

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

**Untersuchungen zum Einfluss von Niacin
auf primäre Mikroglia der Ratte *in vitro***

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

vorgelegt von
Isabel Demmer
aus München

Kiel 2019

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Gohlke, Institut für Experimentelle u. Klinische
Pharmakologie

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2019

Zum Druck genehmigt Kiel, den 20.7.2019

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Inhaltsverzeichnis

I.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
II.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
1	EINLEITUNG	1
1.1	Der Alterungsprozess und seine Auswirkungen auf das ZNS	1
1.2	Mikroglia und ihre Rolle im ZNS	2
1.3	Neurodegenerative Veränderungen	5
1.3.1	Morbus Parkinson	5
1.4	Niacin, ein vielseitiges Vitamin	8
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	11
2	MATERIAL UND METHODEN	12
2.1	Material.....	12
2.1.1	Geräte.....	12
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	13
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	14
2.1.4	Niacin	17
2.1.5	Kits	17
2.1.6	Enzyme	17
2.1.7	Oligonukleotide für die quantitative Realtime-Polymerasekettenreaktion ...	18
2.1.8	Primärantikörper	19
2.1.9	Sekundärantikörper.....	19
2.1.10	Medien, Puffer und Lösungen	20
2.1.10.1	Medien	20
2.1.10.2	Puffer und Lösungen.....	20
2.1.11	Software.....	22

2.1.12 Versuchstiere	22
2.2 Methoden	23
2.2.1 Gewinnung und Kultivierung primärer Mikroglia.....	23
2.2.2 Ernte der Mikroglia.....	24
2.2.3 Stimulation der Mikroglia.....	24
2.2.4 Toxizitätsanalyse mittels MTT-Test.....	25
2.2.5 Indirekte Stickstoffmonoxid (NO) Analyse mittels Griess-Reagenz.....	25
2.2.6 Coomassie Blue Färbung	26
2.2.7 Untersuchungen auf RNA-Ebene.....	26
2.2.7.1 RNA-Isolierung.....	26
2.2.7.2 Quantifizierung der extrahierten RNA	27
2.2.7.3 DNA-Verdau und Reverse Transkription.....	27
2.2.7.4 Quantitative Realtime-Polymerasekettenreaktion (qPCR).....	28
2.2.8 Untersuchungen auf Proteinebene mittels Western Blot Analyse.....	30
2.2.8.1 Isolierung von Gesamtprotein	30
2.2.8.2 Bicinchoninsäure (BCA)-Methode	30
2.2.8.3 SDS-Polyamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	31
2.2.8.4 Blotten	32
2.2.8.5 Immundetektion.....	32
2.2.9 TNF- α und Il-6 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	33
2.2.9.1 Immunfluoreszenzfärbung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (p65) ..	35
2.2.10 Statistische Analysen.....	36
3 ERGEBNISSE	37
3.1 Niacin hatte keinen zytotoxischen Einfluss auf primäre Mikroglia.....	37
3.2 Auswirkung von Niacin auf die Zellmorphologie von Mikroglia	38
3.3 Niacin reduzierte die Synthese des Enzyms induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und die NO-Synthese von Mikroglia	42
3.4 Niacin, ein Agonist des HCA ₂ -Rezeptors.....	44

3.5	Untersuchungen zum Einfluss von Niacin auf die Synthese proinflammatorischer Mediatoren auf mRNA-Ebene in primärer Mikroglia.....	45
3.5.1	Niacin senkte die Synthese des Zytokines Tumornekrosefaktor- α (TNF- α).....	46
3.5.2	Niacin senkte die Synthese des Zytokines Interleukin-1 beta (IL-1 β)	47
3.5.3	Niacin senkte die Synthese des Zytokines Interleukin-6 (IL-6) nach 6-stündiger Inkubation	48
3.6	Wirkung von Niacin auf Proteinebene	49
3.6.1	Niacin regelte die TNF- α Sekretion in Mikroglia herab	50
3.6.2	Niacin regelte die IL-6 Sekretion in Mikroglia herab.....	51
3.6.3	Niacin unterdrückte die Aktivierung intrazellulärer Signalwege (ERK _{1/2} -Kaskade)	53
3.6.4	Niacin verringerte die nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B (p65).....	57
4	DISKUSSION.....	59
4.1	Niacin wirkt positiv auf das Zellüberleben von primärer Mikroglia	59
4.2	Zellmorphologische Veränderungen unter dem Einfluss von Niacin.....	61
4.3	Niacin beeinflusst die NO-Freisetzung der Mikroglia über die Herabregulation der iNOS	63
4.4	Vermittlung der antiinflammatorischen Effekte von Niacin über den HCA ₂ -Rezeptor.....	67
4.5	Einfluss von Niacin auf weitere intrazelluläre Signalwege	72
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	73
6	SUMMARY	74
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	76
8	ERKLÄRUNG	85

9 DANKSAGUNG86

I. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
AD	Morbus Alzheimer
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest	bidestilliertes Wasser
BCA	Bicinchoninsäure
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD33/ 36	<i>cluster of differentiation 33/ 36</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cu ²⁺	Kupfer-II-Ionen
DIC	disseminierte intravasale Koagulopathie
DMF	Dimethylformamid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
DTT	Dithiotreitol
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gez.	gezeichnet

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCAR ₂	<i>hydroxycarboxylic acid receptor 2</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HSL	hormonsensitive Lipase
I-κBs	<i>inhibitors of NF-κB</i>
IL-1β	Interleukin 1β
IL-6	Interleukin 6
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IPS	idiopathisches Parkinson-Syndrom
l	Liter
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LPS	Lipopolysaccachrid
LRRK2	<i>leucine-rich repeat kinase 2</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MMF	Monomethylfumarat
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Multiple Sklerose
MTT	Methylthiazoltetrazolium [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid]
NAD ⁺ / NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinsäureamidadenindinukleotid-Phosphat
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂ ⁻	Superoxid-Radikal
ONOO ⁻	Peroxynitrit
PAGE	Polyacrylamidelektrophorese

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD	Morbus Parkinson
Pen/ Strep	Penicillin/ Streptomycin
pERK	<i>phosphorylated ERK</i>
PKA	Proteinkinase A
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative <i>realtime-polymerase chain reaction</i>
RelA (p65)	NF- κ B Untereinheit
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SDS	Dodecylsulfat Natriumsalz
sec	Sekunde
Sirt-1	Sirtuin-1
β -OHB	β -Hydroxybutyrat
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TLR	toll-like-receptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TTP	thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura
WB	Western Blot
ZNS	zentrales Nervensystem

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Nützliche und schädliche Funktionen von Mikroglia im ZNS.....	4
Abb. 1.2: Strukturformeln von Nikotinsäure und Nikotinamid.	8
Abb. 1.3: NAD ⁺ Vorläufer Metabolismus.	9
Abb. 3.1: Einfluss von Niacin und LPS auf das Zellüberleben primärer Mikroglia.	38
Abb. 3.2: Veränderung der Zellmorphologie primärer Mikroglia nach 6 Stunden.	40
Abb. 3.3: Veränderung der Zellmorphologie primärer Mikroglia nach 24 Stunden.	41
Abb. 3.4: Niacin reduzierte die mRNA-Menge von iNOS in LPS-aktivierter Mikroglia nach 6 und 24 Stunden.	43
Abb. 3.5: Niacin reduzierte die NO-Freisetzung in LPS-aktivierter Mikroglia nach 6 und 24 Stunden.	44
Abb. 3.6: Primäre Mikroglia exprimieren den HCA2-Rezeptor, dessen mRNA-Menge in LPS-aktivierter Mikroglia herabreguliert wurde.	45
Abb. 3.7: Niacin reduzierte signifikant die TNF- α mRNA-Synthese von aktivierter Mikroglia nach 6 Stunden.	47
Abb. 3.8: Niacin reduzierte signifikant die IL-1 β mRNA-Synthese von aktivierter Mikroglia nach 2 und 6 Stunden.	48
Abb. 3.9: Niacin reduzierte signifikant die IL-6 mRNA-Synthese von aktivierter Mikroglia nach 6 Stunden.	49
Abb. 3.10: Einfluss von Niacin auf die TNF- α Sekretion auf Proteinebene.	51
Abb. 3.11: Einfluss von Niacin auf die IL-6 Sekretion auf Proteinebene.	53
Abb. 3.12: Einfluss von Niacin nach 15 Minuten auf den MAPK-Signalweg in Mikroglia.	54
Abb. 3.13: Einfluss von Niacin nach 30 Minuten auf den MAPK-Signalweg in Mikroglia.	55
Abb. 3.15: Niacin verringerte die Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern nach 6-stündiger Stimulation.	58
Abb. 4.1: Quellen von ROS/ RNS und ihre zellulären Wirkungen.	65
Abb. 4.2: Möglicher Signalweg für Niacin durch die Bindung des HCA2-Rezeptors.	70

1 Einleitung

1.1 Der Alterungsprozess und seine Auswirkungen auf das ZNS

Die durchschnittliche Lebenserwartung der Menschen in den westlich geprägten Industrieländern wird immer höher. Ursächlich dafür sind unter anderem die verbesserte medizinische Versorgung und eine flächendeckende Aufklärung über eine gesunde Lebensweise.

Mit dem steigenden Alter geht aber auch der fortschreitende körperliche Abbau einher. Die Organfunktionen verlieren an Leistungsfähigkeit und auch im Gehirn beginnt ein Umbau mit zunehmendem Zellverlust. Es gibt viele Theorien, die sich mit den Alterungsprozessen befassen. Einerseits geht man davon aus, dass sogenannte intrinsische Faktoren, wie z.B. genetische Prädispositionen, eine wichtige Rolle spielen und andererseits sogenannte extrinsische Faktoren, zu denen Ernährung und Umwelteinflüsse (z.B. Verunreinigungen der Luft) zählen und sich beeinflussend auf die Alterung des Körpers auswirken.

Auf zellulärer Ebene macht man eine Telomerverkürzung der Chromosomen nach jeder Zellteilung mitverantwortlich für das Altern der Zellen. Bei jeder Zellteilung geht eine gewisse Telomerasequenz verloren, was schlussendlich zum Zellverlust führt.

Jedoch auch postmitotische Zellen, wie Neurone, sind dem Alterungsprozess unterworfen. Hier greift nun die *free radical theory of aging*. In dieser Theorie geht man davon aus, dass durch Anreicherung von freien Radikalen und Oxidantien zelluläre Prozesse fehlerhaft ablaufen und es somit zu Beschädigungen der Zellen kommen kann (Beckman und Ames 1998; Grune und Stein 2013).

Freie Radikale haben unterschiedliche Entstehungsmöglichkeiten. Sie können durch innere zelluläre Prozesse oder auch durch äußere Einflüsse, wie z.B. UV-Strahlung, entstehen. Die erhöhte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt zu einem Ungleichgewicht zwischen Oxidation und Antioxidantien in den Zellen. Diese Erhöhung der ROS bezeichnet man auch als *oxidativen Stress*. Die Folgen des *oxidativen Stresses* auf die Zellen können, wie oben beschrieben, fehlerhafte Zellprozesse sein, welche wiederum zu einer gesteigerten Freisetzung freier Radikale führen können. Im ZNS gelten vor allem *oxidativer Stress* und vermehrte Gliazellaktivierung als Merkmale der Alterung. Auch bei der Ausprägung

altersbedingter neurodegenerative Erkrankungen scheinen diese beiden Faktoren eine bedeutende Rolle zu spielen. Besonders Mikroglia, die ortsständigen Makrophagen des ZNS, stellen eine der Hauptquelle oxidativer Erzeugnisse wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO), und entzündungsfördernder Mediatoren wie Zytokine, während des Alterns dar. Entzündlichen Prozessen wird eine zentrale Rolle im Alterungsprozess und bei altersabhängigen Störungen zugeschrieben (Koellhoffer u. a. 2017).

1.2 Mikroglia und ihre Rolle im ZNS

Pio del Rio-Hortega beschrieb im Jahre 1932 als erster die Mikroglia als einen Bestandteil des zentralen Nervensystems. Damit gilt er u.a. als Entdecker der Mikroglia und Oligodendrozyten. Schon damals postulierte er, dass Mikroglia eine amöboide Form aufweisen und sich in eine ramifizierte Form umwandeln können (Kettenmann u. a. 2011).

Mikroglia machen ungefähr 10 - 12 % der Zellen des zentralen Nervensystems aus und sind dort die am häufigsten vorkommenden mononuklearen Phagozyten. Deshalb werden sie auch als ortsständige Makrophagen des ZNS bezeichnet und spielen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort und bei entzündlichen Prozessen im ZNS. Mikroglia stammen aus frühen myeloiden Vorläufern des embryonalen Dottersacks und wandern in das sich entwickelnde Neuralrohr ein bevor sich die Blut-Hirn-Schranke ausgebildet hat und proliferieren dort im Anschluss (Colonna und Butovsky 2017).

Wie oben erwähnt, beschrieb schon Del Rio-Hortega, dass Mikroglia in verschiedenen Konfigurationen vorliegen können. Lange galt, dass Mikroglia im ramifizierten Zustand ruhend, also inaktiv sind. In dieser ramifizierten Form liegen sie unter physiologischen Bedingungen im ZNS vor und besitzen wenig Soma und viele dünne Fortsätze. Durch pathologische Prozesse aktiviert, ändern die Mikroglia ihre Form in eine amöboide, aktive Gestalt mit kurzen und dickeren Fortsätzen. Doch mittlerweile ist bekannt, dass sich die Morphologie der Mikroglia nicht auf einen Reiz hin in einen einzigen bestimmten Zustand ändert, sondern dass es eine Vielzahl von Phänotypen gibt. Dieser Wechsel des Aktivierungszustandes kommt auch bei Makrophagen vor. Bei ihnen ist eine klassische Aktivierung (M1) und eine alternative Aktivierung (M2)

bekannt. Da Mikroglia Mitglieder der Monozyten-Makrophagen Familie sind, weisen sie auch diesen Phänotypenwechsel auf (Varnum und Ikezu 2012). Im M1-Aktivierungszustand antwortet die Mikroglia auf Verletzungen und Infektionen mit der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen. In der M2-Konfiguration wirkt die Mikroglia dämpfend auf die proinflammatorische Immunantwort ein und fördert die Phagozytose von Zelldebris und Geweberegeneration. Damit trägt sie in diesem Zustand zur Immunsuppression und zum Schutz der Neuronen bei (Tang und Le 2016).

Ebenso ist die Mikroglia in der ramifizierten Form nicht ruhend. Mikroglia „scannen“ kontinuierlich durch Strecken und Zurückziehen ihrer Zellfortsätze ihre Umgebung und können über diese Verbindungen mit Neuronen, Astrozyten, Blutgefäßen und Synapsen kommunizieren (Mosser u. a. 2017).

