultrospec 3100 pro	Amersham Biosciences, Freiburg
Pipetten (1-1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (1-5 ml)	Carl-Roth, Karlsruhe

Pipetus® - Standard	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Plattenausleser GENios Basic	Tecan, Männedorf (Schweiz)
Präzisionswaage BP 610	Sartorius AG, Göttingen
Rotationsschüttler Typ R0 01	Gerhard, Bonn
Sicherheitswerkbank HERAsafe®	Heraeus, Hanau
Spectrophotometer U-2000	Hitachi, Krefeld
Spektroskop Epoch Multi Volume Spectrophotometer System	Biotek, Bad Friedrichshall
Stromquelle PowerPac 200	Bio-Rad, München
Take3 Multi-Volume Plate	Biotek, Bad Friedrichshall
Thermal Cycler GenAMP® PCR System 9700	Applied Biosystems, Waltham (USA)
Thermo-Block TDB-120	Biosan, Riga (Lettland)
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot Turbo	Bio-Rad, München
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia (USA)
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Osterode
Zentrifuge Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Centrifuge 5430	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Centrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Micro Centrifuge I R 220VAC	Carl Roth, Karlsruhe
Zentrifuge MiniSpin	Eppendorf, Hamburg

2.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser (ø 12 mm, ø 26 mm)	Carl Roth, Karlsruhe
ELISA 96-Mikrotiterplatte „Nunc MaxiSorp™“	Nunc GmbH, Wiesbaden
Gewebekulturschälchen (60 x 15 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Objektträger (26 x 76 mm)	Carl Roth, Karlsruhe

Pasteurpipetten	Eppendorf, Hamburg
PCR 96-Mikrotiterplatte Multiply® 96-well PCR microplate	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Eppendorf, Hamburg
PVDF-Membran Hybond-P	Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont (UK)
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml und 1,5 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Whatman-Pappe	GE Healthcare, Little Chalfont (UK)
Zellkulturflasche (25 cm ² , 75 cm ²)	Sarstedt, Nürnberg
Zellkulturplatten (6-, 12- und 24-Vertiefungen)	Sarstedt, Nürnberg
Zellschaber	Sarstedt, Nürnberg
Zentrifugenröhrchen (10 ml und 50 ml)	Sarstedt, Nürnberg

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid/Bisacrylamid (29 : 1)	Serva, Heidelberg
Ammoniumpersulfat (APS, 10 % (w/v))	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Amphotericin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Azeton	Carl Roth, Karlsruhe
Azetonnitril	Sigma-Aldrich, Hamburg
Bisbenzimid	Sigma-Aldrich, Hamburg
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Riedel-de Haen, Seelze
Chloroform	Sigma-Aldrich, Hamburg
Coomassie-Blau	Serva, Heidelberg
Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS; Ca ²⁺ und Mg ²⁺ frei)	PAN Biotech, Aidenbach
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Karlsruhe
Fluordesoxyuridin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Glutaraldehyd	Merck Schuchardt, Hohenbrunn
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Glykogen	Sigma-Aldrich, Hamburg
Griess-Reagenz	Sigma-Aldrich, Hamburg
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Biomol, Hamburg
Honokiol ($\geq 98\%$ (w/w) (HPLC), Pulver)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Horse Serum (HS)	Invitrogen, Karlsruhe
Immu-Mount Eindeckmedium	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaisers Glyceringelantine	Merck, Darmstadt
Kasein (Magermilchpulver)	Frema, Heimertingen
L-Glutamin	PAN Biotech, Aidenbach
Lipopolysaccharid (LPS) aus Salmonella typhimurium	Sigma-Aldrich, Hamburg
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
MTT-Pulver (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide 98% (w/w))	Sigma-Aldrich, Hamburg
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
Natrium-Pyrophosphat	Sigma-Aldrich, Hamburg
Natrium-Vanadat	Sigma-Aldrich, Hamburg
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumduodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natronlauge (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech, Aidenbach
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Quiazol Lysis Reagenz	Quiagen, Hilden
RNase-freies A. dest.	Anatomisches Institut, Kiel

Salzsäure (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄ , 2 N)	Carl Roth, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS-EDTA-Puffer	Amersham, Freiburg
TRIS-HCL	Carl Roth, Karlsruhe
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Hamburg
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Hamburg
Trypsin	Invitrogen, Darmstadt
Tween [®] 20	Carl Roth, Karlsruhe
β-Glycerol-phosphat	Sigma-Aldrich, Hamburg

2.4 Medien, Lösungen, Puffer, Enzyme, Sonden und Antikörper für die einzelnen Versuche

Zellisolierung und -kultivierung:

Mikroglia-Zellkulturmedium	500 ml DMEM [4,5 g Glukose/l]
	60 ml FKS (bei 44 - 53 °C für 30 Minuten im Wasserbad inaktiviert)
	6 ml Penicillin [10 000 U/ml] und Streptomycin [10 mg/ml] in DPBS
	5 ml L-Glutamin [200 mM]
Mikroglia-Stimulationsmedium	500 ml DMEM [4,5 g Glukose/l]
	60 ml FKS (bei 56 °C für 30 Minuten im Wasserbad inaktiviert)
	6 ml Penicillin [10 000 U/ml] und Streptomycin [10 mg/ml] in DPBS
	5 ml L-Glutamin [200 mM]

Astrozyten-Zellkulturmedium	500 ml DMEM [4,5 g Glukose/l]
	60 ml FKS (bei 56 °C für 30 Minuten im Wasserbad inaktiviert)
	6 ml Penicillin [10 000 U/ml] und Streptomycin [10 mg/ml] in PBS
	5 ml L-Glutamin [200 nM]
Dissoziationslösung	10 ml DMEM [4,5 g Glucose/l]
	24 mg HEPES
	20 mg Trypsin
	2 mg EDTA
	35 µM DNase [1 mg/ml]
Zellablöselösung	30 mg EDTA
	3 mg Trypsin
	25 ml DPBS
<u>MTT-Test:</u>	
MTT-Lösung	100 mg MTT-Pulver
	20 ml DPBS
Solubilisierungslösung	20 g SDS
	70 ml 50%ige (w/v) DMF-Lösung
	2,5 ml 80%ige (v/v) Essigsäure
	2,5 ml HCL [1 N]
<u>Coomassie-Blau-Färbung:</u>	
Coomassie-Blau-Farblösung	1 g Coomassie-Blau
	450 ml Methanol
	450 ml A. dest.
	100 ml Essigsäure

Coomassie-Entfärbelösung	450 ml	Methanol
	450 ml	A. dest.
	100 ml	Essigsäure

reverse Transkription:

RQ1 RNase-free DNase (1 u/μl)	Promega, Fitchburg (USA)
RQ1 DNase 10x Reaction Buffer	Promega, Fitchburg (USA)
RQ1 DNase Stop Solution	Promega, Fitchburg (USA)
Random Hexamer Primer (0,2 μg/μl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
5x Reaction Buffer für reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
dNTP-Mix (10 mM)	Bioline, Luckenwalde
RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (200 u/μl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

quantitative Real-Time PCR (qPCR) TaqMan®-Assay on Demand:

eukaryotische 18s-RNA, Hs99999901_s1	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
iNOS, Rn00561614_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
IL-6, Rn00561420_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
IL-1β, Rn00580432_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
TNF-α, Rn99999017_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
IL-10, Rn00563409_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Taqman®-Universal PCR Master-Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

ELISA:

BD OptEIA™ Rat IL-6 ELISA Set	BD Biosciences, Portland (USA)
BD OptEIA™ Rat TNF- α ELISA Set	BD Biosciences, Portland (USA)

Waschpuffer	80 g NaCl
	11,6 g Natriumhydrogenphosphat
	2 g Kaliumhydrogenphosphat
	2 g Kaliumchlorid
	ad 10,0 l A. dest.

Assay Diluent	DPBS + 10 % (v/v) FKS
---------------	-----------------------

Pierce™ TMB Substrat Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
--------------------------	--

Semiquantitative Analyse (Proteinisolierung, SDS-Page, Western Blot):

Lysispuffer zur Isolierung von Gesamtprotein	1 ml NaCl [1 M] in A. dest.
	1 ml TRIS [0,5 M] in A. dest. (pH: 7,5)
	0,1 ml EDTA [0,5 M] in A. dest.
	0,1 ml 1 % (v/v) Triton X-100
	0,02 ml Natrium-Vanadat [2 mM]
	0,25 ml Natrium-Pyrophosphat [2,5 mM]
	0,1 ml β -Glycerol-Phosphat [1 mM]
	0,1 ml Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) [1 mM] in Acetonitril
	ad 10 ml A. dest.
Gelpuffer I (pH: 8,8) für Trenngel	45,43 g TRIS HCL [1,5 M]
	1 g 0,4 % (w/v) SDS

	ad 250 ml A. dest.
Polyacrylamidtrenngel (10 %)	3,33 ml Acrylamid 2,6 ml Gelpuffer I 4,03 ml A. dest. 60 µl 10 % (w/v) APS 30 µl TEMED
Gelpuffer II (pH: 6,8) für Sammelgel	15,1 g TRIS HCL [0,5 M] 1 g 0,4 % (w/v) SDS ad 250 ml A. dest.
Sammelgel (4,5 %)	1,67 ml Acrylamid 2,6 ml Gelpuffer II 5,79 ml A. dest. 60 µl 10 % (w/v) APS 30 µl TEMED
Prestaines Protein Ladder (10-180 kDa)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Laufpuffer (pH: 8,2)	12,2 g TRIS 57,6 g Glycin 4 g SDS ad 4,0 l A. dest.
SDS - Probenpuffer (pH: 8,0)	0,23 g SDS 1,25 ml Gelpuffer II 1 ml Glycin 50 mM DTT ad 10 ml A. dest.

Transferpuffer (pH: 9,0)	7,5 g TRIS [25 mM] 36,03 g Glycin [192 mM] 250 ml 10 % (v/v) Methanol ad 2,5 l A. dest.
TRIS-gepufferte Saline Tween (TBS-T; pH: 7,5)	6,057 g TRIS 20,454 g NaCl 5 ml EDTA [0,5 M] 2,5 ml 0,1 % (v/v) Tween® 20 ad 2,5 l A. dest.
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
SuperSignal™ West Femto-Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Primärantikörper „Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/ Tyr204) (D13.14.4E) XP® Rabbit mAb“	Cell Signaling Technology, Denvers (USA)
Primärantikörper „Anti-MAP Kinase 2/Erk2 Antibody, clone 1B3B9, 0,48 mg/ml“	Merck, Darmstadt
Sekundärantikörper „goat anti-rabbit IgG- HRP: sc-2004, 200 µg/0,5 ml“	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA)
Sekundärantikörper „chicken anti-mouse IgG-HRP: sc-2962, 200 µg/0,5 ml“	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA)

Immunzytochemische Färbung:

Phosphatpuffer	1,66 g Natriumdihydrogenphosphat 11,2 g Dinatriumhydrogenphosphat ad 500 ml A. dest.
Bauer-Puffer	4,24 g NaCl 0,2 g KCl

	0,13 g CaCl ₂
	0,2 g MgCl ₂
	1,8 g Glucose
	2,38 g HEPES
	ad 500 ml A. dest, supplementiert mit 1 % (w/v) BSA + 1 % (v/v) HS
Zamboni-Fixierlösung	8 g Paraformaldehyd, bei 60 °C gelöst in
	35 ml gesättigter Pikrinsäure
	ad 165 ml Phosphatpuffer
BSA-Lösung	1 % (w/v) BSA in DPBS
Bisbenzimidlösung	10 % (w/v) Bisbenzimid in A. dest.
Primärantikörper anti-KLF4 (polyclonal antibody PAB 19194, 1 µg/ml)	Abnova, Taiwan (China)
Sekundärantikörper anti-rabbit Alexa Fluor A 31628 (200 µl)	Invitrogen, Carlsbad (USA)

2.5 Computersoftware

ABI Prism 7000 SDS	Applied Biosystems, Waltham (USA)
ABI Prism 7500 Software	Applied Biosystems, Waltham (USA)
Adobe Photoshop CC (14.0)	Adobe Systems Incorporated, San José (USA)
Axiovision 4.7	Carl Zeiss, Göttingen
Endnote x7	Thomson Reuters, New York City (USA)
FusionCapt Advance	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Gen5 Take3 Session	Biotek Instruments, Winooski (USA)
GraphPad Prism 7.0b	GraphPad Software, La Jolla (USA)
Pages 5.6.2	Apple Inc., Cupertino (USA)

3 Methoden

Zunächst wurden primäre Mikroglia und Astrozyten aus den Gehirnen postnataler Ratten isoliert und kultiviert. Daraufhin wurden Stimulationsversuche mit unterschiedlichen Konzentrationen von Honokiol und unterschiedlicher Stimulationsdauer durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend sowohl morphologisch als auch durch zell- und molekularbiologische Methoden untersucht.

3.1 Isolierung und Kultivierung primärer Mikroglia und Astrozyten

Die Isolierung der Mikroglia und Astrozyten wurde nach einer modifizierten Standardmethode von McCarthy und deVellis (1980) durchgeführt [149]. Die für diese Arbeit verwandten Zellen stammten aus den Gehirnen neugeborener Ratten (P0 - P3), welche aus dem Tierhaus der vorklinischen Institute der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel bezogen wurden. Im Verlauf der Arbeit an der Dissertation wurde die Tierzucht umgestellt, sodass die initialen Versuche mit Zellen des Stammes der Sprague Dawley Ratte durchgeführt wurden, während die Zellen der späteren Versuche aus dem Stamm der Wistar Ratte stammten.

Nach der Dekapitierung von 10-12 Tieren wurden die Gehirne aus der Schädelkalotte präpariert und anschließend in einer Petrischale mit Dulbecco's PBS (DPBS), supplementiert mit 1 % Penicillin/Streptomycin, gewaschen. Anschließend wurden die Meningen unter binokulärer Vergrößerung entfernt und die Großhirnkortizes und das *Mesencephalon* freipräpariert. 4-5 Kortexhälften und bis zu 6 *Mesencephali* wurden in separaten Kulturschälchen mit 3 ml DPBS gewaschen und mit einem Skalpell unter sterilen Bedingungen zerkleinert. Die Gewebestücke aus je einem Kulturschälchen wurden in 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt und in diesen durch zweimalige Inkubation im Wasserbad mit je 3 ml Dissoziationslösung und 35 µl DNase I bei 37 °C für je 30 Minuten enzymatisch dissoziiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und in jedes Röhrchen 2 ml FKS-haltiges Zellkulturmedium und 50 µl DNase I pipettiert. Durch das FKS wurde die Trypsinaktivität gestoppt. Die enzymatisch dissoziierten Zellen wurden anschließend mechanisch durch wiederholtes Resuspendieren durch feuerverengte Pasteurpipetten dissoziiert und vereinzelt.

Für die Kultivierung der Mikroglia wurden die Zellen aus je zwei Kortizes, aufgrund unterschiedlicher Wachstumseigenschaften getrennt von je zwei *Mesencephali*, in 75 cm²-Zellkulturflaschen in 10 ml Mikroglia-Zellkulturmedium ausgesät. Diese wurden im Anschluss für 8 bis 10 Tage im Inkubator bei 37 °C und 8,4 % CO₂ inkubiert. In dieser Wachstumsphase fand erstmals nach 24 Stunden, danach alle 48 Stunden, ein Mediumwechsel statt.

Etwa ab dem 10. Tag konnten die Zellen täglich geerntet werden: Durch Schütteln per Hand wurden die adhärenen Mikroglia vom Astrozytenrasen gelöst und flottierten frei im Zellkulturüberstand, welcher dann in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen dekantiert wurde. Dabei wurden die Zellen der *Mesencephali* mit den Zellen der Kortizes vereint. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände für 5 Minuten bei 4500 x g zentrifugiert, die Überstände verworfen und die Zellpellets in 100 µl Mikroglia-Zellkulturmedium resuspendiert. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden alle Zellsuspensionen vereinigt und 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau, welches avitale Zellen blau färbt, in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und anschließend 10 µl davon in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Unter einem Mikroskop wurden dann die vitalen, ungefärbten Zellen ausgezählt und die Gesamtzellzahl berechnet. Für die sich anschließenden Versuche wurden die Mikroglia in der gewünschten Dichte ausgesät.

Für die Kultivierung der Astrozyten wurden zwei dissoziierte Kortizes in drei 25 cm²-Zellkulturflaschen in 8 ml Astrozyten-Zellkulturmedium ausgesät. Anschließend wurden die Zellen im Inkubator bei 37 °C und 8,4 % CO₂ inkubiert, wobei bis zum 8. Kulturtag alle zwei Tage ein Mediumwechsel stattfand. Ab dem 8. Kulturtag wurde zu dem Medium 2,5 µg/ml Amphotericin pipettiert. Vom 9. auf den 10. Tag wurden die Zellkulturflaschen auf einem Rotationsschüttler außerhalb des Inkubators bei Raumtemperatur (RT) für 16 Stunden geschüttelt. Am 10. Kulturtag wurde zu dem Medium 10 µM Fluordesoxyuridin pipettiert um die Mikroglia in den Zellkulturen zu eliminieren. Anschließend wurden die Astrozyten für drei weitere Tage im Brutschrank bei 37 °C und 8,4 % CO₂ inkubiert.

Ab dem 14. Kulturtag konnten die Astrozyten geerntet werden. Dafür wurde zunächst das Zellkulturmedium abgesaut, die Zellen mit DPBS gespült und für 20 Sekunden mit 2 ml Ablöselösung versetzt. Nach dem Absaugen der Lösung folgte eine Inkubation für 2 - 3 Minuten bei 37 °C im Inkubator. Zum Stoppen des enzymatischen Ablösevorganges wurden

die Zellen mit 3 ml FKS-haltigem Astrozyten-Kulturmedium versetzt und anschließend mit einem sterilen Zellschaber vom Boden der Kulturflaschen mechanisch gelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension aus je drei Flaschen in eine Petrischale überführt und die Zellen durch mehrfaches Resuspendieren vereinzelt. Anschließend wurde die Petrischale für 10 Minuten bei 37 °C im Inkubator inkubiert. In dieser Zeit setzten sich die verbliebenen Mikroglia am Boden der Petrischale ab, sodass die nicht-adhärenzte Zellpopulation fast ausschließlich aus Astrozyten bestand. Das Medium mit den Astrozyten wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt und anschließend für 5 Minuten bei 700 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Astrozytenpellet in 2 ml Astrozyten-Kulturmedium resuspendiert. Dann wurden die vitalen Astrozyten in einer Neubauer-Zählkammer nach Färbung mit Trypanblau ausgezählt und in der gewünschten Zelldichte ausgesät.

3.2 Zellaussaat

Für die sich anschließenden Versuche wurden die Mikroglia und Astrozyten folgendermaßen ausgesät:

<u>MTT-Test:</u>	100.000 Mikroglia/Ansatz in 200 µl Medium in 96 Napf-Mikrotiterplatte; 10.000 Astrozyten/Ansatz in 200 µl Medium in 96 Napf-Mikrotiterplatte
<u>Coomassie-Blau-Färbung:</u>	100.000 Mikroglia/Ansatz auf Deckgläser in 1 ml Medium in 6 Napf-Zellkulturplatte; 50.000 Astrozyten/Ansatz auf Deckgläser in 1 ml Medium in 6 Napf-Zellkulturplatte
<u>qPCR, ELISA und Westernblot:</u>	1.000.000 Mikroglia/Ansatz in 12 Napf-Zellkulturplatte; 150.000 Astrozyten/Ansatz in 12 Napf-Zellkulturplatte

Immunfluoreszenz-Färbung: 100.000 Mikroglia/Ansatz auf Deckgläser in 1 ml
Medium in 6 Napf-Zellkulturplatte;
50.000 Astrozyten/Ansatz auf Deckgläser in 1 ml
Medium in 6 Napf-Zellkulturplatte

3.3 Stimulation

Nachdem die ausgesäten Mikroglia für 24 Stunden und die ausgesäten Astrozyten für 72 Stunden im Inkubator kultiviert wurden, wurden die Zellen für die Coomassie-Blau-Färbung, die indirekte NO-Messung und die Versuche mittels qPCR, ELISA und Westernblot folgendermaßen inkubiert:

<u>Mikroglia</u>	<u>Astrozyten</u>
1. Kontrolle: unstimuliert	1. Kontrolle: unstimuliert
2. LPS [5 ng/ml]	2. LPS [5 ng/ml]
3. Honokiol [10 µM]	3. Honokiol [25 µM]
4. Honokiol [10 µM] + LPS [5 ng/ml]	4. Honokiol [25 µM] + LPS [5 ng/ml]

Für den MTT-Test wurde eine Stimulationsreihe von 1 µM bis 50 µM Honokiol +/- LPS der Mikroglia und von 1 µM bis 100 µM Honokiol +/- LPS der Astrozyten angelegt.

Alle Versuchsansätze, die Honokiol enthielten, wurden mit dieser Substanz 30 Minuten vor der LPS-Stimulation vorinkubiert. Die Stimulation erfolgte im Inkubator bei 37°C und 8,4 % CO₂.

Für die jeweiligen Versuche wurden folgende Inkubationszeiten untersucht:

<u>MTT-Test:</u>	24 Stunden für Mikroglia und Astrozyten
<u>Coomassie-Blau-Färbung:</u>	24 Stunden für Mikroglia und Astrozyten
<u>indirekte NO-Messung im Zellkulturüberstand:</u>	24 Stunden für Mikroglia und Astrozyten

Quantifizierung der mRNA-Expression mittels qPCR:

24 Stunden für IL-6, IL-1 β und IL-10 in Mikroglia; 3 Stunden für TNF- α in Mikroglia;
3 Stunden für IL-6, IL-1 β , TNF- α in Astrozyten; 6 Stunden für IL-10 in Astrozyten

Quantifizierung der Proteinfreisetzung mittels ELISA:

24 Stunden für Mikroglia und Astrozyten

Analyse der ERK1/2-Phosphorylierung mittels Western Blot:

30 Minuten und 60 Minuten für Mikroglia und Astrozyten

3.4 MTT-Test

Um die Toxizitätsgrenze Honokiols zu ermitteln, wurde ein MTT-Test durchgeführt. Bei diesem Test wird das gelbliche, wasserlösliche Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetra-zoliumbromid (MTT) als Substrat den zu untersuchenden Zellen hinzugegeben, welches durch deren mitochondriale Dehydrogenasen (Succinat-Dehydrogenase) sowie durch die Reduktionsäquivalenten Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) und Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH), zu wasserunlöslichem, violetterem Formazan reduziert wird. Das Ausmaß des Farbumschlags korreliert mit der Zellzahl der Probe und ist ebenso von deren physiologischem Zustand abhängig [150]. Durch die photometrische Bestimmung des Farbumschlags ist somit eine Aussage über die Vitalität der Zellen und rückschließend über die toxische Wirkung Honokiols möglich.

Zunächst wurden die Zellen in einer 96 Napf-Mikrotiterplatte in einer Zellkonzentration von 100.000 Mikroglia bzw. 10.000 Astrozyten pro Vertiefung in 200 μ l Zellkulturmedium ausgesät und für 24 Stunden (Mikroglia) bzw. 72 Stunden (Astrozyten) im Inkubator bei 37 °C und 8,4 % CO₂ inkubiert. Danach wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen entsprechend dem Protokoll (Kap. 2.2.3) stimuliert.

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde der Zellüberstand gründlich abgesaugt und die Zellen dreimalig mit 200 μ l DPBS je Vertiefung gewaschen. Nach Absaugen des Puffers wurden die Zellen mit 100 μ l Mikroglia- bzw. Astrozyten-Zellkulturmedium sowie 25 μ l MTT-Lösung versetzt. Für den Leerwert wurde in drei Vertiefungen ohne Zellen die äquivalente Menge Zellkulturmedium und MTT-Lösung pipettiert. Nach einer zweistündigen

Inkubation bei 37 °C und 8,4 % CO₂ wurde je Vertiefung 100 µl Solubilisierungslösung hinzugegeben und erneut für zwei Stunden bei gleichen Bedingungen inkubiert, wodurch sich die gebildeten Formazan-Kristalle lösten. Im Anschluss wurde nach Durchmischung jedes Ansatzes mit einem Zellspatel die mitochondriale Reduktion der gelben, wasserlöslichen MTT-Lösung in bläuliches, wasserunlösliches Formazan bei 550nm photometrisch bestimmt. Der MTT-Test gab Rückschlüsse darüber, ab welcher Konzentration Honokiol zum Zelltod der Mikroglia und Astrozyten führt und mit welcher maximalen Konzentration an Honokiol die nachfolgenden Versuche durchgeführt werden konnten.

3.5 Untersuchung der Zellmorphologie mittels Coomassie-Blau-Färbung

Die Morphologie der Mikroglia und Astrozyten wurde getrennt voneinander mithilfe der Coomassie-Blau-Färbung unter dem Lichtmikroskop untersucht. Coomassie ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der sich unspezifisch an die basischen Seitenketten von Proteinen anlagert.

Zunächst wurden die Mikroglia und Astrozyten auf Deckgläser ausgesät und für 24 Stunden (Mikroglia) bzw. 72 Stunden (Astrozyten) im Inkubator bei 37 °C und 8,4 % CO₂ inkubiert und anschließend für 24 Stunden dem Protokoll entsprechend stimuliert (siehe 3.3). Nach anschließendem dreimaligen Waschen mit DPBS wurden die Zellen auf Deckgläsern zur Zellfixierung für 40 Minuten mit 30 µl 2,5%igem Glutaraldehyd inkubiert. Erneut wurden die Deckgläser dreimal mit DPBS gewaschen. Im Anschluss folgte eine Inkubation mit 1 ml der Färbelösung Coomassie-Blau bei RT. Nach 40 Minuten wurde die überschüssige Färbelösung entfernt und die Zellen mit 1 ml Entfärbelösung und anschließend dreimalig mit A. dest. gespült. Danach wurden die Deckgläser auf Objektträger mit Kaisers-Glyceringelantine eingedeckt und die Zellmorphologie unter dem Lichtmikroskop ausgewertet.

3.6 Zell- und molekularbiologische Methoden

Um eine mögliche immunmodulatorische Eigenschaft Honokiols auf Mikroglia und Astrozyten zu untersuchen, wurde zunächst die von den Zellen produzierte Stickstoffmonoxid-Menge im jeweiligen Zellkulturüberstand gemessen. Anschließend wurden sowohl die Mikroglia als auch die Astrozyten auf die Expression proinflammatorischer

Zytokine auf RNA- und auf Proteinebene untersucht. Im Anschluss folgte der Nachweis beteiligter Signaltransduktionswege mittels ELISA und Immunfluoreszenzfärbung.

3.6.1 Indirekte NO-Messung

Die Stickstoffmonoxid-Menge im Zellkulturüberstand dient als Indikator der Mikroglia-aktivierung. Da NO eine sehr kurze Halbwertszeit hat und sofort zu Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-) reagiert, erfolgte deren Messung indirekt mit dem Griess-Reagenz und anschließender photometrischer Auswertung [151].

100 μl des Kulturüberstands wurden mit 100 μl Griess-Reagenz in einer 96 Napf-Mikrotiterplatte vermischt und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Dabei reagierte das in den Stimulationsansätzen möglicherweise gebildete Nitrit zunächst mit Sulfanilamid, der ersten Komponente des Griess-Reagenz, zu einem Komplex. Dieser Komplex reagierte anschließend mit Naphtylethylendiamin, der zweiten Komponente des Griess-Reagenz, zu einem violetten Azofarbstoff [152].

Durch photometrische Messung des Farbumschlags bei einer Wellenlänge von 550 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm wurde die Nitrit-Menge ausgewertet.

3.6.2 Untersuchung auf RNA-Ebene

Für die Untersuchung einer möglichen immunmodulatorischen Aktivität Honokiols auf RNA-Ebene der Mikroglia und Astrozyten waren drei Arbeitsschritte erforderlich:

Zunächst erfolgte die RNA-Isolierung aus den stimulierten Zellen. Anschließend wurde die gesamte RNA in komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) umgeschrieben. Im letzten Schritt wurde diese mithilfe der quantitativen *real-time* PCR (qPCR) gezielt untersucht.

3.6.2.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wurde mithilfe der Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion (*single-step* Methode) nach Chomczynski und Sacchi (1987) in leicht abgewandelter Form durchgeführt [153]. Diese Methode basiert auf den unterschiedlichen

Löslichkeiten der Zellbestandteile und besteht aus den drei Schritten: Extraktion, Präzipitation und Waschung.

Für die Extraktion wurden zu den stimulierten Zellen in den Vertiefungen der Zellkultur-Napf-Platten, nachdem der Überstand der Versuchsansätze verworfen und die Zellen zweimalig mit DPBS gewaschen wurden, 1 ml Quiazol-Reagenz je Napf pipettiert. Quiazol besteht aus dem chaotropen Salz Guanidiniumthiocyanat und in reinem Wasser gelöstem Phenol (pH-Wert: 4,8). Das chaotrope Salz bewirkt eine Denaturierung aller Proteine, sodass die Zellen effektiv lysiert und gleichzeitig vorhandene RNAsen inaktiviert werden. Dadurch wird die zu extrahierende RNA für den weiteren Verlauf vor einem Abbau bewahrt. Phenol bildet als Detergens eine organische Phase mit den in der Lösung befindlichen Proteinen. Da das Phenol in reinem Wasser gelöst ist und sich somit im sauren pH-Bereich (pH: 4,8) befindet, reichert sich die DNA in dieser organischen Phase an, sodass ein wässriges RNA-Isolat entsteht. Nach der Zugabe von Quiazol-Reagenz, wurden die lysierten Zellen mitsamt ihrem Zellinhalt vom Boden jedes Wells mittels eines Zellschabers gelöst und in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt.

Für eine eindeutigere Phasentrennung wurden je 200 µl Chloroform hinzupipettiert, die Eppendorfgefäße per Hand geschüttelt, für 3 Minuten bei RT inkubiert und anschließend für 15 Minuten bei 12 000 x g und 6 °C zentrifugiert. Dadurch wurden drei deutliche Phasen in den Eppendorf-Gefäßen sichtbar: eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase (enthielt DNA, Proteine, Lipide), eine mittlere Interphase (DNA, Proteine) und eine obere, farblose, wässrige Phase mit der gewünschten RNA sowie Kohlenhydraten. Anschließend wurde die obere wässrige Phase mit der zu extrahierenden RNA vorsichtig in ein neues Eppendorf-Gefäß abpipettiert. Für die Präzipitation wurde als Fällungshilfe 1 µl Glykogen (70 mg/ml) hinzugegeben. Anschließend wurde die Emulsion mit 500 µl Isopropylalkohol durchmischt. Nach anschließender 10-minütiger Inkubation bei RT und 10-minütiger Zentrifugation bei 12 000 x g und 6 °C legte sich die RNA als gelartiges Pellet am Boden des Eppendorf-Gefäßes nieder. Als Reinigungsschritt wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml Ethanol (75 %) versetzt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 7 500 x g und 6 °C war die RNA als weißes Pellet am Boden des Eppendorf-Gefäßes deutlich sichtbar. Der Überstand wurde verworfen, das RNA-Pellet luftgetrocknet und anschließend in 20 µl RNase-freiem

A. dest gelöst. Dafür wurde es bei 57 °C für 10 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde die RNA-Lösung bei -70 °C gelagert.

3.6.2.2 Messung des RNA-Gehalts

Damit die Real-Time PCR-Ergebnisse der einzelnen Proben quantitativ miteinander vergleichbar sind, musste von allen Proben die exakt selbe Menge an cDNA erstellt werden. Dafür war die Kenntnis über den RNA-Gehalt in der 20 µl Lösung erforderlich. Das Messen der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch mithilfe dem Spektroskop „Epoch Multi Volume Spectrophotometer System“, der „Take3 Multi-Volume Plate“ und der Software „Gen5 Take3 Session“ bei 260 nm für RNA und einer Referenzwellenlänge von 280 nm für DNA. Aus dem Quotienten der gemessenen Werte bei 260 nm und 280 nm wurde der Wert für die Reinheit der RNA ermittelt. Es wurden nur RNA-Proben verwendet, deren Reinheit bei 1,7 - 2,0 lag.

3.6.2.3 Reverse Transkription

Im Anschluss an die RNA-Isolierung erfolgte die Reverse Transkription - das Umschreiben der RNA in cDNA. Dieser Schritt war erforderlich, um in der anschließenden qPCR die Nukleinsäuren amplifizieren zu können. Des Weiteren kann die cDNA nicht durch ubiquitär vorkommende RNAsen abgebaut werden. Sie ist somit umweltstabiler und folglich besser lagerbar als die RNA-Proben.

Vor der Reversen Transkription erfolgte der Abbau möglicher genomischer DNA in den Proben, um einen möglichst hohen Reinheitsgrad isolierter RNA zu erhalten. Dafür wurde 1 µg RNA jeder Probe in 8 µl Reinstwasser gelöst und mit 1 µl RNase-freiem DNase Puffer und 1 µl RNase-freier DNase vermischt und für 15 Minuten bei 37 °C im Thermocycler inkubiert. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt und für die weitere Arbeit auf Eis gestellt. Der DNA-Abbau wurde durch die Zugabe von 1 µl Stopplösung (EDTA 25 mM) je Probe bei einer Inkubation von 10 Minuten bei 65 °C gestoppt. Im Anschluss folgte die reverse Transkription: Zunächst wurde zu jeder Probe 1 µl Random Hexamer Primer, ein Primer-Mix bestehend aus jeweils sechs zufällig zusammengesetzten Nukleotiden, hinzugegeben. Bei einer Inkubation von 5 Minuten und 70 °C lagerten sich diese an die RNA-Moleküle komplementär an und dienten im späteren

Schritt als Startstellen für die Reverse Transkriptase („Primerhybridisierung“, „*primer annealing*“). Anschließend wurde zu jeder Probe ein Mix aus 4 µl 5x Reaktionspuffer, 2 µl dNTP-Mix (10 mM) und 1 µl A. dest. hinzupipettiert und diese für 5 Minuten bei 25 °C inkubiert. Zuletzt wurde jede Probe mit 1 µl reverser Transkriptase versetzt und durch folgendes Inkubationsprogramm im Thermocycler die cDNA synthetisiert, welche bei -20°C für ca. 6 Monate lagerungsfähig war:

10 Minuten bei 25°C (Primerhybridisierung),

60 Minuten bei 42°C (Reverse Transkription),

10 Minuten bei 70°C (Enzyminaktivierung)

3.6.2.4 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Mithilfe der qPCR wurden die gesuchten Genabschnitte der cDNA quantifiziert (iNOS, IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-10). Das Verfahren basiert auf der Amplifikation der gesuchten Sequenzen mithilfe der Taq-Polymerase im Thermocycler und einem nach jedem Zyklus detektierbaren Fluoreszenzsignal, welches mit der Anzahl an DNA-Amplifikaten korreliert. Das Fluoreszenzsignal entsteht durch spezifische TaqMan®-Sonden, welche als zur gesuchten Sequenz komplementären Oligonukleotide mit dieser hybridisieren. Am 5'-Ende der Sonde befindet sich ein FAM-Reporterelement und am 3'-Ende ein TAMRA-Löscherelement. Nach Trennung des Reporterelements vom Löscherelement durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase während der Elongationsphase der qPCR, gibt das Reporterelement auf Anregung ein Fluoreszenzsignal ab. Anhand der Zellzykluszahl, in der sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Störsignal abhebt (C_T -Wert) im Vergleich mit dem C_T -Werts eines mitgeführten Standards (*House-Keeping* Gen 18s rRna) wurde der gesuchte Genabschnitt nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode quantifiziert.

Der Reaktionsansatz bestand aus 4 µl der 1 : 20 in RNase-freiem A. dest. verdünnten cDNA, 1 µl TaqMan® Assay on Demand (Primer und Sonden spezifisch für das jeweils gesuchte Gen), 10 µl Taqman®-Universal PCR Mastermix und 5 µl RNase-freiem A. dest. Insgesamt wurden 40 Zyklen der qPCR mit dem ABI PRISM® 7500 Fast Real-Time PCR System mit folgendem Programm durchgeführt:

1. Denaturierung bei 94 °C für 15 Sekunden
2. Hybridisierung bei 60 °C für 60 Sekunden

3. Elongation bei 72 °C für 45 Sekunden

Nach dem letzten Zyklus erfolgte eine zehnminütige Polymerisationsphase bei 72 °C.

3.6.3 Untersuchungen auf Proteinebene

3.6.3.1 ELISA

Der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest (*Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay*, ELISA) ist ein antikörperbasiertes Detektionsverfahren, welches in dieser Arbeit für die Quantifizierung der Zytokine IL-6 und TNF- α im Zellkulturüberstand der Mikroglia und Astrozyten Anwendung fand. Es wurden die BD OptEIA™ ELISA Kits der Firma BD Biosciences nach Herstellerangaben verwendet.

Zunächst wurde eine 96 Napf-Mikrotiterplatte mit 100 μ l eines Fangantikörpers (anti-IL-6 bzw. anti-TNF- α) je Vertiefung über Nacht bei 4 °C beschichtet. Der Antikörper wurde zuvor in einem Verhältnis von 1 : 250 in DPBS verdünnt. Am Folgetag wurden die nichtgebundenen, überschüssigen Antikörper durch fünfmaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt und die verbliebenen freien Bindungsstellen des Trägermaterials mit 200 μ l Assay Diluent durch einstündige Inkubation bei RT geblockt. Im Anschluss erfolgte ein erneuter fünfmaliger Waschschrift. Danach wurden die zu analysierenden Zellkulturüberstände mit DPBS verdünnt (Proben mit LPS 1 : 50, Proben ohne LPS 1 : 2) und davon jeweils 100 μ l in Dreifachansätzen in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Zusätzlich wurde eine Standard-Konzentrationsreihe für das jeweilige Zytokin mitgeführt. Dieser Ansatz wurde für zwei Stunden bei 36 °C (IL-6) bzw. RT (TNF- α) zwecks Bindung des nachzuweisenden Proteins an den Fangantikörper inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift zur Entfernung nicht-gebundener Antikörper wurde ein sekundärer Biotin-konjugierter Detektionsantikörper (1 : 250 in DPBS) hinzugegeben und für eine Stunde bei 36 °C (IL-6) bzw. RT (TNF- α) inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschschrift zur Entfernung überschüssiger Detektionsantikörper. Daraufhin wurde in jede Vertiefung 100 μ l Enzymreagenz (Streptavidin-HRP-Konjugat, SAV-HRP, 1 : 250 in Assay Diluent) pipettiert und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Streptavidin weist eine sehr hohe Affinität zu Biotin auf und bindet somit an den sekundären Antikörper. Nach einem erneuten Waschschrift wurden 100 μ l TMB Substrat hinzupipettiert, welches katalysiert durch HRP (*horseradish peroxidase*, Meerrettichperoxidase) zu einem blauen Farbstoff oxidiert wird. Nach 20 Minuten wurde die

Oxidation durch Zugabe von 50 µl Schwefelsäure (2 N) beendet. Ausgewertet wurde der ELISA mit einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 450 nm bei einer Referenzwellenlänge von 570 nm.

3.6.3.2 Western Blot

Die Expression proinflammatorischer Mediatoren wird u. a. über die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade (MAPK) der extrazellulär-regulierten Kinasen (ERK)1/2 vermittelt. Ein möglicher Einfluss auf ERK1/2 durch Honokiol wurde mittels Western Blot untersucht.

Dafür wurden die Zellen zunächst lysiert und das gewonnene Proteingemisch mithilfe einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-Page) auf Grundlage der unterschiedlichen Molekülgrößen der vorliegenden Proteine in Banden aufgetrennt. Durch das negativ geladene SDS wurde die Eigenladung der Proteinmoleküle maskiert, sodass die Moleküle nach ihrem Molekulargewicht in unterschiedlicher Geschwindigkeit im elektrischen Feld wanderten. Anschließend wurden die Proteinbanden mittels Western Blot auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) transferiert, auf welcher die Immundetektion stattfand. Mithilfe eines spezifischen Primärantikörpers und eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers konnten die gesuchten Proteine nach Zugabe von Luminol, welches durch HRP oxidiert wurde, über die entstehende Lumineszenz nachgewiesen werden.

(1) Proteinisolierung: Nach der Stimulation der Zellen wurde das Medium entfernt und die Zellen zweifach mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl Lysispuffer versetzt und nach kurzer Einwirkzeit mit einem sterilen Zellschaber vom Boden der Zellkulturplatte mechanisch abgetragen. Das Lysat (Gesamtprotein) jeder Probe wurde zur Dissoziation mehrfach resuspendiert und anschließend in jeweils ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

(2) Proteinquantifizierung: Die Proteinquantifizierung erfolgte mithilfe des BCATM Kits in doppelter Bestimmung. Zunächst wurden jeweils 10 µl Probe in die Vertiefungen einer 96 Napf-Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurde zu jeder Probe 200 µl Arbeitsreagenz des BCATM Kits hinzugegeben, bestehend aus 50 Volumenanteilen des Reagenzes A und einem Volumenanteil des Reagenzes B. Daraufhin wurde die Extinktion bei 540 nm im

GENios Tecan photometrisch gemessen. Anhand eines mitgeführten Protein-Standards von 25 bis 2000 $\mu\text{g/ml}$ wurde die Proteinkonzentration jeder Probe ermittelt.

(3) SDS-Page: Für die SDS-Page wurde ein 10%iges Polyacrylamidtrenngel zwischen zwei senkrecht stehenden Glasplatten gegossen und mit Propanol überschichtet. Sobald sich dieses verfestigt hatte, wurde das Propanol abgesaugt und über das Trenngel ein 4,5%iges Sammelgel gegossen. Mithilfe eines eingesetzten Taschenkamms wurden Aussparungen im Sammelgel erstellt, in welche später die Proteinproben pipettiert wurden. Nach etwa 15 Minuten hatte sich das Sammelgel verfestigt und der Taschenkamm konnte entfernt werden.

Die zu untersuchenden Proteinproben wurden in einer Konzentration von 5 μg in 20 μl SDS verdünnt und für 5 Minuten bei 99 °C im Thermoblock denaturiert. Daraufhin wurden die Proben in die Aussparungen des Sammelgels pipettiert. Zusätzlich wurden 5 μl eines Protein-Standards (*Ladder*), der 10 Proteine mit bekanntem Molekulargewicht enthielt, in eine Aussparung gegeben. Anschließend wurden immer zwei Gele in eine Laufkammer eingespannt, welche sodann mit Laufpuffer aufgefüllt wurde. In die innere Kammer wurden zusätzlich 10 μl Bromphenolblau gegeben, um die Lauflinie sichtbar zu machen. Anschließend wurde eine Stromquelle mit einer Spannung von 200 V und einer Stromstärke von 340 mA angelegt, bis der Bromphenolblau-Lauffrontanzeiger nach ca. 45 Minuten das untere Ende der Kammer erreicht hatte.

(4) Proteintransfer (Blotting): Anschließend folgte die Übertragung der nach Größe aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran. Diese Membran, in Größe des Trenngels geschnitten, wurde durch einminütiges Einweichen in Methanol aktiviert, anschließend mit A. dest. gewaschen und für 15 Minuten in einen Transferpuffer gelegt. Zusätzlich wurden vier Whatman-Pappen mit Transferpuffer getränkt und die An- und Kathodenplatte mit demselben Puffer befeuchtet. Für das senkrechte Blotten wurden zwei der getränkten Whatman-Pappen auf die Kathodenplatte gelegt und eventuell vorhandene Luftblasen ausgestrichen. Auf die zwei Pappen wurde die PVDF-Membran und obenauf das Polyacrylamidgel aus der SDS-Page platziert. Auf das Gel wurden die übrigen zwei Whatman-Pappen positioniert. Das System wurde durch das Anbringen der Anodenplatte oberhalb der zwei Pappen abgeschlossen.

Durch das Anbringen einer senkrechten Spannung von 25 V bei einer Stromstärke von 340 mA für eine Dauer von 30 Minuten wurden die Proteine senkrecht der Verlaufsrichtung

der zuvor durchgeführten SDS-Page auf die PVDF-Membran übertragen und blieben dort durch hydrophobe Wechselwirkungen haften.

(5) Immundetektion: Die Detektion gesuchter Proteine auf der Membran erfolgte mittels spezifischer Primärantikörper und HRP-gekoppelter Sekundärantikörper durch die nach Zugabe einer HRP-Substratlösung entstehenden Chemilumineszenz.

Zunächst wurden dafür die freien Bindungsstellen der PVDF-Membran durch einstündige Inkubation in 5%iger (w/v) Magermilch unter ständiger leichter Kreisbewegung geblockt. Nach dreimaligem Spülen mit DPBS und anschließendem Waschen mit TBS-T wurde die Membran mit 5 ml der Primärantikörperlösung (rabbit anti-rat Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) in einer Verdünnung von 1 : 1 000 in TBS-T) in einem 50 ml Röhrchen bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach anschließendem dreimaligen Waschen mit TBS-T für je 15 Minuten unter ständiger Kreisbewegung auf dem Rotationsschüttler, wurde auf die Membran ein HRP-konjugierter Sekundärantikörper (goat anti-rabbit IgG-HRP in einer Verdünnung von 1 : 20 000 in TBS-T) pipettiert und für eine Stunde auf dem Rotationsschüttler bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimalig für je 15 Minuten unter ständiger Kreisbewegung mit TBS-T gespült. Das Visualisieren der Proteinbanden erfolgte mithilfe des SuperSignal™ West Femto-Substrat-Kits nach Herstellerangaben. Dazu wurde die Membran für eine Minute bei RT mit 300 µl der angesetzten Substratlösung inkubiert. Bei der dadurch ablaufenden Enzym-Substrat-Reaktion katalysierte das HRP die Oxidierung von Luminol und Chemilumineszenz wurde frei, die anschließend gemessen wurde. Dafür wurde die Membran in eine dünne Klarsichtfolie gegeben und mit dem Chemifluoreszenzdetektor Fusion SL Vilber Lourmat und der Software FusionCapt Advance die visualisierten Proteinbanden quantitativ ausgewertet.

(6) Stripping: Durch das „Strippen“ („Abziehen“) der auf der Membran gebundenen Antikörper kann dieselbe Membran zur Immundetektion eines weiteren Proteins genutzt werden.

Nachdem das Protein pERK1/2 auf der Membran detektiert und quantitativ ausgewertet wurde, wurde die Membran zur Ablösung der gebundenen Antikörper für 15 Minuten bei RT auf dem Rotationsschüttler mit 0,2 M NaOH inkubiert und anschließend mit TBS-T gespült. Danach wurden 5 ml der Primärantikörperlösung (mouse anti-rat anti-MAP Kinase 2/Erk2 antibody in einer Verdünnung von 1 : 500 in TBS-T) auf die Membran pipettiert und diese in

einem 50 ml Röhrchen bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach einem dreimaligen Waschschrift mit TBS-T für je 15 Minuten unter ständiger Kreiselbewegung auf dem Rotationsschüttler wurde der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper (chicken anti-mouse IgG-HRP in einer Verdünnung von 1 : 5 000 in TBS-T) auf die Membran pipettiert und nach einer Inkubation von einer Stunde auf dem Rotationsschüttler bei RT analog zum oben beschriebenen Ablauf weiter verfahren.

3.7 Immunfluoreszenzfärbung des Transkriptionsfaktors KLF-4

Es ist bekannt, dass Mikroglia den Transkriptionsfaktor KLF-4 exprimieren, welcher eine wesentliche Rolle bei entzündlichen Prozessen spielt, während seine Expression und Funktion in Astrozyten nur wenig erforscht ist.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob KLF-4 in primären Astrozyten und Mikroglia mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden kann.

Zunächst wurden die Mikroglia und Astrozyten auf Deckgläsern ausgesät und für 24 Stunden (Mikroglia) bzw. 72 Stunden (Astrozyten) im Inkubator bei 37 °C und 8,4 % CO₂ inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen über eine Zeitdauer von 50 Minuten schrittweise auf 4 °C heruntergekühlt. Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Zunächst wurde der Zellkulturüberstand entfernt und die Zellen zweimalig mit modifiziertem „Bauer-Puffer“ [154] gespült. Danach wurden die Zellen für 60 Minuten bei RT mit 100 µl des 1 : 100 in DMEM (supplementiert mit 4 % Pferdeserum HS) verdünnten Primärantikörpers anti-KLF-4 (1 µg/ml) bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimalig mit Bauer-Puffer gespült und für 60 Minuten bei 4 °C mit 100 µl des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers anti-rabbit Alexa Fluor A 31628 (1 : 700) bei RT im Dunkeln inkubiert. Daraufhin wurde der Überstand entfernt und die Zellen für 30 Minuten in Zamboni-Fixierlösung bei 4 °C fixiert. Nach erneutem, zweimaligem Waschen mit Bauer-Puffer wurden die Zellkerne durch eine dreiminütige Inkubation mit je 100 µl Bisbenzimidlösung gefärbt. Bisbenzimid ist ein blau fluoreszierender Farbstoff, der sich selektiv durch Interkalation an die DNA anlagert. Danach wurde das Bisbenzimid abpipettiert und die Zellen zweimal mit DPBS und anschließend mit A. dest. gewaschen, bevor die Zellen auf den Deckgläsern auf Objektträger mit dem Eindeckmedium Immu-Mount eingedeckt wurden. Nach einer Trocknungszeit von mindestens 6 Stunden, wurden die Zellen unter dem

Fluoreszenzmikroskop betrachtet und die Färbung mit dem Programm Axiovision ausgewertet.

3.8 Statistik

Die Berechnungen der Ergebnisse in dieser Arbeit sowie deren graphische Darstellung wurden mit dem Programm GraphPad Prism erstellt (Version 7.0b). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM (Standardabweichung des Mittelwerts) dargestellt. Für die statistische Auswertung wurden Varianzanalysen (ANOVA) angewendet mit anschließender Bonferroni-Testung. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt ($\alpha < 0,05$). Alle Experimente wurden mit mindestens drei Wiederholungen durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von Honokiol auf das Überleben der Mikroglia und Astrozyten

Zunächst wurde ein möglicher Einfluss von Honokiol auf das Zellüberleben der Mikroglia und Astrozyten mittels MTT-Test untersucht. Bei diesem Test korreliert eine Reduktion der Substanz MTT mit der Anzahl vitaler Zellen.

Eingesetzt wurden für Mikroglia die Honokiol-Konzentrationen 1 μM , 10 μM , 25 μM und 50 μM allein sowie in Kombination mit 5 ng/ml LPS. Für Astrozyten wurde zusätzlich die Honokiol-Konzentration 100 μM untersucht. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden. Als Kontrolle diente eine Probe mit unstimulierten Zellen, deren Zellüberlebensrate als 100 % definiert wurde.

Die Ergebnisse des MTT-Tests an Mikroglia sind in der Abb. 3.1 grafisch dargestellt.

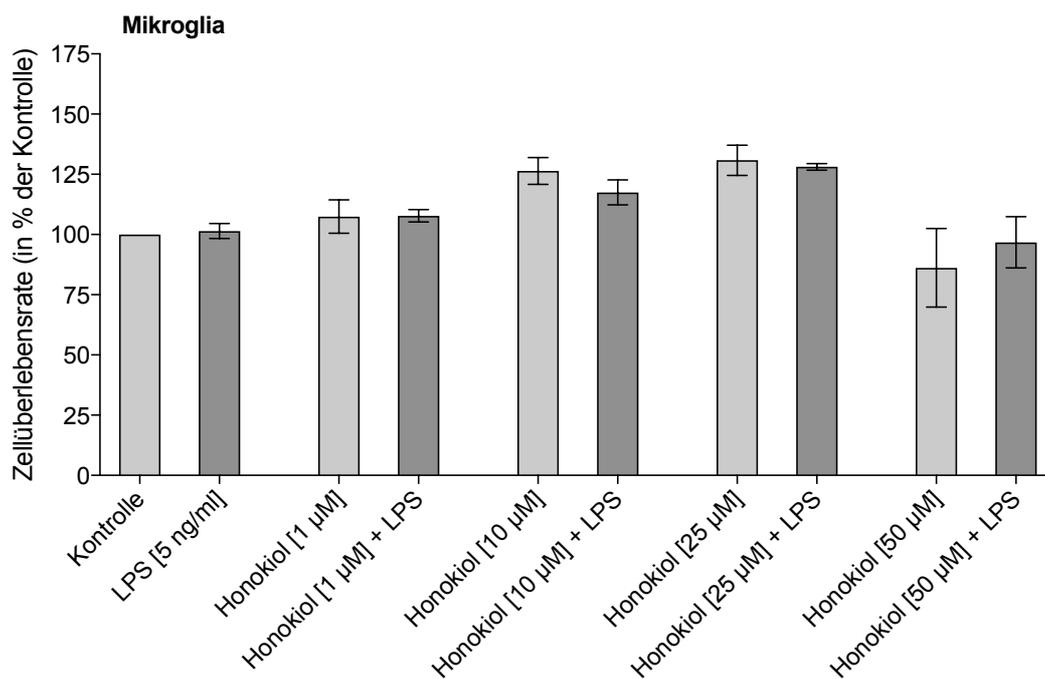


Abb. 3.1: Einfluss von Honokiol auf das Zellüberleben der Mikroglia. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden zeigte sich im MTT-Test, dass Honokiol allein oder auch in Kombination mit 5 ng/ml LPS in allen getesteten Konzentrationen (1 μM , 10 μM , 25 μM und 50 μM) nicht zytotoxisch auf Mikroglia wirkt. 50 μM Honokiol zeigten jedoch eine Verringerung des Zellüberlebens um 13,82 %, was aber noch nicht als zytotoxisch zu werten ist. Im Folgenden sind jeweils Inkubationsansatz und die prozentuale Zellüberlebensrate angegeben: Kontrolle: 100 %; LPS [5 ng/ml]: 101,43 %; Honokiol [1 μM]: 107,46 %; Honokiol [1 μM] + LPS [5 ng/ml]: 107,76 %; Honokiol [10 μM]: 126,40 %; Honokiol [10 μM] + LPS [5 ng/ml]: 117,48 %; Honokiol [25 μM]: 130,83 %; Honokiol [25 μM] + LPS [5 ng/ml]: 128,11 %; Honokiol [50 μM]: 86,18 %; Honokiol [50 μM] + LPS [5 ng/ml]: 96,77 %. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM (n = 4).

Es zeigte sich, dass Honokiol im untersuchten Konzentrationsbereich von 1 μM bis 50 μM weder allein noch in Kombination mit 5 ng/ml LPS einen zytotoxischen Effekt auf Mikroglia ausübte. Des Weiteren ließ sich im Bereich von 1 μM bis 25 μM eine konzentrationsabhängige, verstärkte Reduktion von MTT feststellen, die auf eine mögliche Honokiol-vermittelte Zellproliferation hindeutet.

Die Ergebnisse des MTT-Tests an Astrozyten sind in der Abb. 3.2 grafisch dargestellt.

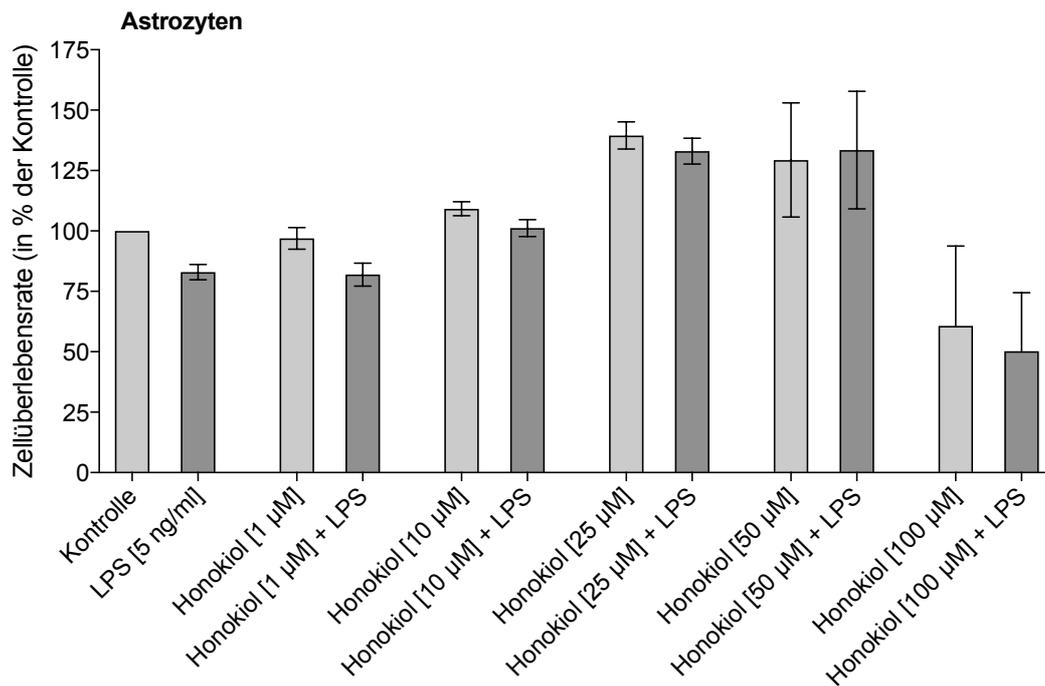


Abb. 3.2: Einfluss von Honokiol auf das Zellüberleben der Astrozyten. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden zeigte sich im MTT-Test, dass Honokiol allein oder auch in Kombination mit 5 ng/ml LPS in den getesteten Konzentrationen 1 μM , 10 μM , 25 μM und 50 μM nicht zytotoxisch auf Astrozyten wirkt. 100 μM Honokiol zeigten jedoch eine Verringerung des Zellüberlebens um 39,33 % und in Kombination mit LPS um 49,79 %. Im Folgenden sind jeweils Inkubationsansatz und die prozentuale Zellüberlebensrate angegeben: Kontrolle: 100 %; LPS [5 ng/ml]: 83,00 %; Honokiol [1 μM]: 96,89 %; Honokiol [1 μM] + LPS [5 ng/ml]: 81,94 %; Honokiol [10 μM]: 109,19 %; Honokiol [10 μM] + LPS [5 ng/ml]: 101,24 %; Honokiol [25 μM]: 139,49 %; Honokiol [25 μM] + LPS [5 ng/ml]: 133,07 %; Honokiol [50 μM]: 129,38 %; Honokiol [50 μM] + LPS [5 ng/ml]: 133,50 %; Honokiol [100 μM]: 60,67 %; Honokiol [100 μM] + LPS [5 ng/ml]: 50,21 %. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM (n = 4).

In den Versuchen mit Astrozyten konnte im untersuchten Konzentrationsbereich von 1 μM bis 50 μM Honokiol weder bei einer Inkubation mit Honokiol allein noch in Kombination mit 5 ng/ml LPS ein zytotoxischer Effekt festgestellt werden. Im Bereich von 10 μM bis 50 μM ließ sich eine konzentrationsabhängige, verstärkte Reduktion von MTT nachweisen, die, wie auch bei den Mikroglia, auf eine Honokiol-vermittelte Zellproliferation hindeutet. Außerdem zeigte sich, dass bei einer Zugabe von 10 μM bis 50 μM Honokiol, die durch alleinige LPS-Gabe verminderte Zellüberlebensrate nicht nur aufgehoben, sondern sogar deutlich gesteigert werden konnte.

Eine Einzelinkubation mit 100 μM Honokiol führte jedoch zu einer drastischen Reduktion der Zellüberlebensrate auf 60,67 % und mit zusätzlicher LPS-Gabe auf 50,21 %. Damit sind 100 μM Honokiol als zytotoxisch für Astrozyten zu werten.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die weiterführenden Experimente an Mikroglia mit einer Honokiol-Konzentration von 10 μM und an Astrozyten mit einer Honokiol-Konzentration von 25 μM durchgeführt.

4.2 Einfluss von Honokiol auf die Morphologie der Mikroglia und Astrozyten

Um einen möglichen Einfluss von Honokiol auf die Morphologie der Mikroglia und Astrozyten festzustellen, wurden diese nach 24-stündiger Inkubation mit der Färbelösung Coomassie-Blau gefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Die Abbildung 4.1 zeigt repräsentative Fotos aus jeweils drei unabhängigen Versuchen der Mikroglia und die Abbildung 4.2 aus jeweils drei unabhängigen Versuchen der Astrozyten.

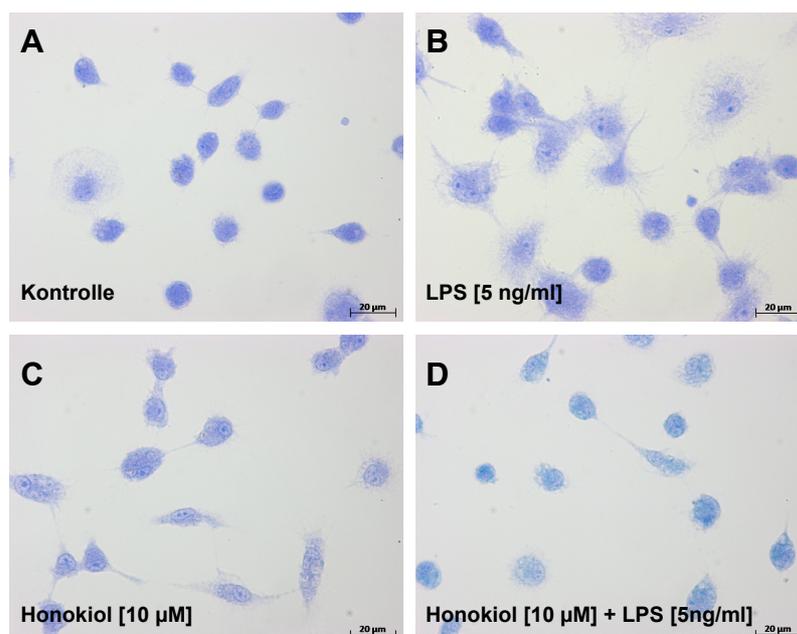


Abb. 4.1: Einfluss von Honokiol auf die Morphologie primärer Mikroglia. Für die morphologische Beurteilung wurden die Mikroglia für 24 Stunden inkubiert, anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt und unter dem Lichtmikroskop betrachtet. In der Kontrolle zeigten sich die Mikroglia in ihrer ruhenden Form (A). Nach Inkubation mit LPS (5 ng/ml) nahmen sie den aktivierten, amöboiden Phänotyp ein (B). Die alleinige Gabe von Honokiol (10 µM) zeigte morphologisch weiterhin den ruhenden, ramifizierten Phänotyp (C). Die simultane Inkubation mit LPS (5 ng/ml) und Honokiol (10 µM) zeigte, dass Honokiol die LPS-bedingte morphologische Transformation zum aktivierten Phänotyp unterbindet (D). Dargestellt sind repräsentative Fotos aus n = 3 unabhängigen Versuchen.