In vivo Studien an gesunden Mäusen konnten zeigen, dass Mikroglia sogar fähig sind, in einer Stunde das ganze Hirnparenchym zu überprüfen. Somit kontrollieren Mikroglia ständig aufmerksam den Zustand des Gehirns (Nimmerjahn u. a. 2005).

Durch dieses ständige Überprüfen ihrer Umgebung helfen sie, die Homöostase im ZNS aufrecht zu erhalten. Denn sie können sterbende oder tote Zellen und Zelldebris phagozytieren und eine große Bandbreite an Faktoren freisetzen, durch die sie mit anderen Zellen des ZNS kommunizieren. Einige von ihnen fördern die Apoptose, wie TNF- α oder ROS, andere unterstützen das Zellüberleben und die Proliferation. Unter anderem durch diese Eigenschaften nehmen sie auch eine wichtige Rolle bei der Gehirnentwicklung ein und sorgen so für einen geregelten Umbau des ZNS (Bilimoria und Stevens 2015).

Ebenso wird die synaptische Aktivität, wie oben erwähnt, im erwachsenen Gehirn durch Mikroglia beeinflusst, indem sie das Molekül *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) sezernieren. Mikroglia nehmen also Einfluss auf die Vernetzung des Gehirns und kontrollieren den Zustand der Neurone (Latz u. a. 2014).

Aber nicht nur zum Aufrechterhalten der Gewebshomöostase dienen die Mikroglia, sie sind auch ein wichtiger Bestandteil der Immunantwort des ZNS. Durch eingedrungene Mikroorganismen oder Verletzungen des Gewebes werden sie aktiviert, setzen daraufhin verschiedene Entzündungsmediatoren frei, wie z.B. Zytokine und freie Radikale, und werden zur Phagozytose angeregt.

Nimmt die Aktivierung der Mikroglia nun aber vermehrt in Richtung M1-Konfiguration zu, entsteht ein Ungleichgewicht und die entzündungsfördernden Einflüsse gewinnen Überhand. Bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Parkinson (PD), kommt es als Folge der fortschreitenden Zellschädigung und des Neuronenverlusts zur Aktivierung der Immunantwort des ZNS und somit zu einer Aktivierung der Mikroglia. Im Falle von PD wird bei der Degeneration der dopaminergen Neurone u.a. Neuromelanin freigesetzt, was die Mikrogliazellaktivierung fördert und so die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen stimuliert, den Transkriptionsfaktor NF- κ -B hochreguliert und den MAP-Kinase-Signalweg aktiviert (Hirsch u. a. 2012). Ist diese Aktivierung der Mikroglia nun von lang anhaltender Dauer, wie bei PD, fördern diese chronischen neuroinflammatorischen Prozesse das Fortschreiten der Erkrankung.

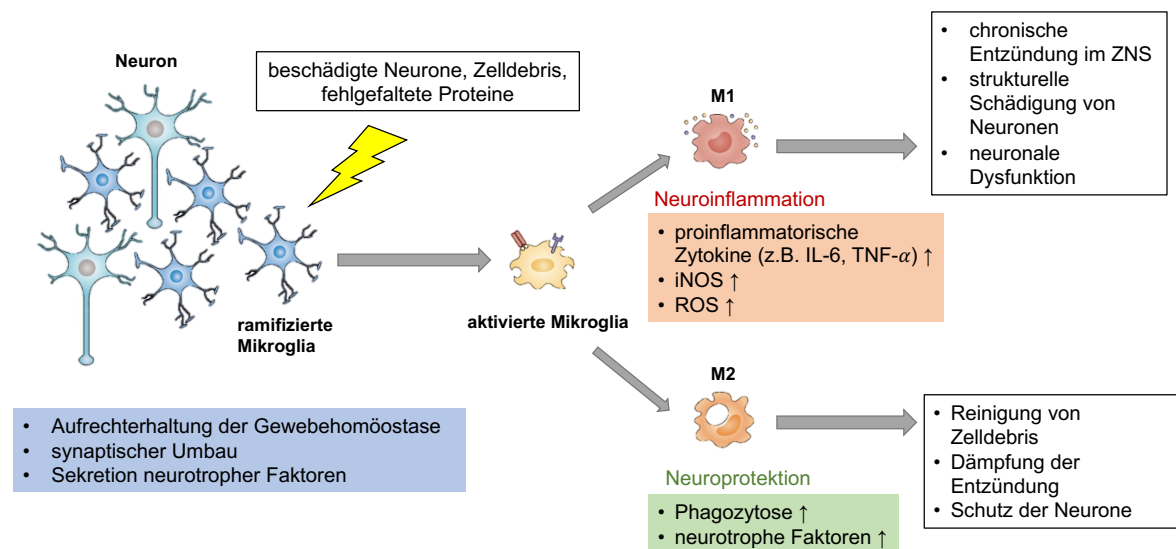


Abb. 1.1: Nützliche und schädliche Funktionen von Mikroglia im ZNS.

Im gesunden Gehirn bilden Mikroglia einen gitterähnlichen Verbund und stehen in engem Kontakt mit benachbarten Neuronen. Sie bauen Synapsen um und sezernieren neurotrophe Faktoren, um das neuronale Netzwerk aufrecht zu erhalten. Durch Phagozytose von akkumulierten Zelldebris tragen sie zum Konstanthalten der Gewebemöostase bei. Verschiedene Stimuli können durch Bindung an Rezeptoren, die auf der Oberfläche von Mikroglia exprimiert werden (z.B. TLR2, TLR4, TLR6, CD33, CD36), die Mikrogliaaktivierung fördern. Es hängt von der Signalstärke, der Stelle im Gewebe und den Umgebungseinflüssen ab, ob die Beseitigung des Reizes oder die Sekretion von Entzündungsmediatoren im Vordergrund steht. Die M1-Konfiguration ist mit der gesteigerten Expression der iNOS, erhöhter Produktion von ROS und proinflammatorischen Zytokinen, wie z.B. IL-1 β , TNF- α , IL-6, assoziiert. In der M2-Konfiguration wird vor allem die Phagozytose und Freisetzung neurotropher Faktoren gefördert. Diese unterschiedlichen Antwortmöglichkeiten der aktivierten Mikroglia bewirken entweder eine Dämpfung der Entzündungsreaktion oder führen zu einer chronischen Neuroinflammation. Chronische Neuroinflammation kann zur neuronalen Dysfunktion und Neuronenverlust führen (modifiziert nach Latz u. a. 2014 und London u. a. 2013).

1.3 Neurodegenerative Veränderungen

Unter neurodegenerativen Veränderungen wird ein großer Bereich neuronaler Erkrankungen zusammengefasst. Der Begriff Neurodegeneration setzt sich aus dem griechischen Wort *neuron*, was übersetzt *Nerv* heißt und dem, aus dem Lateinischen stammenden Wort *degenerare*, was so viel wie *aus der Art schlagen* bedeutet, zusammen. Wie diese wörtliche Übersetzung schon andeutet, handelt es sich bei dieser Art von Erkrankungen um Verfallserscheinungen im Nervensystem (Jahn und Werheid 2015).

Den neurodegenerativen Erkrankungen gemeinsam ist jedoch die Tatsache, dass Proteinablagerungen in Bereichen des Gehirns akkumulieren. Diese Akkumulation stellt eine der Hauptursachen bei der Entstehung von neurodegenerativen Veränderungen dar, da durch sie eine erhöhte Reaktion der zellulären Abwehr im ZNS provoziert wird. Somit ist jede primäre Neurodegeneration mit einem sekundären neuroinflammatorischen Aspekt assoziiert. Mikroglia werden z.B. durch geschädigte Neurone aktiviert, was wiederum zu einer verstärkten Bildung der ROS und inflammatorischen Mediatoren führen kann (Grune und Stein 2013).

1.3.1 Morbus Parkinson

Zu den neurodegenerativen Erkrankungen zählt man unter anderem Morbus Parkinson (PD). Morbus Parkinson ist die zweit häufigste neurodegenerative Erkrankung nach Morbus Alzheimer. Die Inzidenz der Parkinson-Erkrankung liegt bei 10-18 Erkrankungen auf 100.000 Personen pro Jahr. Mit der steigenden Lebenserwartung und dadurch alternden Bevölkerung wird die Anzahl der an Parkinson erkrankten Menschen voraussichtlich um mehr als 50 % bis zum Jahr 2030 steigen (Kalia und Lang 2015).

Der englische Arzt James Parkinson beschrieb bereits 1817 in seiner Schrift „*An Essay on the Shaking Palsy*“ die für diese Erkrankung typischen Kardinalsymptome Tremor und Bradykinese und lieferte damit eine Grundlage für die weitere Forschung. Mittlerweile gelten Bradykinese, Rigor, Ruhetremor und posturale Instabilität als die vier Leitsymptome des idiopathischen Parkinson-Syndroms (IPS).

Die Parkinson-Krankheit wird eingeteilt in das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS), oder auch primäre Parkinson-Krankheit genannt, und in die symptomatische oder auch sekundäre Parkinson-Erkrankung. Bei dem idiopathischen Parkinson-Syndrom ist die Ursache der Erkrankung noch weitgehend unbekannt, wohingegen man die Ursachen oder den Auslöser der symptomatischen Parkinson-Erkrankung kennt und sie danach weiter unterteilt. So kann die Erkrankung z.B. medikamentös bedingt sein durch Neuroleptika oder α -Methyl-DOPA, aber auch eine Vergiftung mit Toxinen, wie Kohlenmonoxid, oder Gehirnverletzungen können zum symptomatischen Parkinson-Syndrom führen. Es ist jedoch auch eine genetisch bedingte, vererbte Form, das familiäre Parkinson-Syndrom bekannt. Es handelt sich dabei um Mutationen auf spezifischen Genabschnitten und macht weltweit 15 % aller PD-Erkrankungen aus. Mittlerweile wurden bereits 24 Genloki identifiziert, die mit einem erhöhten Krankheitsrisiko assoziiert sind (Kalia und Lang 2015). Es gibt eine autosomal-rezessiv vererbte Form des juvenilen Parkinsonismus (*early onset PD*), die mit Mutationen auf dem Gen *Parkin*, *DJ-1* (*protein deglycase DJ-1*) und *PINK1* (phosphatase and tensin homolog {PTEN}-induced putative kinase 1) einhergeht. Bei der autosomal-dominanten Form findet man Mutationen auf den Genen *α -synuclein* und *LRRK2* (*leucin-rich repeat kinase 2*) (Gerlach u. a. 2007; Tiwari und Pal 2017a).

PD ist durch die Degeneration dopaminergener Neurone in der *Substantia nigra pars compacta* gekennzeichnet. Aus dem daraus resultierenden Dopamin-Mangel wird das nigro-striatale dopaminerge System gestört, welches vor allem an der Willkürmotorik beteiligt ist. Die primären Krankheitszeichen treten erst in Erscheinung, wenn bereits 57-85 % der dopaminergen Zellen verschwunden sind. Ein weiteres Charakteristikum stellen, in den noch intakten dopaminergen Neuronen, die Einschluss-Körperchen, sogenannte *Lewy-Körperchen*, dar. Dabei handelt es sich um eosinophile zytoplasmatische Einschlüsse, die hauptsächlich aus α -Synuclein bestehen. Diese Protein-Aggregate aus falsch gefalteten Proteinen können nicht abgebaut werden und es kommt zur Bildung der Einschluss-Körperchen, wodurch es zur Dysfunktion und zum schlussendlichen Untergang der betroffenen Neurone kommen kann. Es ist jedoch umstritten, ob die Einschluss-Körperchen zellschädigend, oder sogar neuroprotektiv wirken. Da diese Einschluss-Körperchen bei einer Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen nachgewiesen wurden, werden sie unter dem

Begriff α -Synucleinopathien zusammengefasst (Fahn 2003; Gerlach u. a. 2007; Kalia und Lang 2015).

Das Altern ist eines der größten Risikofaktoren für die Entwicklung der Parkinson-Erkrankung. Die Prävalenz und Inzidenz steigt nahezu exponentiell mit dem Alter. Andere Risikofaktoren, neben dem vererbbaeren, familiären Risiko, sind Umweltbelastungen. Es wurden einige Umweltfaktoren identifiziert, die das Risiko an PD zu erkranken erhöhen. Zu den Risikofaktoren gehören z.B. Pestizidbelastung, Leben auf dem Land, landwirtschaftliche Tätigkeiten, das Trinken von Brunnenwasser, die Einnahme von Beta-Blockern und vorhergegangene Kopfverletzungen. Die genetischen Faktoren und Umweltfaktoren sind jeweils nicht alleine an der Ausbildung von PD verantwortlich. Im Laufe der Zeit konnte die Forschung zeigen, dass es durch ein komplexes Zusammenspiel von genetischen Faktoren und Umweltfaktoren zur Ausbildung der Parkinson-Krankheit kommt (Kalia und Lang 2015).

Doch nicht nur Faktoren, die zur Entstehung der Erkrankung führen, sind von Interesse, ebenso gibt es Einflüsse, die das Fortschreiten der Erkrankung fördern. Einen solchen Faktor stellt die Neuroinflammation bei PD dar. Unter Neuroinflammation versteht man die lokale Immunreaktion des Gehirns auf eingedrungene Pathogene, Verletzungen, oder abnormale Proteinablagerungen. An diesen Prozessen sind u.a. Mikroglia beteiligt, da sie die erste Instanz der angeborenen Immunantwort bilden. Sie phagozytieren eingedrungene Mikroorganismen und setzen eine Vielzahl an proinflammatorischen Zytokinen, Komplementfaktoren und NO frei. Studien deuten an, dass Mutationen in Genen, wie α -Synuclein oder LRRK2 direkt an dem Fortschreiten der chronischen PD-Erkrankung beteiligt sind, da sie die Entzündungsantwort durch die Aktivierung von Mikroglia stimulieren (Tiwari und Pal 2017a).

1.4 Niacin, ein vielseitiges Vitamin

Niacin ist ein wasserlösliches Vitamin aus der Gruppe der B-Komplexe. Deshalb ist es auch unter dem veralteten Namen Vitamin B3 bekannt. Niacin wird jedoch als Sammelbegriff für Nikotinsäure und sein Säureamid Nikotinamid verwendet. Seine bioaktive Form nimmt es in Gestalt von Nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) ein (Jacobson u. a. 2012).

Die Nikotinsäure ist eine organische Verbindung, die zu den Heteroaromaten zählt und aus einem Pyridinring und einer Carboxygruppe besteht.