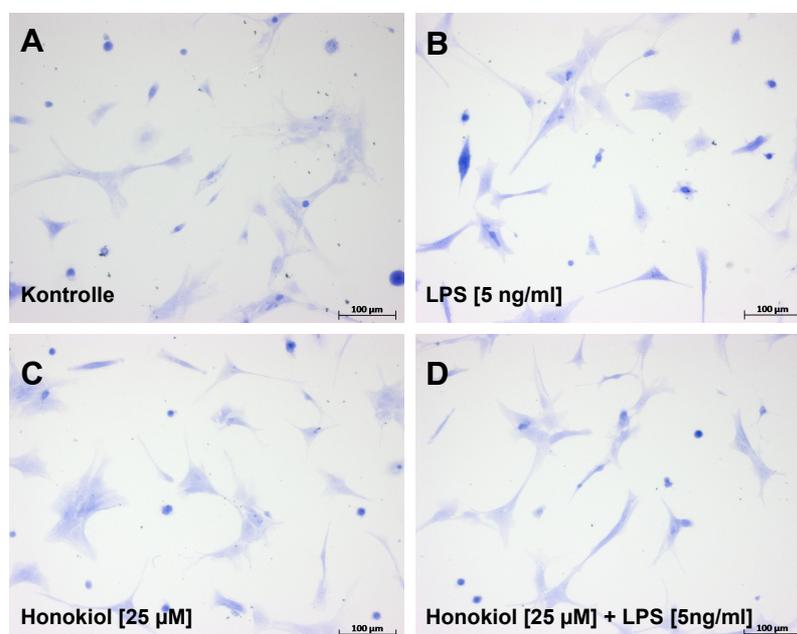


Abb. 4.2: Einfluss von Honokiol auf die Morphologie primärer Astrozyten. Für die morphologische Beurteilung wurden die Astrozyten für 24 Stunden inkubiert, anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt und unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Morphologisch unterschieden sich die Astrozyten in den verschiedenen Inkubationsansätzen nicht. Die Zellen zeigten sich in allen Versuchsansätzen morphologisch vital. Dargestellt sind repräsentative Fotos aus n = 3 unabhängigen Versuchen.

In der Kontrolle zeigten sich die Mikroglia in ihrer ruhenden Form mit einem kleinen dunklen Zellkern, einer dünnen Schicht Zytoplasma und feinen Zellausläufern (Abb 4.1 A). Nach Stimulation mit 5 ng/ml LPS ließen sich eine Ausbreitung des Zytoplasmas feststellen, welches von dichten, retikulären Strukturen durchzogen war, sowie die Ausbildung kräftiger Zellausläufer (B). Dieses eher amöboide Erscheinungsbild entspricht dem aktivierten Phänotyp der Mikroglia. Die Inkubation mit 10 μ M Honokiol führte zu einer geringfügigen Bildung von Zellfortsätzen sowie einer Auflockerung des Chromatins im Zellkern (C). Dieser Phänotyp ist morphologisch eher der ruhenden Form als der aktivierten zuzuordnen. Nach simultaner Inkubation mit LPS und Honokiol zeigten sich die Zellen in ihrer ruhenden Form (D).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Honokiol selbst nicht aktivierend auf Mikroglia wirkt und das Potential besitzt, die LPS-bedingte Ausbildung des morphologisch aktivierten Phänotyps in Mikroglia zu reduzieren.

Die Coomassie-Blau-Färbungen der Astrozyten zeigten, dass sich die Morphologie der Zellen in keinem der gewählten Versuchsansätze veränderte (Abb. 4.2). In jedem Versuchsansatz zeigten sich die Zellen morphologisch vital.

4.3 Einfluss von Honokiol auf die Stickstoffmonoxid-Freisetzung der Mikroglia und Astrozyten

Als ein Indikator für die Mikrogliaaktivierung wurde die von den Zellen produzierte Stickstoffmonoxid-Menge im Zellkulturmedium mittels Griess-Reagenz nach 24-stündiger Inkubation indirekt gemessen. Ein Ansatz mit unstimulierten Zellen diente als Kontrolle zur Ermittlung der Basisrate. Zusätzlich wurde die NO-Freisetzung der Astrozyten untersucht. Die Ergebnisse der Mikroglia sind in Abb. 5 A und die Ergebnisse der Astrozyten in Abb. 5 B jeweils in Relation zu den LPS-aktivierten Zellen grafisch dargestellt.

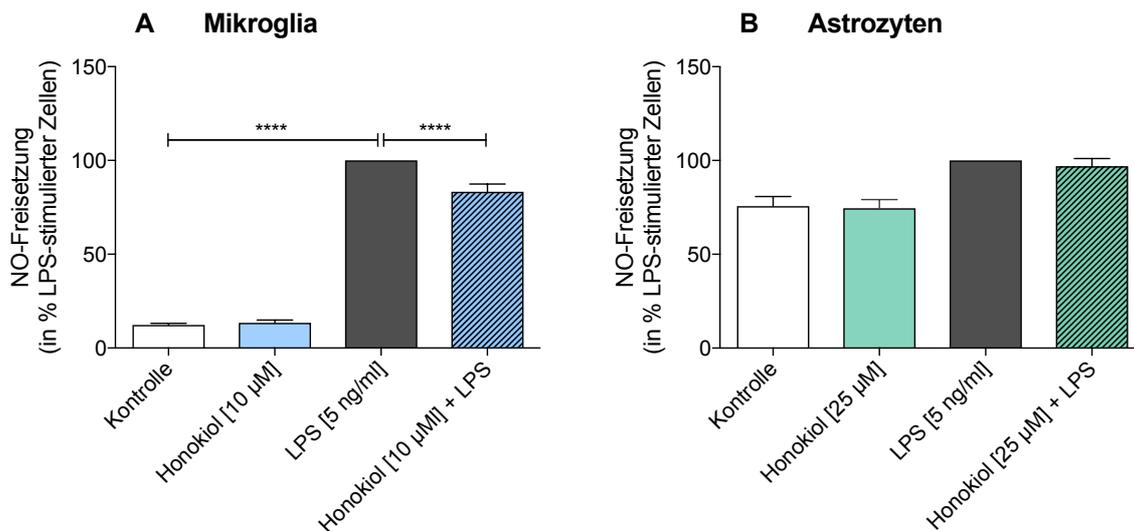


Abb. 5: Modulation der Stickstoffmonoxid (NO)-Freisetzung durch Honokiol in LPS-stimulierten Mikroglia und Astrozyten. Die NO-Freisetzung wurde im Zellkulturmedium indirekt mittels Griess-Reagenz ermittelt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden zeigte sich, dass Honokiol signifikant die LPS-induzierte NO-Freisetzung in Mikroglia reduzierte (A). Die alleinige Inkubation mit Honokiol hatte keinen Einfluss auf die NO-Freisetzung. Im Folgenden sind jeweils Inkubationsansatz und die prozentuale NO-Freisetzung angegeben: Kontrolle: 12,26 %; Honokiol [10 µM]: 13,45 %; LPS [5 ng/ml]: 100 %; Honokiol [10 µM] + LPS [5 ng/ml]: 83,26 %. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden zeigte sich kein signifikanter Einfluss durch Honokiol auf die NO-Freisetzung in Astrozyten (B). Im Folgenden sind jeweils Inkubationsansatz und die prozentuale NO-Freisetzung angegeben: Kontrolle: 75,68 %; Honokiol [25 µM]: 74,55 %; LPS [5 ng/ml]: 100 %; Honokiol [25 µM] + LPS [5 ng/ml]: 96,96 %. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM (n = 8 (Mikroglia), n = 12 (Astrozyten); ****p \leq 0,0001).

Nach Stimulation der Mikroglia mit LPS zeigte sich eine signifikante Steigerung der NO-Freisetzung, welche als 100 % definiert wurde, im Vergleich mit der unstimulierten Kontrolle (12,26 %). Nach Koinkubation mit Honokiol und LPS wurde die LPS-induzierte NO-Freisetzung von 100 % auf 83,26 % herabreguliert. Es ließ sich kein Einfluss von Honokiol allein (13,45 %) auf die NO-Freisetzung verglichen mit den unstimulierten Zellen nachweisen.

Diesem Versuch zufolge führt Honokiol nicht zu einer vermehrten Mikrogliaaktivierung und hat das Potenzial, die LPS-induzierte verstärkte NO-Freisetzung signifikant zu reduzieren.

In den Astrozyten führte die Stimulation mit LPS nur zu einer tendenziellen Hochregulierung der NO-Freisetzung (100 %), verglichen mit der unstimulierten Kontrolle (75,68 %). Weder nach Koinkubation mit Honokiol und LPS (96,96 %) noch nach alleiniger Inkubation mit Honokiol (74,55 %) ließ sich eine Modulation der NO-Freisetzung feststellen.

4.4 Einfluss von Honokiol auf die iNOS-mRNA-Expression in Mikroglia

NO wird im menschlichen Organismus durch verschiedene NO-Synthasen gebildet. In den Mikroglia wird NO im Rahmen der Inflammation v. a. über die iNOS synthetisiert. Ihre Aktivität ist im Gegensatz zu anderen NO-Synthasen nicht regulierbar, sodass eine erhöhte NO-Freisetzung über eine verstärkte iNOS-Expression vermittelt wird.

Eine mögliche Modulation der iNOS-mRNA-Expressionsrate durch Honokiol in Mikroglia wurde in dieser Arbeit mittels qPCR nach 24-stündiger Inkubation untersucht. Ein Ansatz mit unstimulierten Zellen diente als Kontrolle zur Ermittlung der Basisexpressionsrate. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 in Relation zu den LPS-aktivierten Mikroglia grafisch dargestellt.

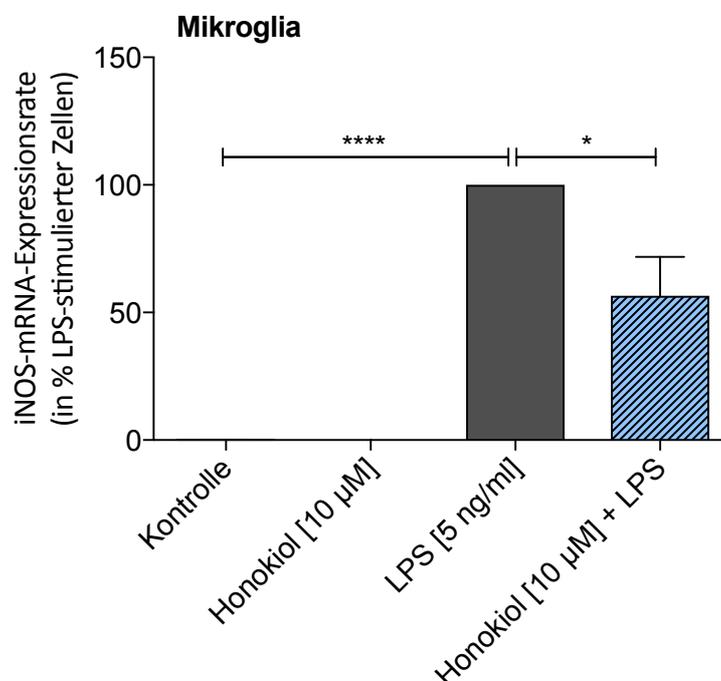


Abb. 6: Modulation der induzierbaren NO-Synthase (iNOS)-mRNA-Expressionsrate durch Honokiol in LPS-stimulierten Mikroglia. Die iNOS-mRNA-Expressionsrate wurde relativ mittels qPCR quantifiziert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden zeigte sich, dass Honokiol signifikant die LPS-induzierte iNOS-mRNA-Expression in Mikroglia reduzierte. Die alleinige Inkubation mit Honokiol hatte keinen Einfluss auf die iNOS-mRNA-Expression. Im Folgenden sind jeweils Inkubationsansatz und die prozentuale iNOS-mRNA-Expressionsrate angegeben: Kontrolle: 0,14 %; Honokiol [10 µM]: 0,02 %; LPS [5 ng/ml]: 100 %; Honokiol [10 µM] + LPS [5 ng/ml]: 56,61 %. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM (n = 3; *p \leq 0,05, ****p \leq 0,0001).

Die Stimulation mit LPS führte zu einer signifikanten Steigerung der iNOS-mRNA-Expressionsrate (100 %), verglichen mit der Kontrolle (0,14 %). Durch simultane Inkubation der Mikroglia mit Honokiol und LPS wurde die LPS-induzierte iNOS-mRNA-Expression signifikant von 100 % auf 56,61 % reduziert. Die alleinige Inkubation mit Honokiol (0,02 %)

hatte im Vergleich mit der unstimulierten Kontrolle (0,14 %) keinen Einfluss auf die iNOS-mRNA-Expressionsrate.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die durch Honokiol reduzierte NO-Freisetzung der LPS-aktivierten Mikroglia aus einer herabregulierten iNOS-mRNA-Expressionsrate resultiert.

4.5 Modulation der mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine in Mikroglia und Astrozyten durch Honokiol

Ein möglicher Einfluss von Honokiol auf die mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1 β und TNF- α in Mikroglia und Astrozyten wurde mittels qPCR untersucht. Ein Ansatz unstimulierter Zellen diente als Kontrolle zur Ermittlung der Basisexpressionsrate des jeweils untersuchten Zytokins. Im Folgenden werden für die Zytokine IL-6 und IL-1 β die Ergebnisse aus den Versuchen mit Mikroglia nach 24-stündiger Inkubation gezeigt, da diese die stabilsten Ergebnisse erbrachten, während die Astrozyten bereits nach 3-stündiger Inkubation signifikante Resultate ohne großer Streuung ergaben. TNF- α hingegen ist ein Zytokin, welches früh nach Stimulation exprimiert wird. Eine Stimulation mit LPS hatte nach 24 Stunden in Mikroglia in Bezug auf TNF- α keine Auswirkungen mehr. Nach dieser Zeit zeigte die unstimulierte Kontrolle eine TNF- α -mRNA-Expressionsrate auf ähnlichem Niveau wie nach Stimulation mit LPS, sodass für TNF- α auch für die Mikroglia die Ergebnisse nach 3-stündiger Stimulation gezeigt werden.

4.5.1 Einfluss von Honokiol auf die IL-6-mRNA-Expression in Mikroglia und Astrozyten

Die Ergebnisse der IL-6-mRNA-Expression in Mikroglia nach 24-stündiger Inkubation sind in Abb. 7 A und die Ergebnisse der Astrozyten nach 3-stündiger Inkubation in Abb. 7 B in Relation zu den LPS-aktivierten Zellen grafisch dargestellt.

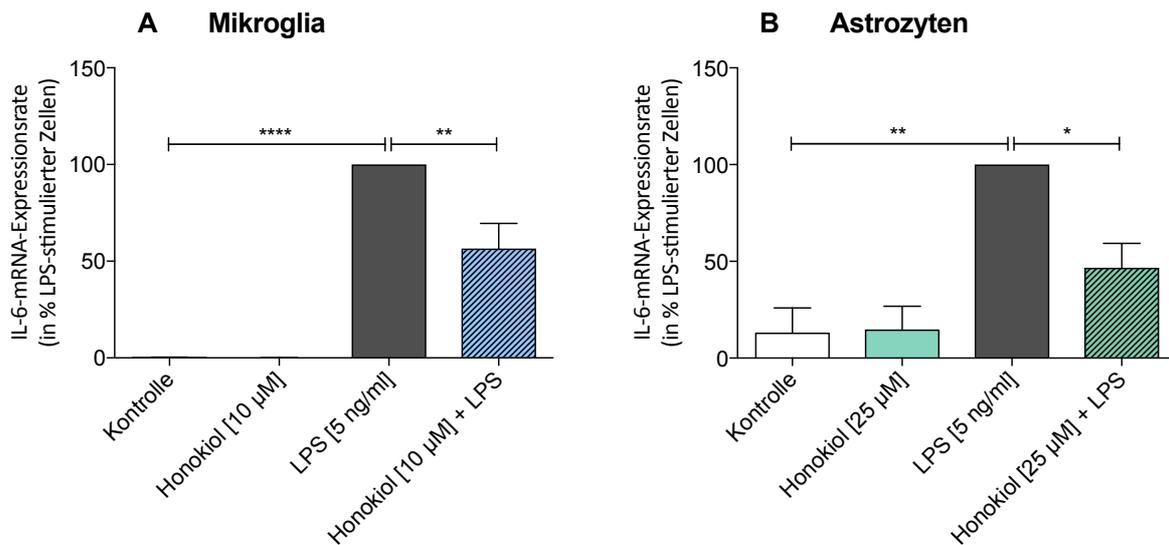


Abb. 7: Modulation der Interleukin (IL)-6-mRNA-Expressionsrate durch Honokiol in LPS-stimulierten Mikroglia und Astrozyten. Die IL-6-mRNA-Expressionsrate wurde relativ mittels qPCR quantifiziert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden zeigte sich, dass Honokiol signifikant die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression in Mikroglia reduzierte (A). Die alleinige Inkubation mit Honokiol hatte keinen Einfluss auf die IL-6-mRNA-Expression. Im Folgenden sind jeweils Inkubationsansatz und die prozentuale IL6-mRNA-Expression angegeben: Kontrolle: 0,33 %; Honokiol [10 µM]: 0,11 %; LPS [5 ng/ml]: 100 %; Honokiol [10 µM] + LPS [5 ng/ml]: 56,51 %. Nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden zeigte sich, dass Honokiol signifikant die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression in Astrozyten reduzierte, ohne dass die alleinige Inkubation mit Honokiol einen Einfluss auf die IL-6-mRNA-Expression hatte (B). Im Folgenden sind jeweils Inkubationsansatz und die prozentuale IL6-mRNA-Expression angegeben: Kontrolle: 13,15 %; Honokiol [25 µM]: 14,83 %; LPS [5 ng/ml]: 100 %; Honokiol [25 µM] + LPS [5 ng/ml]: 46,73 %. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM (n = 4 (Mikroglia), n = 3 (Astrozyten)); *p \leq 0,05, **p \leq 0,01, ****p \leq 0,0001).

Die Stimulation mit LPS führte zu einer signifikant verstärkten IL-6-mRNA-Expression in den Mikroglia (100 %) verglichen mit der unstimulierten Kontrolle (0,33 %). Nach simultaner Inkubation mit LPS und Honokiol wurde die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression signifikant von 100 % auf 56,51 % reduziert. Die Stimulation mit Honokiol allein (0,11 %) hatte keinen Einfluss auf die IL-6-mRNA-Expressionsrate im Vergleich mit der Kontrolle.

Auch in den Astrozyten führte eine Stimulation mit LPS zu einer signifikanten Steigerung der IL-6-mRNA-Expression (100 %) im Vergleich mit der Kontrolle (13,15 %). Nach Koinkubation mit Honokiol und LPS wurde die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression von 100 % auf 46,73 % herabreguliert. Es ließ sich kein Einfluss von Honokiol allein auf die IL-6-mRNA-Expressionsrate verglichen mit den unstimulierten Zellen nachweisen (14,83 %).

Folglich ist Honokiol in der Lage, die LPS-induzierte verstärkte IL-6-mRNA-Expression in den Mikroglia sowie den Astrozyten zu reduzieren, ohne selbst die IL-6-mRNA-Expressionsrate der nicht-aktivierten Zellen zu erhöhen.

4.5.2 Einfluss von Honokiol auf die IL-1 β -mRNA-Expression in Mikroglia und Astrozyten

Die Ergebnisse der IL-1 β -mRNA-Expressionsrate in Mikroglia nach 24-stündiger Inkubation sind in Abb. 8 A und die Ergebnisse der IL-1 β -mRNA-Expressionsrate in Astrozyten nach 3-stündiger Inkubation in Abb. 8 B in Relation zu den LPS-aktivierten Zellen grafisch dargestellt.

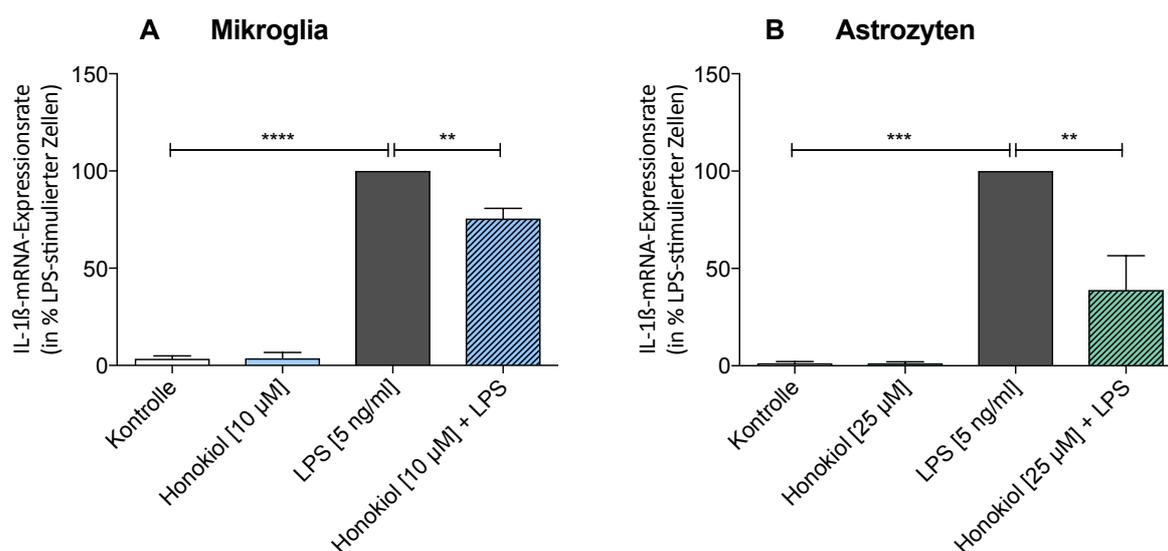


Abb. 8: Modulation der Interleukin (IL)-1 β -mRNA-Expressionsrate durch Honokiol in LPS-stimulierten Mikroglia und Astrozyten. Die IL-1 β -mRNA-Expressionsrate wurde relativ mittels qPCR quantifiziert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden zeigte sich, dass Honokiol signifikant die LPS-induzierte IL-1 β -mRNA-Expression in Mikroglia reduzierte, während die alleinige Inkubation mit Honokiol keinen Einfluss auf die IL-1 β -mRNA-Expression hatte (A). Im Folgenden sind jeweils Inkubationsansatz und die prozentuale IL-1 β -mRNA-Expression angegeben: Kontrolle: 3,47 %; Honokiol [10 μ M]: 3,70 %; LPS [5 ng/ml]: 100 %; Honokiol [10 μ M] + LPS [5 ng/ml]: 75,55 %. Nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden zeigte sich, dass Honokiol signifikant die LPS-induzierte IL-1 β -mRNA-Expression in Astrozyten reduzierte (B). Die alleinige Inkubation mit Honokiol hatte keinen Einfluss auf die IL-1 β -mRNA-Expressionsrate. Im Folgenden sind jeweils Inkubationsansatz und die prozentuale IL-1 β -mRNA-Expression angegeben: Kontrolle: 1,25 %; Honokiol [25 μ M]: 1,22 %; LPS [5 ng/ml]: 100 %; Honokiol [25 μ M] + LPS [5 ng/ml]: 38,98 %. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM (n = 3 (Mikroglia), n = 3 (Astrozyten)); **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001, ****p \leq 0,0001).

Die Stimulation mit LPS führte zu einer signifikant verstärkten IL-1 β -mRNA-Expression in den Mikroglia (100 %) im Vergleich mit der unstimulierten Kontrolle (3,47 %). Nach Koinkubation mit LPS und Honokiol wurde die LPS-induzierte IL-1 β -mRNA-Expressionsrate signifikant von 100 % auf 75,55 % herabreguliert. Die Inkubation mit Honokiol allein (3,70 %) hatte keinen Einfluss auf die IL-1 β -mRNA-Expressionsrate verglichen mit der Kontrolle.

Die Ergebnisse der Astrozyten gleichen denen der Mikroglia. Auch in den Astrozyten führte

eine Stimulation mit LPS zu einer signifikant verstärkten IL-1 β -mRNA-Expression (100 %) im Vergleich mit der unstimulierten Kontrolle (1,25 %). Nach simultaner Inkubation mit Honokiol und LPS wurde die LPS-induzierte IL-1 β -mRNA-Expressionsrate signifikant reduziert (38,98 %). Nach Inkubation mit Honokiol allein ließ sich keine Änderung der IL-1 β -mRNA-Expressionsrate verglichen mit den unstimulierten Zellen feststellen (1,22 %).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Honokiol das Potential besitzt, die LPS-induzierte IL-1 β -mRNA-Expression in Mikroglia sowie Astrozyten zu reduzieren, ohne selbst die IL-1 β -mRNA-Expressionsrate der nicht-aktivierten Zellen zu erhöhen.

4.5.3 Einfluss von Honokiol auf die TNF- α -mRNA-Expression in Mikroglia und Astrozyten

Die Ergebnisse der TNF- α -mRNA-Expressionsrate nach 3-stündiger Inkubation sind in Abb. 9 A für Mikroglia und in Abb. 9 B für Astrozyten in Relation zu den LPS-aktivierten Zellen grafisch dargestellt.

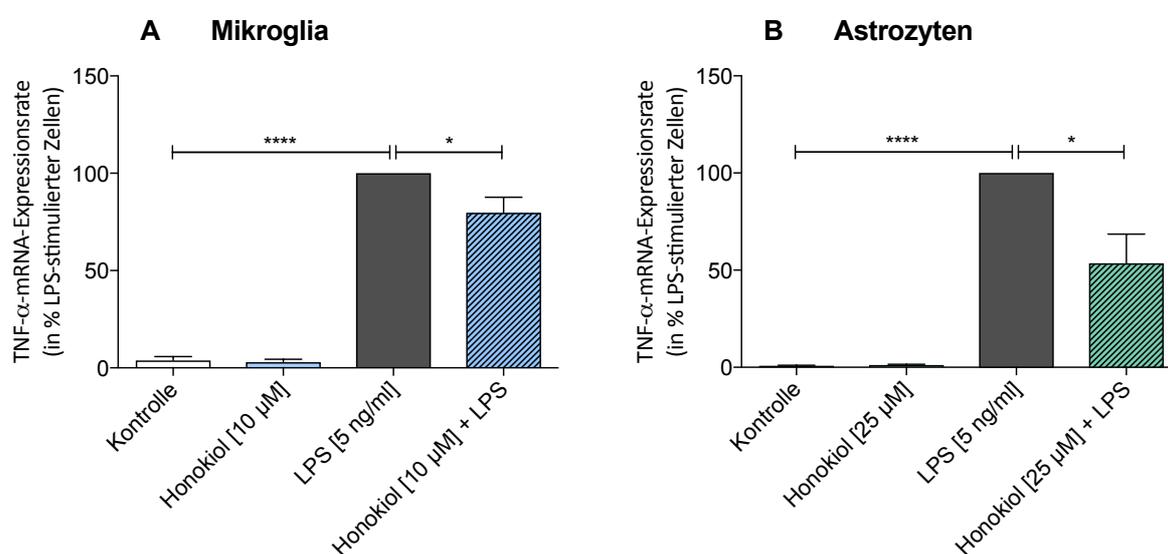


Abb. 9: Modulation der Tumornekrosefaktor (TNF)- α -mRNA-Expressionsrate durch Honokiol in LPS-stimulierten Mikroglia und Astrozyten. Die TNF- α -mRNA-Expressionsrate wurde relativ mittels qPCR quantifiziert. Nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden zeigte sich, dass Honokiol signifikant die LPS-induzierte TNF- α -mRNA-Expression in Mikroglia reduzierte, während die alleinige Inkubation mit Honokiol keinen Einfluss auf die TNF- α -mRNA-Expressionsrate hatte (A). Im Folgenden sind jeweils Inkubationsansatz und die prozentuale TNF- α -mRNA-Expression angegeben: Kontrolle: 3,79 %; Honokiol [10 μ M]: 2,88 %; LPS [5 ng/ml]: 100 %; Honokiol [10 μ M] + LPS [5 ng/ml]: 79,73 %. Nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden zeigte sich, dass Honokiol signifikant die LPS-induzierte TNF- α -mRNA-Expression in Astrozyten reduzierte (B). Die alleinige Inkubation mit Honokiol hatte keinen Einfluss auf die TNF- α -mRNA-Expressionsrate. Im Folgenden sind jeweils Inkubationsansatz und die prozentuale TNF- α -mRNA-Expression angegeben: Kontrolle: 0,82 %; Honokiol [25 μ M]: 1,06 %; LPS [5 ng/ml]: 100 %; Honokiol [25 μ M] + LPS [5 ng/ml]: 53,52 %. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM (n = 4 (Mikroglia), n = 3 (Astrozyten)); *p \leq 0,05, ****p \leq 0,0001).

Die LPS-Stimulation der Mikroglia führte im Vergleich mit der unstimulierten Kontrolle (3,79 %) zu einer signifikant verstärkten TNF- α -mRNA-Expression, die als 100 % definiert wurde. Nach Koinkubation mit LPS und Honokiol wurde die LPS-induzierte TNF- α -mRNA-Expression signifikant von 100 % auf 79,73 % herabreguliert. Die alleinige Honokiol-Inkubation (2,88 %) hatte keinen Einfluss auf die TNF- α -mRNA-Expressionsrate verglichen mit der Kontrolle.

Die Ergebnisse der Astrozyten gleichen denen der Mikroglia. Auch in den Astrozyten führte eine Stimulation mit LPS zu einer signifikanten Steigerung der TNF- α -mRNA-Expression (100 %) im Vergleich mit der unstimulierten Kontrolle (0,82 %). Nach simultaner Inkubation mit Honokiol und LPS wurde die LPS-induzierte TNF- α -mRNA-Expression signifikant reduziert (53,52 %). Nach Inkubation mit Honokiol allein ließ sich keine Änderung der TNF- α -mRNA-Expressionsrate verglichen mit den unstimulierten Zellen feststellen (1,06 %).

Daraus resultierend ist Honokiol in der Lage, die LPS-induzierte TNF- α -mRNA-Expression sowohl in Mikroglia als auch in Astrozyten zu reduzieren, ohne selbst die TNF- α -mRNA-Expressionsrate der nicht-aktivierten Zellen zu erhöhen.

4.5.4 Zusammenfassung der modulatorischen Eigenschaft Honokiols auf die mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine in Mikroglia und Astrozyten

Zusammenfassend zeigen die Versuche, dass durch LPS-Stimulation sowohl in Mikroglia als auch in Astrozyten die mRNA-Expressionsrate der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1 β und TNF- α signifikant gesteigert wird und dass Honokiol das Potential besitzt, die LPS-induzierte mRNA-Expression dieser Zytokine in Mikroglia und in Astrozyten signifikant zu reduzieren.

4.6 Einfluss von Honokiol auf die mRNA-Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 in Mikroglia und Astrozyten

Ein möglicher Einfluss von Honokiol auf die mRNA-Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 in Mikroglia und Astrozyten wurde mittels qPCR untersucht. Die Ergebnisse der IL-10-mRNA-Expressionsrate in Mikroglia nach 24-stündiger Inkubation sind in Abb. 10 A und die Ergebnisse der Astrozyten nach 6-stündiger Inkubation in Abb. 10 B in Relation zu den LPS-aktivierten Zellen grafisch dargestellt. Ein Ansatz mit unstimulierten Zellen diente als Kontrolle zur Ermittlung der Basisexpressionsrate. Entgegen der vorherigen Versuche mit Astrozyten werden die Ergebnisse nach 6-stündiger Inkubation gezeigt, da die Ergebnisse der IL-10-mRNA-Expression nach 3-stündiger Inkubation eine starke Streuung aufwies.

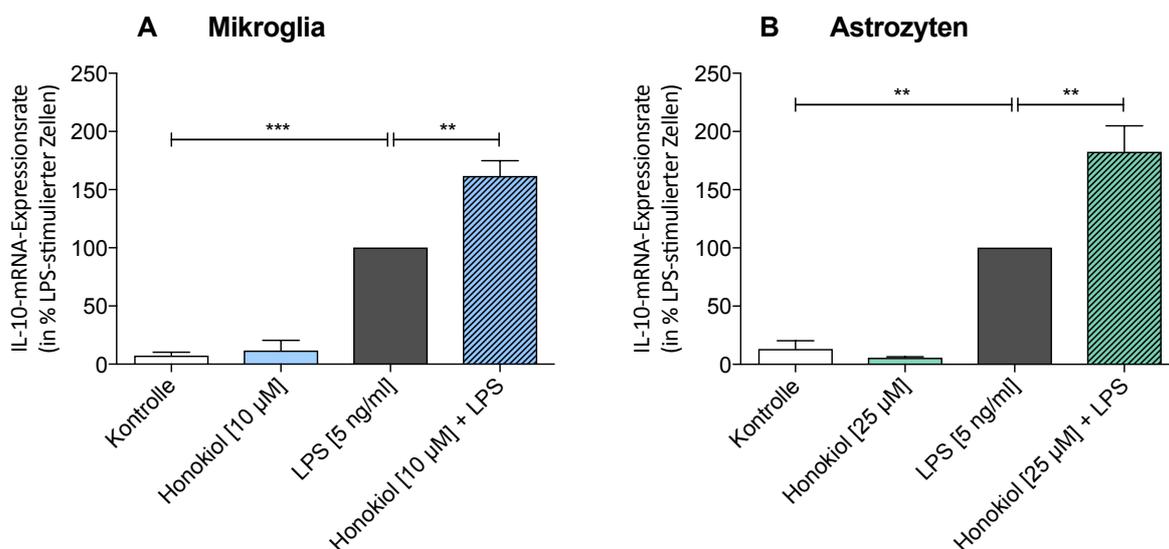


Abb. 10: Modulation der Interleukin (IL)-10-mRNA-Expressionsrate durch Honokiol in LPS-stimulierten Mikroglia und Astrozyten. Die IL-10-mRNA-Expressionsrate wurde relativ mittels qPCR quantifiziert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden zeigte sich, dass Honokiol signifikant die IL-10-mRNA-Expressionsrate in LPS-aktivierten Mikroglia erhöhte (A). Die alleinige Inkubation mit Honokiol hatte keinen Einfluss auf die IL-10-mRNA-Expressionsrate. Im Folgenden sind jeweils Inkubationsansatz und die prozentuale IL-10-mRNA-Expression angegeben: Kontrolle: 7,37 %; Honokiol [10 µM]: 11,75 %; LPS [5 ng/ml]: 100 %; Honokiol [10 µM] + LPS [5 ng/ml]: 161,87 %. Nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden zeigte sich, dass Honokiol signifikant die IL-10-mRNA-Expression in LPS-aktivierten Astrozyten erhöhte, während die alleinige Inkubation mit Honokiol keinen Einfluss auf die IL-10-mRNA-Expressionsrate hatte (B). Im Folgenden sind jeweils Inkubationsansatz und die prozentuale IL-10-mRNA-Expression angegeben: Kontrolle: 13,20 %; Honokiol [25 µM]: 5,72 %; LPS [5 ng/ml]: 100 %; Honokiol [25 µM] + LPS [5 ng/ml]: 182,67 %. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM (n = 3 (Mikroglia), n = 4 (Astrozyten)); **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001).

Die Stimulation der Mikroglia mit LPS führte zu einer signifikant verstärkten IL-10-mRNA-Expression (100 %), verglichen mit der unstimulierten Kontrolle (7,37 %). Nach Koinkubation mit LPS und Honokiol wurde die LPS-induzierte IL-10-mRNA-Expression von 100 % auf 161,87 % weiter signifikant hochreguliert. Die Inkubation mit Honokiol allein (11,75 %) hatte keinen Einfluss auf die IL-10-mRNA-Expressionsrate im Vergleich mit der Kontrolle.

Die Experimente mit den Astrozyten zeigten die gleichen Ergebnisse. Auch in den Astrozyten führte eine Stimulation mit LPS zu einer signifikanten Steigerung der IL-10-mRNA-Expression (100 %) im Vergleich mit der unstimulierten Kontrolle (13,20 %), die nach simultaner Inkubation mit Honokiol und LPS weiter signifikant gesteigert wurde (182,67 %). Die Inkubation mit Honokiol allein zeigte keine signifikante Änderung der IL-10-mRNA-Expressionsrate in den Astrozyten (5,72 %).

Somit führt eine Inkubation der LPS-aktivierten Mikroglia und Astrozyten mit Honokiol zu einer signifikant verstärkten mRNA-Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10. Ein Einfluss auf die IL-10-mRNA-Expression der nicht-aktivierten Zellen konnte nicht nachgewiesen werden.

4.7 Modulation der Proteinfreisetzung proinflammatorischer Zytokine in Mikroglia und Astrozyten durch Honokiol

Ein möglicher Einfluss von Honokiol auf die Proteinsekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α der Mikroglia und Astrozyten wurde mittels ELISA untersucht. Untersucht wurde der Zellkulturüberstand nach 24-stündiger Stimulation. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte zunächst quantitativ anhand einer Standardkurve, die aus den bei jedem Experiment mitgeführten Zytokinstandards von 0 - 2000 pg/ml, erstellt wurde. Aus diesen Werten wurde anschließend die prozentuale Proteinfreisetzung von IL-6 bzw. TNF- α berechnet.

4.7.1 Einfluss von Honokiol auf die IL-6-Proteinfreisetzung in Mikroglia und Astrozyten

Die Ergebnisse der IL-6-Proteinfreisetzung der Mikroglia sind in Abb. 11 A und die der Astrozyten in Abb. 11 B in Relation zu den LPS-aktivierten Zellen grafisch dargestellt.

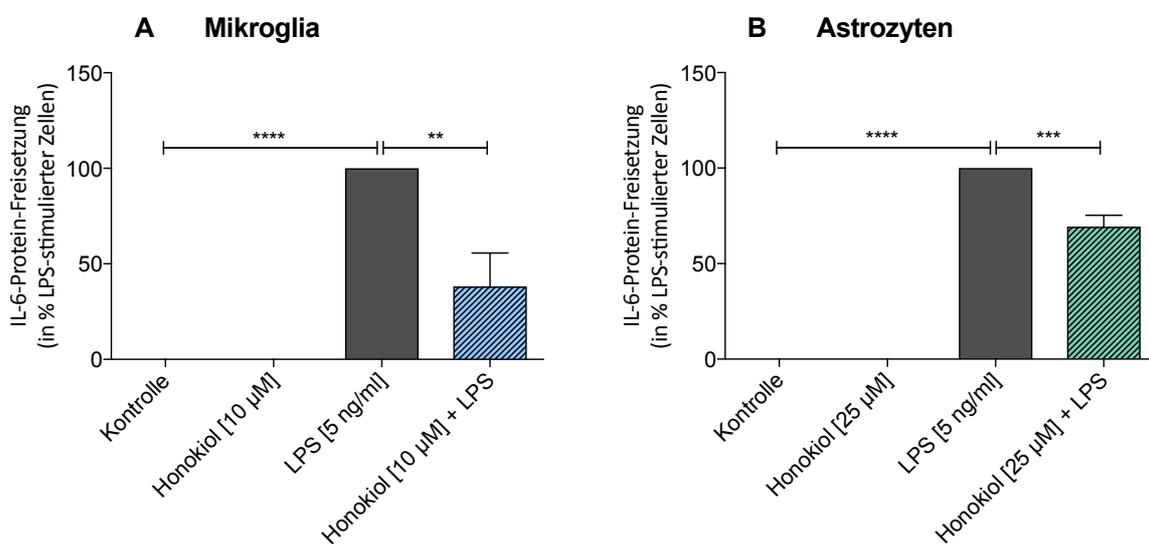


Abb. 11: Modulation der Interleukin (IL)-6-Proteinfreisetzung durch Honokiol in LPS-stimulierten Mikroglia und Astrozyten. Die IL-6-Proteinfreisetzung wurde im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden zeigte sich, dass Honokiol signifikant die LPS-induzierte IL-6-Proteinfreisetzung in Mikroglia reduzierte (A). Die alleinige Inkubation mit Honokiol hatte keinen Einfluss auf die IL-6-Proteinsekretion. Im Folgenden sind jeweils Inkubationsansatz und die prozentuale IL-6-Proteinfreisetzung angegeben: Kontrolle: 0,00 %; Honokiol [10 µM]: 0,00 %; LPS [5 ng/ml]: 100 %; Honokiol [10 µM] + LPS [5 ng/ml]: 38,22 %. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden zeigte sich, dass Honokiol signifikant die LPS-induzierte IL-6-Proteinfreisetzung in Astrozyten reduzierte, ohne dass die alleinige Inkubation mit Honokiol einen Einfluss auf die IL-6-Proteinsekretion hatte (B). Im Folgenden sind jeweils Inkubationsansatz und die prozentuale IL-6-Proteinfreisetzung angegeben: Kontrolle: 0,00 %; Honokiol [25 µM]: 0,00 %; LPS [5 ng/ml]: 100 %; Honokiol [25 µM] + LPS [5 ng/ml]: 69,15 %. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM (n = 4 (Mikroglia), n = 3 (Astrozyten); ***p \leq 0,001, ****p \leq 0,0001).

In Mikroglia zeigte sich eine signifikant verstärkte Proteinsekretion des Zytokins IL-6 nach LPS-Stimulation (100 %) verglichen mit den unstimulierten Zellen, deren Werte unterhalb der Nachweisgrenze lagen (0,00 %). Durch Koinkubation mit LPS und Honokiol wurde eine signifikante Reduktion der IL-6-Proteinsekretion der LPS-aktivierten Mikroglia von 100 % auf 38,22 % nachgewiesen. Bei einer alleinigen Inkubation mit Honokiol war, wie bei den unstimulierten Kontrollzellen, keine IL-6-Sekretion nachweisbar (0,00 %). Diese Ergebnisse kongruieren mit der zuvor nachgewiesenen Modulation der IL-6-mRNA-Expression in den Mikroglia.

Die Ergebnisse zur Bestimmung der IL-6-Proteinsekretion der Astrozyten zeigten die gleiche Tendenz wie die der Mikroglia. Es zeigte sich eine signifikant verstärkte Proteinsekretion des Zytokins IL-6 nach 24-stündiger Stimulation mit LPS (100 %) verglichen mit den unstimulierten Astrozyten, deren Werte ebenfalls unterhalb der Nachweisgrenze lagen (0,00 %). Eine Koinkubation mit Honokiol reduzierte signifikant die IL-6-Proteinsekretion der LPS-aktivierten Astrozyten von 100 % auf 69,15 %. Eine Inkubation mit Honokiol allein führte zu keiner nachweisbaren Proteinsekretion von IL-6 (0,00 %). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der IL-6-mRNA-Expression in den Astrozyten.

Somit führt die Inkubation der LPS-aktivierten Mikroglia und Astrozyten mit Honokiol nicht nur zu einer Reduktion der IL-6-mRNA-Expression, sondern auch zu einer signifikant reduzierten Proteinfreisetzung des Zytokins.

4.7.2 Einfluss von Honokiol auf die TNF- α -Proteinfreisetzung in Mikroglia und Astrozyten

Die Ergebnisse der TNF- α -Proteinfreisetzung der Mikroglia sind in Abb. 12 A und die Ergebnisse der Astrozyten in Abb. 12 B in Relation zu den LPS-aktivierten Zellen grafisch dargestellt.

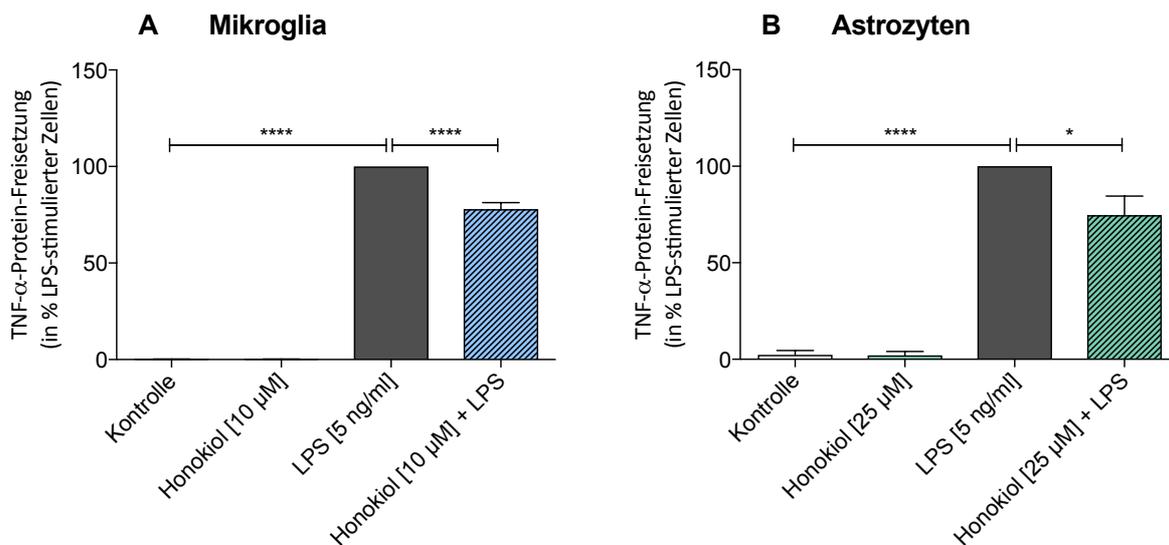


Abb. 12: Modulation der Tumornekrosefaktor (TNF)- α -Proteinfreisetzung durch Honokiol in LPS-stimulierten Mikroglia und Astrozyten. Die TNF- α -Proteinfreisetzung wurde im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden zeigte sich, dass Honokiol signifikant die LPS-induzierte TNF- α -Proteinfreisetzung in Mikroglia reduzierte (A). Die alleinige Inkubation mit Honokiol hatte keinen Einfluss auf die TNF- α -Proteinsekretion. Im Folgenden sind jeweils Inkubationsansatz und die prozentuale TNF- α -Proteinfreisetzung angegeben: Kontrolle: 0,13 %; Honokiol [10 μ M]: 0,13 %; LPS [5 ng/ml]: 100 %; Honokiol [10 μ M] + LPS [5 ng/ml]: 77,95 %. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden zeigte sich, dass Honokiol signifikant die LPS-induzierte TNF- α -Proteinfreisetzung in Astrozyten reduzierte, ohne dass die alleinige Inkubation mit Honokiol einen Einfluss auf die TNF- α -Proteinsekretion hatte (B). Im Folgenden sind jeweils Inkubationsansatz und die prozentuale TNF- α -Proteinfreisetzung angegeben: Kontrolle: 2,31 %; Honokiol [25 μ M]: 2,06 %; LPS [5 ng/ml]: 100 %; Honokiol [25 μ M] + LPS [5 ng/ml]: 74,64 %. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM (n = 3 (Mikroglia), n = 4 (Astrozyten)); *p \leq 0,05, ****p \leq 0,0001).

In den Mikroglia zeigte sich eine signifikant verstärkte Proteinsekretion des Zytokins TNF- α nach LPS-Stimulation (100 %) verglichen mit der unstimulierten Kontrolle (0,13 %). Nach Koinkubation mit LPS und Honokiol wurde die LPS-induzierte TNF- α -Proteinfreisetzung signifikant von 100 % auf 74,64 % reduziert. Die Inkubation mit Honokiol allein (2,06 %) hatte keinen Einfluss auf die TNF- α -Proteinsekretion im Vergleich mit der Kontrolle. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Modulation der TNF- α -mRNA-Expression.

Auch bei den Astrozyten führte die Stimulation mit LPS zu einer signifikant verstärkten Proteinsekretion des Zytokins TNF- α (100 %) im Vergleich mit der unstimulierten Kontrolle

(2,31 %). Nach simultaner Inkubation mit Honokiol und LPS wurde die LPS-induzierte TNF- α -Proteinfreisetzung signifikant reduziert (74,64 %). Die Inkubation mit Honokiol allein hatte keinen Einfluss auf die TNF- α -Proteinsekretion der Astrozyten (1,06 %) verglichen mit der unstimulierten Kontrolle. Diese Ergebnisse kongruieren mit den Ergebnissen der Modulation der TNF- α -mRNA-Expression in den Astrozyten.

Somit hat Honokiol das Potenzial, die LPS-bedingt erhöhte Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins TNF- α der Mikroglia und Astrozyten signifikant zu reduzieren.

4.7.3 Zusammenfassung der modulatorischen Eigenschaft Honokiols auf die Proteinfreisetzung proinflammatorischer Zytokine in Mikroglia und Astrozyten

Zusammenfassend zeigen die Versuche, dass aus der reduzierten mRNA-Expression von IL-6 und TNF- α nach Inkubation der LPS-aktivierten Mikroglia und Astrozyten mit Honokiol auch eine verringerte Proteinfreisetzung dieser proinflammatorischen Zytokine resultiert. Die alleinige Inkubation mit Honokiol hatte keinen Einfluss auf die Freisetzung von IL-6 und TNF- α .

4.8 Einfluss von Honokiol auf die MAP-Kinasen ERK1/2 in Mikroglia und Astrozyten

Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade (MAPK) ist eine Phosphorylierungskaskade, die an einer Vielzahl diverser zellregulatorischer Vorgänge beteiligt ist. Nach Aktivierung dieses Signalweges werden z. B. die extrazellulär-regulierten Kinasen (ERK) phosphoryliert (pERK), welche dann in den Zellkern wandern und dort u. a. die Genexpression von inflammatorischen Zytokinen beeinflussen.

Der Einfluss von Honokiol auf die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 in Mikroglia und Astrozyten wurde mittels Western Blot analysiert. Ein Bild eines repräsentativen Blots für die Mikroglia nach einer 30-minütigen Inkubation ist in der Abb. 13.1 A und nach einer 60-minütigen Inkubation in der Abb. 13.1 B dargestellt.

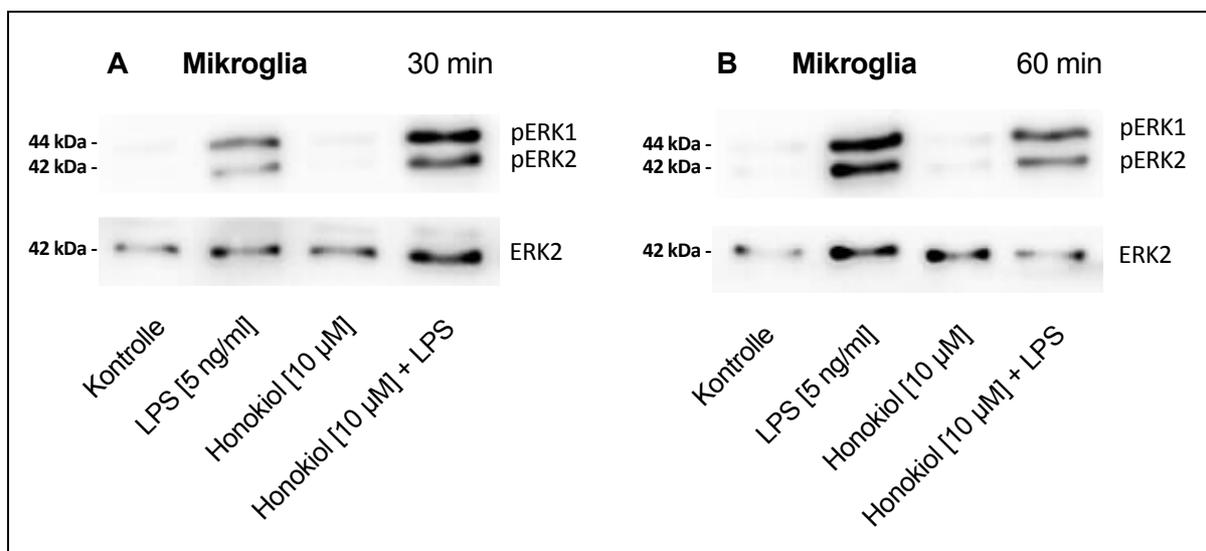


Abb. 13.1: Einfluss von Honokiol auf die Phosphorylierung der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK)1/2 in LPS-stimulierten Mikroglia nach 30- und 60-minütiger Inkubation. Als Indikator für eine Aktivierung des Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kaskade (MAPK)-Signaltransduktionsweges wurde die Phosphorylierung der Kinasen ERK1/2 mittels Western Blot untersucht. Dafür wurden zunächst die Proteinbanden von phosphoryliertem ERK1 (44 kDa) und ERK2 (42 kDa) (pERK1/2) und anschließend von unphosphoryliertem ERK2 (42 kDa) detektiert. Anhand der Bandenintensitäten von pERK1/2 in Bezug zu denen von ERK2 wurden dann vergleichende Aussagen zur Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 getroffen. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten (A) sowie 60 Minuten (B) war eine deutliche Zunahme von pERK1/2 in den LPS-stimulierten Zellen im Vergleich zu der jeweiligen Kontrolle festzustellen. Die alleinige Inkubation mit Honokiol führte zu keiner Änderung der Phosphorylierung von ERK1/2. Durch Koinkubation mit Honokiol und LPS ließ sich nach 30 Minuten eine Zunahme der ERK1/2-Phosphorylierung feststellen, während sie nach 60 Minuten eher reduziert wurde.

Nach einer Inkubationszeit der Mikroglia von 30 Minuten (A) sowie 60 Minuten (B) mit LPS zeigte sich eine deutliche Zunahme der Bandenintensität von pERK1/2 im Vergleich zur

Kontrolle, die für eine verstärkte Aktivierung dieses Signalweges spricht. Die Koinkubation mit Honokiol und LPS führte nach 30 Minuten zu einem weiteren Anstieg von pERK1/2, während die Phosphorylierung von ERK1/2 nach 60 Minuten tendenziell reduziert wurde. Die alleinige Stimulation mit Honokiol zeigte keinen Unterschied zur Kontrolle.

Ein Bild eines repräsentativen Blots für die Astrozyten ist in Abb. 13.2 A nach einer 30-minütigen Inkubation und in Abb. 13.2 B nach einer 60-minütigen Inkubation dargestellt.

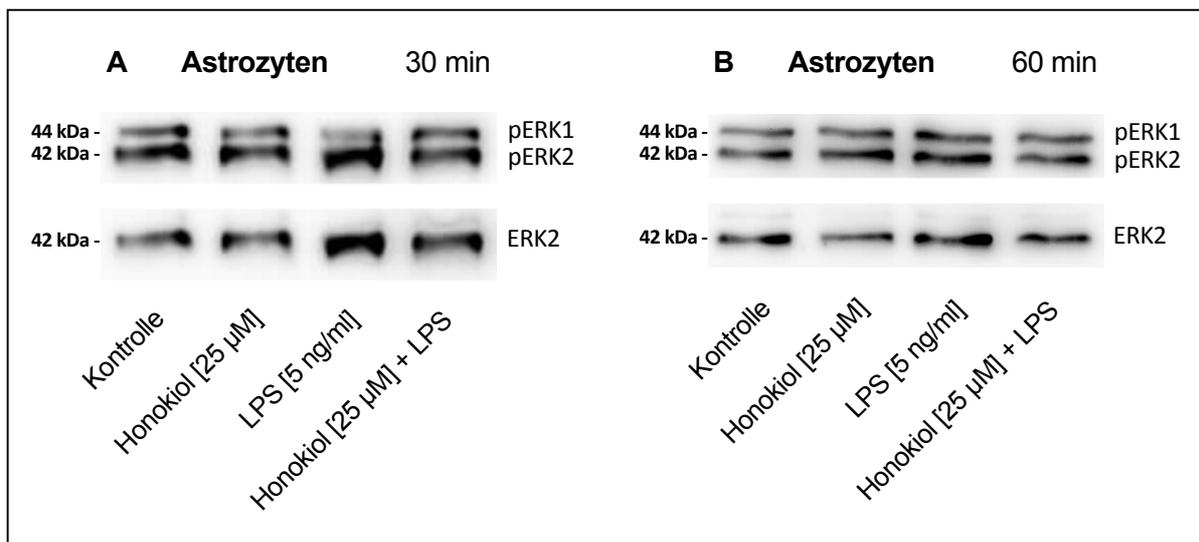


Abb. 13.2: Einfluss von Honokiol auf die Phosphorylierung der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK)1/2 in LPS-stimulierten Astrozyten nach 30- und 60-minütiger Inkubation. Als Indikator für eine Aktivierung des Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kaskade (MAPK)-Signaltransduktionsweges wurde die Phosphorylierung der Kinasen ERK1/2 mittels Western Blot untersucht. Dafür wurden zunächst die Proteinbanden von phosphoryliertem ERK1 (44 kDa) und ERK2 (42 kDa) (pERK1/2) und anschließend von unphosphoryliertem ERK2 (42 kDa) detektiert. Anhand der Bandenintensitäten von pERK1/2 in Bezug zu denen von ERK2 wurden dann vergleichende Aussagen zur Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 getroffen. Sowohl nach 30- (A) als auch nach 60-minütiger (B) Inkubation der Astrozyten mit LPS war die Bandenintensität von pERK1/2 ähnlich der von pERK1/2 der jeweiligen Kontrolle. Nach Inkubation der Astrozyten mit Honokiol sowie nach Koinkubation mit Honokiol und LPS ließ sich keine wesentliche Änderung der ERK-Phosphorylierung feststellen.

Nach einer Inkubationszeit der Astrozyten von 30 Minuten (A) sowie 60 Minuten (B) mit LPS entsprach die Bandenintensität von pERK1/2 nahezu der von pERK1/2 der Kontrolle. Nach Koinkubation mit Honokiol und LPS war weder nach 30 Minuten noch nach 60 Minuten eine wesentliche Änderung der Bandenintensitäten und somit keine Modulation der Phosphorylierungsrate von ERK1/2 erkennbar. Die alleinige Stimulation mit Honokiol zeigte keinen Unterschied zur Kontrolle.

Für eine quantitative Auswertung der Ergebnisse wurden die Bandenintensitäten von pERK1/2 sowie von unphosphoryliertem ERK2 densitometrisch gemessen und die Menge des Anteils von pERK1/2 rechnerisch durch Bildung des Quotienten aus pERK1/2 und ERK2 ermittelt.

Die Ergebnisse für die Mikroglia sind in der Abb. 14.1 A nach einer 30-minütigen Inkubation und in der Abb. 14.1 B nach einer 60-minütigen Inkubation dargestellt.

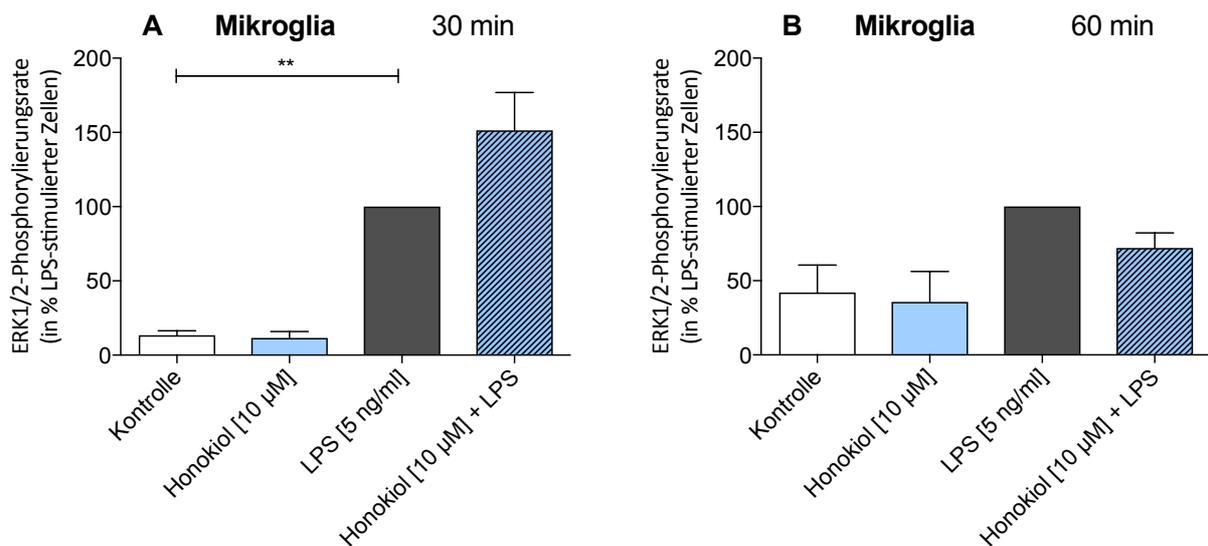


Abb. 14.1: Densitometrische Auswertung der Western Blot-Ergebnisse über den Einfluss von Honokiol auf die Phosphorylierung der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK) 1/2 in LPS-stimulierten Mikroglia nach 30- und 60-minütiger Inkubation. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten zeigte sich, dass Honokiol die LPS-induzierte Phosphorylierungsrate von ERK1/2 steigerte (A). Die alleinige Inkubation mit Honokiol hatte keinen Einfluss auf die ERK1/2-Phosphorylierungsrate. Im Folgenden sind jeweils Inkubationsansatz und die ERK1/2-Phosphorylierungsrate angegeben: Kontrolle: 13,38 %; Honokiol [10 µM]: 11,54 %; LPS [5 ng/ml]: 100 %; Honokiol [10 µM] + LPS [5 ng/ml]: 151,42 %. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten zeigte sich, dass Honokiol die LPS-induzierte ERK1/2-Phosphorylierungsrate in Mikroglia reduzierte, ohne dass die alleinige Inkubation mit Honokiol einen Einfluss auf die ERK1/2-Phosphorylierungsrate hatte (B). Im Folgenden sind jeweils Inkubationsansatz und die ERK1/2-Phosphorylierungsrate angegeben: Kontrolle: 42,05 %; Honokiol [25 µM]: 35,71 %; LPS [5 ng/ml]: 100 %; Honokiol [25 µM] + LPS [5 ng/ml]: 72,07 %. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM (n = 3 (A), n = 4 (B)); **p \leq 0,01).

Die LPS-Stimulation der Mikroglia führte sowohl nach 30 Minuten (A) im Vergleich mit der unstimulierten Kontrolle (13,38 %) als auch nach 60 Minuten (B) im Vergleich mit der unstimulierten Kontrolle (42,05 %) zu einer Zunahme von pERK1/2, welche als 100 % definiert wurde. Nach Koinkubation mit LPS und Honokiol stieg die Phosphorylierungsrate von ERK1/2 nach 30-minütiger Inkubation weiter an (151,42 %), während sie nach 60-minütiger Inkubation reduziert wurde (72,07 %). Die alleinige Honokiol-Inkubation zeigte

weder nach 30 Minuten (11,54 %) noch nach 60 Minuten (35,71 %) eine wesentliche Änderung der Menge an pERK1/2 gegenüber der entsprechenden Kontrolle.

Honokiol führte also tendenziell nach 30-minütiger Inkubation in LPS-stimulierten Mikroglia zu einem Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierungsrate, während nach 60-minütiger Inkubation eine Reduktion der ERK1/2-Phosphorylierung festzustellen war, wenn auch das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde.

Die Ergebnisse für die Astrozyten sind in Abb. 14.2 A nach einer 30-minütigen Inkubation und in Abb. 15.2 B nach einer 60-minütigen Inkubation grafisch dargestellt.