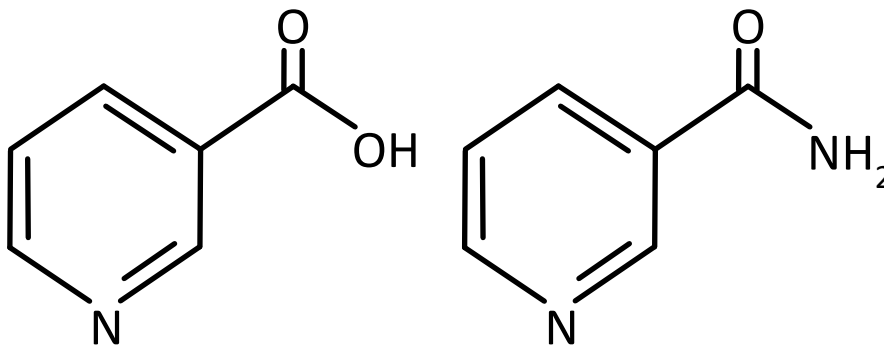


Abb. 1.2: Strukturformeln von Nikotinsäure und Nikotinamid.

Nicotinsäure besteht aus einem Pyridinring und der Carboxygruppe und hat die Summenformel C₆H₅NO₂. Nikotinamid ist das Amid der Nikotinsäure und hat die Summenformel C₆H₆N₂O.

Niacin kann über die Nahrung aufgenommen werden und ist vor allem in Fleisch, Fisch, Nüssen, Milchprodukten und grünem Gemüse enthalten. Der menschliche Körper ist aber auch im Stande, Niacin selbst aus der essenziellen Aminosäure Tryptophan zu synthetisieren. Die empfohlene Menge an Niacin, die täglich aufgenommen werden sollte, liegt bei Erwachsenen zwischen 11 und 16 mg. Sie hängt jedoch von der Altersgruppe, der Energiezufuhr und dem Geschlecht ab und ist während der Schwangerschaft sowie der Stillzeit erhöht (Gell und Wäger 2016; Meyer-Ficca und Kirkland 2016).

Ein Niacin-Mangel kann beim Menschen zu der Erkrankung Pellagra führen. Diese Erkrankung ist durch die drei „Ds“ gekennzeichnet: Dermatitis, Diarrhoe, Demenz. Sie kann in letzter Konsequenz zum Tode führen. Pellagra-Epidemien kommen nur noch selten vor. In wenigen Fällen, wie z.B. bei chronischem Alkoholabusus,

Drogenabhängigen oder Patienten mit Malabsorptionsstörungen tritt dieses Krankheitsbild noch auf (Hegyi u. a. 2004).

Conrad Elvehjem entdeckte um 1940, dass Pellagra durch die Gabe von Nikotinamid, dem Amid der Nikotinsäure, und Nikotinsäure in kristalliner Form heilbar war (Elvehjem 1940). Nikotinsäure und Nikotinamid sind Vorläufer des Koenzyms Nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+), was ein essenzielles Element für alle Zellen darstellt. NAD^+ und sein phosphoryliertes Derivat NADP^+ sind an zahlreichen Reduktions- und Oxidationsreaktionen in eukaryotischen Zellen beteiligt und spielen im Energiemetabolismus der Zellen eine wichtige Rolle. NAD^+ kann ein Hydridion (H^-) aufnehmen und so als NADH der mitochondrialen Elektronentransportkette Reduktionsäquivalente zu Verfügung stellen, die für die oxidative Phosphorylierung benötigt werden.

NAD^+ kann auf verschiedenen Wegen synthetisiert werden. Einerseits aus der essenziellen Aminosäure Tryptophan im Zuge einer acht Stufen umfassenden *De-novo-Synthese*, welche hauptsächlich in der Leber stattfindet, andererseits aus Nikotinsäure über den 3-stufigen *Preiss-Handler-Weg*. Über Nikotinamid und Nikotinamid-Ribose besteht noch eine dritte Möglichkeit NAD^+ zu gewinnen, welche wesentlich direkter und kürzer ist (vgl. Abb.1.3) (Cantó u. a. 2015).

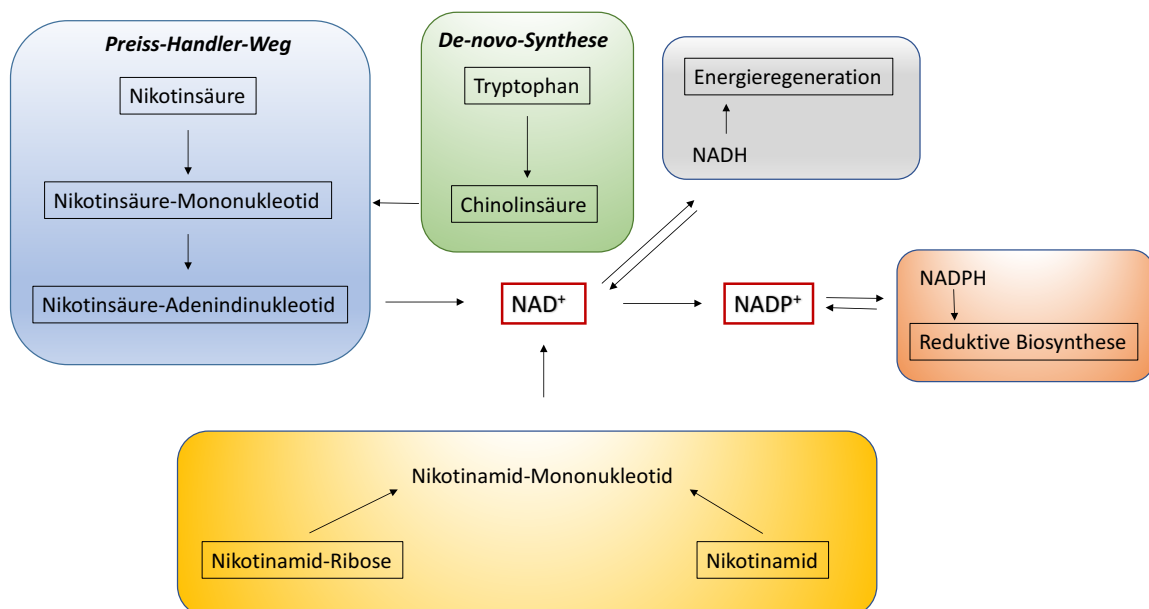


Abb. 1.3: NAD^+ Vorläufer Metabolismus.

Über den *Preiss-Handler-Weg* kann NAD^+ aus Nikotinsäure synthetisiert werden. Nikotinamid und Nikotinamid-Ribose führen auf kurzem Weg gemeinsam über den Zwischenschritt Nikotinamid-Mononukleotid zu NAD^+ . Über

eine 8-stufige *De-novo-Synthese* kann aus Tryptophan NAD^+ entstehen. NAD^+ und NADP^+ sind auch in ihrer reduzierten Form (NADH , NADPH) an zahlreichen Redoxreaktionen des Stoffwechsels der Zelle beteiligt (modifiziert nach Cantó u. a. 2015; Jacobson u. a. 2012).

Aber nicht nur als Medikament gegen die Symptome von Pellagra wird Niacin eingesetzt. Es ist schon seit gut 50 Jahren als ein potentes Therapeutikum gegen Fettstoffwechselerkrankungen im Einsatz. Pharmakologische Dosen von Niacin (1-3 g pro Tag) werden als Lipidsenker eingesetzt, da es die Triglyzeride im Plasma und den *low density Lipoprotein* (LDL)-Spiegel senkt und den *high density* (HDL)-Spiegel erhöhen kann. Dadurch hat es auch einen präventiven und therapeutischen Einfluss bei kardiovaskulären Erkrankungen (Cantó u. a. 2015; Meyer-Ficca und Kirkland 2016). Niacin in diesen Dosen hat jedoch merkliche Nebenwirkungen. Es kann zu einer sogenannten *Flush*-Symptomatik kommen, die sich in einer Hautrötung an Gesicht und Nacken, Hitzegefühl und Hautjucken äußert. Diese Symptomatik kommt durch eine von Niacin provozierte, verstärkte Prostaglandin- D_2 -Ausschüttung durch die dermalen Langerhanszellen und die darauffolgende Vasodilatation zustande. Ebenso wird von gehäuften Alpträumen unter der Niacin-Therapie berichtet (Dunbar und Gelfand 2010).

Chandramohan Wakade veröffentlichte 2014 eine interessante Entdeckung. Ein an Morbus Parkinson erkrankter Patient nahm auf Grund einer Fettstoffwechselstörung Niacin als lipidsenkendes Medikament ein. Als zufälligen Nebeneffekt entdeckte man eine Verbesserung der motorischen und körperlichen Funktionen des Patienten. Die verabreichte Dosis von 1 g Niacin war jedoch zu hoch und es kam zu den oben genannten Nebenwirkungen von Niacin. Wakade und sein Team verabreichten dem Patienten nun eine niedrigere Niacin Dosis (250 mg) und konnten zeigen, dass Niacin in niedrigerer Dosierung die Symptome der Parkinson-Krankheit ohne Nebenwirkungen dämpfen kann (Wakade u. a. 2015).

Auf Grund dieser Entdeckung stellt sich nun die Frage, ob Niacin über Beeinflussung mikroglialer Zellfunktionen ein mögliches Mittel für die Therapie von Morbus Parkinson oder anderen neuodegenerativen Erkrankungen sein kann.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In folgender Arbeit soll der Einfluss von Niacin auf primäre Mikroglia der Ratte *in vitro* unter Berücksichtigung folgender Fragestellungen untersucht werden:

- a) Übt Niacin eine zytotoxische Wirkung auf primäre Mikroglia aus?
- b) Beeinflusst Niacin die mRNA-Synthese der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) und die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO)?
- c) Exprimieren primäre Mikroglia den Niacin-Rezeptor HCAR₂ (*hydroxycarboxylic acid receptor 2*)
- d) Beeinflusst Niacin die mRNA- und Protein-Synthese proinflammatorischer Zytokine?
- e) Wird der MAP (*mitogen-activated protein*) - Kinase-Signalweg durch Niacin aktiviert?
- f) Beeinflusst Niacin die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B?

2 Material und Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte, Materialien und Methoden werden im Folgenden aufgelistet und beschrieben.

2.1 Material

Die Geräte und Materialien wurden von der AG Prof. Lucius des Anatomischen Institutes der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zur Verfügung gestellt.

2.1.1 Geräte

ABI 7500 Fast Real-Time System	Applied Biosystems (Darmstadt)
Elektrophoresekammer	Biometra (Göttingen)
Epoch Mikroplatten Spektralphotometer	BioTek (Bad Friedrichshall)
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf AG (Hamburg)
Folienschweißgerät	Clatronic International GmH (Kempten)
Fusion SL	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
Gefrierschrank	Siemens AG (München)
Gefrierschrank -70°C	Heraeus (Haunau)
Gelgießstand	Bio-Rad (München)
GeneAmp®PCR System 2400	Perkin Elmer GmbH (Rodgau)
GENios Microplate Reader	TECAN (CH-Männendorf)
Heiz-Magnetprüher MR 2002	Heidolph Instruments (Schwabach)
HeraCell 150 CO ₂ Brutschrank	Heraeus (Hanau)
Laborshake	C. Gerhardt GmbH (Königswinter)
Mikroplattenleser, 340 ATTC EAR	SLT Labinstruments GmbH (Salzburg)

Mini-Zentrifuge	Roth (Karlsruhe)
Präzisionswaage BP 610	Sartorius (Göttingen)
Rollmischgerät	Hecht-Assistent (Sonderheim v. d. Rhön)
Stereomikroskop 475022	Zeiss (Jena)
Sterilwerkbank HeraSafe	Heraeus (Haunau)
Stromquelle Power PAC 200	Bio-Rad (München)
Take3™ Mikro-Volumen Platte	BioTek (Bad Friedrichshall)
Thermo-Block TDB-120	BioSan (Steinfurt/ Riga)
Thermomixer	Eppendorf AG (Hamburg)
Tischzentrifuge 5415	Eppendorf AG (Hamburg)
Tischzentrifuge 5430	Eppendorf AG (Hamburg)
Tischzentrifuge 5804 R	Eppendorf AG (Hamburg)
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad (München)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc. (USA)
Wärme-/ Trockenschrank	Memmert GmbH (Schwabach)
Wasserbad	Köttermann GmbH (Uetze/ Hänigsen)
Neubauer Zählkammer 0,0025 mm ² Raster, Tiefe 0,100 mm	Hecht-Assistent (Sonderheim v. d. Rhön)
Zeiss Axiophot	Carl Zeiss (Jena)
Zeiss Axiovert 200	Carl Zeiss (Jena)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

12-Loch-Zellkulturplatte (TC-Platte 12 Well)	Sarstedt (Nürmbrecht)
--	-----------------------

6-Loch-Zellkulturplatte (TC-Platte 6 Well)	Sarstedt (Nürmbrecht)
96-Loch-Zellkulturplatte (TC-Platte 96-Well)	Sarstedt (Nürmbrecht)
Deckgläser (Cover slips) (22x22mm)	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Eppendorf-Reagiergefäße (0,2 ml/ 0,5 ml/ 1,5 ml/ 2 ml)	Sarstedt (Nürmbrecht)
Magermilchpulver	Heirler Conovis GmbH (Radolfzell)
Mikrotiterplatte (96 Fast PCR-Platte Halbrand)	Sarstedt (Nürmbrecht)
MultiFlex Round Tips 1-200 µl	Sorenso™BioScience (Salt Lake City, USA)
Objektträger HistoBond® (adhäsive, silanisierte Oberflächen, 76x26x1mm)	Marienfeld GmbH (Lauda Königshofen)
Petrischalen (ø 60 mm/ ø 100 mm)	Sarstedt (Nürmbrecht)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nürmbrecht)
Polyvinylidenfluorid -(PVDF) 9x6 Membran	Roth (Karlsruhe)
Zentrifugenröhrchen 10 ml (100x16 mm)	Sarstedt (Nürmbrecht)
Zentrifugenröhrchen 50 ml (114x28 mm)	Sarstedt (Nürmbrecht)
Whatmann Papier	Whatmann (Dassel)
Zellkulturflasche mit Filterdeckel (75 cm ²)	Sarstedt (Nürmbrecht)
Zellschaber (Cell Scraper 25 cm)	Sarstedt (Nürmbrecht)

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
2-Propanol	Roth (Karlsruhe)
2,5 % Glutaraldehyd	AppliChem GmbH (Darmstadt)