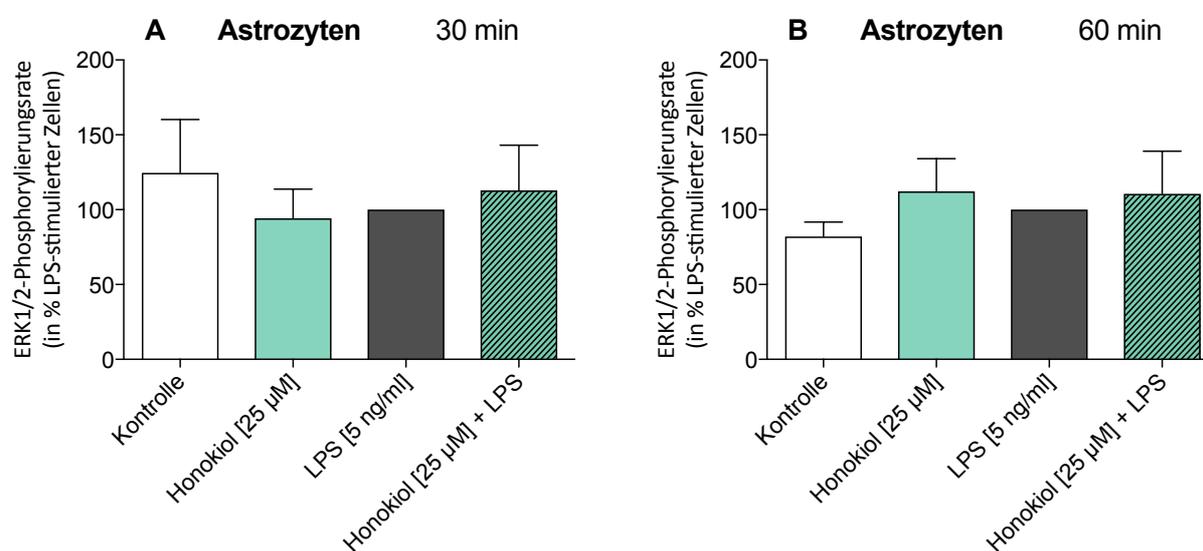


Abb. 14.2: Densitometrische Auswertung der Western Blot-Ergebnisse über den Einfluss von Honokiol auf die Phosphorylierung der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK)1/2 in LPS-stimulierten Astrozyten nach 30- und 60-minütiger Inkubation. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten ließ sich kein modulatorischer Einfluss von Honokiol auf die Phosphorylierungsrate von ERK1/2 in den Astrozyten nachweisen (A). Bereits die unstimulierte Kontrolle zeigte eine ERK1/2-Phosphorylierungsrate auf ähnlichem Niveau der ERK1/2-Phosphorylierungsrate nach LPS-Stimulation. Im Folgenden sind jeweils Inkubationsansatz und die ERK1/2-Phosphorylierungsrate nach 30-minütiger Inkubation angegeben: Kontrolle: 124,60 %; Honokiol [25 µM]: 94,20 %; LPS [5 ng/ml]: 100 %; Honokiol [25 µM] + LPS [5 ng/ml]: 112,73 %. Auch nach 60-minütiger Inkubation war keine Tendenz einer Modulation der ERK1/2-Phosphorylierungsrate durch Honokiol nachweisbar (B). Die ERK1/2-Phosphorylierungsrate der Kontrolle lag auf demselben Niveau der ERK1/2-Phosphorylierungsrate nach LPS-Stimulation. Im Folgenden sind jeweils Inkubationsansatz und die ERK1/2-Phosphorylierungsrate nach 60-minütiger Inkubation angegeben: Kontrolle: 82,03 %; Honokiol [25 µM]: 112,33 %; LPS [5 ng/ml]: 100 %; Honokiol [25 µM] + LPS [5 ng/ml]: 110,58 %. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM (n = 4 (A), n = 4 (B)).

Nach einer 30- sowie nach einer 60-minütigen Inkubation der Astrozyten wies die Kontrolle eine ERK1/2-Phosphorylierungsrate auf ähnlichem Niveau der nach LPS-Stimulation auf.

Weder durch Inkubation der Zellen mit Honokiol allein, noch durch Koinkubation mit Honokiol und LPS ließ sich eine Modulation der ERK1/2-Phosphorylierungsrate erkennen.

4.9 Nachweis von KLF-4 in Mikroglia und Astrozyten durch Immunfluoreszenzfärbung

In vorangegangenen Studien wurde dem Transkriptionsfaktor *Krüppel-like factor* (KLF-4) eine bedeutende Rolle im Rahmen von Entzündungsprozessen zugeschrieben. Er konnte sowohl in Makrophagen als auch in Mikroglia nachgewiesen werden und ist eng mit dem NF- κ B-Signaltransduktionsweg gekoppelt. Über die Expression in Astrozyten ist bisher wenig bekannt.

Mittels Immunfluoreszenzfärbung konnte der Transkriptionsfaktor KLF-4 in dieser Arbeit sowohl in Mikroglia (Abb. 15.1) als auch in Astrozyten (Abb. 15.2) nachgewiesen werden.

KLF-4 stellt sich in den folgenden Abbildungen grün dar, während die Zellkerne nach Inkubation mit Bisbenzimid unter dem Fluoreszenzmikroskop blau fluoreszierten.

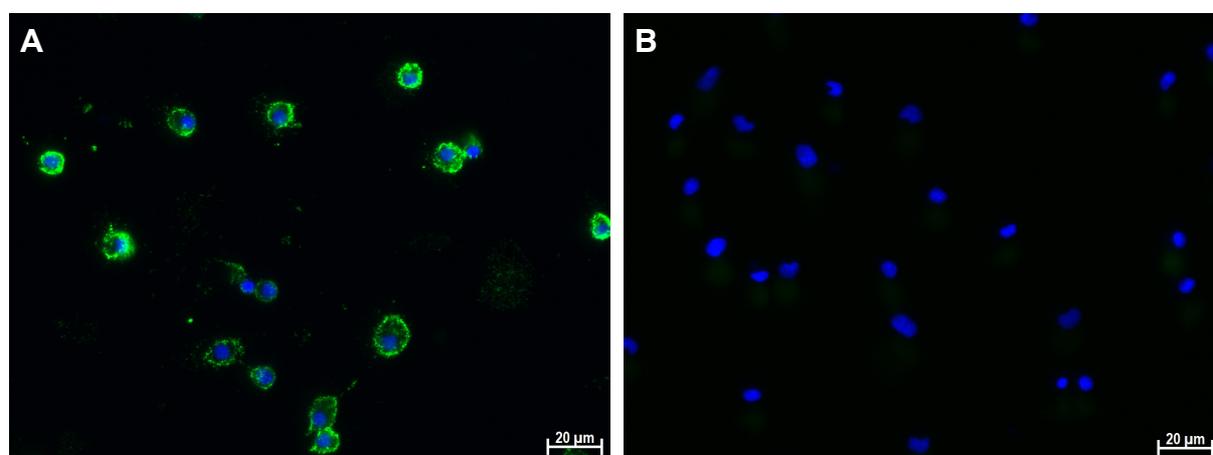


Abb. 15.1: Nachweis von Krüppel-like factor (KLF)-4 in Mikroglia mittels Fluoreszenzfärbung. Die Detektion von KLF-4 erfolgte an unstimulierten Mikroglia, die für 24 Stunden auf Deckgläsern kultiviert wurden, mittels eines spezifischen Primärantikörpers gegen KLF-4 und eines grün fluoreszierenden Sekundärantikörpers. Die Zellkerne wurden mit Bisbenzimid gefärbt. Der Transkriptionsfaktor KLF-4 wurde spezifisch in den unstimulierten Mikroglia nachgewiesen und fluoreszierte grün, während die Zellkerne blau fluoreszierten (A). In den Färbekontrollen wurden die Mikroglia nur mit dem grün fluoreszierenden Sekundärantikörper und Bisbenzimid inkubiert. In den Kontrollen waren nur die blau fluoreszierenden Zellkerne sichtbar (B). Dargestellt sind repräsentative Fotos aus $n = 3$ unabhängigen Versuchen.

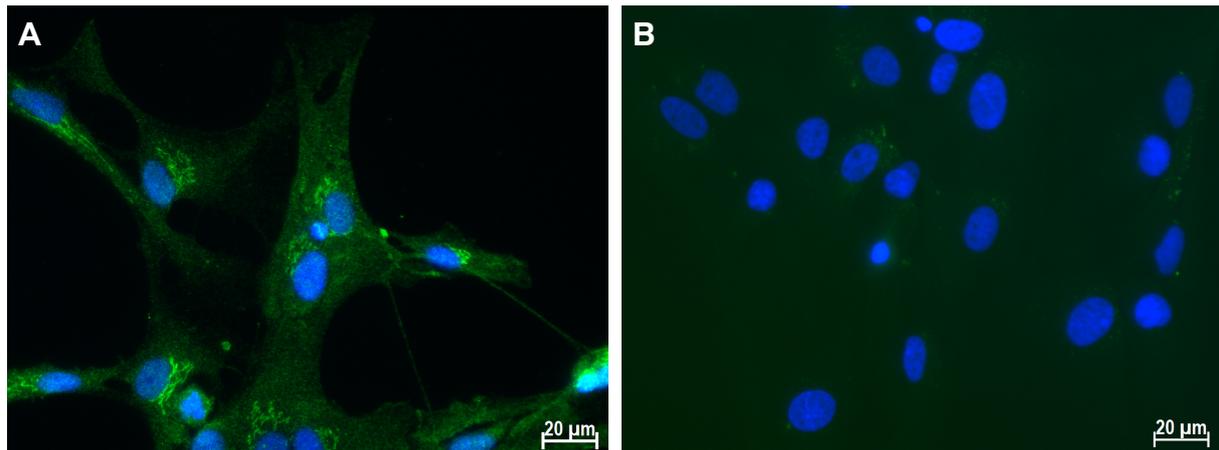


Abb. 15.2: Nachweis von Krüppel-like factor (KLF)-4 in Astrozyten mittels Fluoreszenzfärbung. Die Detektion von KLF-4 erfolgte an unstimulierten Astrozyten, die für 72 Stunden auf Deckgläsern kultiviert wurden, mittels eines spezifischen Primärantikörpers gegen KLF-4 und eines grün fluoreszierenden Sekundärantikörpers. Die Zellkerne wurden mit Bisbenzimid gefärbt. Der Transkriptionsfaktor KLF-4 wurde spezifisch in den unstimulierten Astrozyten nachgewiesen und fluoreszierte grün, während die Zellkerne blau fluoreszierten (A). In den Färbekontrollen wurden die Astrozyten nur mit dem grün fluoreszierenden Sekundärantikörper und Bisbenzimid inkubiert. In den Kontrollen waren nur die blau fluoreszierenden Zellkerne sichtbar (B). Dargestellt sind repräsentative Fotos aus $n = 3$ unabhängigen Versuchen.

Dies ist einer der ersten Nachweise, dass neben den Mikroglia auch Astrozyten den Transkriptionsfaktor KLF-4 exprimieren. Dieser befindet sich in den unstimulierten Astrozyten unmittelbar in Zellkernnähe. Die Färbekontrollen ohne Primärantikörper zeigten keine grüne Fluoreszenz, sodass dadurch bestätigt wurde, dass spezifisch KLF-4 angefärbt wurde.

5 Diskussion

Im Folgenden sollen die Ergebnisse in den Kontext der aktuellen Literatur gebracht und die Möglichkeit des Einsatzes von Honokiol als Therapeutikum im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen diskutiert werden.

Ein wesentlicher Pathomechanismus neurodegenerativer Erkrankungen ist die Mikroglia-assoziierte Neuroinflammation. Bereits vor über 20 Jahren wurden neuroinflammatorische Prozesse bei der Alzheimer-Krankheit beschrieben [26]. Weitere Studien wiesen diese beim Morbus Parkinson [65, 91, 117, 155-157], der Amyotrophen Lateralsklerose und der Multiplen Sklerose nach [6, 47, 158]. Bislang ist nicht eindeutig geklärt, ob das Entzündungsgeschehen die primäre Ursache dieser Erkrankungen darstellt oder ob die Neuroinflammation reaktiv aus dem neuronalen Untergang resultiert. Es verdichten sich jedoch die Hinweise, dass die chronische Immunreaktion mit der langanhaltenden Produktion proinflammatorischer Mediatoren maßgeblich an der Neurodegeneration beteiligt ist und damit das Krankheitsfortschreiten unterhält [6].

Trotz der begründeten Erwartung und einiger wissenschaftlicher Teilerfolge neurodegenerative Erkrankungen durch antiinflammatorische Medikamente therapieren zu können, ist deren Erforschung bislang auch von Rückschlägen begleitet [159]: Anhand von Mausmodellen der Alzheimer-Krankheit konnte durch den Einsatz Nichtsteroidaler Antirheumatika (NSAIDs) eine Eindämmung der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine durch Mikroglia sowie eine Reduktion der Ablagerung von Amyloid-Plaques nachgewiesen werden [160]. Auch epidemiologische Studien an Patienten, die aufgrund entzündlicher Systemerkrankungen eine länger andauernde NSAID-Therapie erhalten haben, ergaben den Hinweis auf ein verringertes Auftreten eines M. Alzheimer oder M. Parkinson [161, 162]. Neuere klinische Studien konnten jedoch keinen signifikant protektiven Effekt durch NSAIDs bestätigen [162-165].

Dieser Misserfolg lässt sich u. a. durch einen verzögerten Therapiestart und eine unzureichende Therapiedauer erklären. Ein wesentlicher Grund könnte jedoch sein, dass NSAIDs lediglich die Expression proinflammatorischer Zytokine durch Mikroglia inhibieren, ohne deren Transformation in den antiinflammatorischen Phänotyp M2 zu bewirken [28, 166].

Die physiologische Inflammation ist durch ein fein abgestimmtes Auftreten des M1- und M2-Phänotyps der Mikroglia gekennzeichnet und dadurch ein ZNS-protectives Geschehen. Der M1-Phänotyp ist der Initiator der Entzündungsreaktion und mit der Expression proinflammatorischer Mediatoren u. a. für die Beseitigung von eindringenden Mikroorganismen verantwortlich, kann jedoch bei langanhaltender Aktivität umliegende Neurone maßgeblich schädigen. Der M2-Phänotyp dient der Wiederherstellung der Gewebemöostase. In diesem Status sind die Mikroglia befähigt, toxische Proteinaggregate, z. B. die Amyloid-Plaques beim M. Alzheimer, zu phagozytieren und die Gewebereparatur durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren zu initiieren [60, 167].

Extrazellulär aggregiertes α -Synuclein, Tau-Proteine und Amyloid-Plaques bewirken die Transformation der Mikroglia in den M1-Phänotyp mit der Folge der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. In diesem Status ist ihre Fähigkeit Proteinaggregate abzubauen stark herabgesetzt [28, 60]. Während zu Beginn des M. Alzheimer und des M. Parkinson das Gleichgewicht noch auf Seite der M2-Zellen liegt, dominiert im Verlauf der Erkrankungen der M1-Phänotyp. Die neurotoxischen Proteinaggregate können nicht mehr abgebaut werden, die Inflammation spitzt sich weiter zu und es entsteht ein *Circulus vitiosus*, der in einem irreversiblen Neuronenverlust mündet [60, 168, 169]. Als mögliche Ursache wird, neben der Exposition der Mikroglia mit den Proteinaggregaten, eine mit dem Altern einhergehende Verlagerung des immunologischen Gleichgewichts in Richtung Proinflammation angesehen [27, 168, 169]. Während vermehrt proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α exprimiert werden, sinkt die Konzentration der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-4 im gealterten ZNS (Kap. 1.2.5) [27, 60, 119, 170].

Die Arbeitsgruppen um Shimizu *et al.* sowie Michelucci *et al.* konnten *in-vitro* nachweisen, dass die Stimulation primärer Mikroglia mit IL-4 und IL-10 bzw. IL-13 zu einer Transformation der Zellen in den M2-Phänotyp führt, mit der Folge eines deutlich verstärkten Abbaus von Amyloid- β [169, 171]. In einem *in-vivo* Alzheimer-Modell an Mäusen konnten diese Befunde bestätigt werden: Nach intrazerebraler Injektion von IL-4 und IL-13 zeigte sich eine verminderte A β -Konzentration im ZNS bei einem vermehrten Auftreten der M2-Mikroglia. Dieser Befund ging mit einer verbesserten Kognition der Mäuse einher [172]. Die Arbeitsgruppe um Michelucci konnte zeigen, dass selbst kleine Dosen von IL-10 und IL-4

den antiinflammatorischen Status der Mikroglia, sogar nach deren Stimulation mit Amyloid- β , aufrecht erhalten können [169].

Um neurodegenerative Erkrankungen anhand des Pathomechanismus der Neuroinflammation zu behandeln, sind folglich Medikamente notwendig, die nicht nur eine Eindämmung der Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren bewirken, sondern die Immunreaktion in Richtung Antiinflammation und Neuroprotektion, im Sinne des M2-Phänotyps der Mikroglia, modulieren [167, 173]. Vor diesem Hintergrund wurde Honokiol in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Dabei ist die Auswirkung auf die Astrozyten nicht außer Acht zu lassen. Lange Zeit galten die Astrozyten als die neuroprotektiven Zellen im Entzündungsgeschehen. Physiologisch exprimieren diese „Ruhe-signale“, die die Mikroglia im antiinflammatorischen M2-Phänotyp bewahren und deren Expression von Gewebereparaturfaktoren fördern [169]. Mittlerweile ist bekannt, dass sie im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen ebenfalls proinflammatorische Zytokine exprimieren und durch die Freisetzung von CSF-1 die Proliferation der Mikroglia induzieren [27, 65, 66, 72]. Weiterhin gibt es Nachweise, dass Astrozyten reaktive Nitrogen- und Sauerstoffspezies exprimieren können [14].

Nach der aktuellsten Literatur werden die Astrozyten, ähnlich wie die Mikroglia, in zwei unterschiedliche Phänotypen unterschieden: A1 und A2. Während der A2-Phänotyp neuroprotektive Faktoren freisetzt und die Formation von Synapsen, die Phagozytose von Zelldebris und die Gewebereparatur unterstützt, ist der durch aktivierte Mikroglia induzierte A1-Phänotyp gekennzeichnet durch die Expression neurotoxischer Mediatoren. Dabei wurde durch die Arbeitsgruppe um Liddelow eine verstärkte Ansammlung des A1-Phänotyps der Astrozyten in *post-mortem* Untersuchungen der Gehirne u. a. von Patienten mit M. Alzheimer und M. Parkinson nachgewiesen [174].

5.1 In-vitro Versuche an Mikroglia und Astrozyten

In dieser Arbeit wurde die immunmodulatorische Wirkung des Polyphenols Honokiol auf primäre Mikroglia und primäre Astrozyten *in-vitro* untersucht. Als ein anerkanntes Versuchsmodell [175, 176] wurden die Zellen durch Stimulation mit LPS, einem bakteriellen Endotoxin, aktiviert. Dadurch lässt sich eine Neuroinflammation, wie sie beispielsweise beim M. Parkinson oder M. Alzheimer auftritt, simulieren und die Auswirkung von Therapeutika

auf das Genexpressionsprofil der Zellen ermitteln [177]. LPS aktiviert Mikroglia und Astrozyten, ähnlich wie die A β -Aggregate beim M. Alzheimer, über den Rezeptor TLR4 und den Co-Rezeptor CD14 [6, 85, 178-180]. Die Folge ist u. a. eine verstärkte Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1 β und TNF- α , sowie eine durch erhöhte iNOS-Expression bedingte vermehrte Freisetzung von NO [85, 104, 180, 181].

Die erhöhte Expression dieser proinflammatorischen Mediatoren war in der vorliegenden Arbeit nach einer LPS-Stimulation sowohl in den Mikroglia als auch in den Astrozyten (abgesehen von NO und iNOS) nachweisbar. Weiterhin bestätigte die mikroskopische Beurteilung der Mikroglia nach Coomassie-Blau-Färbung einen aktivierten Phänotyp nach deren Stimulation mit LPS.

Zu beachten ist, dass die Kultivierung der Zellen an sich einen Stimulationsreiz darstellt. Um diesen Reiz zu verringern und die Zellen als Ausgangspunkt für die Versuche in dieser Arbeit in ihrem deaktivierten Phänotyp zu bewahren, wurden die Mikroglia nach der Zellaussaat zunächst für 24 Stunden und die Astrozyten für 72 Stunden vorinkubiert.

Die mikroskopische Beurteilung der Mikroglia nach Coomassie-Blau-Färbung zeigte weiterhin, dass sich die Kontrollen der Mikroglia in ihrer ramifizierten, ruhenden Form befanden.

Zusammenfassend war somit eine suffiziente Versuchsgrundlage zur Beurteilung der Wirkung von Honokiol in einem inflammatorischen *in-vitro* Versuchsmodell gegeben.

5.2 Toxizität von Honokiol und mögliche Nebenwirkungen

In dieser Arbeit wurde eine Honokiol-Konzentration von 10 μ M für die Versuche mit den Mikroglia und von 25 μ M für die Versuche mit den Astrozyten verwendet, nachdem zuvor die toxische Grenze Honokiols mittels MTT-Test bestimmt wurde. Dabei ließ sich eine Verringerung der MTT-Reduktion, die auf eine Zelldysfunktion oder den Zelltod hindeutet, erst ab einer Konzentration von 50 μ M für Mikroglia und ab einer Konzentration von 100 μ M für Astrozyten feststellen. Bei der nächstkleineren Konzentration von 25 μ M für Mikroglia und 50 μ M für Astrozyten trat keine Verringerung der MTT-Reduktion auf. Für die weiteren Versuche wurde mit 10 μ M für Mikroglia und 25 μ M für Astrozyten ein ausreichender „Sicherheitsabstand“ gewählt, um zu gewährleisten, dass die Versuche mit intakten Zellen durchgeführt werden und eine mögliche Verringerung der Expression bzw. Freisetzung

proinflammatorischer Mediatoren nicht auf der Grundlage einer Störung der Zellfunktion oder gar einer reduzierten Zellanzahl basiert. Durch die mikroskopische Beurteilung der Zellmorphologie nach Inkubation mit den o. g. Konzentrationen wurde die Unversehrtheit der Zellen bestätigt.

Die in der vorliegenden Arbeit gewählten Honokiol-Konzentrationen stehen im Einklang mit den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen. Kaushik *et al.* sowie Chuang *et al.* verwendeten in ihren Experimenten an Mikroglia-Zelllinien ebenfalls Honokiol-Konzentrationen von bis zu 10 μM [127, 143]. Die Arbeitsgruppe um Zhang wies bei ihrer *in-vivo* Studie an Mäusen eine mittlere letale Dosis (LD_{50}) von 50,5 mg/kg KG bei intravenöser Applikation einer Honokiol-Mikroemulsion nach. In dieser Konzentration ergaben sich Degenerationen der Leber-Zellen, Protein-ähnliche Ablagerungen in den Glomeruli der Nieren, Lungenödeme und Einblutungen in das Lungenparenchym. In der Testung einer sub-chronischen Applikation über 30 Tage betrug die höchste nicht-letale Dosis 500 $\mu\text{g/kg KG}$ [132]. Diese Konzentration beträgt das 100fache der Konzentration Honokiols, die nach intraperitonealer Applikation in Mäusen antiinflammatorische Eigenschaften auf Mikroglia aufwies [143]. Aufgrund dieser Versuche lässt sich eine hohe therapeutische Breite Honokiols annehmen.

Als weiteres Ergebnis konnte bei den MTT-Versuchen der vorliegenden Dissertation eine geringe Steigerung der MTT-Reduktion durch Mikroglia nach Inkubation mit 10 μM Honokiol und durch Astrozyten nach Inkubation mit 25 μM Honokiol gezeigt werden, die für einen zellproliferativen Einfluss der Substanz spricht.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der heutigen Erkenntnis, dass sich die Mikroglia und die Astrozyten durch Proliferation lokal selbst erhalten können [53, 65, 182, 183]. An dieser Stelle ist wichtig zu erwähnen, dass sich die Mikroglia und Astrozyten nach alleiniger Honokiol-Inkubation in den weiteren Versuchen dieser Arbeit in Bezug auf das Gen-Expressionsprofil im nicht-aktivierten Phänotyp befanden, der sich auch in der mikroskopischen Beurteilung der Mikroglia widerspiegelte, sodass die Honokiol-induzierte Zellproliferation eher protektive als negative Effekte im ZNS ausüben sollte.

Weiterhin zeigte der MTT-Test in der vorliegenden Arbeit, dass die LPS-bedingte verminderte Zellüberlebensrate der Astrozyten durch eine Stimulation mit Honokiol in den Konzentrationen von 10 μM bis 50 μM nicht nur aufgehoben, sondern sogar deutlich

gesteigert wurde. Dieses Ergebnis deutet auf eine zellprotektive Wirkung Honokiols auf Astrozyten hin.

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht die Toxizität auf Neurone überprüft. Fukuyama *et al.* zeigten *in-vitro* eine deutlich herabgesetzte Zellviabilität primärer Neurone der Ratte bei einer Honokiol-Inkubation in einer Konzentration von 100 μM [138]. Da diese Konzentration um das 10- bzw. 4-fache über der in der vorliegenden Dissertation verwendeten Konzentration liegt, spricht das Ergebnis nicht gegen den Einsatz von Honokiol als potentielles Therapeutikum. Im Gegenteil: Die Arbeitsgruppe um Fukuyama wies in den Konzentrationen von 0,1 bis 10 μM Honokiol einen konzentrationsabhängigen neurotrophen Effekt *in-vitro* auf primäre Neurone der Ratte nach [138]. Dies entspricht der Honokiol-Konzentration, die in der vorliegenden Arbeit antiinflammatorisch auf Mikroglia wirkte.

Da Honokiol bislang kaum empirisch in therapeutischer Dosierung an Menschen eingesetzt wird, ist wenig über Langzeitnebenwirkungen bekannt. Honokiol werden antikoagulatorische Eigenschaften zugeschrieben, sodass der Einsatz bei Patienten mit hämorrhagischen Erkrankungen oder bereits bestehender antikoagulatorischer Therapie in Hinblick auf ein gesteigertes Blutungsrisiko oder auf mögliche Interaktionen weiter erforscht und deren Einsatz als kritisch bewertet werden sollte [129]. Relativiert werden müssen diese Bedenken nach den Ergebnissen von Zhang *et al.*, die keine signifikante Änderung der Koagulationsparameter Prothrombinzeit (PT), aktivierte partielle Thromboplastinzeit (*activated partial thromboplastin time*, aPTT), Plasmathrombinzeit (PTZ) und Fibrinogen bei 30 tägiger Applikation von 100 - 2.500 μg Honokiol/kg KG/Tag in Ratten feststellen konnten [132]. Als wichtige Nebenwirkung für die klinische Anwendung sollte eine bei Mäusen beobachtete Irritation der Gefäßwände nach intravenöser Applikation von Honokiol-Mikroemulsionen beachtet werden [132]. Zusätzlich wurden für Honokiol Diazepam-ähnliche Nebenwirkungen wie Amnesie, motorische Störungen und Sedierung beschrieben [125, 148]. Diese könnten die Sturzneigung von Parkinson-Patienten erhöhen sowie die kognitiven Fähigkeiten von Patienten mit M. Alzheimer verschlechtern. Sie treten jedoch erst bei einer sehr hohen, vermutlich weit oberhalb der für die antiinflammatorische und neuroprotektive Wirkung notwendigen Dosierung auf [125, 148].

5.3 Einfluss von Honokiol auf die Morphologie und das Genexpressionsprofil der Mikroglia und Astrozyten

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Honokiol die Fähigkeit besitzt, die Expression und Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren in LPS-aktivierten primären Mikroglia und Astrozyten signifikant zu reduzieren. Bereits die morphologische Untersuchung der Mikroglia ergab den Hinweis, dass Honokiol in der Lage ist, die LPS-bedingte Aktivierung der Zellen zu unterdrücken. Nach LPS-Stimulation zeigten sich die Zellen in ihrer amöboiden Form, im Sinne des klassisch aktivierten M1-Phänotyps, während sie nach Kostimulation mit Honokiol und LPS in ihrer ruhenden, ramifizierten Form verblieben. Bei den Astrozyten ließ sich keine Änderung des morphologischen Phänotyps feststellen. Es sind in der Literatur jedoch auch keine morphologischen Änderungen beschrieben, die auf den Aktivitätszustand der Astrozyten rückschließen lassen.

NO-Freisetzung und iNOS-Expression: NO ist bei hoher Konzentration als eigenständige neurotoxische Substanz sowie als Ausgangspunkt für die Bildung von RNS ein wesentlicher Mediator der Neuroinflammation (Kap. 1.2.3) [21, 75-77]. Durch die exzessive Freisetzung von NO zusammen mit ROS entsteht ein verheerendes Ungleichgewicht zwischen oxidativen Stressmechanismen und antioxidativen Prozessen. Dieser Mechanismus trägt wesentlich zum neuronalen Sterben im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen bei [81, 82]. Sowohl beim M. Parkinson als auch beim M. Alzheimer wiesen einige Arbeitsgruppen eine vermehrte Anzahl oxidiertes Proteine, DNA und Eisen sowie Lipidperoxide im ZNS nach, bei einer verminderten Konzentration des Antioxidans Glutathion [81, 104, 184]. Dabei ist die SNpc aufgrund ihrer hohen metabolischen Rate unter pro-oxidativen Bedingungen besonders anfällig für neurotoxische oxidative Stressmechanismen [82]. Weiterhin begünstigt oxidativer Stress die Bildung von A β und die anschließende Nitrierung dieses Proteins verstärkt dessen Neigung zur Aggregation [185]. A β -Aggregate wiederum aktivieren Mikroglia über deren TLRs mit der Folge der weiteren Produktion von NO und ROS sowie anderen, bereits beschriebenen proinflammatorischen Mediatoren [6]. Die anhaltend erhöhte Freisetzung von NO führt zu einer exzessiven Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat. Neben der dadurch entstehenden Glutamatergischen Neurotoxizität induziert der Neurotransmitter die weitere NO-Bildung in Neuronen [74, 186]. Zusammenfassend entsteht also ein sich selbst verstärkender neurotoxischer Kreislauf.

In dieser Arbeit ließ sich nach 24-stündiger LPS-Stimulation eine stark erhöhte NO-Konzentration im Zellkulturüberstand der Mikroglia messen, welche nach Koinkubation mit Honokiol und LPS signifikant reduziert wurde. Des Weiteren zeigte sich eine Korrelation der NO-Freisetzung mit der iNOS-mRNA-Expressionsrate, welche in den LPS-aktivierten Mikroglia nach Inkubation mit Honokiol ebenfalls signifikant reduziert wurde, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die NO-Freisetzung über die iNOS-Expression reguliert wird. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Untersuchungen von Chao *et al.*, die eine konzentrationsabhängige Reduktion der NO-Freisetzung in LPS-stimulierten Makrophagen nach Inkubation mit 1 μ M bis 10 μ M Honokiol zeigen konnten [141], sowie mit den Ergebnissen von Kaushik *et al.*, die neben einer Reduktion der NO-Freisetzung auch eine reduzierte iNOS-Expression nach Honokiol-Inkubation in einer Mikroglia-Zelllinie der Maus nachwiesen [143].

Von *Post-mortem* Untersuchungen an Patienten mit M. Parkinson ist eine verstärkte iNOS-Expression in Mikroglia der *Substantia nigra* (SN) bekannt [187]. Die Arbeitsgruppe um Arimoto konnte im Tiermodell zeigen, dass durch Inhibition dieser Synthese das Sterben dopaminerger Neurone nach LPS-Injektion in die SN signifikant verringert wird. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass das NO-induzierte Neuronensterben auf der Grundlage einer erhöhten iNOS-Expression basiert [85]. Die Reduktion der iNOS-mRNA-Expression, wie sie in der vorliegenden Arbeit nach Honokiol-Inkubation gezeigt wurde, stellt somit einen potentiellen Ansatz im Rahmen der Therapie des M. Parkinson dar.

Kummer *et al.* konnten in einem *in-vivo* Alzheimer-Modell an Mäusen eine verringerte Nitrierung und Aggregation von A β durch den Einsatz eines spezifischen iNOS-Inhibitors nachweisen. Dieses Ergebnis ging mit einer besseren kognitiven Funktion der Tiere einher [188]. Vor diesem Hintergrund verspricht der Einsatz von Honokiol durch eine Reduktion der iNOS-mRNA-Expression einen weiteren wesentlichen Pathomechanismus des M. Alzheimer durchbrechen zu können und sollte in diesem Hinblick weiter erforscht werden. Trotz einiger Nachweise, dass auch Astrozyten im Rahmen der Neuroinflammation über die verstärkte iNOS-Expression vermehrt NO freisetzen [14], ließ sich in der vorliegenden Arbeit keine signifikante Änderung der NO-Freisetzung durch Astrozyten nach LPS- oder Honokiol-Inkubation feststellen, sodass auf die Untersuchung der iNOS-mRNA-Expression dieser Zellen verzichtet wurde.

Reduktion der proinflammatorischen Zytokine: Das Ungleichgewicht zwischen dem M1- und M2-Phänotyp der Mikroglia mit der exzessiven Freisetzung proinflammatorischer Zytokine stellt einen wesentlichen Pathomechanismus in neurodegenerativen Erkrankungen dar (Kap. 1.2.3 und 1.2.4) [60, 115]. So zeigten *post-mortem* Untersuchungen der Gehirne von Patienten mit M. Parkinson eine verstärkte Ansammlung von aktivierten Mikroglia und proinflammatorischen Zytokinen in der SN. Weiterhin konnte ein Anstieg der mikroglialen Aktivität in Frühstadien des M. Parkinson mittels Positronen-Emissions-Tomographie nachgewiesen werden, welcher negativ mit der Dichte dopaminerger Nervenzellenden und positiv mit der Ausprägung der motorischen Symptomatik korrelierte [7, 189, 190]. Zusätzlich sind beim M. Parkinson erhöhte Spiegel der Zytokine IL-6 und IL-1 β im Liquor nachweisbar [191, 192].

Dabei ist die Funktion von IL-6 im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen dichotom: Muller *et al.* beschrieben eine umgekehrte Korrelation zwischen dem erhöhten IL-6-Spiegel und der Krankheitsausprägung bei Parkinson-Patienten [193]. So wird spekuliert, dass in einem frühen Krankheitsstadium die IL-6-Freisetzung positive Effekte auf das Zellüberleben der Neurone haben kann [193]. Damit bleibt auch zu diskutieren, ob erhöhte IL-6 Serumwerte die Ursache für ein nachgewiesenes gesteigertes Parkinson-Risiko darstellen, oder ob diese nicht viel eher Ausdruck einer beginnenden Erkrankung sind, mit dem Versuch eines Kompensationsmechanismus des ZNS [194]. Während sich Studien über mögliche erhöhte IL-6-Spiegel im Liquor von Alzheimer-Patienten widersprechen [195, 196], wurden in *post-mortem* Untersuchungen der Gehirne dieser Patienten erhöhte IL-6-Spiegel in unmittelbarer Nähe der A β -Plaques nachgewiesen [197]. Im Rahmen der Pathogenese des M. Alzheimer ist bekannt, dass IL-6 die Synthese von APP fördert [198]. Während die alleinige *in-vitro* Stimulation von Neuronen mit IL-6 keinen zellulären Schaden auszulösen scheint, wird der neurotoxische Effekt von A β durch die Kombination mit IL-6 signifikant gesteigert [88, 199]. Zusammenfassend ist die Funktion von IL-6 im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen nicht eindeutig als neurotoxisch oder neuroprotektiv zu beurteilen. Die erhöhte Expression ist in Zusammenschau mit dem übrigen Genexpressionsprofil, der Dynamik und Konzentration sowie der Begleitpathologien zu werten. Aus diesem Grund erscheint eine vollständige Blockierung der IL-6-Expression in der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen nicht als

sinnvoll, aber wohl hingegen eine Reduktion der IL-6-Freisetzung im Sinne einer Neuorientierung der Zellen in den antiinflammatorischen Phänotyp M2.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression und Proteinfreisetzung von IL-6 nach 24-stündiger Inkubation mit Honokiol in LPS-aktivierten Mikroglia gezeigt werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Versuchen von Kaushik *et al.*, die in einer Mikroglia-Zelllinie der Maus eine konzentrationsabhängige Reduktion der LPS-induzierten Proteinfreisetzung von IL-6 nach 12-stündiger Inkubation mit 1 μM sowie 10 μM Honokiol nachwies [143]. Weiterhin zeigte die Arbeitsgruppe in einem *in-vivo* Experiment an Mäusen eine signifikante Reduktion der IL-6-Freisetzung im ZNS nach intraperitonealer Injektion von Honokiol und LPS im Vergleich zu einer alleinigen LPS-Injektion [143].

Eine Modulation der mRNA-Expression und Proteinfreisetzung von IL-6 in Astrozyten durch Honokiol ist bislang nicht beschrieben. Als eine der ersten Arbeiten zeigt die vorliegende Dissertation eine signifikante Reduktion sowohl der IL-6-mRNA-Expression nach 3-stündiger Inkubation als auch der IL-6-Proteinfreisetzung nach 24-stündiger Inkubation mit Honokiol in LPS-aktivierten Astrozyten.

Als ein weiteres proinflammatorisches Zytokin, welches in erhöhter Konzentration beim M. Parkinson und M. Alzheimer nachweisbar ist [90, 91], wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Honokiol auf die mRNA-Expression von IL-1 β in Mikroglia und Astrozyten untersucht. Der Einfluss von IL-1 β am neurodegenerativen Geschehen wurde bereits in Kap. 1.2.3 mit der Aktivierung proinflammatorischer Signalkaskaden über NF- κB und der MAP-Kinasen, sowie mit der Erhöhung der neuronalen Vulnerabilität, der neuronalen Apoptose-Induktion, der Permeabilitätssteigerung der Blut-Hirn-Schranke und der Rekrutierung von peripheren Immunzellen, erläutert.

In *in-vivo* Versuchen konnten Carvey *et al.* einen verstärkten Untergang dopaminerger Neurone nach intraparenchymaler Injektion von IL-1 β nachweisen [104]. In *in-vitro* Studien wurde durch einen IL-1 β -neutralisierenden Antikörper der IL-1 β -abhängige Zelluntergang Tyrosinhydroxylase-positiver Zellen (als Index für dopaminerge Neurone) in primärer *mesencephaler* Kultur nach LPS-Induktion signifikant reduziert [200]. Somit verspricht die Reduktion von IL-1 β , eine mögliche therapeutische Wirkung im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen zu haben. Da IL-1 β in geringer Konzentration jedoch auch neuroprotektive

Effekte zugeschrieben werden [96, 100], erscheint eine Wiederherstellung der Homöostase der IL-1 β -Freisetzung weitaus sinnvoller als deren vollständige Blockade.

Ein Einfluss von Honokiol auf die mRNA-Expression oder Proteinfreisetzung des zentralen proinflammatorischen Zytokins IL-1 β in Mikroglia ist in der Literatur bislang nicht beschrieben. Als eine der ersten Arbeiten zeigt die vorliegende Dissertation eine signifikante Reduktion der LPS-induzierten mRNA-Expression von IL-1 β in Mikroglia nach 24-stündiger Inkubation mit Honokiol. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Ergebnissen von Lee *et al.*, die eine signifikante Reduktion der LPS-induzierten IL-1 β -Proteinfreisetzung in einer Makrophagen-Zelllinie der Maus nach 12-stündiger Inkubation mit 10 μ M sowie 20 μ M Honokiol zeigen konnten [201].

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig eine Modulation der IL-1 β -mRNA-Expression in Astrozyten durch Honokiol nachgewiesen: Nach 3-stündiger Koinkubation mit Honokiol und LPS wurde die IL-1 β -mRNA-Expression im Vergleich zu den LPS-behandelten Zellen signifikant reduziert.

Als drittes proinflammatorisches Zytokin wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Honokiol auf die mRNA-Expression und Proteinfreisetzung von TNF- α in Mikroglia und Astrozyten untersucht.

TNF- α wird im Rahmen des neuroinflammatorischen Geschehens von Mikroglia und Astrozyten freigesetzt und aktiviert u. a. über die MAP-Kinasen und NF- κ B die Expression sämtlicher proinflammatorischer Mediatoren [70]. Weiterhin kann TNF- α direkt die neuronale Apoptose induzieren und ist so maßgeblich am Voranschreiten neurodegenerativer Erkrankungen beteiligt [70, 102, 202, 203]. So finden sich in der SN von Parkinson-Patienten vermehrt TNF- α -exprimierende Gliazellen, während die dopaminergen Neurone den TNF-Rezeptor (TNFR) aufweisen [103]. Auch beim M. Alzheimer sind erhöhte TNF- α -Spiegel im ZNS, besonders in unmittelbarer Umgebung der A β -Plaques, sowie im Liquor der Patienten, nachweisbar. Die erhöhten Spiegel des Zytokins scheinen mit dem Krankheitsstadium zu korrelieren [90, 101, 204]. Weiterhin gibt es Hinweise, dass erhöhte TNF- α -Spiegel bei gesunden Menschen das Risiko erhöhen, an einem M. Alzheimer zu erkranken [101, 205-207]. Dies lässt sich u. a. dadurch erklären, dass das Zytokin die Bildung von A β fördert [208-210].

In der vorliegenden Dissertation reduzierte Honokiol signifikant die LPS-induzierte TNF- α -mRNA-Expression nach 3-stündiger Inkubation, sowie die LPS-induzierte TNF- α -Proteinfreisetzung nach 24-stündiger Inkubation in Mikroglia. Diese Ergebnisse stimmen mit denen der Arbeitsgruppe um Kaushik überein, die eine konzentrationsabhängige Reduktion der LPS-induzierten TNF- α -Proteinfreisetzung in einer Mikroglia-Zelllinie nach 12-stündiger Inkubation mit 1 μ M bzw. 10 μ M Honokiol nachwies [143]. Ähnliche Ergebnisse wurden von Zhang *et al.* beschrieben [211]. Die Arbeitsgruppe zeigte eine Reduktion der TNF- α -Proteinfreisetzung bereits nach 6-stündiger Inkubation mit Honokiol in LPS-aktivierten primären Mikroglia der Ratte. Weiterhin konnte die Arbeitsgruppe eine Reduktion der TNF- α -Freisetzung in Glia-Kokulturen nachweisen [211]. Eine Modulation der TNF- α -Expression in isolierten Astrozyten wurde bislang hingegen nicht beschrieben.

In der vorliegenden Dissertation wurde somit erstmalig eine Reduktion der TNF- α -mRNA-Expression durch Honokiol nach 3-stündiger Inkubation sowie der TNF- α -Proteinfreisetzung nach 24-stündiger Inkubation in primären Astrozyten nachgewiesen. Somit verspricht Honokiol aufgrund der Eigenschaft einer Reduktion der TNF- α -Freisetzung ein potentielles Therapeutikum im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen zu sein.

Bei einem Einsatz von Pharmaka, die auf einer Reduktion der TNF- α -Freisetzung oder gar auf einer vollständigen Blockade der Zytokinfreisetzung bzw. seines Rezeptors beruhen, muss jedoch bedacht werden, dass die TNF- α -Wirkung maßgeblich von der Dynamik der Freisetzung und den beteiligten Rezeptoren abhängig ist. Während gelöstes TNF (*soluble TNF*, solTNF) über den TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) neurotoxisch wirkt, ist membranständiges TNF (*transmembrane TNF*, tmTNF) über den TNF-Rezeptor 2 (TNFR2) für die Homöostase des ZNS zuständig und fördert sogar die Bildung von Synapsen sowie die Neurogenese [70, 101]. McCoy *et al.* zeigten in *in-vivo* Studien an Sprague Dawley Ratten, dass die Neutralisierung von solTNF die nigrale Degeneration im Parkinson-Modell signifikant reduziert [212]. Eine Blockade beider TNFRs über einen längeren Zeitraum scheint hingegen nicht sinnvoll und verstärkt sogar die A β -Ablagerung im Alzheimer-Modell, da die Mikroglia durch die Supprimierung ihre Funktion in der Aufrechterhaltung der Homöostase des ZNS verlieren [101]. Dies zeigt erneut, dass eine Neuorientierung der Zellen hin zum neuroprotektiven M2-Phänotyp vielversprechender in der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen scheint, als die einfache Blockierung der Zellen.

In weiteren Versuchen sollte überprüft werden, ob Honokiol lediglich die Freisetzung von solTNF reduziert, oder auch die von tmTNF.

Da TNF- α die Expression von IL-1 β und IL-6 in Mikroglia bzw. Astrozyten induziert [67, 213, 214] und in dieser Arbeit die TNF- α -Freisetzung durch Honokiol signifikant gesenkt wurde, ist im Umkehrschluss denkbar, dass die Reduktion der IL-1 β - und IL-6-Expression durch Honokiol, z. T. aus der Reduktion von TNF- α resultiert. Auch die Zytokinkinetik spricht für eine TNF- α -abhängige Reduktion von IL-6 und IL-1 β in der vorliegenden Arbeit: Als frühzeitig exprimiertes Zytokin [214] wurde für TNF- α bereits nach 3-stündiger Inkubation der Mikroglia eine Reduktion der mRNA-Expression durch Honokiol festgestellt, während die mRNA-Expression von IL-6 und IL-1 β erst nach 24-stündiger Inkubation signifikant gesenkt wurde. Diese Ergebnisse korrelieren mit der von Anderson *et al.* ermittelten Zytokinkinetik, sowie dem durch die Arbeitsgruppe entworfenen Rückkopplungsmodell [214].

Verstärkte Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10: Ein weiterer möglicher Mechanismus der Reduktion der Expression proinflammatorischer Mediatoren durch Honokiol scheint die Steigerung der Expression des Zytokins IL-10 zu sein. Die Aktivierung der IL-10-Rezeptoren führt über die Phosphorylierung von STAT 3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) zur Transkription von Proteinen, die die p65-Untereinheit von NF- κ B inhibieren (u. a. *A20-binding inhibitor of NF- κ B activation* [Abin-3]), mit der Folge der verminderten Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 [107, 108]. Weiterhin ist aus *in-vitro* Experimenten eine Reduktion der LPS-induzierten NO- und ROS-Freisetzung durch Mikroglia, nach deren Inkubation mit IL-10, bekannt [215]. Im Parkinson-Tiermodell wurde von Arimoto *et al.* eine signifikante Reduktion der mikroglialen inflammatorischen Aktivität nach nigraler Injektion von IL-10 nachgewiesen, die mit einem reduzierten dopaminergen Zelluntergang einherging [216].

In der vorliegenden Dissertation konnte erstmalig eine signifikante Hochregulation der IL-10-mRNA-Expression durch Honokiol nach 24-stündiger Inkubation in LPS-aktivierten Mikroglia, sowie nach 6-stündiger Inkubation in LPS-aktivierten Astrozyten gezeigt werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit denen von Li *et al.*, die eine konzentrationsabhängige verstärkte Expression von IL-10 in LPS-aktivierten dendritischen Zellen nach Inkubation mit 10 μ M bis 20 μ M Honokiol nachwiesen [140]. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die

Reduktion der proinflammatorischen Mediatoren durch Honokiol z. T. über die verstärkte Expression von IL-10 vermittelt sein kann.

Neben der antiinflammatorischen Eigenschaft sind viele neuroprotektive Effekte für IL-10 beschrieben: Die selektive Inhibierung der p65-Untereinheit von NF- κ B resultiert in einer verstärkten Expression des Glutamat-Wiederaufnahme-Transporters Glutamat Transporter (GLT)-1 und wirkt so präventiv der exzitotoxischen Glutamat-Akkumulation im synaptischen Spalt entgegen [54, 56, 107]. Gleichzeitig zeigen Neurone nach Aktivierung ihres IL-10-Rezeptors 1 (IL-10R1) durch die Normalisierung erhöhter intrazellulärer Ca^{2+} -Spiegel sowie durch eine erhöhte Expression von anti-apoptischen Faktoren (u. a. B-cell lymphoma (Bcl)-2 und B-cell lymphoma (Bcl)-xl) und durch eine verminderte Expression des proapoptischen Enzyms Caspase-3 eine erhöhte Resistenz gegenüber Glutamat-induzierter Exzitotoxizität und Hypoxie [107, 109-111].

Bei Patienten mit M. Parkinson lassen sich im Vergleich mit gesunden Kontrollgruppen deutlich erhöhte IL-10-Spiegel im Serum feststellen, auch wenn eine Korrelation zwischen dem IL-10-Spiegel und der Krankheitsausprägung nicht nachgewiesen wurde [107, 217-219]. In einer weiteren Studie konnte durch sportliche Aktivität eine Symptomverbesserung bei Parkinson-Patienten erreicht werden, die mit erhöhten IL-10-Spiegeln einherging [220]. So scheint die Freisetzung von IL-10 der Versuch des Organismus zu sein, dem inflammatorischen Ungleichgewicht in neurodegenerativen Erkrankungen entgegenzuwirken. Dieser Hintergrund spricht dafür, dass Honokiol aufgrund der verstärkten Expression von IL-10 mit der folgenden Reduktion der proinflammatorischen Mediatoren und verstärkten Freisetzung neuroprotektiver Faktoren einen positiven Effekt im Rahmen der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen haben kann.

Betrachtet man die unterschiedlichen Inkubationszeiten, die in dieser Arbeit zu einer Modulation der mRNA-Expression der untersuchten Zytokine geführt haben, fällt eine unterschiedliche Zytokinkinetik auf. Für Astrozyten wurden die Ergebnisse der mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine nach 3-stündiger Inkubation gezeigt, da die Ergebnisse in Vorversuchen nach 6- bzw. 24-stündiger Inkubation starken Schwankungen unterlagen. Die Untersuchung von IL-10 ergab hingegen erst nach 6-stündiger Inkubation stabile Ergebnisse.

In den Mikroglia ließ sich eine Modulation der mRNA-Expression der Zytokine IL-6, IL-1 β und IL-10 erst nach 24-stündiger Inkubation feststellen. Für TNF- α hingegen ließ sich bereits nach 3-stündiger Inkubation eine signifikante Modulation nachweisen.

Eine unterschiedliche Kinetik der Zytokinexpression mit gegenseitigen *Feed-back*-Regulationen wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben [214]. Zusätzlich lassen sich die teilweise schwankenden Ergebnisse zu anderen Inkubationszeiten als der dargestellten dadurch erklären, dass während der Versuche für die vorliegende Dissertation ein Wechsel des verwandten Rattenstammes aufgrund einer Umstellung der Tierzucht des Tierhauses der vorklinischen Institute der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel stattfand. Während die initialen Versuche mit Zellen der Wistar Ratte durchgeführt wurden, erfolgten die späteren Versuche mit Zellen der Sprague Dawley Ratte. Dabei wurden aus immunologischen Überlegungen nie Zellen des einen Rattenstammes mit denen des anderen gemischt.

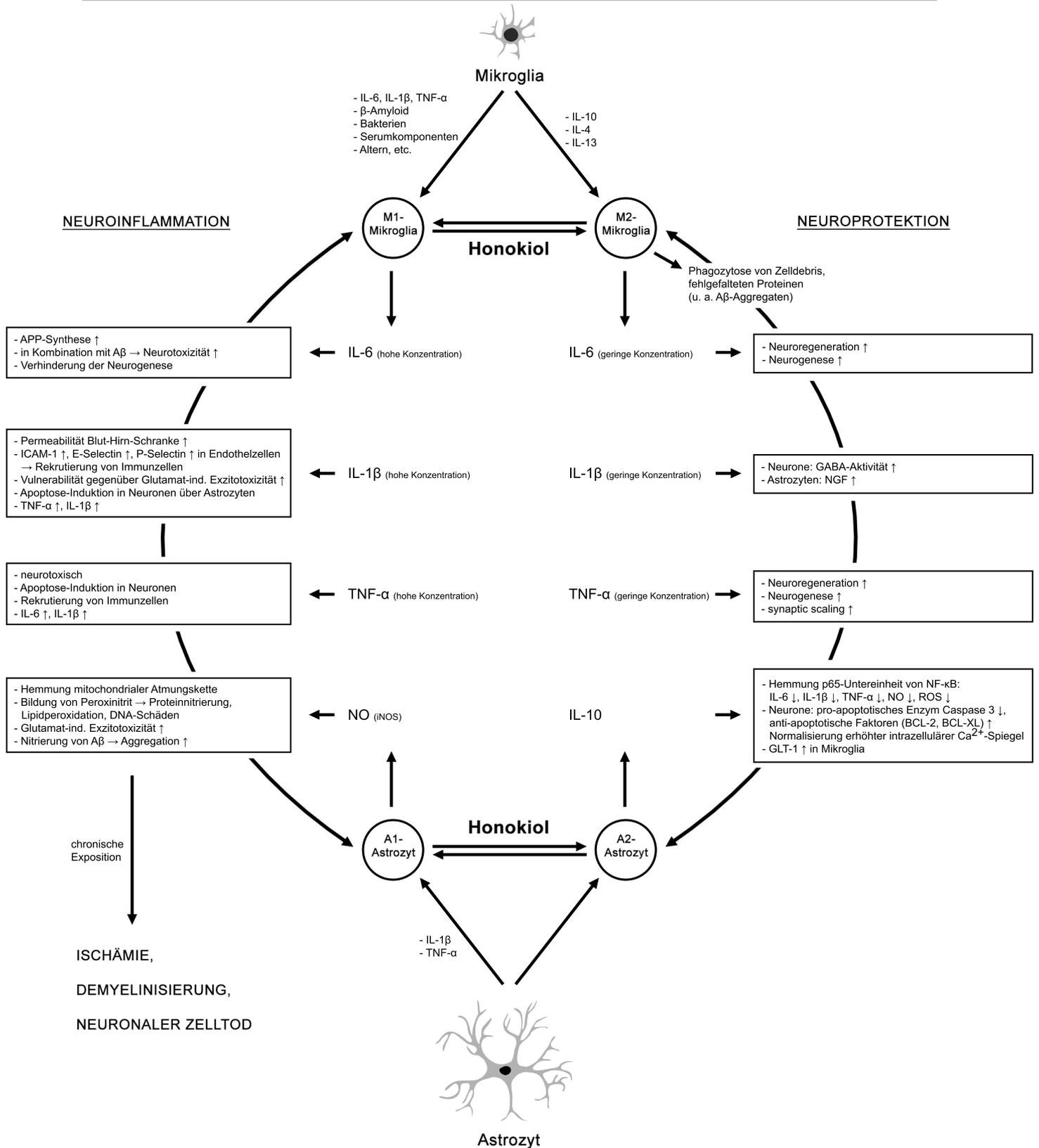


Abb. 16: Zusammenfassende Darstellung möglicher neuroprotektiver Mechanismen durch Honokiol in Mikroglia und Astrozyten. Die Abbildung zeigt den Einfluss von Honokiol auf Mikroglia und Astrozyten. Es wird deutlich, dass die Mikroglia und Astrozyten je nach Phänotyp eine neuroinflammatorische oder eine neuroprotektive Stellung einnehmen können. Somit kann eine reine Blockade der Zellen oder eine vollständige Blockade einzelner Zytokine bzw. Zytokinrezeptoren eher negative Auswirkungen im Rahmen der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen haben, während eine Neuorientierung der Zellen zum neuroprotektiven Phänotyp, z. B. durch Honokiol, vielversprechender erscheint. Die Astrozyten wurden wie in der Arbeit um Liddelow [174] in Anlehnung an die Einteilung der Mikroglia als A1- und A2-Phänotyp definiert. Es handelt sich um eine skizzierende Darstellung ohne Anspruch auf Vollständigkeit.

5.4 Einfluss von Honokiol auf intrazelluläre Signalwege in Mikroglia und Astrozyten

Aus Experimenten anderer Arbeitsgruppen ist bereits bekannt, dass Honokiol die Expression proinflammatorischer Zytokine in Mikroglia über die Inhibition des Transkriptionsfaktors NF- κ B reduziert [221]. Ein weiterer Weg, über den Honokiol seine antiinflammatorische Wirkung vermitteln könnte, wurde in der vorliegenden Arbeit mit einer Reduktion der Phosphorylierung von ERK1/2 in Mikroglia gezeigt.

Die MAP-Kinase ERK1/2 ist an einer Vielzahl diverser zellregulatorischer Vorgänge beteiligt. In Mikroglia und Astrozyten wird die ERK1/2-Kaskade als paralleler Weg für die Expression proinflammatorischer Mediatoren zu dem über NF- κ B- und dem über die MAP-Kinase p38-vermittelten Signalweg beschrieben [176, 222-225]. *Post-mortem* Untersuchungen an Gehirnen sowohl von Patienten mit M. Alzheimer als auch von Patienten mit M. Parkinson zeigten eine Akkumulation von pERK1/2 im ZNS [226-228]. Mittlerweile sind diverse Verknüpfungen pathologischer Merkmale neurodegenerativer Erkrankungen mit der ERK-vermittelten Signalkaskade bekannt. So wurde α -Synuclein als Aktivator der ERK-Kaskade in Mikroglia beschrieben, mit der Folge einer gesteigerten Expression von IL-1 β , TNF- α und NO [228, 229]. Weiterhin scheint eine gesteigerte Aktivität der ERK1/2-Kaskade an einer verstärkten Phosphorylierung von tau-Proteinen beteiligt zu sein [227]. Durch den Einsatz eines ERK-Inhibitors wurde im Mausmodell ein verzögertes Auftreten tau-assoziiierter motorischer Symptome beschrieben [230]. Zusätzlich konnte durch die Inhibition der ERK1/2-Kaskade die Expression der proinflammatorischen Mediatoren in Mikroglia und Astrozyten *in-vitro* und *in-vivo* deutlich reduziert werden [176, 222-225, 228]. Somit scheint der Einsatz von Inhibitoren der ERK-Kaskade in Mikroglia und Astrozyten ein Ansatz in der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen zu sein.

Die 60-minütige Inkubation mit Honokiol zeigte in dieser Arbeit eine tendenzielle Reduktion der Phosphorylierung von ERK1/2 in LPS-aktivierten primären Mikroglia. Auch wenn diese Ergebnisse nicht signifikant waren, stimmen sie mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein: sowohl in den ontogenetisch verwandten Makrophagen als auch in einer Mikroglia-Zelllinie wurde eine Reduktion der LPS- bzw. IFN- γ -induzierten Phosphorylierung von ERK1/2 durch Honokiol nachgewiesen [127, 141]. Für eine signifikante Reduktion der IFN- γ -induzierten ERK1/2-Phosphorylierung in einer Ratten- sowie Maus-Mikroglia-Zelllinie

wurde von Chuang *et al.* eine Inkubationszeit von 4 Stunden untersucht [127], im Gegensatz zu der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Inkubationszeit von 60 Minuten. Ähnliche Ergebnisse liegen für synoviale Fibroblasten im Modell der rheumatoiden Arthritis sowie für glatte Muskelzellen im Modell der Atherosklerose vor [221, 231]. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Reduktion der Expression proinflammatorischer Mediatoren durch Honokiol in LPS-aktivierten Mikroglia zumindest z. T. über die Reduktion der ERK1/2-Phosphorylierung resultiert.

Die in dieser Dissertation gezeigte Tendenz einer passageren Steigerung der ERK1/2-Phosphorylierung nach 30-minütiger Honokiol-Inkubation widerspricht den Ergebnissen von Chao *et al.*, die in Monozyten sowohl nach 30 Minuten als auch nach 60 Minuten eine Reduktion der Aktivierung der ERK1/2-Kaskade nachwies [141]. Weiterhin wirkte sich die tendenzielle Aktivierung der Kaskade nicht in Form einer gesteigerten Expression der untersuchten proinflammatorischen Zytokine in der vorliegenden Arbeit aus. Generell ist die ERK1/2-Kaskade sehr komplex und kann nicht nur auf eine proinflammatorische Rolle im Entzündungsgeschehen reduziert werden. Die Signalkaskade ist an einer Vielzahl unterschiedlicher, z. T. sogar gegensätzlicher zellregulatorischer Prozessen beteiligt [232]. So wiesen Lin *et al.* im Parkinson-Modell nach, dass eine kurzzeitige, frühe Aktivierung der ERK1/2-Kaskade in dopaminergen Neuronen eine zellprotektive Wirkung hat [233]. Weiterhin beschrieben Zhai *et al.* und Lee *et al.* dass die Inkubation von Neuronen mit Honokiol, sowie der verwandten Substanz 4-O-Methylhonokiol, das Neuronenwachstum über die Aktivierung der ERK1/2-Kaskade fördert [139, 234].

In der vorliegenden Dissertation ließ sich kein Einfluss auf die ERK-Kaskade in primären Astrozyten durch Honokiol feststellen. Durch Immunfluoreszenzfärbungen konnte jedoch nachgewiesen werden, dass neben Mikroglia auch Astrozyten den Transkriptionsfaktor KLF-4 exprimieren. KLF-4 ist in einer Reihe von Wachstums- und Differenzierungsprozessen diverser Systeme des Organismus involviert [235]. Zuletzt wurde für KLF-4 eine bedeutende Rolle in der Mikrogliaaktivierung mit der Folge der Expression proinflammatorischer Mediatoren beschrieben. Dabei scheint KLF-4 mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B zu interagieren, möglicherweise in Form eines Bindungspartners von pNF- κ B [144]. Der über NF- κ B vermittelte Signaltransduktionsweg ist einer der bedeutendsten im inflammatorischen Geschehen. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors, z. B. über den TLR4 durch LPS, führt

zu seiner Phosphorylierung und konsekutiven Verlagerung in den Zellkern, mit der folgenden Induktion der Expression proinflammatorischer Mediatoren wie iNOS, COX-2, TNF- α und IL-6 [236, 237]. Die Arbeitsgruppe um Kaushik wies durch Inhibition von KLF-4 in LPS-aktivierten Mikroglia eine signifikante Reduktion dieser Mediatoren nach [144]. In einer weiteren Arbeit wurde Honokiol als ein effizienter KLF-4-Inhibitor in Mikroglia *in-vitro* und *in-vivo* beschrieben [143]. Somit ist denkbar, dass auch in den Astrozyten die LPS-induzierte proinflammatorische Reaktion über den Transkriptionsfaktor KLF-4 vermittelt wird und die Reduktion der Expression proinflammatorischer Mediatoren durch Honokiol aus der Inhibition dieses Transkriptionsfaktors resultiert. Die Hypothese, dass KLF-4 auch in Astrozyten an der Inflammation beteiligt sein kann, wird bestärkt durch die neue Erkenntnis, dass der Transkriptionsfaktor in den Astrozyten nach einem ischämischen Ereignis sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* verstärkt exprimiert wird [238]. Von einer Überexpression des Transkriptionsfaktors ist bekannt, dass diese in einer verstärkten Expression proinflammatorischer Mediatoren in Mikroglia resultiert [143].

5.5 Beteiligte Rezeptoren

Bereits die Molekülstruktur von Honokiol zeigt Gemeinsamkeiten mit Cannabinoid-Rezeptor-Liganden, sowohl synthetischer als auch pflanzlicher Herkunft [239]. Cannabinoid-Rezeptoren gehören zu der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und werden in zwei Untergruppen unterschieden: Der Cannabinoid-Rezeptor (CB)1 und CB2 [239]. CB1 wird sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem exprimiert. Er ist v. a. auf Neuronen und Astrozyten, jedoch auch auf Mikroglia nachweisbar [240, 241]. Der Rezeptor wird mit neuroprotektiven Eigenschaften verknüpft, u. a. über die Inhibition einer toxischen Neurotransmitter-Freisetzung (Exzitotoxizität) sowie über die Induktion antioxidativer Prozesse [241-243]. Weiterhin wird ihm eine analgetische und appetitsteigernde Wirkung zugeschrieben [239]. Seine psychoaktiven Effekte und der negative Einfluss auf die Gedächtnisleistung begrenzen jedoch einen therapeutischen Einsatz [239, 241]. Der CB2 galt lange Zeit als Rezeptor des peripheren Immunsystems. Mittlerweile ist hingegen bekannt, dass er ebenfalls von Mikroglia, Astrozyten und Neuronen exprimiert wird [240, 242, 244, 245]. Über CB2 werden v. a. antiinflammatorische Eigenschaften vermittelt. Seine Expression im ZNS wird im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen stark hochreguliert [246, 247].

Über die Aktivierung von CB1 und CB2 konnte eine Reduktion der Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren, wie NO, IL-6, IL-1 β und TNF- α und eine verstärkte Expression antiinflammatorischer Zytokine, wie IL-10 und IL-4 sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* in Mikroglia und z. T. auch in Astrozyten nachgewiesen werden [241, 243, 248, 249].

Honokiol wurde durch Rempel *et al.* als Agonist des CB1 beschrieben, sodass die antiinflammatorische und neuroprotektive Wirkung über diesen Rezeptor vermittelt sein kann. In derselben Studie wurde für Honokiol jedoch auch ein inverser Agonismus an CB2 nachgewiesen, bei gleicher Affinität zu beiden Rezeptoren [239]. Somit ist denkbar, dass die antiinflammatorische Wirkung von Honokiol über zumindest einen weiteren Rezeptor vermittelt wird.