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	BD Biosciences (San Diego, USA)
5-Fluoro-2-Deoxyuridine (FDU)	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Acrylamid + 0,8% Bisacrylamid	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat 10% (APS)	Merck (Darmstadt)
Antibody Diluent Reagent	Invitrogen (Darmstadt)
Aqua bidest (RNAse frei)	Anatomisches Institut (Kiel)
Azeton	Merck (Darmstadt)
bovine serum albumin (BSA)	Serva (Heidelberg)
Bromphenolblau wasserlöslich	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Chlorwasserstoff (HCl)	Roth (Karlsruhe)
Coomassie Blue	Bio-Rad (München)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)	Merck (Darmstadt)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA Titriplex II)	Merck (Darmstadt)
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen (Darmstadt)
Glycerin	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Glykogen 70mg/ml	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Griess-Reagenz	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Hämalaun	Merck (Darmstadt)
HEPES	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Immu-Mount-Eindeckmedium	ThermoFisher Scientific (Kalamazoo, USA)
Kaisers Glyceringelatine	Merck (Darmstadt)

Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Kaliumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
L-Glutamin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Lipopolysaccharid von Salmonella Typhimurium	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Methanol	Fluka (Buchs)
MTT-Pulver	Sigma-Aldrich (Steinheim)
N, N-Dimethylformamid (DMF)	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Natronlauge (NaOH)	Roth (Karlsruhe)
Nicotinsäure/ Niacin/ Vitamin B3	Sigma-Aldrich (Steinheim)
PageRuler™/ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific (Bonn)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Penicillin 1.000 U/ml / Streptomycin 10 mg/ml (Pen/ Strep)	PAN Biotech (Aidenbach)
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Thermo Scientific (Bonn)
Trichlormethan/ Chloroform	Roth (Karlsruhe)
Tris Pufferan®	Roth (Karlsruhe)
Trypanblau-Lösung 0,4%	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Trypsin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tween®20	Roth (Karlsruhe)

2.1.4 Niacin

Die Versuchssubstanz Niacin wurde von der Firma Sigma-Aldrich in Pulverform bezogen. Da die Substanz ein Vitamin und relativ lichtempfindlich ist, wurde sie im Dunklen verwahrt und vor jedem Versuchsansatz frisch angesetzt. Dafür wurde das Pulver in einer definierten Menge Aqua bidest gelöst und eine 10 µM Stammlösung hergestellt, die dann entsprechend weiter verdünnt wurde.

2.1.5 Kits

Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
DAB-Substrat-Kit	Vector Laboratories (Burlingame, Kalifornien)
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher (Rockford, USA)
Quanti Nova™ PCR Kit	Qiagen (Hilden)
Rat IL-6 ELISA Set	BD Biosciences (San Diego, USA)
Rat TNF- α ELISA Set	BD Biosciences (San Diego, USA)
VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit	Vector Laboratories (Burlingame, Kalifornien)

2.1.6 Enzyme

RevertAcid H Minus Reverse Transcriptase	Thermo Scientific (Bonn)
RQ1 RNase-Free DNase (1 U/µl)	Promega (Mannheim)

2.1.7 Oligonukleotide für die quantitative Realtime-Polymerasekettenreaktion

Die in der Realtime-Polymerasekettenreaktion (qPCR) eingesetzten Primer und Sonden wurden mit dem Programm *Primer3* designt und von der Firma Eurogentec S.A. (Belgien) in einer Konzentration von 100 µM synthetisiert.

GAPDH (Ratte):

vorwärts: 5' - CAG-CAA-GGA-TAC-TGA-GAG-CAA-GAG-A - 3'

rückwärts: 5' - GGA-TGG-AAT-TGT-GAG-GGA-GAT-G - 3'

Sonde: 5' - AGG-AGT-CCC-CAT-CCC-AAC-TCA-GCC-C - 3'

TNF- α (Ratte):

vorwärts: 5' - AAC-ACA-CGA-GAC-GCT-GAA-GTA-GTG - 3'

rückwärts: 5' - GAC-ATT-CCG-GGA-TCC-AGT-GA - 3'

Sonde: 5' - CTC-ATG-AGC-CGC-CAC-CGG-CAA-G - 3'

IL-1 β (Ratte):

vorwärts: 5' - TCT-CCA-GTC-AGG-CTT-CCT-TGT-G - 3'

rückwärts: 5' - GGT-CAT-TCT-CCT-CAC-TGT-CGA-AA - 3'

Sonde: 5' - CTG-AAG-CAG-CTA-TGG-CAA-CTG-TCC-CTG-AA - 3'

IL-6 (Ratte):

vorwärts: 5' - AAG-CCA-GAG-TCA-TTC-AGA-GCA-ATA-C - 3'

rückwärts: 5' - GCC-ACT-CCT-TCT-GTG-ACT-CTA-ACT-T - 3'

Sonde: 5' - CCT-TCC-TAC-CCC-AAC-TTC-CAA-TGC-TCT-CCT - 3'

iNOS (Ratte):

vorwärts: 5' - TGG-TGA-AAG-CGG-TGT-TCT-TTG - 3'

rückwärts: 5' - GCT-TCC-GAC-TTT-CCT-GTC-TCA-GT - 3'

Sonde: 5' - TCC-CGC-GTC-AGA-GCC-ACA-GTC-CT - 3'

HCAR2 (Ratte):

vorwärts: 5' – CAT-GGT-GGT-TGC-CAT-TGT-GTT-T – 3'

rückwärts: 5' – ACA-GTT-CCT-CAC-GTT-GTG-TT – 3'

Sonde: 5' – TGC-TTC-CTG-CCC-AGT-GTG-GCC-GTG-A – 3'

2.1.8 Primärantikörper

Anti-MAP Kinase 2/ Erk2, clone 1B3B9
[200 µg/ml]

Merck Millipore (Darmstadt)

Rabbit Phospho-p44/42 MAPK
(Erk1/2) (Thr202/Tyr204)
[200 µg/ml]

Cell Signaling Technology
(Danvers, USA)

Anti-CD 11b/c antibody (OX42)
[1 mg/ml]

Abcam (Cambridge, UK)

NF-κB p65 [100 µg/ml]

Santa Cruz Biotechnology
(Heidelberg)

2.1.9 Sekundärantikörper

Chicken anti-mouse IgG-HRP
[200 µg/ml]

Santa Cruz Biotechnology
(Heidelberg)

Goat anti-rabbit IgG-HRP
[200 µg/ml]

Santa Cruz Biotechnology
(Heidelberg)

Goat anti-mouse IgG (H+L)
[1,5 mg/ml]

Vector Laboratories (Burlingame,
Kalifornien)

Goat anti-mouse IgG Alexa Fluor® 488 [2
mg/ml]

Invitrogen (Darmstadt)

2.1.10 Medien, Puffer und Lösungen

2.1.10.1 Medien

Mikrogliazellkulturmedium	500 ml 60 ml 6 ml 5 ml	DMEM FCS (inaktiviert bei 44°C bis 53°C) Pen/ Strep L-Glutamin
---------------------------	---------------------------------	---

Mikrogliastimulationsmedium	500 ml 60 ml 6 ml	DMEM FCS (inaktiviert bei 56°C) Pen/ Strep
-----------------------------	-------------------------	--

2.1.10.2 Puffer und Lösungen

Coomassie Farblösung	1g 450 ml 450 ml 100 ml	Coomassie Methanol Aqua bidest Essigsäure
----------------------	----------------------------------	--

Dissoziationslösung	10 ml 24 mg 20 mg 2 mg 35 µl	DMEM HEPES Trypsin EDTA DNase
---------------------	--	---

Elektodenpuffer/ Laufpuffer pH 8,2-8,3	12,2 g 57,6 g 4,0 g ad 4 l	TRIS Glycerin SDS Aqua bidest
--	-------------------------------------	--

Entfärberlösung für Coomassie-Färbung	450 ml 450 ml 100 ml	Methanol Aqua bidest Essigsäure
---------------------------------------	----------------------------	---------------------------------------

Gelpuffer I pH 8,8	45,43 g 1,00 g ad 250 ml	TRIS SDS Aqua bidest pH 8,8 mit HCl einstellen
--------------------	--------------------------------	---

Gelpuffer II pH 6,8	15,10 g 1,00 g ad 250 ml	TRIS SDS Aqua bidest pH 6,8 einstellen ca. 40 ml HCl
Lösung zum Ablösen von Zellen	25 ml 0,003 g 0,030 g	PBS (Ca ²⁺ und Mg ²⁺ frei) Trypsin EDTA
Sammelgel 4,5 % (für 2 Gele)	2,6 ml 1,67 ml 5,79 ml 60 µl 30 µl	Gelpuffer II Acrylamid Aqua bidest Ammoniumpersulfat 10 % TEMED
SDS Ladepuffer	1,48 g 1,5 g 12 ml 2,25 ml 30 mg ad 25 ml	TRIS SDS Glycerin 2-Mercaptoethanol Bromphenolblau Aqua bidest
SDS-Probenpuffer pH 8,00	0,23 g 1,25 ml 1,00 ml 50 mM ad 10 ml	SDS Gelpuffer II Glycerin DTT Aqua bidest
Solubilisierungslösung	50% 80% 20 g 2,5 ml 2,5 ml	DMF-Lösung mit Aqua bidest Essigsäure-Lösung mit Aqua bidest SDS in 70 ml 50% DMF lösen 80% Essigsäure 1 N HCl
TBS-T-Puffer pH 7,5	20,00 mM 0,14 M 1,00 mM 0,1 %	TRIS NaCl EDTA Tween 20
Transfer-Puffer pH 9,00	7,50 g 36,03 g 250 ml ad 2,5 l	TRIS Glycerin Methanol Aqua bidest
Trenngel 10 % (für 2 Gele)	5,2 ml 6,66 ml 8,06 ml 120 µl 60 µl	Gelpuffer I Acrylamid Aqua bidest Ammoniumpersulfat 10 % TEMED

Waschpuffer für ELISA	80,00 g 11,60 g 2,00 g 2,00 g 10 l 5 ml	NaCl Natriumhydrogenphosphat Kaliumhydrogenphosphat Kaliumchlorid Aqua bidest 0,05% Tween
Zamboni-Fixierlösung (für 200 ml)	165 ml 8g 35 ml	Phosphatpuffer Paraformaldehyd Pikrinsäure

2.1.11 Software

7500 Software v2.0.6	Applied Biosystems (Foster City, USA)
AxioVision SE64 Rel. 4.9	Carl Zeiss (Jena)
Fusion-CAPT	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
Gen5™ Datenanalyse-Software Gen5 Secure für 21 CFR Part 11 Konformität	BioTek (Bad Friedrichshall)
Magellan™ - Data Analysis Software	TECAN (CH-Männendorf)
Prism 5	GraphPad Software (La Jolla, USA)
Microsoft® Word Version 15.33	Microsoft
Microsoft® PowerPoint Version 15.33	Microsoft

2.1.12 Versuchstiere

Die für die *in vitro* Versuche dieser Arbeit benötigten Zellen wurden aus zwei bis drei Tage alten Ratten des Stammes Sprague Dawley gewonnen. Die Tiere wurden im Victor-Hensen-Tierhaus der vorklinischen Institute der Christians-Albrechts-Universität unter Standardbedingungen gehalten. Die Tierversuchsgenehmigungsnummer lautet V312-7224.121-13.

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung und Kultivierung primärer Mikroglia

Die Mikroglia wurden unter semisterilen Bedingungen aus den Gehirnen neugeborener Ratten des Stammes Sprague Dawley gewonnen (P2-P3). Nachdem die Tiere dekaptiert waren, wurden die Gehirne herauspräpariert und in einer Petrischale (\varnothing 60 mm) zweimal mit 13 ml DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Gehirne in eine mit 40 ml DPBS befüllte große Petrischale (\varnothing 100 mm) überführt. Danach wurden unter einem Binokular die Kortexhälften vom Hirnstamm gelöst, der Hippocampus aus den Kortexhälften entfernt und die Meningen abgelöst. Dann wurde das vordere *Mesencephalon* herauspräpariert. Die Kortizes und *Mesencephali* wurden dann unter Kühlung auf Eis voneinander getrennt, in mittlere Petrischalen gegeben und zweimal mit DPBS gespült, bevor jeweils zwei der Kortexhälften bzw. zwei *Mesencephali* in kleinen Petrischalen unter einer Sterilwerkbank mit einem Einmalskalpell mechanisch zerkleinert wurden und der Inhalt jedes Schälchens in je ein 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt wurde. Nachdem sich die Gewebesteilchen am Boden der Röhrchen abgesetzt hatten, wurden die Überstände abgesaugt und zu jedem Ansatz 3 ml Dissoziationslösung unter Zugabe von 35 μ l DNase I (1mg/ml) gegeben, geschüttelt und für 30 Minuten bei 37°C und 8,4% CO₂-Sättigung im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Ansätze noch einmal geschüttelt und für weitere 15 Minuten bei 37°C und 8,4% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Überstände abgesaugt und je 2 ml serumhaltiges Mikrogliazellkulturmedium zu den Ansätzen pipettiert, um die Trypsinaktivität zu stoppen. Im Anschluss wurden unter Zugabe von je 50 μ l DNase I die Zellen aus den dissoziierten Gewebeteilchen mittels feuerverengter Pasteurpipetten vereinzelt und die isolierten Zellen aus je zwei Kortexhälften bzw. zwei *Mesencephali* in 75cm²-Zellkulturflaschen mit Filterdeckel in 10 ml Mikrogliazellkulturmedium ausgesät und bei 37°C und 8,4% CO₂-Sättigung im Brutschrank inkubiert. Bis zur Ernte der Mikroglia wurde alle zwei Tage ein Mediumwechsel vorgenommen. In diesem Zeitraum bildete sich ein Astrozytenrasen auf dem Boden der Zellkulturflaschen aus.

2.2.2 Ernte der Mikroglia

Nach Erreichen einer Konfluenz von 80 % des Astrozytenrasens, konnten die Mikroglia geerntet werden. Dafür wurden die Mikroglia durch kräftiges Schütteln vom Astrozytenrasen gelöst und flottierten dann frei im Kulturmedium, welches anschließend in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 700 x g für 5 Minuten zentrifugiert wurde. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in der restlichen Kulturflüssigkeit resuspendiert. Danach wurden alle geernteten Zellen in einem 50 ml Röhrchen zusammengeführt und gezählt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau in einem Eppendorf-Reagiergefäß auf dem Reagenzglasschüttler (Vortex) gemischt, davon 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und unter dem Mikroskop ausgezählt. Je nach gewünschter Zellzahl wurden anschließend die Zellen ausgesät.