In Studien anderer Arbeitsgruppen wurde eine Interaktion von Honokiol mit dem γ -Aminobuttersäure (GABA)_A-Rezeptor nachgewiesen, der für seine sedierende, anxiolytische und muskelrelaxierende Wirkung bekannt ist [250]. Lee *et al.* wiesen nach, dass eine Aktivierung sowohl des GABA_A- als auch des GABA_B-Rezeptors in LPS- sowie IFN- γ -aktivierten Mikroglia und Astrozyten in einer Reduktion der Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren, vermittelt über die Inhibition der Signalkaskade über NF- κ B und p38, resultiert [251]. Somit ist denkbar, dass die Reduktion der Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren durch Honokiol über eine Aktivierung des GABA_A-Rezeptors vermittelt wird.

Weiterhin wurde für Honokiol, als ein natürlich vorkommendes Reginoid, ein Agonismus am Retinoid-X-Rezeptor (RXR) beschrieben [252]. Der RXR gehört zu der Gruppe der Kernrezeptoren (*nuclear receptors*, NRs), der nach seiner Aktivierung mit einem weiteren RXR ein Homodimer, oder nach Aktivierung eines Partner NRs, wie z. B. dem Leber-X-Rezeptor (*liver X receptor*, LXR), ein Heterodimer bildet. Diese Rezeptoren werden ebenfalls von Mikroglia und Astrozyten exprimiert. Ein Agonismus an diesen Rezeptoren reduziert die LPS-induzierte proinflammatorische Antwort der Zellen, z. T. über die Inhibition der NF- κ B-vermittelten Signalkaskade [253, 254]. Einschränkend ist zu erwähnen, dass in den Versuchen der Arbeitsgruppe um Kotani Honokiol allein nicht potent genug war, RXR-Heterodimere zu aktivieren, wohl aber über Agonisten an den Partner NRs die Aktivierung der RXR-Heterodimere zu potenzieren [252].

Somit lässt sich die antiinflammatorische Wirkung Honokiols über mehrere Rezeptoren erklären. Für den therapeutischen Einsatz muss in weiterführenden Versuchen überprüft

werden, ob die antiinflammatorische Wirkung bereits bei einer Dosierung erreicht wird, bei der noch keine unerwünschten psychoaktiven Nebenwirkungen über CB1 auftreten. Weiterhin wäre interessant zu erforschen, ob die Kombination eines Agonisten der Partner NRs, z. B. Rosiglitazone [255, 256], zusammen mit Honokiol zu einer Potenzierung der antiinflammatorischen Wirkung führt.

5.6 Bewertung der Ergebnisse und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen das Potential Honokiols, die Mikroglia nach LPS-Stimulation in ihrem Genexpressionsprofil in Richtung des M2-Phänotyps neu zu orientieren, mit der Reduktion der Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren und der verstärkten Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10. Der gleiche antiinflammatorische, neuroprotektive Effekt konnte auf Astrozyten nachgewiesen werden. Dabei wurde bereits in einer vorherigen Studie von Chao *et al.* nachgewiesen, dass Honokiol nicht die Bindung von LPS an die Zellen antagonisiert oder die Rezeptoren TLR4 und CD14 beeinflusst und so eine antiinflammatorische Wirkung vortäuscht [141].

Somit besteht die Möglichkeit, dass durch den therapeutischen Einsatz von Honokiol der *Circulus vitiosus* der gegenseitigen progredienten inflammatorischen Aktivierung der Zellen durchbrochen werden kann, welcher einen wesentlichen Pathomechanismus der Neurodegeneration darstellt. Aber nicht nur die Neuorientierung der Mikroglia und Astrozyten macht Honokiol zu einem vielversprechenden Agens im Rahmen der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen. Die Vielzahl neuroprotektiver Eigenschaften, wie die Reduktion von oxidativen Stressmechanismen und die verstärkte Freisetzung von neurotrophen Faktoren, sind Begleiteffekte, die sich positiv in der Therapie des M. Parkinson oder des M. Alzheimer auswirken können [138, 139]. Vorangegangene Studien anderer Arbeitsgruppen an Nagetieren zeigten, dass Honokiol ohne Weiteres die Blut-Hirn-Schranke überwindet, sodass die erwähnten Effekte im ZNS bei praktikabler Applikation zu erwarten sind [133, 135]. Zu bedenken bleibt, dass es sich bei den Versuchen in der vorliegenden Arbeit um ein stark simplifiziertes Modell von Entzündungsvorgängen handelt und die inflammatorischen Zusammenhänge sich *in-vivo* weitaus komplexer darstellen. Zusätzlich muss bedacht werden, dass die untersuchten Zellen vor dem „pathologischen Reiz“ mit Honokiol vorstimuliert wurden. Auf die Realität bezogen entspräche dies einer

prophylaktischen Honokiol-Einnahme. Ein solcher Einsatz könnte der altersbedingten steigenden Empfindlichkeit des ZNS eine neurodegenerative Erkrankung zu entwickeln vorbeugen, indem die Balance zwischen dem M1- und dem M2-Mikroglia-Typ gehalten wird [163, 166]. Honokiol wird seit Jahrhunderten in der traditionellen chinesischen und japanischen Medizin angewendet, sodass Prävalenzstudien zum Auftreten neurodegenerativer Erkrankungen an dieser Kohorte aufschlussreiche Ergebnisse erbringen könnten.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Honokiol auf Mikroglia und Astrozyten *in-vitro* in Hinblick auf die Frage, ob diese Substanz in der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen eine Option darstellt, untersucht. Neurodegenerative Erkrankungen, wie der M. Parkinson und der M. Alzheimer, verzeichnen aufgrund des demographischen Wandels eine steigende Prävalenz in unserer Gesellschaft und werden aktuellen Vorausberechnungen nach eine wachsende gesundheitsökonomische Bedeutung in der Zukunft einnehmen, ohne dass bislang kausale Therapiekonzepte bekannt sind. Trotz der Heterogenität neurodegenerativer Erkrankungen ist ihnen eine inflammatorische Begleitkomponente als Pathologie gemeinsam, die den progredienten Neuronenverlust unterhält. Eine Eindämmung der Neuroinflammation, an der v. a. die Mikroglia und Astrozyten durch die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren beteiligt sind, verspricht das Krankheitsfortschreiten zu verlangsamen und Symptome zu lindern. So wurden in den vergangenen Jahren viele Pharmaka auf eine potentielle Neuorientierung der Zellen vom proinflammatorischen in den antiinflammatorischen Phänotyp untersucht.

Honokiol ist ein Lignan, welches seit Jahrhunderten in der traditionellen chinesischen sowie japanischen Medizin u. a. zur Behandlung von Fieber, Kopfschmerzen, gastrointestinalen Beschwerden, thrombotischen Ereignissen und psychischen Erkrankungen Anwendung findet. Dafür wird die Substanz aus der Rinde der *Magnolia obovata Thunb* und der *Magnolia officinalis Rehd. et Wils.* gewonnen und in Form von Tees konsumiert. In den vergangenen Jahren wurde eine antiinflammatorische Wirkung durch Honokiol u. a. auf dendritische Zellen, Makrophagen sowie Mikrogliazelllinien nachgewiesen. Dabei scheint die Wirkung v. a. über die Inhibition der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und KLF-4 vermittelt zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Lignan in einem neuroinflammatorischen *in-vitro* Modell durch Stimulation primärer Mikroglia und Astrozyten aus den Hirnen neugeborener Ratten mit LPS und Koinkubation mit Honokiol untersucht. In der verwendeten Konzentration von 10 μ M für Mikroglia und 25 μ M für Astrozyten war Honokiol nicht zytotoxisch, sondern zeigte sich im MTT-Test vielmehr zellprotektiv. Morphologische Untersuchungen deuteten auf das Potential Honokiols hin, die LPS-bedingte Transformation der Mikroglia in den aktivierten Phänotyp zu unterbinden. Weiterhin wurde eine signifikante

Reduktion der NO-Freisetzung über eine Reduktion der Expression von iNOS in LPS-stimulierten Mikroglia nach Koinkubation mit Honokiol nachgewiesen. Auch die Untersuchungen des Genexpressionsprofils der Mikroglia und Astrozyten deuteten auf eine Neuorientierung der Zellen vom proinflammatorischen Phänotyp nach LPS-Stimulation in den eher antiinflammatorischen Phänotyp nach Koinkubation mit Honokiol hin, indem die Expression der Zytokine IL-6, IL-1 β und TNF- α signifikant gesenkt und die Expression des Zytokins IL-10 signifikant gesteigert wurde. Auf Proteinebene wurde eine signifikante Reduktion der Freisetzung von IL-6 und TNF- α in Mikroglia und Astrozyten nachgewiesen. Die sich anschließenden Untersuchungen der ERK1/2-Kaskade zeigten, dass die Reduktion der Expression proinflammatorischer Mediatoren in Mikroglia teilweise über eine Reduktion der ERK1/2-Phosphorylierungsrate vermittelt sein kann. In den Astrozyten hatte Honokiol keinen Einfluss auf die ERK1/2-Phosphorylierung. Als eine der ersten Arbeiten zeigt die vorliegende jedoch die Expression des Transkriptionsfaktors KLF-4 morphologisch nicht nur in Mikroglia, sondern auch in Astrozyten. Somit ist denkbar, dass die Reduktion der Expression proinflammatorischer Mediatoren nicht nur in Mikroglia, sondern auch in Astrozyten u. a. aus einer Inhibition von KLF-4 durch Honokiol resultiert.

Neben den in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen antiinflammatorischen Effekten wurde für Honokiol eine neurotrophe Wirkung beschrieben. Da das Lignan die Blut-Hirn-Schranke überwindet, erscheint seine Applikation als potentiell Therapeutikum für Erkrankungen des Zentralen Nervensystems simpel.

In Zusammenschau ist Honokiol ein vielversprechendes Agens im Rahmen der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen, sodass ein möglicher klinischer Einsatz weiter erforscht werden sollte.

7 Literaturverzeichnis

1. Przedborski, S., Vila, M., Jackson-Lewis, V. (2003): Neurodegeneration: what is it and where are we? *J Clin Invest*, 111, 3-10.
2. Bossy-Wetzel, E., Schwarzenbacher, R., Lipton, S. A. (2004): Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med*, 10 Suppl, 2-9.
3. Roses, A. D. (1996): Apolipoprotein E in neurology. *Curr Opin Neurol*, 9, 265-270.
4. Hardy, J. (1997): Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*, 20, 154-159.
5. Luchsinger, J. A., Gustafson, D. R. (2009): Adiposity, type 2 diabetes, and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 16, 693-704.
6. Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., Gage, F. H. (2010): Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140, 918-934.
7. Le, W., Wu, J., Tang, Y. (2016): Protective Microglia and Their Regulation in Parkinson's Disease. *Front Mol Neurosci*, 9, 89.
8. Burn, D. J., Jaros, E. (2001): Multiple system atrophy: cellular and molecular pathology. *Mol Pathol*, 54, 419-426.
9. Armstrong, R. A. (2012): On the 'classification' of neurodegenerative disorders: discrete entities, overlap or continuum? *Folia Neuropathol*, 50, 201-208.
10. Kovacs, G. G. (2014): Current Concepts Of Neurodegenerative Diseases. *EMJ Neurol*, 1, 78-86.
11. Kovacs, G. G. (2014): *Neuropathology of Neurodegenerative Diseases: A Practical Guide*. Cambridge University Press, Cambridge.
12. Fahn, S. (2003): Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, 991, 1-14.
13. Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K., Seitelberger, F. (1973): Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci*, 20, 415-455.
14. 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.
15. Jellinger, K. A. (1991): Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol Chem Neuropathol*, 14, 153-197.
16. Nussbaum, R. L., Polymeropoulos, M. H. (1997): Genetics of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, 6, 1687-1691.
17. Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R.

- C., Di Iorio, G., Golbe, L. I., Nussbaum, R. L. (1997): Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276, 2045-2047.
18. Gerlach, M. R., H.; Riederer, P. (2007): *Die Parkinson-Krankheit. Grundlagen, Klinik, Therapie.* 4. Auflage, Springer-Verlag, Wien.
 19. Masuhr, K. F., Neumann, M. (2007): *Duale Reihe: Neurologie.* 6. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart.
 20. Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P. R., Rimmer, E., Sczufca, M. (2005): Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, 366, 2112-2117.
 21. Block, M. L., Zecca, L., Hong, J. S. (2007): Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*, 8, 57-69.
 22. Mattson, M. P. (2004): Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, 430, 631-639.
 23. Kril, J. J., Patel, S., Harding, A. J., Halliday, G. M. (2002): Neuron loss from the hippocampus of Alzheimer's disease exceeds extracellular neurofibrillary tangle formation. *Acta Neuropathol*, 103, 370-376.
 24. Yankner, B. A., Duffy, L. K., Kirschner, D. A. (1990): Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science*, 250, 279-282.
 25. Meyer-Luehmann, M., Spires-Jones, T. L., Prada, C., Garcia-Alloza, M., de Calignon, A., Rozkalne, A., Koenigsknecht-Talboo, J., Holtzman, D. M., Bacskai, B. J., Hyman, B. T. (2008): Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*, 451, 720-724.
 26. Akiyama, H. (1994): Inflammatory response in Alzheimer's disease. *Tohoku J Exp Med*, 174, 295-303.
 27. Blasko, I., Stampfer-Kountchev, M., Robatscher, P., Veerhuis, R., Eikelenboom, P., Grubeck-Loebenstien, B. (2004): How chronic inflammation can affect the brain and support the development of Alzheimer's disease in old age: the role of microglia and astrocytes. *Aging Cell*, 3, 169-176.
 28. Koenigsknecht-Talboo, J., Landreth, G. E. (2005): Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid and IgGs are differentially regulated by proinflammatory cytokines. *J Neurosci*, 25, 8240-8249.
 29. Mawuenyega, K. G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J. C., Yarasheski, K. E., Bateman, R. J. (2010): Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science*, 330, 1774.
 30. Serrano-Pozo, A., Mielke, M. L., Gomez-Isla, T., Betensky, R. A., Growdon, J. H., Frosch, M. P., Hyman, B. T. (2011): Reactive glia not only associates with plaques but also parallels tangles in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 179, 1373-1384.
 31. Morales, I., Jimenez, J. M., Mancilla, M., Maccioni, R. B. (2013): Tau oligomers and fibrils induce activation of microglial cells. *J Alzheimers Dis*, 37, 849-856.

32. Asai, H., Ikezu, S., Woodbury, M. E., Yonemoto, G. M., Cui, L., Ikezu, T. (2014): Accelerated neurodegeneration and neuroinflammation in transgenic mice expressing P301L tau mutant and tau-tubulin kinase 1. *Am J Pathol*, 184, 808-818.
33. Bennett, D. A., Beckett, L. A., Murray, A. M., Shannon, K. M., Goetz, C. G., Pilgrim, D. M., Evans, D. A. (1996): Prevalence of parkinsonian signs and associated mortality in a community population of older people. *N Engl J Med*, 334, 71-76.
34. Finckh, U. (2006): Genetische Faktoren bei Alzheimer-Demenz. *Dtsch Arztebl Int*, 103, 1010-1016.
35. Pöttsch, O., Rößger, F. (2015): Bevölkerung Deutschlands bis 2060: 13. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden.
36. Streit, W. J. (2002): Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia*, 40, 133-139.
37. Cserr, H. F., Knopf, P. M. (1992): Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. *Immunol Today*, 13, 507-512.
38. Behrendt, P. (2013): Immunmodulation als Therapiestrategie beim Idiopathischen Parkinson-Syndrom. Med. Diss., Kiel.
39. Reese, T. S., Karnovsky, M. J. (1967): Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol*, 34, 207-217.
40. Schwartz, M., Moalem, G., Leibowitz-Amit, R., Cohen, I. R. (1999): Innate and adaptive immune responses can be beneficial for CNS repair. *Trends Neurosci*, 22, 295-299.
41. Aloisi, F., Ria, F., Adorini, L. (2000): Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol Today*, 21, 141-147.
42. Wraith, D. C., Nicholson, L. B. (2012): The adaptive immune system in diseases of the central nervous system. *J Clin Invest*, 122, 1172-1179.
43. Perry, V. H. (1998): A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *J Neuroimmunol*, 90, 113-121.
44. Bechmann, I., Mor, G., Nilsen, J., Eliza, M., Nitsch, R., Naftolin, F. (1999): FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia*, 27, 62-74.
45. Flugel, A., Schwaiger, F. W., Neumann, H., Medana, I., Willem, M., Wekerle, H., Kreutzberg, G. W., Graeber, M. B. (2000): Neuronal FasL induces cell death of encephalitogenic T lymphocytes. *Brain Pathol*, 10, 353-364.
46. Sierra, A., de Castro, F., Del Rio-Hortega, J., Rafael Iglesias-Rozas, J., Garrosa, M., Kettenmann, H. (2016): The "Big-Bang" for modern glial biology: Translation and comments on Pio del Rio-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia*, 64, 1801-1840.

47. Gebicke-Haerter, P. J., Van Calker, D., Norenberg, W., Illes, P. (1996): Molecular mechanisms of microglial activation. A. Implications for regeneration and neurodegenerative diseases. *Neurochem Int*, 29, 1-12.
48. Kreutzberg, G. W. (1996): Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 19, 312-318.
49. Hanisch, U. K., Kettenmann, H. (2007): Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*, 10, 1387-1394.
50. Trapp, B. D., Wujek, J. R., Criste, G. A., Jalabi, W., Yin, X., Kidd, G. J., Stohlman, S., Ransohoff, R. (2007): Evidence for synaptic stripping by cortical microglia. *Glia*, 55, 360-368.
51. Yokoyama, A., Yang, L., Itoh, S., Mori, K., Tanaka, J. (2004): Microglia, a potential source of neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. *Glia*, 45, 96-104.
52. Butovsky, O., Ziv, Y., Schwartz, A., Landa, G., Talpalar, A. E., Pluchino, S., Martino, G., Schwartz, M. (2006): Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci*, 31, 149-160.
53. Yang, I., Han, S. J., Kaur, G., Crane, C., Parsa, A. T. (2010): The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology. *J Clin Neurosci*, 17, 6-10.
54. Bachis, A., Colangelo, A. M., Vicini, S., Doe, P. P., De Bernardi, M. A., Brooker, G., Mocchetti, I. (2001): Interleukin-10 prevents glutamate-mediated cerebellar granule cell death by blocking caspase-3-like activity. *J Neurosci*, 21, 3104-3112.
55. Persson, M., Brantefjord, M., Hansson, E., Ronnback, L. (2005): Lipopolysaccharide increases microglial GLT-1 expression and glutamate uptake capacity in vitro by a mechanism dependent on TNF-alpha. *Glia*, 51, 111-120.
56. Kim, K., Lee, S. G., Kegelman, T. P., Su, Z. Z., Das, S. K., Dash, R., Dasgupta, S., Barral, P. M., Hedvat, M., Diaz, P., Reed, J. C., Stebbins, J. L., Pellicchia, M., Sarkar, D., Fisher, P. B. (2011): Role of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: opportunities for developing novel therapeutics. *J Cell Physiol*, 226, 2484-2493.
57. Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Helmchen, F. (2005): Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308, 1314-1318.
58. Eliason, D. A., Cohen, S. A., Baratta, J., Yu, J., Robertson, R. T. (2002): Local proliferation of microglia cells in response to neocortical injury in vitro. *Brain Res Dev Brain Res*, 137, 75-79.
59. Colton, C. A. (2009): Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol*, 4, 399-418.
60. Tang, Y., Le, W. (2016): Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*, 53, 1181-1194.
61. Neumann, H., Boucraut, J., Hahnel, C., Misgeld, T., Wekerle, H. (1996): Neuronal control of MHC class II inducibility in rat astrocytes and microglia. *Eur J Neurosci*, 8, 2582-2590.

62. Zhao, X., Wang, H., Sun, G., Zhang, J., Edwards, N. J., Aronowski, J. (2015): Neuronal Interleukin-4 as a Modulator of Microglial Pathways and Ischemic Brain Damage. *J Neurosci*, 35, 11281-11291.
63. Lüllmann-Rauch, R. (2009): Taschenlehrbuch Histologie. 3. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart.
64. Pfrieger, F. W., Barres, B. A. (1997): Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science*, 277, 1684-1687.
65. McGeer, P. L., McGeer, E. G. (2008): Glial reactions in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 23, 474-483.
66. Vallieres, L., Campbell, I. L., Gage, F. H., Sawchenko, P. E. (2002): Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *J Neurosci*, 22, 486-492.
67. Sawada, M., Suzumura, A., Marunouchi, T. (1992): TNF alpha induces IL-6 production by astrocytes but not by microglia. *Brain Res*, 583, 296-299.
68. McGeer, P. L., McGeer, E. G. (1995): The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev*, 21, 195-218.
69. John, G. R., Lee, S. C., Song, X., Riviaccio, M., Brosnan, C. F. (2005): IL-1-regulated responses in astrocytes: relevance to injury and recovery. *Glia*, 49, 161-176.
70. McCoy, M. K., Tansey, M. G. (2008): TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation*, 5, 45.
71. Oh, J., McCloskey, M. A., Blong, C. C., Bendickson, L., Nilsen-Hamilton, M., Sakaguchi, D. S. (2010): Astrocyte-derived interleukin-6 promotes specific neuronal differentiation of neural progenitor cells from adult hippocampus. *J Neurosci Res*, 88, 2798-2809.
72. Thery, C., Stanley, E. R., Mallat, M. (1992): Interleukin 1 and tumor necrosis factor-alpha stimulate the production of colony-stimulating factor 1 by murine astrocytes. *J Neurochem*, 59, 1183-1186.
73. Bredt, D. S., Snyder, S. H. (1994): Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem*, 63, 175-195.
74. Stewart, V. C., Heales, S. J. (2003): Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration. *Free Radic Biol Med*, 34, 287-303.
75. Dawson, V. L., Dawson, T. M., Bartley, D. A., Uhl, G. R., Snyder, S. H. (1993): Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J Neurosci*, 13, 2651-2661.
76. Good, P. F., Werner, P., Hsu, A., Olanow, C. W., Perl, D. P. (1996): Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 149, 21-28.
77. Mihm, M. J., Schanbacher, B. L., Wallace, B. L., Wallace, L. J., Uretsky, N. J., Bauer, J. A. (2001): Free 3-nitrotyrosine causes striatal neurodegeneration in vivo. *J Neurosci*, 21, Rc149.

78. Wink, D. A., Kasprzak, K. S., Maragos, C. M., Elespuru, R. K., Misra, M., Dunams, T. M., Cebula, T. A., Koch, W. H., Andrews, A. W., Allen, J. S., et al. (1991): DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science*, 254, 1001-1003.
79. Reynolds, A., Laurie, C., Mosley, R. L., Gendelman, H. E. (2007): Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Int Rev Neurobiol*, 82, 297-325.
80. Ghasemi, M., Fatemi, A. (2014): Pathologic role of glial nitric oxide in adult and pediatric neuroinflammatory diseases. *Neurosci Biobehav Rev*, 45, 168-182.
81. Markesbery, W. R. (1997): Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*, 23, 134-147.
82. Tansey, M. G., McCoy, M. K., Frank-Cannon, T. C. (2007): Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Exp Neurol*, 208, 1-25.
83. Tarazi, F. I., Sahli, Z. T., Wolny, M., Mousa, S. A. (2014): Emerging therapies for Parkinson's disease: from bench to bedside. *Pharmacol Ther*, 144, 123-133.
84. Nathan, C., Xie, Q. W. (1994): Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*, 269, 13725-13728.
85. Arimoto, T., Bing, G. (2003): Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in the substantia nigra by lipopolysaccharide causes microglial activation and neurodegeneration. *Neurobiol Dis*, 12, 35-45.
86. Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M., Taga, T. (1995): Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*, 86, 1243-1254.
87. Jones, S. A. (2005): Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol*, 175, 3463-3468.
88. Erta, M., Quintana, A., Hidalgo, J. (2012): Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci*, 8, 1254-1266.
89. Cafferty, W. B., Gardiner, N. J., Das, P., Qiu, J., McMahon, S. B., Thompson, S. W. (2004): Conditioning injury-induced spinal axon regeneration fails in interleukin-6 knock-out mice. *J Neurosci*, 24, 4432-4443.
90. Paganelli, R., Di Iorio, A., Patricelli, L., Ripani, F., Sparvieri, E., Faricelli, R., Iarlori, C., Porreca, E., Di Gioacchino, M., Abate, G. (2002): Proinflammatory cytokines in sera of elderly patients with dementia: levels in vascular injury are higher than those of mild-moderate Alzheimer's disease patients. *Exp Gerontol*, 37, 257-263.
91. Nagatsu, T., Sawada, M. (2005): Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines. *Curr Pharm Des*, 11, 999-1016.
92. Benveniste, E. N., Sparacio, S. M., Norris, J. G., Grenett, H. E., Fuller, G. M. (1990): Induction and regulation of interleukin-6 gene expression in rat astrocytes. *J Neuroimmunol*, 30, 201-212.

93. Sparacio, S. M., Zhang, Y., Vilcek, J., Benveniste, E. N. (1992): Cytokine regulation of interleukin-6 gene expression in astrocytes involves activation of an NF-kappa B-like nuclear protein. *J Neuroimmunol*, 39, 231-242.
94. Norris, J. G., Tang, L. P., Sparacio, S. M., Benveniste, E. N. (1994): Signal transduction pathways mediating astrocyte IL-6 induction by IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol*, 152, 841-850.
95. O'Neill, L. A., Greene, C. (1998): Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol*, 63, 650-657.
96. John, G. R., Chen, L., Riviaccio, M. A., Melendez-Vasquez, C. V., Hartley, A., Brosnan, C. F. (2004): Interleukin-1beta induces a reactive astroglial phenotype via deactivation of the Rho GTPase-Rock axis. *J Neurosci*, 24, 2837-2845.
97. Thornton, P., Pinteaux, E., Gibson, R. M., Allan, S. M., Rothwell, N. J. (2006): Interleukin-1-induced neurotoxicity is mediated by glia and requires caspase activation and free radical release. *J Neurochem*, 98, 258-266.
98. Viviani, B., Bartesaghi, S., Gardoni, F., Vezzani, A., Behrens, M. M., Bartfai, T., Binaglia, M., Corsini, E., Di Luca, M., Galli, C. L., Marinovich, M. (2003): Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *J Neurosci*, 23, 8692-8700.
99. Konsman, J. P., Drukarch, B., Van Dam, A. M. (2007): (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. *Clin Sci (Lond)*, 112, 1-25.
100. Simi, A., Tsakiri, N., Wang, P., Rothwell, N. J. (2007): Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration. *Biochem Soc Trans*, 35, 1122-1126.
101. Montgomery, S. L., Bowers, W. J. (2012): Tumor necrosis factor-alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol*, 7, 42-59.
102. Mogi, M., Harada, M., Riederer, P., Narabayashi, H., Fujita, K., Nagatsu, T. (1994): Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci Lett*, 165, 208-210.
103. Boka, G., Anglade, P., Wallach, D., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Hirsch, E. C. (1994): Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 172, 151-154.
104. Carvey, P. M., Chen, E. Y., Lipton, J. W., Tong, C. W., Chang, Q. A., Ling, Z. D. (2005): Intra-parenchymal injection of tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1-beta produces dopamine neuron loss in the rat. *J Neural Transm (Vienna)*, 112, 601-612.
105. Lobo-Silva, D., Carriche, G. M., Castro, A. G., Roque, S., Saraiva, M. (2016): Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation. *J Neuroinflammation*, 13, 297.
106. Ledebor, A., Breve, J. J., Wierinckx, A., van der Jagt, S., Bristow, A. F., Leysen, J. E., Tilders, F. J., Van Dam, A. M. (2002): Expression and regulation of interleukin-10 and

- interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells. *Eur J Neurosci*, 16, 1175-1185.
107. Kwilasz, A. J., Grace, P. M., Serbedzija, P., Maier, S. F., Watkins, L. R. (2015): The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases. *Neuropharmacology*, 96, 55-69.
 108. Sabat, R., Grutz, G., Warszawska, K., Kirsch, S., Witte, E., Wolk, K., Geginat, J. (2010): Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev*, 21, 331-344.
 109. Sharma, S., Yang, B., Xi, X., Grotta, J. C., Aronowski, J., Savitz, S. I. (2011): IL-10 directly protects cortical neurons by activating PI-3 kinase and STAT-3 pathways. *Brain Res*, 1373, 189-194.
 110. Turovskaya, M. V., Turovsky, E. A., Zinchenko, V. P., Levin, S. G., Godukhin, O. V. (2012): Interleukin-10 modulates $[Ca^{2+}]_i$ response induced by repeated NMDA receptor activation with brief hypoxia through inhibition of InsP(3)-sensitive internal stores in hippocampal neurons. *Neurosci Lett*, 516, 151-155.
 111. Tukhovskaya, E. A., Turovsky, E. A., Turovskaya, M. V., Levin, S. G., Murashev, A. N., Zinchenko, V. P., Godukhin, O. V. (2014): Anti-inflammatory cytokine interleukin-10 increases resistance to brain ischemia through modulation of ischemia-induced intracellular Ca^{2+} response. *Neurosci Lett*, 571, 55-60.
 112. Gehrman, J., Matsumoto, Y., Kreutzberg, G. W. (1995): Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev*, 20, 269-287.
 113. Lieb, K., Fiebich, B. L., Schaller, H., Berger, M., Bauer, J. (1996): Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha induce expression of alpha 1-antichymotrypsin in human astrocytoma cells by activation of nuclear factor-kappa B. *J Neurochem*, 67, 2039-2044.
 114. Blasko, I., Marx, F., Steiner, E., Hartmann, T., Grubeck-Loebenstien, B. (1999): TNFalpha plus IFNgamma induce the production of Alzheimer beta-amyloid peptides and decrease the secretion of APPs. *Faseb j*, 13, 63-68.
 115. Minghetti, L., Levi, G. (1998): Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog Neurobiol*, 54, 99-125.
 116. Roodveldt, C., Christodoulou, J., Dobson, C. M. (2008): Immunological features of alpha-synuclein in Parkinson's disease. *J Cell Mol Med*, 12, 1820-1829.
 117. McGeer, P. L., Itagaki, S., Boyes, B. E., McGeer, E. G. (1988): Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*, 38, 1285-1291.
 118. Sheng, J. G., Mrak, R. E., Griffin, W. S. (1998): Enlarged and phagocytic, but not primed, interleukin-1 alpha-immunoreactive microglia increase with age in normal human brain. *Acta Neuropathol*, 95, 229-234.
 119. Ye, S. M., Johnson, R. W. (2001): An age-related decline in interleukin-10 may contribute to the increased expression of interleukin-6 in brain of aged mice. *Neuroimmunomodulation*, 9, 183-192.
 120. Venkateshappa, C., Harish, G., Mythri, R. B., Mahadevan, A., Bharath, M. M., Shankar, S. K. (2012): Increased oxidative damage and decreased antioxidant function in aging

- human substantia nigra compared to striatum: implications for Parkinson's disease. *Neurochem Res*, 37, 358-369.
121. Reeve, A., Simcox, E., Turnbull, D. (2014): Ageing and Parkinson's disease: why is advancing age the biggest risk factor? *Ageing Res Rev*, 14, 19-30.
 122. Fearnley, J. M., Lees, A. J. (1991): Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain*, 114 (Pt 5), 2283-2301.
 123. 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. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 54, 388-396.
 124. Fujita, M. I., H.; Sashida, Y. (1972): Honokiol, a New Phenolic Compound isolated from the Bark of *Magnolia obovata* Thunb. *Chem Pharm Bull*, 20, 212-213.
 125. Kuribara, Y. M. a. H.): Overview of the Pharmacological Features of Honokiol. *CNS Drug Reviews*, 6, 35-44.
 126. Sarker, S. D., Maruyama, Y. (2002): *Magnolia: The genus Magnolia (Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles)*. 1st edition, Taylor & Francis, London.
 127. Chuang, D. Y., Chan, M. H., Zong, Y., Sheng, W., He, Y., Jiang, J. H., Simonyi, A., Gu, Z., Fritsche, K. L., Cui, J., Lee, J. C., Folk, W. R., Lubahn, D. B., Sun, A. Y., Sun, G. Y. (2013): Magnolia polyphenols attenuate oxidative and inflammatory responses in neurons and microglial cells. *J Neuroinflammation*, 10, 15.
 128. Maruyama, Y., Kuribara, H., Morita, M., Yuzurihara, M., Weintraub, S. T. (1998): Identification of magnolol and honokiol as anxiolytic agents in extracts of saiboku-to, an oriental herbal medicine. *J Nat Prod*, 61, 135-138.
 129. Woodbury, A., Yu, S. P., Wei, L., Garcia, P. (2013): Neuro-modulating effects of honokiol: a review. *Front Neurol*, 4, 130.
 130. Esumi, T., Makado, G., Zhai, H., Shimizu, Y., Mitsumoto, Y., Fukuyama, Y. (2004): Efficient synthesis and structure-activity relationship of honokiol, a neurotrophic biphenyl-type neolignan. *Bioorg Med Chem Lett*, 14, 2621-2625.
 131. Han, M., Yu, X., Guo, Y., Wang, Y., Kuang, H., Wang, X. (2014): Honokiol nanosuspensions: preparation, increased oral bioavailability and dramatically enhanced biodistribution in the cardio-cerebro-vascular system. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 116, 114-120.
 132. Zhang, Q., Li, J., Zhang, W., An, Q., Wen, J., Wang, A., Jin, H., Chen, S. (2015): Acute and sub-chronic toxicity studies of honokiol microemulsion. *Regul Toxicol Pharmacol*, 71, 428-436.
 133. Wang, X., Duan, X., Yang, G., Zhang, X., Deng, L., Zheng, H., Deng, C., Wen, J., Wang, N., Peng, C., Zhao, X., Wei, Y., Chen, L. (2011): Honokiol crosses BBB and BCSFB, and inhibits brain tumor growth in rat 9L intracerebral gliosarcoma model and human U251 xenograft glioma model. *PLoS One*, 6, e18490.
 134. Tsai, T. H., Chou, C. J., Cheng, F. C., Chen, C. F. (1994): Pharmacokinetics of honokiol after intravenous administration in rats assessed using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 655, 41-45.