2.2.3 Stimulation der Mikroglia

Für die verschiedenen Experimente wurden die Zellen in unterschiedlicher Zelldichte in Mikrogliakulturmedium ausgesät und nach einem Tag Wachstum im Brutschrank bei 37°C und 8,4% CO₂-Sättigung entsprechend stimuliert. Für die Toxizitätsanalyse und die Stickstoffmonoxid (NO) Analyse wurden je 100.000 Mikroglia in je 200 µl Mikrogliakulturmedium in eine 96-Loch-Zellkulturplatte ausgesät und am folgenden Tag in 100 µl frischem Medium für 24 Stunden stimuliert. Für die quantitativen Realtime-Polymerasekettenreaktionen (qPCR), die *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) und Western Blot (WB) Analysen wurden je 1.000.000 Zellen in eine 12-Loch-Zellkulturplatte ausgesät. Die Stimulationsdauer für WB Analysen betrug 15, 30 und 60 Minuten, für qPCR 3, 6 und 24 Stunden, für ELISA ebenfalls 3, 6 und 24 Stunden. Für die Coomassie Blue Färbung wurden je 100.000 Zellen pro Ansatz auf Deckgläsern ausgesät und für 24 Stunden stimuliert.

Vor dem eigentlichen Beginn der Stimulationszeit wurden die Versuchsansätze, die Niacin enthielten, mit diesem für 30 Minuten präinkubiert. Die Konzentration von Niacin betrug 0,1 µM. Danach erst wurde LPS in einer Konzentration von 10 ng/ml zu den entsprechenden Ansätzen pipettiert. Die unstimulierten Kontrollansätze erhielten entsprechende Mengen DPBS.

2.2.4 Toxizitätsanalyse mittels MTT-Test

Zum Ausschluss einer möglichen Zytotoxizität der Versuchssubstanz Niacin wurde ein Methylthiazoltetrazolium [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid] (MTT)-Test nach Mosmann (Mosmann 1983) angewandt. Dieser Test beruht auf der Reduktion des wasserlöslichen, schwach gelben MTT zum wasserunlöslichen, blau-violetten Formazan. Diese Reduktion findet nur in den Mitochondrien lebender Zellen statt, was Rückschlüsse auf eine mögliche Toxizität der Versuchssubstanz zulässt.

Für den MTT-Test wurden die Mikroglia in eine 96-Loch-Zellkulturplatte ausgesät und dem Protokoll entsprechend stimuliert. Danach wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und je 100 µl des Mikrogliastimulationsmediums mit je 25 µl der MTT-Lösung zu den Ansätzen pipettiert und die Platte für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit wurde das MTT von den lebenden Zellen in violette Formazan-Kristalle umgesetzt. Nach Ablauf der Zeit wurden 100 µl der Solubilisierungslösung dazupipettiert und die Platte erneut für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit lösten sich die Formazankristalle auf. Nachdem der Inhalt der Vertiefungen mit einem kleinen Rührstab homogenisiert worden war, folgte die photometrische Messung der Ansätze bei 540 nm.

2.2.5 Indirekte Stickstoffmonoxid (NO) Analyse mittels Griess-Reagenz

Um die Wirkung von Niacin auf die NO-Freisetzung der aktivierten Mikroglia zu bestimmen, wurde der NO-Gehalt in den Kulturüberständen mit Hilfe des Griess-Reagenzes bestimmt. Dazu wurden je 100 µl der Zellkulturüberstände zu 100 µl Griess-Reagenz in eine 96-Loch-Zellkulturplatte pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Auswertung erfolgte im Anschluss mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 540 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm.

2.2.6 Coomassie Blue Färbung

Um die Zellmorphologie darzustellen, wurden die Mikroglia auf Deckgläsern ausgesät und diese in 6-Loch-Zellkulturplatten in 1 ml Medium inkubiert und stimuliert. Anschließend wurden Färbungen mit Coomassie Blue durchgeführt. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Deckgläser zweimal mit DPBS gewaschen und mit den Zellen für 40 Minuten mit 2,5 % Glutaraldehyd fixiert. Anschließend wurde zweimal mit DPBS gespült und die Zellen mit der Coomassie Farblösung für weitere 40 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Entfärberlösung dazu gegeben, kurz geschwenkt und abgesaugt. Zum Abschluss wurden die Mikroglia auf den Deckgläsern mit Aqua bidest gespült und mit Kaisers Glyceringelatine auf Objektträgern eingedeckt. Am Zeiss Mikroskop Axiophot wurden die Ergebnisse der Färbung mikroskopisch ausgewertet und dokumentiert.

2.2.7 Untersuchungen auf RNA-Ebene

2.2.7.1 RNA-Isolierung

Für die Isolierung von RNA wurden nach Entfernung des Mediums und zweimaligem Waschen mit DPBS, die Zellmembranen der Mikroglia mit je 1 ml Trizol-Reagenz pro Ansatz lysiert. Anschließend wurden die Lysate mit einem Zellschaber abgelöst und in Eppendorf-Reagiergefäße überführt. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde das Gemisch 15 Sekunden per Hand geschüttelt mit einer nachfolgenden Inkubation von 2 bis 3 Minuten bei 15°C bis 30°C. Danach wurden die Proben für 15 Minuten bei 6°C und 12.000 x g zentrifugiert, wodurch sich drei Phasen bildeten. Die obere farblose, wässrige Phase enthielt RNA, darunter folgte die milchig-trübe Interphase und eine untere, rote Phenol-Chloroformphase, die DNA und Proteine enthielt. Die obere, wässrige Phase mit RNA wurde vorsichtig abpipettiert und in neue Eppendorf-Reagiergefäße überführt. Nach Zugabe von 1 µl Glykogen (70 mg/ml) wurde das Gemisch auf einem Reagenzglasschüttler (Vortex) durchmischt, anschließend mit 500 µl Isopropylalkohol versetzt und nochmals durchmischt. Nach zehnmütiger Inkubation bei RT wurden die Proben für 10 Minuten bei 6°C und 12.000 x g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren lagerte sich die RNA als gelartiges Pellet am

Boden des Reagiergefäßes ab und der Überstand wurde vorsichtig entfernt. Das RNA-Pellet wurde unter Zugabe von 1 ml 75% Ethanol und erneutem Durchmischen auf dem Vortex gelöst und für weiter 5 Minuten bei 6°C und 7.600 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das Pellet für ca. 10 Minuten an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl RNase-freiem Aqua bidest gelöst, durchmischt und kurz zentrifugiert. Nach zehnmütiger Inkubation bei 57°C im Thermo-Block folgte ein weiteres kurzes Zentrifugieren, dem sich die Quantifizierung der extrahierten RNA anschloss.

2.2.7.2 Quantifizierung der extrahierten RNA

Um den Gehalt und die Reinheit der extrahierten RNA zu bestimmen, wurden von der extrahierten RNA 2 µl in die vorgesehenen Vertiefungen der *Take3™ Mikro-Volumen Platte* aufgetragen. Bei einer Wellenlänge von 260 nm, gemessen gegen einen Leerwert (2 µl RNase-freies Aqua bidest), wurde der RNA-Gehalt photometrisch in einem Spektrophometer bestimmt. Gleichzeitig erfolgte die photometrische Messung verunreinigender Proteine oder DNA in den Proben bei 280 nm. Aus dem Quotienten der optischen Dichte der beiden Messwerte (OD 260 / OD 280) ergab sich der Reinheitsgrad der Proben, welcher zwischen 1,7 und 2,2 liegen sollte. War dies der Fall, so wurde die extrahierte RNA entweder bei -70°C gelagert, oder im nächsten Schritt revers transkribiert und damit in komplementäre DNA umgeschrieben.

2.2.7.3 DNA-Verdau und Reverse Transkription

Vor der eigentlichen cDNA-Synthese wurde zunächst mögliche verunreinigende DNA mit einer DNase verdaut. Damit jeder Ansatz jeweils 1 µg mRNA in 8 µl Aqua bidest enthält, wurde für jede Probe je nach RNA-Gehalt pro 1 µl die entsprechende Menge an extrahierter RNA auf insgesamt 8 µl Aqua bidest berechnet.

Danach wurden zu jedem Ansatz jeweils 1 µl DNase-Puffer und 1 µl DNase gegeben, auf dem Vortex gemischt, kurz zentrifugiert und für 15 Minuten bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Im Anschluss wurden die Ansätze auf Eis gestellt und die DNase-Aktivität durch Zugabe von je 1 µl Stopplösung [25mM], und Inkubation im Thermocycler bei 65°C für 10 Minuten beendet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Ansätze wieder auf Eis gestellt und es folgte die reverse Transkription, bei der die RNA in komplementäre DNA umgeschrieben wurde. Dazu wurde jeweils 1 µl des *Random-Hexamer-Primer*-Gemisches hinzugefügt, mit dem Vortex vermischt, zentrifugiert und für 5 Minuten bei 70°C inkubiert. Nachdem die Proben wieder auf Eis standen, wurde zu jedem Ansatz 4 µl *5x-Reaction Buffer*, 2 µl *dNTP-Mix* [10 mM] und 1 µl Aqua bidest pipettiert und für 5 Minuten bei 25°C inkubiert. Danach wurde jeweils 1 µl *Reverse Transkriptase* direkt in jeden Ansatz pipettiert und diese im Thermocycler für 10 Minuten bei 25°C (Primer-Annealing), für 60 Minuten bei 42°C (reverse Transkription) und für 10 Minuten bei 70°C (Inaktivierung der Transkriptase) inkubiert. Die so hergestellte cDNA wurde für die anschließende Polymerasekettenreaktion eingesetzt und konnte bei – 20°C für ungefähr 4 Wochen gelagert werden.

2.2.7.4 Quantitative Realtime-Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine etablierte Methode, um *in vitro* spezifische DNA-Sequenzen zu amplifizieren. Bei der quantitativen Realtime-PCR wird zusätzlich ein Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt, dessen Signalintensität äquivalent mit den Amplifikationsprodukten ist. So kann während des Ablaufs der qPCR der Anstieg der Produktmenge verfolgt werden (Heid u. a. 1996).

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten qPCR-System wird zusätzlich zum Primer-Paar eine zur gesuchten Sequenz komplementäre Oligonukleotid-Sonde verwendet. An einem Ende ist die Sonde mit einem Fluoreszenzfarbstoff als Indikator gekoppelt, dessen Anregung und Emission durch den *Quencher* unterbunden wird, der sich am anderen Kettenende befindet. Nach dem Hybridisierungsschritt wird die Sonde bei der nachfolgenden Primerverlängerung durch die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-

Polymerase gespalten. Dabei werden der Farbstoff und der *Quencher* freigesetzt, wodurch ein Fluoreszenzsignal entsteht (Richter 2003).

In dieser Arbeit wurden Primer und Sonden der proinflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 β (IL-1 β), des Enzyms induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und des Rezeptors *hydroxycarboxylic acid receptor 2* (HCAR2) und als endogene Kontrolle das „Haushaltsgen“ Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Zunächst wurde ein Mastermix aus der doppelten Anzahl der Versuchsansätze hergestellt. Ein Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

10 μ l *2xProbe PCR Master Mix QuantiNova*

1 μ l *QN Rox Reference Dye*

1 μ l Vorwärtsprimer [8 μ M]

1 μ l Rückwärtsprimer [8 μ M]

1 μ l Sonde [4 μ M]

2 μ l Aqua bidest

Die cDNA-Proben wurde zuvor im Verhältnis 1:20 mit Aqua bidest verdünnt und davon je 4 μ l in die 96-Loch-qPCR-Platte pipettiert. Dann wurde zu jeder Probe 16 μ l des Mastermixes pipettiert und die Platte mit den Ansätzen bei 12.000 x g für 30 Sekunden zentrifugiert. Die qPCR zur Untersuchung der mRNA-Expression des entsprechenden Gens wurde mit dem *ABI 7500 Fast Real-Time System* von Applied Biosystems durchgeführt. Dabei durchlief das Programm ein anfängliches *Holding Stage* bei 50°C für 20 Sekunden und die *Pre-denaturation* bei 95°C für 10 Minuten. Im Anschluss durchlief das Programm 40 Zyklen mit folgendem sich wiederholenden Ablauf: 15 Sekunden Denaturierung bei 95°C, 60 Sekunden *Annealing /Extension* bei 60°C. Während der Abkühlung von 95 °C auf 60 °C erfolgte bei 72 °C die Extension. Die Ergebnisse wurden mit der $\Delta\Delta$ -Ct-Methode berechnet und mit dem Programm *7500 Software v2.0.* von Applied Biosystems ausgewertet.

2.2.8 Untersuchungen auf Proteinebene mittels Western Blot Analyse

Die Western Blot Analyse dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen durch deren Übertragung auf eine Trägermembran. Die Proteine werden entsprechend ihrer unterschiedlichen Größen z.B. mittels des Gelelektrophoreseverfahrens SDS-Polyacrylamidelektrophorese (PAGE) aufgetrennt und anschließend auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragen. Das negativ geladene Detergenz SDS verdeckt die Eigenladung der Proteine, welche sich somit entsprechend ihres Molekulargewichtes in Banden anordnen. Aus den so entstandenen Proteinbanden können dann mit spezifischen Antikörpern die gesuchten Proteine detektiert werden.

2.2.8.1 Isolierung von Gesamtprotein

Für die Gewinnung des Gesamtproteins wurde zunächst das Kulturmedium aus den dafür zuvor stimulierten Ansätzen entfernt (vgl. 2.2.3) und die adhärenenten Mikroglia in der 12-Loch-Zellkulturplatte zweimal mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden je 100 µl Lysispuffer auf die Zellen pipettiert und die Mikroglia mit einem sterilen Zellschaber vom Boden der Vertiefungen mechanisch abgelöst. Nachdem die Zellysate durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren homogenisiert wurden, schloss sich die Proteinbestimmung mittels der Bicinchoninsäure (BCA-Methode) an.

2.2.8.2 Bicinchoninsäure (BCA)-Methode

Vor der Durchführung der Western Blot Analysen wurde die Mengenbestimmung des Gesamtproteins mit Hilfe der BCA-Methode vorgenommen. Es handelt sich dabei um eine colormetrische Methode, d.h. die Probe reagiert mit dem Reagenz unter Bildung eines löslichen, gefärbten Produkts, dessen Intensität mit der Menge an vorhandenem Gesamtprotein korreliert. In diesem Fall geht Cu^{2+} in Cu^+ über, welches mit Natrium-Bicinchoninat im alkalischen Milieu einen typischen Farbkomplex bildet (Richter 2003: S.198).

Für die Gesamtproteinbestimmung wurden zunächst die Standards und das Arbeitsreagenz nach Herstellerangaben angesetzt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit DPBS verdünnt und davon je 10 µl der jeweiligen Probe in Dreifachbestimmung in die Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert. Im Anschluss wurde die Standardreihe in Doppelbestimmung ebenfalls auf die Platte aufgetragen. Darauf folgte die Zugabe von 200 µl des Arbeitsreagenzes zu jedem Ansatz und die anschließende Inkubation bei 37°C für 30 Minuten. Danach wurden die Proben mit dem *GENios Microplate Reader* bei einer Wellenlänge von 540 nm gegen den Standard photometrisch gemessen. Die erhaltenen Werte wurden mit Hilfe des Programmes Excel von Microsoft dokumentiert und ausgewertet.

2.2.8.3 SDS-Polyamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurde zunächst ein 10%iges Trenngel angesetzt. Für das Gel wurden 2,6 ml des Gelpuffers I, 3,33 ml Acrylamid, 4,03 ml Aqua bidest, 60 µl 10%iges Ammoniumperoxodisulfat (APS) und 30 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED) in einem 50 ml Röhrchen angesetzt, kurz auf dem Vortex vermischt und vorsichtig zwischen die beiden Glasplatten, die in den Gelgießstand eingespannt waren, gegossen. Der Raum zwischen den beiden Glasplatten betrug 1,5 mm, was folglich die Dicke des Gels ergab. Um eine möglichst glatte Oberfläche zu schaffen, wurde das Gel nach dem Gießen mit Propanol überschichtet. Dies sollte gewährleisten, dass später alle Proteine gleichzeitig in das Trenngel eintreten. Nach dem Aushärten des Trenngels wurde die Lösung für das 4,5%ige Sammelgel aus 1,3 ml Gelpuffer II, 0,84 ml Acrylamid, 2,9 ml Aqua bidest, 30 µl 10 % APS und 15 µl TEMED angesetzt und gemischt. Das Propanol wurde vom Trenngel abgegossen, der Kamm für die Geltaschen in den Gelgießstand eingesetzt und die Lösung für das Sammelgel auf das bereits polymerisierte Trenngel gegossen. Nach fertiger Polymerisation wurde der Kamm entfernt und die Glasplatten mit dem Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Kammer wurde zu dreiviertel mit Laufpuffer (pH 8,2-8,3) gefüllt.

Die Proben wurden aus dem -20°C Schrank entnommen, zentrifugiert und je 5 µg Protein mit dem Ladepuffer Dithiothreitol (DTT⁺), versetzt mit Bromphenolblau zum

Sichtbarmachen der Lauflinien, auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Der Ladepuffer soll dafür sorgen, dass die Proteine in die Taschen absinken und nicht nach oben aus der Tasche schwimmen. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten im Wärmeblock bei 96 °C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. In die erste Geltasche wurden 6 µl des Molekulargewichtsmarkers *PageRuler™/ Prestained Protein Ladder* pipettiert. Die weiteren Taschen wurden mit je 10 µl der Proben beschickt. Anschließend wurde der Deckel auf die Elektrophoresekammer aufgesetzt und eine Spannung von 150 Volt und eine Stromstärke von 340 mA wurden angelegt. Das Programm lief für ca. 40 Minuten, bis die Laufront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

2.2.8.4 Blotten

Im nächsten Schritt wurden die nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen (geblottet). Dazu wurde die Membran für 60 Sekunden mit Methanol benetzt und anschließend zusammen mit den Whatman-Filterpapieren in Transferpuffer (pH 9) gelegt und für 15 Minuten auf einem *Laborshake* eingeweicht. Nach dem Prinzip der *Semidry*-Methode wurde ein „Blotting-Sandwich“ auf der Kathodenplatte der Elektrodenkammer wie folgt erstellt: zuerst wurden zwei Whatman-Filterpapiere eingelegt, worauf die Membran gelegt wurde. Nachdem das Gel aus der Laufkammer geholt worden war, wurde es auf der Membran platziert und abschließend mit zwei Whatman-Filtern bedeckt. Um mögliche Luftblasen zwischen den Schichten zu beseitigen, wurde mit einem Roller über das „Blotting-Sandwich“ gefahren. Der Anodendeckel wurde aufgesetzt und das Laufprogramm für 30 Minuten bei 25 Volt und 1 mA gestartet.

2.2.8.5 Immundetektion

Nach dem Blotten wurde die Membran für 1 Stunde in Magermilch-TBS-T unter Schütteln inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Währenddessen wurden in einem 50 ml Röhrchen 10 µl des Primärantikörpers *ERK2* (1:500) in 5 ml

Magermilch-TBS-T verdünnt. Danach wurde die Membran in das Röhrchen mit dem Primärantikörperansatz gegeben und über Nacht bei 4°C auf einem Rollmischgerät inkubiert, so dass sich die Antikörperlösung gleichmäßig auf der gesamten Membran verteilen konnte.

Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung entfernt und die Membran dreimal mit TBS-T jeweils für 15 Minuten auf dem Rollmischgerät gewaschen. Im Anschluss folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper *chicken anti-mouse* (1:5.000). Dazu wurden 3 µl des Antikörpers in 15 ml Magermilch-TBS-T angesetzt und die Membran für 1 Stunde bei RT und unter Schütteln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Membran erneut dreimalig mit TBS-T für jeweils 15 Minuten unter Bewegung gespült. Für die nachfolgende Darstellung der Banden wurde das *ECL-Kit* von GE Healthcare verwendet. Dazu wurden je 200 µl der beiden Lösungen A und B im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die Membran pipettiert, welche dann in eine dünne Plastikfolie falten- und blasenfrei eingeschlagen wurde. Das Sichtbarmachen der Banden und die Digitalisierung erfolgte in einem Chemilumineszenzgerät. Um den Anteil an phosphoryliertem *PERK* (*pERK*) auf derselben Membran zu bestimmen, wurde diese „gestrippt“, das heißt, die gebundenen Antikörper wurden chemisch von der Membran entfernt. Dazu wurde die Membran kurz mit TBS-T gespült und für 10 Minuten unter Schütteln in Natriumhydroxid (0,2 N NaOH) geschwenkt. Danach wurde die gestrippte Membran für eine Stunde in Magermilch-TBS-T-Puffer inkubiert, bevor 5 µl des Primärantikörpers *pERK* (1:1.000) in 5 ml Magermilch-TBS-T angesetzt und auf die Membran pipettiert wurden. Es folgte eine Inkubation für 2 Stunden bei RT unter Bewegung auf dem Rollmischgerät. Danach wurde die Membran dreimal mit TBS-T gespült und mit dem Sekundärantikörper *goat anti-rabbit* (1:30.000) für eine Stunde bei RT unter Bewegung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T für jeweils 15 Minuten wurden die Banden wie, oben beschrieben dargestellt und digitalisiert. Die Auswertung und Quantifizierung erfolgten mit dem Programm *Fusion*.

2.2.9 TNF- α und Il-6 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Der Sandwich-ELISA ist ein immunologisches Verfahren, mit dem der spezifische Nachweis eines Moleküls auf Proteinebene möglich ist. Bei dieser Technik werden

zwei Antikörper (Fang-Antikörper und Detektions-Antikörper) benötigt, die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Wichtig ist jedoch, dass die beiden Antikörper an unterschiedlichen Epitopen des Antigens binden, damit sie sich nicht gegenseitig blockieren. Der erste primäre Antikörper, der sog. Fang-Antikörper, wird an die Oberfläche der Vertiefungen einer 96-Loch-ELISA-Platte gebunden. Es folgt die Zugabe der Proben, die das nachzuweisende Antigen enthalten. Nach einer Inkubationsphase wird die Platte gewaschen und es bleiben nur noch die an den Fang-Antikörper gebundenen Antigene zurück. Nach erneutem Waschen schließt sich die Zugabe eines weiteren primären Antikörpers an, des sog. Detektions-Antikörpers. Dieser bindet auch an das gesuchte, bereits vom Fang-Antikörper gebundene Antigen, jedoch an einer anderen Bindungsstelle. Damit ist das „Sandwich“ vervollständigt, d.h. die Probe, bzw. das gesuchte Antigen, ist zwischen den zwei spezifischen Antikörpern gebunden. Um diese Bindung nachzuweisen, folgt die Zugabe eines enzymgekoppelten Sekundärantikörpers, der wiederum an den Detektions-Antikörper bindet und somit eine enzymatische Farbreaktion katalysiert.

Für die Detektion und Quantifizierung von TNF-alpha und IL-6 in den zu untersuchenden Proben, wurden ein *Rat TNF- α ELISA Set* bzw. ein *Rat IL-6 ELISA Set* der Firma BD Biosciences nach Herstellerangaben verwendet.

Dafür wurde zuerst eine 96-Loch-ELISA-Platte mit jeweils 100 μ l des entsprechenden Fang-Antikörpers anti-TNF- α (Verdünnung 1:250 in DPBS) bzw. anti-IL-6 (Verdünnung 1:125 in DPBS) pro Vertiefung über Nacht bei 4°C beschichtet. Am nächsten Tag wurde die Antikörper-Lösung entfernt und die Platte fünfmal für 15 Sekunden mit einem ELISA-Waschpuffer gewaschen. Es folgte das Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit je 200 μ l Blockierlösung für 1 Stunde bei RT und anschließendes, fünfmaliges Waschen mit dem ELISA-Waschpuffer. Anschließend wurden je 100 μ l der mit *Assay Diluent* verdünnten zu untersuchenden Zellkulturüberstände in die Vertiefungen pipettiert. Für die Quantifizierung wurde eine Verdünnungsreihe der TNF-a bzw. IL-6 Proteinstandards von 2000 pg/ml bis 31,25 pg/ml mit auf die Platte pipettiert. Die Platte wurde abgedeckt und für 2 Stunden bei RT (TNF- α) oder bei 37°C im Inkubator (IL-6) inkubiert. Darauf folgte fünfmaliges Waschen für je 15 Sekunden, um ungebundenes Antigen zu entfernen, bevor je 100 μ l des verdünnten biotinylierten Sekundärantikörpers (Verdünnung 1:500 für TNF- α

und 1:250 für IL-6) zu den Ansätzen pipettiert wurden. Nach einer anschließenden Inkubation für 1 Stunde bei RT (TNF- α) bzw. bei 37°C im Inkubator (IL-6), wurde ungebundener Sekundärantikörper entfernt, indem die Platte fünfmal mit dem ELISA-Waschpuffer gewaschen wurde. Zur Detektion des gebundenen biotynilierten Sekundärantikörpers und damit möglichen Quantifizierung des jeweiligen Zytokins in den Zellkulturüberständen, wurden zu jedem Ansatz je 100 μ l des verdünnten *Enzym Reagent* (Meerrettichperoxidase-(HRP)-konjugiertes Streptavidin) (1:250), welches hochaffin an das Biotin des Sekundärantikörpers bindet, in die Vertiefungen der Platte pipettiert und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach anschließendem siebenmaligem Waschen für je 25 Sekunden mit ELISA-Waschpuffer wurden je 100 μ l der *Substrat-Solution* (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) + Wasserstoffperoxid) hinzugefügt und die Platte im Dunkeln bei RT für 30 Minuten inkubiert. Zum Abstoppen der Enzym-Substrat-Reaktion wurden je 50 μ l der *Stop-Solution* (1 mol/l Schwefelsäure) pro Vertiefung dazugegeben und die Absorption photometrisch bei 450 nm gemessen. Anhand der mitgeführten Standardreihe wurde eine Standardkurve erstellt, mit deren Hilfe die Zytokin-Konzentrationen in den Proben berechnet wurde.

2.2.9.1 Immunfluoreszenzfärbung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (p65)

Eine in der aktuellen Forschung verwendete Methode, um Proteine und andere Moleküle spezifisch darzustellen, ist die Immunfluoreszenzfärbung.

Dabei wird mit Hilfe von Antikörpern die zu untersuchende Struktur in den Zellen sichtbar gemacht und kann so lokalisiert oder auch quantifiziert werden. In dieser Arbeit wurde die indirekte Immunfluoreszenz angewandt. Dabei bindet ein Primärantikörper spezifisch an das Epitop des zu untersuchenden Proteins und wird mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper detektiert.

Für die NF- κ B Immunfluoreszenzfärbung wurden 100.000 Mikroglia auf Deckgläser ausgesät und für 24 Stunden in 1 ml Mikrogliazellkulturmedium in einer 6-Loch-Zellkulturplatte im Inkubator gehalten, bevor sie dem Protokoll entsprechend stimuliert wurden. Nach Beendigung der Stimulationszeit wurde das Stimulationsmedium entfernt und die Zellen einmalig mit DPBS gespült. Anschließend wurden die Deckgläser in Glasschälchen überführt und die Zellen mit eiskaltem Azeton für 10

Minuten fixiert. Azeton permeabilisiert Membranen für die Detektion intrazellulärer Strukturen. Nach der Fixierung wurden die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen und dann je 100 µl des Primärantikörpers NF-κB (1:50 in *Antibody Diluent Reagent Solution* verdünnt) auf die Deckgläser aufgetragen und für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde dreimal mit DPBS gespült und der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper *Goat anti-mouse IgG Alexa Fluor® 488* (1:700 in DPBS) auf die Zellen pipettiert. Nach einer Stunde Inkubation bei RT wurde der Sekundärantikörper entfernt und die Zellen dreimal mit DPBS gespült. Danach schloss sich eine 5-minütige Kernfärbung mit Bisbenzimid an. Dazu wurde eine Spatelspitze Bisbenzimid in 50 ml DPBS gelöst und je 2 ml auf die Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen dreimal mit DPBS und abschließend einmalig mit Aqua bidest gespült. Im Anschluss wurden die Mikroglia auf den Deckgläsern mit Immuno-Mount auf Objektträgern eingedeckt. Die Ergebnisse der Färbung wurden am Zeiss Axiovert 200 mikroskopisch ausgewertet und dokumentiert.

2.2.10 Statistische Analysen

Für die statistischen Auswertungen dieser Arbeit wurde das Programm Prism5 (GraphPad, USA) verwendet. Die statistische Signifikanz zwischen den Versuchsgruppen wurde mittels one-way ANOVA und anschließendem Bonferroni Test bewertet. Die Signifikanzschwelle α wurde bei einem p-Wert $< 0,05$ festgelegt (ns $p \geq 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte *in vitro* ein möglicher entzündungshemmender oder immunmodulatorischer Effekt von Niacin auf primäre Mikroglia untersucht werden. Studien anderer Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass Niacin in Alveolarmakrophagen, die zuvor durch LPS aktiviert wurden, den positiven Effekt hatte, die Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen, wie z.B. IL-6 und TNF- α , zu dämpfen (Zhou u. a. 2014).