135. Lin, J. W., Chen, J. T., Hong, C. Y., Lin, Y. L., Wang, K. T., Yao, C. J., Lai, G. M., Chen, R. M. (2012): Honokiol traverses the blood-brain barrier and induces apoptosis of neuroblastoma cells via an intrinsic bax-mitochondrion-cytochrome c-caspase protease pathway. *Neuro Oncol*, 14, 302-314.
136. Lin, Y. R., Chen, H. H., Ko, C. H., Chan, M. H. (2006): Neuroprotective activity of honokiol and magnolol in cerebellar granule cell damage. *Eur J Pharmacol*, 537, 64-69.
137. Lin, Y. R., Chen, H. H., Ko, C. H., Chan, M. H. (2005): Differential inhibitory effects of honokiol and magnolol on excitatory amino acid-evoked cation signals and NMDA-induced seizures. *Neuropharmacology*, 49, 542-550.
138. Fukuyama, Y., Nakade, K., Minoshima, Y., Yokoyama, R., Zhai, H., Mitsumoto, Y. (2002): Neurotrophic activity of honokiol on the cultures of fetal rat cortical neurons. *Bioorg Med Chem Lett*, 12, 1163-1166.
139. Zhai, H., Nakade, K., Oda, M., Mitsumoto, Y., Akagi, M., Sakurai, J., Fukuyama, Y. (2005): Honokiol-induced neurite outgrowth promotion depends on activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2). *Eur J Pharmacol*, 516, 112-117.
140. Li, C. Y., Chao, L. K., Wang, S. C., Chang, H. Z., Tsai, M. L., Fang, S. H., Liao, P. C., Ho, C. L., Chen, S. T., Cheng, W. C., Chiang, C. S., Kuo, Y. H., Hua, K. F., Hsu, I. C. (2011): Honokiol inhibits LPS-induced maturation and inflammatory response of human monocyte-derived dendritic cells. *J Cell Physiol*, 226, 2338-2349.
141. Chao, L. K., Liao, P. C., Ho, C. L., Wang, E. I., Chuang, C. C., Chiu, H. W., Hung, L. B., Hua, K. F. (2010): Anti-inflammatory bioactivities of honokiol through inhibition of protein kinase C, mitogen-activated protein kinase, and the NF-kappaB pathway to reduce LPS-induced TNFalpha and NO expression. *J Agric Food Chem*, 58, 3472-3478.
142. Weng, T. I., Wu, H. Y., Kuo, C. W., Liu, S. H. (2011): Honokiol rescues sepsis-associated acute lung injury and lethality via the inhibition of oxidative stress and inflammation. *Intensive Care Med*, 37, 533-541.
143. Kaushik, D. K., Mukhopadhyay, R., Kumawat, K. L., Gupta, M., Basu, A. (2012): Therapeutic targeting of Kruppel-like factor 4 abrogates microglial activation. *J Neuroinflammation*, 9, 57.
144. Kaushik, D. K., Gupta, M., Das, S., Basu, A. (2010): Kruppel-like factor 4, a novel transcription factor regulates microglial activation and subsequent neuroinflammation. *J Neuroinflammation*, 7, 68.
145. Kuribara, H., Kishi, E., Hattori, N., Yuzurihara, M., Maruyama, Y. (1999): Application of the elevated plus-maze test in mice for evaluation of the content of honokiol in water extracts of magnolia. *Phytother Res*, 13, 593-596.
146. Watanabe, K., Watanabe, H., Goto, Y., Yamaguchi, M., Yamamoto, N., Hagino, K. (1983): Pharmacological properties of magnolol and honokiol extracted from *Magnolia officinalis*: central depressant effects. *Planta Med*, 49, 103-108.
147. Kuribara, H., Stavinoha, W. B., Maruyama, Y. (1998): Behavioural pharmacological characteristics of honokiol, an anxiolytic agent present in extracts of *Magnolia* bark, evaluated by an elevated plus-maze test in mice. *J Pharm Pharmacol*, 50, 819-826.

148. Kuribara, H., Stavinoha, W. B., Maruyama, Y. (1999): Honokiol, a putative anxiolytic agent extracted from magnolia bark, has no diazepam-like side-effects in mice. *J Pharm Pharmacol*, 51, 97-103.
149. 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. *J Leukoc Biol*, 50, 86-92.
150. Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.
151. Viinikka, L. (1996): Nitric oxide as a challenge for the clinical chemistry laboratory. *Scand J Clin Lab Invest*, 56, 577-581.
152. Mur, L. A., Mandon, J., Cristescu, S. M., Harren, F. J., Prats, E. (2011): Methods of nitric oxide detection in plants: a commentary. *Plant Sci*, 181, 509-519.
153. Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-159.
154. Horsthemke, B., Schulz, M., Bauer, K. (1984): Degradation of substance P by neurones and glial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 125, 728-733.
155. Gerhard, A., Pavese, N., Hotton, G., Turkheimer, F., Es, M., Hammers, A., Eggert, K., Oertel, W., Banati, R. B., Brooks, D. J. (2006): In vivo imaging of microglial activation with [¹¹C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 21, 404-412.
156. Sawada, M., Imamura, K., Nagatsu, T. (2006): Role of cytokines in inflammatory process in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 373-381.
157. Block, M. L., Hong, J. S. (2007): Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity. *Biochem Soc Trans*, 35, 1127-1132.
158. Banati, R. B., Graeber, M. B. (1994): Surveillance, intervention and cytotoxicity: is there a protective role of microglia? *Dev Neurosci*, 16, 114-127.
159. Lyman, M., Lloyd, D. G., Ji, X., Vizcaychipi, M. P., Ma, D. (2014): Neuroinflammation: the role and consequences. *Neurosci Res*, 79, 1-12.
160. Lim, G. P., Yang, F., Chu, T., Chen, P., Beech, W., Teter, B., Tran, T., Ubeda, O., Ashe, K. H., Frautschy, S. A., Cole, G. M. (2000): Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 20, 5709-5714.
161. Zandi, P. P., Anthony, J. C., Hayden, K. M., Mehta, K., Mayer, L., Breitner, J. C. (2002): Reduced incidence of AD with NSAID but not H2 receptor antagonists: the Cache County Study. *Neurology*, 59, 880-886.
162. Rees, K., Stowe, R., Patel, S., Ives, N., Breen, K., Clarke, C. E., Ben-Shlomo, Y. (2011): Non-steroidal anti-inflammatory drugs as disease-modifying agents for Parkinson's disease: evidence from observational studies. *Cochrane Database Syst Rev*, Cd008454.
163. van Gool, W. A., Aisen, P. S., Eikelenboom, P. (2003): Anti-inflammatory therapy in Alzheimer's disease: is hope still alive? *J Neurol*, 250, 788-792.

164. Samii, A., Etminan, M., Wiens, M. O., Jafari, S. (2009): NSAID use and the risk of Parkinson's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Drugs Aging*, 26, 769-779.
165. Manthripragada, A. D., Schernhammer, E. S., Qiu, J., Friis, S., Wermuth, L., Olsen, J. H., Ritz, B. (2011): Non-steroidal anti-inflammatory drug use and the risk of Parkinson's disease. *Neuroepidemiology*, 36, 155-161.
166. Tansey, M. G., Goldberg, M. S. (2010): Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis*, 37, 510-518.
167. 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 Pharmacol Sci*, 26, 517-525.
168. Jimenez, S., Baglietto-Vargas, D., Caballero, C., Moreno-Gonzalez, I., Torres, M., Sanchez-Varo, R., Ruano, D., Vizuete, M., Gutierrez, A., Vitorica, J. (2008): Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J Neurosci*, 28, 11650-11661.
169. Michelucci, A., Heurtaux, T., Grandbarbe, L., Morga, E., Heuschling, P. (2009): Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta. *J Neuroimmunol*, 210, 3-12.
170. Nolan, Y., Maher, F. O., Martin, D. S., Clarke, R. M., Brady, M. T., Bolton, A. E., Mills, K. H., Lynch, M. A. (2005): Role of interleukin-4 in regulation of age-related inflammatory changes in the hippocampus. *J Biol Chem*, 280, 9354-9362.
171. Shimizu, E., Kawahara, K., Kajizono, M., Sawada, M., Nakayama, H. (2008): IL-4-induced selective clearance of oligomeric beta-amyloid peptide(1-42) by rat primary type 2 microglia. *J Immunol*, 181, 6503-6513.
172. Kawahara, K., Suenobu, M., Yoshida, A., Koga, K., Hyodo, A., Ohtsuka, H., Kuniyasu, A., Tamamaki, N., Sugimoto, Y., Nakayama, H. (2012): Intracerebral microinjection of interleukin-4/interleukin-13 reduces beta-amyloid accumulation in the ipsilateral side and improves cognitive deficits in young amyloid precursor protein 23 mice. *Neuroscience*, 207, 243-260.
173. Wyss-Coray, T., Mucke, L. (2002): Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron*, 35, 419-432.
174. Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Munch, A. E., Chung, W. S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Stevens, B., Barres, B. A. (2017): Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541, 481-487.
175. Rosenstiel, P., Lucius, R., Deuschl, G., Sievers, J., Wilms, H. (2001): From theory to therapy: implications from an in vitro model of ramified microglia. *Microsc Res Tech*, 54, 18-25.

176. Wilms, H., Sievers, J., Rickert, U., Rostami-Yazdi, M., Mrowietz, U., Lucius, R. (2010): Dimethylfumarate inhibits microglial and astrocytic inflammation by suppressing the synthesis of nitric oxide, IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 in an in-vitro model of brain inflammation. *J Neuroinflammation*, 7, 30.
177. Meredith, G. E., Sonsalla, P. K., Chesselet, M. F. (2008): Animal models of Parkinson's disease progression. *Acta Neuropathol*, 115, 385-398.
178. Galea, E., Reis, D. J., Fox, E. S., Xu, H., Feinstein, D. L. (1996): CD14 mediate endotoxin induction of nitric oxide synthase in cultured brain glial cells. *J Neuroimmunol*, 64, 19-28.
179. Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006): Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783-801.
180. Orihuela, R., McPherson, C. A., Harry, G. J. (2016): Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol*, 173, 649-665.
181. Darlington, C. L. (2005): Astrocytes as targets for neuroprotective drugs. *Curr Opin Investig Drugs*, 6, 700-703.
182. Cuadros, M. A., Navascues, J. (1998): The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol*, 56, 173-189.
183. Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., Huber, T. (2013): Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci*, 7, 45.
184. Boll, M. C., Alcaraz-Zubeldia, M., Montes, S., Rios, C. (2008): Free copper, ferroxidase and SOD1 activities, lipid peroxidation and NO(x) content in the CSF. A different marker profile in four neurodegenerative diseases. *Neurochem Res*, 33, 1717-1723.
185. Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G. C., Town, T., Morgan, D., Shinohara, M. L., Perry, V. H., Holmes, C., Bazan, N. G., Brooks, D. J., Hunot, S., Joseph, B., Deigendesch, N., Garaschuk, O., Boddeke, E., Dinarello, C. A., Breitner, J. C., Cole, G. M., Golenbock, D. T., Kummer, M. P. (2015): Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*, 14, 388-405.
186. Dawson, V. L., Dawson, T. M. (1996): Nitric oxide neurotoxicity. *J Chem Neuroanat*, 10, 179-190.
187. Hunot, S., Boissiere, F., Faucheux, B., Brugg, B., Mouatt-Prigent, A., Agid, Y., Hirsch, E. C. (1996): Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 72, 355-363.
188. Kummer, M. P., Hermes, M., Delekarte, A., Hammerschmidt, T., Kumar, S., Terwel, D., Walter, J., Pape, H. C., Konig, S., Roeber, S., Jessen, F., Klockgether, T., Korte, M., Heneka, M. T. (2011): Nitration of tyrosine 10 critically enhances amyloid beta aggregation and plaque formation. *Neuron*, 71, 833-844.
189. Ouchi, Y., Yoshikawa, E., Sekine, Y., Futatsubashi, M., Kanno, T., Ogusu, T., Torizuka, T. (2005): Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 57, 168-175.

190. Hirsch, E. C., Hunot, S. (2009): Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol*, 8, 382-397.
191. Blum-Degen, D., Muller, T., Kuhn, W., Gerlach, M., Przuntek, H., Riederer, P. (1995): Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett*, 202, 17-20.
192. Mogi, M., Harada, M., Narabayashi, H., Inagaki, H., Minami, M., Nagatsu, T. (1996): Interleukin (IL)-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 211, 13-16.
193. Muller, T., Blum-Degen, D., Przuntek, H., Kuhn, W. (1998): Interleukin-6 levels in cerebrospinal fluid inversely correlate to severity of Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand*, 98, 142-144.
194. Chen, H., O'Reilly, E. J., Schwarzschild, M. A., Ascherio, A. (2008): Peripheral inflammatory biomarkers and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol*, 167, 90-95.
195. Marz, P., Heese, K., Hock, C., Golombowski, S., Muller-Spahn, F., Rose-John, S., Otten, U. (1997): Interleukin-6 (IL-6) and soluble forms of IL-6 receptors are not altered in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett*, 239, 29-32.
196. Martinez, M., Fernandez-Vivancos, E., Frank, A., De la Fuente, M., Hernanz, A. (2000): Increased cerebrospinal fluid fas (Apo-1) levels in Alzheimer's disease. Relationship with IL-6 concentrations. *Brain Res*, 869, 216-219.
197. Hull, M., Strauss, S., Berger, M., Volk, B., Bauer, J. (1996): The participation of interleukin-6, a stress-inducible cytokine, in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*, 78, 37-41.
198. Ringheim, G. E., Szczepanik, A. M., Petko, W., Burgher, K. L., Zhu, S. Z., Chao, C. C. (1998): Enhancement of beta-amyloid precursor protein transcription and expression by the soluble interleukin-6 receptor/interleukin-6 complex. *Brain Res Mol Brain Res*, 55, 35-44.
199. Qiu, Z., Gruol, D. L. (2003): Interleukin-6, beta-amyloid peptide and NMDA interactions in rat cortical neurons. *J Neuroimmunol*, 139, 51-57.
200. Gayle, D. A., Ling, Z., Tong, C., Landers, T., Lipton, J. W., Carvey, P. M. (2002): Lipopolysaccharide (LPS)-induced dopamine cell loss in culture: roles of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and nitric oxide. *Brain Res Dev Brain Res*, 133, 27-35.
201. Lee, S. Y., Cho, J. Y. (2009): Inhibitory effects of honokiol on LPS and PMA-induced cellular responses of macrophages and monocytes. *BMB Rep*, 42, 574-579.
202. Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T., Ichijo, H. (2001): ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep*, 2, 222-228.
203. Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P. (2003): Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*, 10, 45-65.
204. Dickson, D. W. (1997): The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol*, 56, 321-339.

205. Culpan, D., MacGowan, S. H., Ford, J. M., Nicoll, J. A., Griffin, W. S., Dewar, D., Cairns, N. J., Hughes, A., Kehoe, P. G., Wilcock, G. K. (2003): Tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 350, 61-65.
206. Ma, S. L., Tang, N. L., Lam, L. C., Chiu, H. F. (2004): Association between tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism and Alzheimer's disease. *Neurology*, 62, 307-309.
207. Laws, S. M., Pernecky, R., Wagenpfeil, S., Muller, U., Forstl, H., Martins, R. N., Kurz, A., Riemenschneider, M. (2005): TNF polymorphisms in Alzheimer disease and functional implications on CSF beta-amyloid levels. *Hum Mutat*, 26, 29-35.
208. Yamamoto, M., Kiyota, T., Horiba, M., Buescher, J. L., Walsh, S. M., Gendelman, H. E., Ikezu, T. (2007): Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha regulate amyloid-beta plaque deposition and beta-secretase expression in Swedish mutant APP transgenic mice. *Am J Pathol*, 170, 680-692.
209. Buchhave, P., Zetterberg, H., Blennow, K., Minthon, L., Janciauskiene, S., Hansson, O. (2010): Soluble TNF receptors are associated with A β metabolism and conversion to dementia in subjects with mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*, 31, 1877-1884.
210. Chen, C. H., Zhou, W., Liu, S., Deng, Y., Cai, F., Tone, M., Tone, Y., Tong, Y., Song, W. (2012): Increased NF-kappaB signalling up-regulates BACE1 expression and its therapeutic potential in Alzheimer's disease. *Int J Neuropsychopharmacol*, 15, 77-90.
211. Zhang, P., Liu, X., Zhu, Y., Chen, S., Zhou, D., Wang, Y. (2013): Honokiol inhibits the inflammatory reaction during cerebral ischemia reperfusion by suppressing NF-kappaB activation and cytokine production of glial cells. *Neurosci Lett*, 534, 123-127.
212. McCoy, M. K., Martinez, T. N., Ruhn, K. A., Szymkowski, D. E., Smith, C. G., Botterman, B. R., Tansey, K. E., Tansey, M. G. (2006): Blocking soluble tumor necrosis factor signaling with dominant-negative tumor necrosis factor inhibitor attenuates loss of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 26, 9365-9375.
213. Cai, Z., Pang, Y., Lin, S., Rhodes, P. G. (2003): Differential roles of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta in lipopolysaccharide-induced brain injury in the neonatal rat. *Brain Res*, 975, 37-47.
214. Anderson, W. D., Makadia, H. K., Greenhalgh, A. D., Schwaber, J. S., David, S., Vadigepalli, R. (2015): Computational modeling of cytokine signaling in microglia. *Mol Biosyst*, 11, 3332-3346.
215. Qian, L., Hong, J. S., Flood, P. M. (2006): Role of microglia in inflammation-mediated degeneration of dopaminergic neurons: neuroprotective effect of interleukin 10. *J Neural Transm Suppl*, 367-371.
216. Arimoto, T., Choi, D. Y., Lu, X., Liu, M., Nguyen, X. V., Zheng, N., Stewart, C. A., Kim, H. C., Bing, G. (2007): Interleukin-10 protects against inflammation-mediated degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra. *Neurobiol Aging*, 28, 894-906.
217. Brodacki, B., Staszewski, J., Toczyłowska, B., Kozłowska, E., Drela, N., Chalimoniuk, M., Stepień, A. (2008): Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNF α , and

- INFgamma concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. *Neurosci Lett*, 441, 158-162.
218. Rentzos, M., Nikolaou, C., Andreadou, E., Paraskevas, G. P., Rombos, A., Zoga, M., Tsoutsou, A., Boufidou, F., Kapaki, E., Vassilopoulos, D. (2009): Circulating interleukin-10 and interleukin-12 in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand*, 119, 332-337.
219. Menza, M., Dobkin, R. D., Marin, H., Mark, M. H., Gara, M., Bienfait, K., Dicke, A., Kusnekov, A. (2010): The role of inflammatory cytokines in cognition and other non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Psychosomatics*, 51, 474-479.
220. Cadet, P., Zhu, W., Mantione, K., Rymer, M., Dardik, I., Reisman, S., Hagberg, S., Stefano, G. B. (2003): Cyclic exercise induces anti-inflammatory signal molecule increases in the plasma of Parkinson's patients. *Int J Mol Med*, 12, 485-492.
221. Li, J., Shao, X., Wu, L., Feng, T., Jin, C., Fang, M., Wu, N., Yao, H. (2011): Honokiol: an effective inhibitor of tumor necrosis factor-alpha-induced up-regulation of inflammatory cytokine and chemokine production in human synovial fibroblasts. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 43, 380-386.
222. Bhat, N. R., Zhang, P., Lee, J. C., Hogan, E. L. (1998): Extracellular signal-regulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha gene expression in endotoxin-stimulated primary glial cultures. *J Neurosci*, 18, 1633-1641.
223. Lu, K., Cho, C. L., Liang, C. L., Chen, S. D., Liliang, P. C., Wang, S. Y., Chen, H. J. (2007): Inhibition of the MEK/ERK pathway reduces microglial activation and interleukin-1-beta expression in spinal cord ischemia/reperfusion injury in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 133, 934-941.
224. Wilms, H., Rosenstiel, P., Romero-Ramos, M., Arlt, A., Schafer, H., Seegert, D., Kahle, P. J., Odoy, S., Claasen, J. H., Holzkecht, C., Brandenburg, L. O., Deuschl, G., Schreiber, S., Kirik, D., Lucius, R. (2009): Suppression of MAP kinases inhibits microglial activation and attenuates neuronal cell death induced by alpha-synuclein protofibrils. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 22, 897-909.
225. Brandenburg, L. O., Kipp, M., Lucius, R., Pufe, T., Wruck, C. J. (2010): Sulforaphane suppresses LPS-induced inflammation in primary rat microglia. *Inflamm Res*, 59, 443-450.
226. Zhu, X., Castellani, R. J., Takeda, A., Nunomura, A., Atwood, C. S., Perry, G., Smith, M. A. (2001): Differential activation of neuronal ERK, JNK/SAPK and p38 in Alzheimer disease: the 'two hit' hypothesis. *Mech Ageing Dev*, 123, 39-46.
227. Pei, J. J., Braak, H., An, W. L., Winblad, B., Cowburn, R. F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I. (2002): Up-regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and MEK1/2 is associated with the progression of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res*, 109, 45-55.
228. Klegeris, A., Pelech, S., Giasson, B. I., Maguire, J., Zhang, H., McGeer, E. G., McGeer, P. L. (2008): Alpha-synuclein activates stress signaling protein kinases in THP-1 cells and microglia. *Neurobiol Aging*, 29, 739-752.

229. Seo, J. H., Rah, J. C., Choi, S. H., Shin, J. K., Min, K., Kim, H. S., Park, C. H., Kim, S., Kim, E. M., Lee, S. H., Lee, S., Suh, S. W., Suh, Y. H. (2002): Alpha-synuclein regulates neuronal survival via Bcl-2 family expression and PI3/Akt kinase pathway. *Faseb j*, 16, 1826-1828.
230. Churcher, I. (2006): Tau therapeutic strategies for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem*, 6, 579-595.
231. Zhu, X., Wang, Z., Hu, C., Li, Z., Hu, J. (2014): Honokiol suppresses TNF-alpha-induced migration and matrix metalloproteinase expression by blocking NF-kappaB activation via the ERK signaling pathway in rat aortic smooth muscle cells. *Acta Histochem*, 116, 588-595.
232. Wortzel, I., Seger, R. (2011): The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes Cancer*, 2, 195-209.
233. Lin, E., Cavanaugh, J. E., Leak, R. K., Perez, R. G., Zigmond, M. J. (2008): Rapid activation of ERK by 6-hydroxydopamine promotes survival of dopaminergic cells. *J Neurosci Res*, 86, 108-117.
234. Lee, Y. K., Choi, I. S., Kim, Y. H., Kim, K. H., Nam, S. Y., Yun, Y. W., Lee, M. S., Oh, K. W., Hong, J. T. (2009): Neurite outgrowth effect of 4-O-methylhonokiol by induction of neurotrophic factors through ERK activation. *Neurochem Res*, 34, 2251-2260.
235. McConnell, B. B., Yang, V. W. (2010): Mammalian Kruppel-like factors in health and diseases. *Physiol Rev*, 90, 1337-1381.
236. Wilms, H., Rosenstiel, P., Sievers, J., Deuschl, G., Zecca, L., Lucius, R. (2003): Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease. *Faseb j*, 17, 500-502.
237. Brown, G. C., Neher, J. J. (2010): Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. *Mol Neurobiol*, 41, 242-247.
238. Park, J. H., Riew, T. R., Shin, Y. J., Park, J. M., Cho, J. M., Lee, M. Y. (2014): Induction of Kruppel-like factor 4 expression in reactive astrocytes following ischemic injury in vitro and in vivo. *Histochem Cell Biol*, 141, 33-42.
239. Rempel, V., Fuchs, A., Hinz, S., Karcz, T., Lehr, M., Koetter, U., Muller, C. E. (2013): Magnolia Extract, Magnolol, and Metabolites: Activation of Cannabinoid CB2 Receptors and Blockade of the Related GPR55. *ACS Med Chem Lett*, 4, 41-45.
240. Coppola, M., Mondola, R. (2014): Potential use of *Magnolia officinalis* bark polyphenols in the treatment of cannabis dependence. *Med Hypotheses*, 83, 673-676.
241. Kozela, E., Juknat, A., Vogel, Z. (2017): Modulation of Astrocyte Activity by Cannabidiol, a Nonpsychoactive Cannabinoid. *Int J Mol Sci*, 18.
242. Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., Felder, C. C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B. R., Mechoulam, R., Pertwee, R. G. (2002): International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*, 54, 161-202.

243. Benito, C., Tolon, R. M., Pazos, M. R., Nunez, E., Castillo, A. I., Romero, J. (2008): Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation. *Br J Pharmacol*, 153, 277-285.
244. Pertwee, R. G. (1997): Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther*, 74, 129-180.
245. Morgan, N. H., Stanford, I. M., Woodhall, G. L. (2009): Functional CB2 type cannabinoid receptors at CNS synapses. *Neuropharmacology*, 57, 356-368.
246. Ashton, J. C., Glass, M. (2007): The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol*, 5, 73-80.
247. Gertsch, J., Anavi-Goffer, S. (2012): Methylhonokiol attenuates neuroinflammation: a role for cannabinoid receptors? *J Neuroinflammation*, 9, 135.
248. Ortega-Gutierrez, S., Molina-Holgado, E., Arevalo-Martin, A., Correa, F., Viso, A., Lopez-Rodriguez, M. L., Di Marzo, V., Guaza, C. (2005): Activation of the endocannabinoid system as therapeutic approach in a murine model of multiple sclerosis. *Faseb j*, 19, 1338-1340.
249. Esposito, G., Scuderi, C., Savani, C., Steardo, L., Jr., De Filippis, D., Cottone, P., Iuvone, T., Cuomo, V., Steardo, L. (2007): Cannabidiol in vivo blunts beta-amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1beta and iNOS expression. *Br J Pharmacol*, 151, 1272-1279.
250. Taferner, B., Schuehly, W., Huefner, A., Baburin, I., Wiesner, K., Ecker, G. F., Hering, S. (2011): Modulation of GABAA-receptors by honokiol and derivatives: subtype selectivity and structure-activity relationship. *J Med Chem*, 54, 5349-5361.
251. Lee, M., Schwab, C., McGeer, P. L. (2011): Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity. *Glia*, 59, 152-165.
252. Kotani, H., Tanabe, H., Mizukami, H., Amagaya, S., Inoue, M. (2012): A naturally occurring rexinoid, honokiol, can serve as a regulator of various retinoid x receptor heterodimers. *Biol Pharm Bull*, 35, 1-9.
253. Zhang-Gandhi, C. X., Drew, P. D. (2007): Liver X receptor and retinoid X receptor agonists inhibit inflammatory responses of microglia and astrocytes. *J Neuroimmunol*, 183, 50-59.
254. Lee, H. C., Headley, M. B., Iseki, M., Ikuta, K., Ziegler, S. F. (2008): Cutting edge: Inhibition of NF-kappaB-mediated TSLP expression by retinoid X receptor. *J Immunol*, 181, 5189-5193.
255. Woster, A. P., Combs, C. K. (2007): Differential ability of a thiazolidinedione PPARgamma agonist to attenuate cytokine secretion in primary microglia and macrophage-like cells. *J Neurochem*, 103, 67-76.
256. Xu, S., Guan, Q., Wang, C., Wei, X., Chen, X., Zheng, B., An, P., Zhang, J., Chang, L., Zhou, W., Mody, I., Wang, Q. (2014): Rosiglitazone prevents the memory deficits induced by amyloid-beta oligomers via inhibition of inflammatory responses. *Neurosci Lett*, 578, 7-11.

8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel, abgesehen von den Ratschlägen meines Doktorvaters und meiner Arbeitsgruppe, als die angegebenen benutzt habe.

Die Arbeit wurde bisher an keiner anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt.

Weiterhin erkläre ich, dass ich bisher weder ein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe noch dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Kiel, den 06.01.2018

Marvin Heimke

9 Danksagung

Diese Arbeit wäre nicht entstanden ohne die Unterstützung zahlreicher Beteiligter.

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ralph Lucius für die Vergabe des Promotionsplatzes, die Auswahlmöglichkeit des Themas, die zahlreichen Anregungen während der wissenschaftlichen Arbeit und nicht zuletzt für die mir entgegengebrachte Geduld.

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an Frau Dr. rer. nat. Uta Rickert für die hervorragende Unterstützung von der Versuchsplanung bis zur Verfassung dieser Arbeit richten, für die vielen Ratschläge und Diskussionen, die Motivierung sowie ihr stets offenes Ohr für Fragen.

Ich danke Frau Rosemarie Sprang, Frau Monika Grell, Herrn Günther Schäfer und Frau Gaby Steinkamp für die freundliche Aufnahme im Labor, die praktische Anleitung sowie die Unterstützung bei der Versuchsdurchführung.

Weiterhin danke ich Herrn Clemens Franke für die computertechnische Unterstützung.

In besonderem Maße möchte ich mich bei meiner Familie für ihre bedingungslose Unterstützung und ihren Ansporn sowohl im Studium als auch während der Ausarbeitung dieser Arbeit bedanken.

Zuletzt gilt ein großer Dank meinen Freunden für die Korrekturtätigkeit und Kritiken zu dieser Arbeit.

10 Curriculum vitae

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wurden alle Unterpunkte bis auf „Veröffentlichung“ entfernt.

Veröffentlichung

- 09/2015 Zitierfähiges Abstract:
Heimke, M., Wilms, H., Lucius, R., Rickert, U. (2015): The influence of honokiol on microglia and astrocytes.
Posterpräsentation
Anatomische Gesellschaft, 110th Annual Meeting
Würzburg
- 01/2018 Paper eingereicht:
Rickert, U., Cossais, F., Heimke, M., Arnold, P., Wilms, H., Lucius, R.: Anti-inflammatory properties of Honokiol in activated primary microglia and astrocytes.