In Anlehnung an diese Literatur wurde der Versuchsaufbau dieser Arbeit geplant und in Vorversuchen überprüft, ob und in welchen Konzentrationen Niacin eine Wirkung auf primäre Mikroglia ausübt. Somit wurden die folgenden Versuche mit Niacin in einer Konzentration von 0,1 μ M durchgeführt.

3.1 Niacin hatte keinen zytotoxischen Einfluss auf primäre Mikroglia

Um eine potentielle zytotoxische Wirkung der Versuchssubstanz Niacin auf das Überleben der Mikroglia auszuschließen, wurden MTT-Tests durchgeführt. Eventuelle toxische Wirkungen würden sich in einer deutlichen Verringerung der MTT-Reduktion zu Formazan bemerkbar machen, da die Anzahl der vitalen Zellen abgenommen hätte. Abb. 3.1 zeigt, dass nach einer Stimulationszeit der Mikroglia von 24 Stunden die Versuchssubstanz Niacin, weder allein, noch in Kombination mit LPS eine zytotoxische Wirkung auf primäre Mikroglia ausübte. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (100%) war ein leichter Rückgang der MTT-Reduktion auf 89,78% bei den allein mit 0,1 μ M Niacin behandelten Mikroglia zu messen, wohingegen die MTT-Reduktion bei einer Behandlung der Mikroglia mit LPS allein und in Kombination mit Niacin zu einem Anstieg der MTT-Reduktion führte. In den Ansätzen, die mit 10 ng/ml LPS behandelt wurden, betrug die MTT-Reduktion 117,18% und in den kombiniert mit 0,1 μ M Niacin und 10 ng/ml LPS behandelten Mikroglia 119,09%. Die Ergebnisse zeigten für alle verwendeten Substanzen in den angebenen Konzentrationen keine zytotoxischen Effekte auf die primäre Mikroglia.

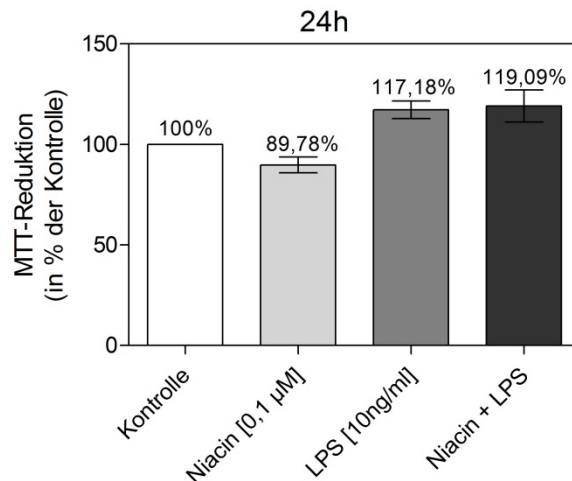


Abb. 3.1: Einfluss von Niacin und LPS auf das Zellüberleben primärer Mikroglia.

Die Reduktionsrate von MTT zu Formazan wurde mittels MTT-Test bestimmt. Nach einer 24-stündigen Inkubation der Versuchsansätze (unstimulierte Kontrolle, Niacin [0,1 µM], LPS [10ng/ml], Niacin + LPS) wurde die Formazan-Bildung photometrisch gemessen. Es zeigten sich für die festgesetzten Konzentrationen von 0,1 µM Niacin und 10 ng/ml LPS allein oder in Kombination keine zytotoxischen Effekte auf die Mikroglia. Die Messwertangaben erfolgten in % unstimulierter Mikroglia. (Mittelwert ± SEM, n=3)

3.2 Auswirkung von Niacin auf die Zellmorphologie von Mikroglia

Mikroglia sind die ortsständigen Immunzellen des ZNS und können in verschiedenen morphologischen Zuständen im Gewebe auftreten. Die unterschiedliche Morphologie kann vom Aktivierungszustand der Mikroglia abhängen. Der ruhende, nicht unmittelbar aktive Funktionszustand ist oft an einer ramifizierten Form zu erkennen. Nach Aktivierung gehen die Mikroglia vermehrt in eine amöboide Form über. Ramifizierte Mikroglia besitzen einen schmalen, dichten Zellkern und Zellausläufer in viele Richtungen. Aktivierte Mikroglia hingegen weisen ein größeres Zytosoma und kürzere, plumpere zytoplasmatische Ausläufer auf (Harry 2013).

In dieser Arbeit wurden die verschieden behandelten Mikroglia mit Coomassie-Blau gefärbt und mögliche zellmorphologischen Formveränderungen unter dem Lichtmikroskop untersucht und dargestellt.

In Abb. 3.2 sind die morphologischen Veränderungen der Mikroglia nach 6 Stunden unter dem Einfluss von 0,1 µM Niacin und 10 ng/ml LPS dargestellt. Unstimulierte Mikroglia liegt vorwiegend in der ramifizierten, also wahrscheinlich ruhenden Form vor. Die Zellkerne erscheinen dicht, es sind vermehrt Vakuolen im Zytosol zu sehen und die zahlreichen Zellausläufer sind gut abgrenzbar (Abb 3.2 a). Eine Behandlung mit 10

ng/ml LPS lässt nach 6 Stunden eine leichte Änderung der Zellgestalt erkennbar. Es liegen sowohl Zellen in ramifizierter, als auch Zellen in aktiver, amöboider Konfiguration vor. Die aktivierte Mikroglia fällt durch ein voluminöseres Erscheinungsbild auf. Dieser Eindruck ergibt sich aus der Verschiebung der Zellkern-Zytoplasma Relation hin zum Zytoplasma. Ebenfalls sind die Zellausläufer verkürzt und in ihrer Anzahl reduziert (Abb. 3.2 b).

Abb. 3.2 c zeigt, dass eine alleinige Stimulation mit 0,1µM Niacin nach 6-stündiger Inkubation zu keiner deutlichen zellulären Gestaltsveränderung führt. Die Zellen weisen einen dichten Zellkern, deutliche Vakuolen und lange Ausläufer auf.

Bei einer Kostimulation mit 0,1 µM Niacin und 10 ng/ml LPS zeigt sich ein eher gemischtes Bild. Mikroglia liegen im sog. aktivierten, im ruhenden Zustand und in der Übergangsphase zwischen den beiden Aktivierungsgraden vor. Amöboide, plump wirkende Zellkörper, liegen neben kompakter erscheinenden Zellen mit deutlichen Zellausläufern.

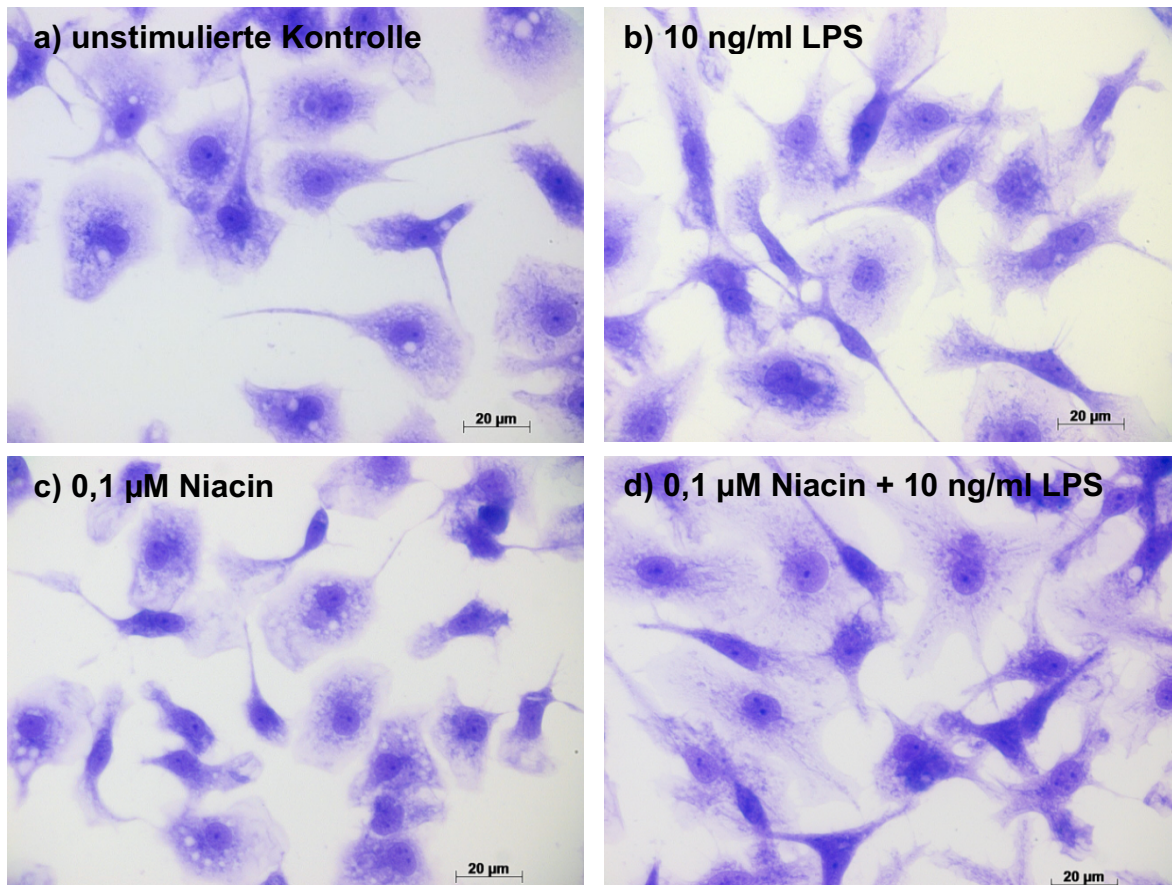


Abb. 3.2: Veränderung der Zellmorphologie primärer Mikroglia nach 6 Stunden.

Nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden wurden die morphologischen Veränderungen der Mikroglia, welche sich unter dem Einfluss von Niacin mit und ohne LPS zeigten, mit Hilfe der Coomassie-Blau Färbung dargestellt und lichtmikroskopisch untersucht. Aus einer unabhängigen Versuchszahl von n=10 wurden repräsentative Fotos aufgenommen, von denen jeweils eins hier repräsentiert wird.

In Abb. 3.3 sind die morphologische Veränderung der Mikroglia nach 24 Stunden unter dem Einfluss von 0,1 μM Niacin und 10 ng/ml LPS dargestellt.

Abb. 3.3 a) zeigt die Zellgestalt der Mikroglia im unstimulierten Zustand. Die Mikroglia liegt vorwiegend in der ramifizierten, also ruhenden Form vor. Die Zellkerne erscheinen dicht, es sind vermehrt Vakuolen im Zytosol zu sehen und die zahlreichen Zellausläufer sind gut abgrenzbar. Insgesamt erscheinen die Zellen kompakt und rundlich. In Abb. 3.3 b) zeigt sich die Auswirkung von 10 ng/ml LPS auf die Morphologie der Mikroglia. Sie liegt nun überwiegend in der amöboiden, aktivierten Form vor. Die Zellen weisen deutlich mehr Zytoplasma in Relation zum Zellkern auf und haben kaum Ausläufer. Diese sind eher kurz und plump. Vakuolen sind nicht deutlich wahrnehmbar. In Abb. 3.3 c) wird die Morphologie der Mikroglia nach 24-stündiger Inkubation mit 0,1μM Niacin sichtbar. Die Stimulation mit Niacin führte zu keiner signifikanten

zellulären Gestaltveränderung. Die Zellen weisen einen dichten Zellkern auf, deutliche Vakuolen und lange Ausläufer. Abb. 3.3 d) zeigt die Morphologie nach 24-stündiger Kostimulation mit 0,1 μM Niacin und 10 ng/ml LPS. Die Zellen wirken insgesamt, im Gegensatz zur Einzelstimulation mit LPS, etwas kompakter. Die Zytoplasma-Zellkern-Relation verschiebt sich eher in Richtung Zellkern und es sind vermehrt Zellausläufer zu sehen, die etwas verkürzt wirken, aber nicht ganz so plump erscheinen.

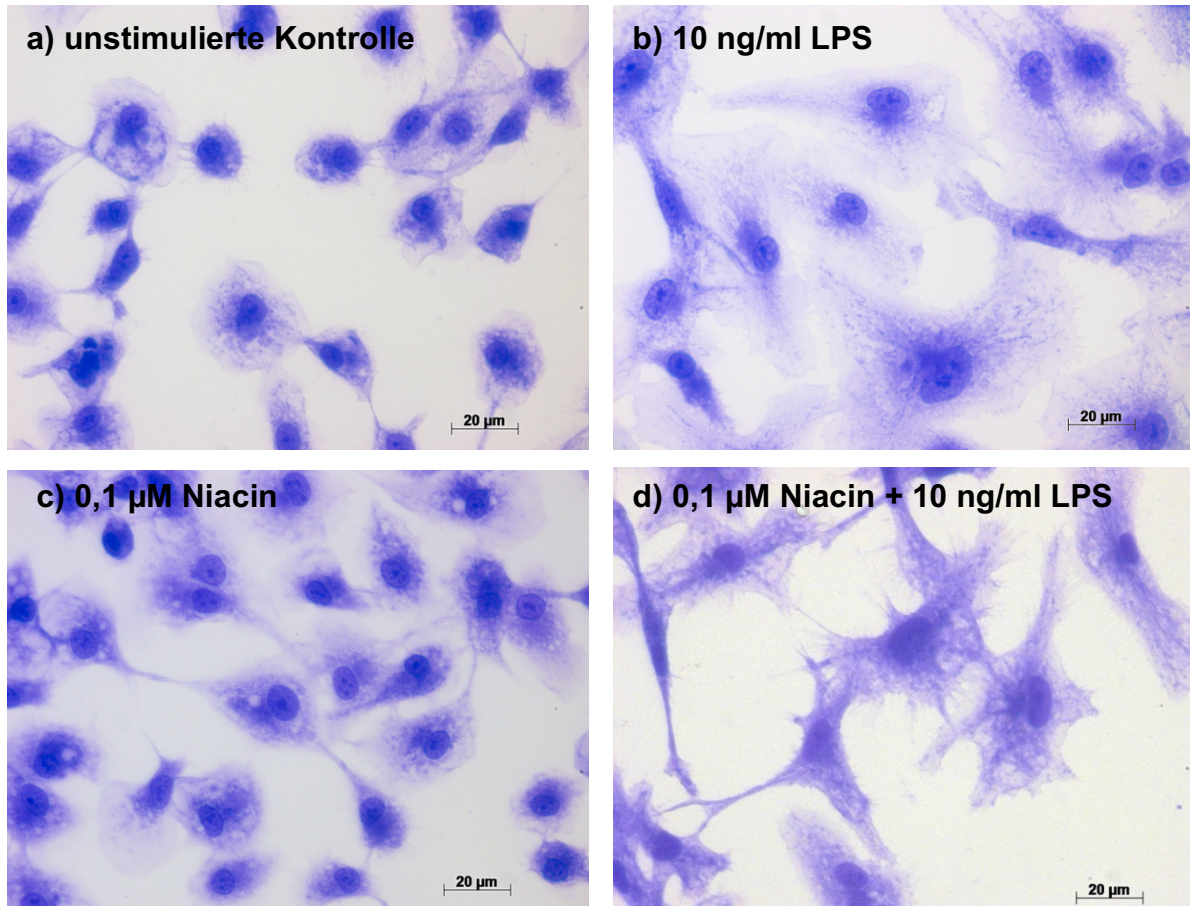


Abb. 3.3: Veränderung der Zellmorphologie primärer Mikroglia nach 24 Stunden.

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die morphologischen Veränderungen der Mikroglia, welche sich unter dem Einfluss von Niacin und LPS zeigten, mit Hilfe der Coomassie-Blau Färbung dargestellt und lichtmikroskopisch untersucht. Aus einer unabhängigen Versuchszahl von $n=10$ wurden repräsentative Fotos aufgenommen, von denen jeweils eins hier repräsentiert wird.

3.3 Niacin reduzierte die Synthese des Enzyms induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und die NO-Synthese von Mikroglia

NO ist ein bioaktives, freies Radikal, das durch das Enzym induzierbare NO-Synthase (iNOS) aus der Aminosäure L-Arginin in der Mikroglia gebildet wird.

Mikroglia exprimieren das Enzym iNOS nicht kontinuierlich, sondern vor allem als Reaktion auf pathologische Vorgänge, wie z.B. Ischämien, Traumata oder entzündliche Geschehen (Ghasemi und Fatemi 2014). Nach solch einem Reiz wird folglich zuerst die iNOS-Synthese gesteigert, welche in dieser Arbeit durch die Bestimmung der iNOS mRNA-Menge mittels qPCR detektiert wurde. Die anschließend zu detektierende Antwort auf die gesteigerte iNOS-Expression ist eine erhöhte NO-Synthese in der Mikroglia. Das freigesetzte NO reagiert mit Superoxid zu (Peroxi)-nitrit, dessen Akkumulation im Zellüberstand mit Hilfe des Griess-Reagenz nachgewiesen werden kann.

Da die beiden Reaktionsabläufe, wie oben beschrieben, zusammenspielen, werden die Ergebnisse gemeinsam betrachtet.

In Abb. 3.4 ist die prozentual mittels qPCR ermittelte iNOS mRNA-Menge nach Stimulation mit und ohne Niacin in LPS-aktivierter Mikroglia jeweils nach 6 und 24 Stunden dargestellt.

Nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden betrug die iNOS mRNA-Menge der unstimulierten Kontrolle 0,03% und die der Einzelstimulation mit 0,1 μ M Niacin 0,04%, im Vergleich zu den 100% der mit 10 ng/ml LPS aktivierten Mikroglia. Die iNOS mRNA-Menge der simultan mit 0,1 μ M Niacin und 10 ng/ml LPS stimulierten Mikroglia wurde auf 58,18%, im Vergleich zu 100% der mit 10 ng/ml LPS-aktivierten Mikroglia, herabreguliert. Damit wurde kein Einfluss von Niacin allein im Vergleich zu unbehandelten Mikroglia nachgewiesen, jedoch eine signifikante Reduktion der iNOS-mRNA-Synthese in LPS-aktivierter Mikroglia.

Nach 24 Stunden betrug der Wert der unstimulierten Kontrolle 0,18% und der der Einzelstimulation mit Niacin ebenfalls 0,18%, in Bezug auf die 100% der LPS-aktivierten Mikroglia. In der simultan mit Niacin und LPS behandelten Mikroglia zeigte sich eine Herabregulation der iNOS-mRNA-Synthese auf 78,53%. Damit wurde festgestellt, dass auch nach einer 24-stündigen Behandlung 0,1 μ M Niacin alleine, im Vergleich zu den Kontrollzellen, keinen Einfluss auf Mikroglia ausübte. In LPS-

aktivierten Mikroglia senkte Niacin nach 24 Stunden die iNOS-mRNA-Synthese jedoch signifikant, aber im Vergleich zu einer 6-stündigen Behandlung nicht so stark.

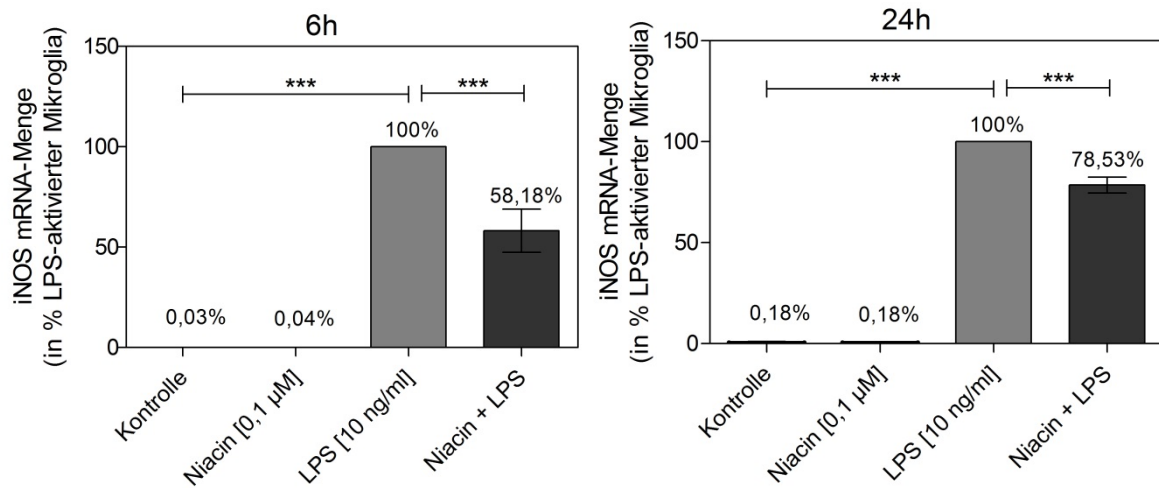


Abb. 3.4: Niacin reduzierte die mRNA-Menge von iNOS in LPS-aktivierter Mikroglia nach 6 und 24 Stunden.

Nach RNA-Isolierung und Umschreibung dieser in cDNA erfolgte die relative qPCR mit Hilfe des TaqMan®-Systems. Dabei wurden die Messwerte mit der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode ausgewertet. Die Messwertangaben erfolgten in % LPS-aktivierter Mikroglia. (Mittelwert \pm SEM; $n \geq 3$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$)

In der folgenden Abb. 3.5 sind die prozentualen Ergebnisse der NO-Freisetzung in LPS-aktivierter Mikroglia unter dem Einfluss von Niacin dargestellt.

Nach einer 6-stündigen Stimulationszeit der Mikroglia betragen die Werte der unstimulierten Kontrolle 32,99% und die der Einzelstimulation mit 0,1 µM Niacin 31,22%, bezogen auf den Wert von 100% der mit 10 ng/ml LPS aktivierten Mikroglia. In der kombinierten Stimulation mit 0,1 µM Niacin und 10 ng/ml LPS wurde die NO-Freisetzung der LPS-aktivierten Mikroglia auf 94,13% gesenkt.

Nach 24 Stunden sanken die Werte der Kontrolle auf 5,85% und die der Einzelstimulation mit 0,1 µM Niacin auf 5,42%. Der Wert der simultanen Stimulation von Niacin und LPS nach 24 Stunden sank auf 87,43 %, im Vergleich zu den 100% der mit LPS stimulierten Mikroglia. Somit zeigte sich bereits nach 6 Stunden ein leichter Rückgang und nach 24 Stunden eine deutliche Reduktion der iNOS und der damit verbundenen NO-Freisetzung.

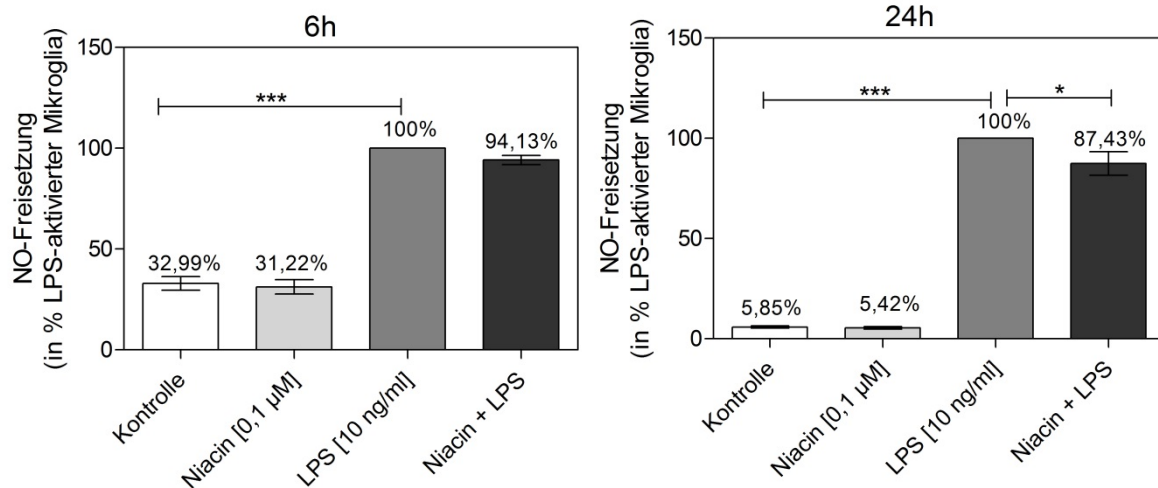


Abb. 3.5: Niacin reduzierte die NO-Freisetzung in LPS-aktivierter Mikroglia nach 6 und 24 Stunden.

Mittels Griess-Reagenz erfolgte die NO-Messung in den Zellkulturüberständen der Stimulationsansätze nach 6 und 24 Stunden. Die Messwertangaben erfolgten in % LPS-aktivierter Mikroglia. (Mittelwert \pm SEM; $n \geq 3$; ns $p \geq 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

3.4 Niacin, ein Agonist des HCA₂-Rezeptors

Niacin gilt als Agonist des Rezeptors HCA₂, der früher auch GPR109A genannt wurde. Der Rezeptor gehört zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die eine entscheidende Rolle bei Entzündungsprozessen spielen (Graff u. a. 2016; Offermanns und Schwaninger 2015).

Um auf mRNA-Ebene nachzuweisen, dass primäre Mikroglia den Niacin-Rezeptor HCA₂ exprimieren, wurden relative qPCR-Analysen durchgeführt. Die Stimulationszeiten wurden auf 6 Stunden festgelegt, da ebenfalls die Synthese der proinflammatorischen Zytokine nach dieser Zeit analysiert wurde. Mit LPS-aktivierte primäre Mikroglia diente als Vergleichskontrolle. Die Messwerte wurden auf die der LPS-aktivierten Mikroglia bezogen und in % angegeben. Nach 6-stündiger Stimulation und anschließender pPCR zeigte sich, dass Mikroglia den Niacin-Rezeptor HCA₂ exprimieren (Abb. 3.6). Im Vergleich zu den 100% der Einzelstimulation mit LPS, war die HCAR₂ mRNA-Menge in der Kontrolle mit 4,28% und die der Einzelstimulation mit 5,25% sehr niedrig. In der Kostimulation mit Niacin und LPS sanken die prozentualen Werte der HCAR₂ mRNA-Menge auf 76,87% ab, verglichen mit den 100% der mit LPS aktivierten Mikroglia.

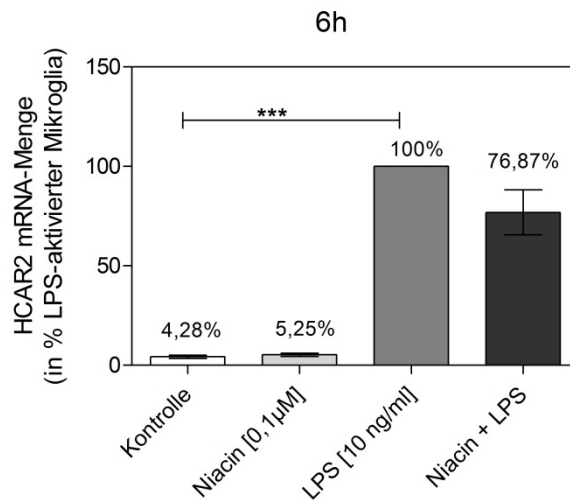


Abb. 3.6: Primäre Mikroglia exprimieren den HCA2-Rezeptor, dessen mRNA-Menge in LPS-aktivierter Mikroglia durch Niacin herabreguliert wurde.

Nach 6 Stunden Stimulation und anschließender RNA-Isolierung der Versuchsansätze und Umschreibung dieser in cDNA, erfolgte die relative qPCR mit Hilfe des TaqMan®-Systems. Die Messwertangaben erfolgten in % LPS-aktivierter Mikroglia (Mittelwert \pm SEM; n=5).

3.5 Untersuchungen zum Einfluss von Niacin auf die Synthese proinflammatorischer Mediatoren auf mRNA-Ebene in primärer Mikroglia

Mikroglia reagieren z.B. auf eine bakterielle Infektion u.a. mit Proliferation und exprimieren Rezeptoren wie Toll-like-Rezeptor 2 (TLR2), Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) oder Toll-like-Rezeptor 9 (TLR9), um bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) zu erkennen. Nach ihrer Aktivierung, z.B. durch LPS, sezernieren Mikroglia viele proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 beta (IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6) (Nayak u. a. 2014).

Um herauszufinden, ob Niacin diese Hochregulation der genannten Entzündungsmediatoren beeinflussen kann, wurde die mRNA-Synthese von TNF- α , IL-1 β und IL-6 mittels qPCR untersucht. LPS-aktivierte Mikroglia diente als Vergleichskontrolle. Die Stimulationszeiten betragen 2 und 6 Stunden. Ebenfalls durchgeführte Versuche mit einer Stimulationszeit von 24 Stunden schwankten in den Ergebnissen jedoch sehr stark und führten zu keinem Resultat mit Aussagekraft und wurden somit nicht in dieser Arbeit aufgeführt.

3.5.1 Niacin senkte die Synthese des Zytokines Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)

In Abb. 3.7 ist die prozentual mittels qPCR ermittelte TNF- α mRNA-Menge nach Stimulation mit und ohne Niacin in LPS-aktivierter Mikroglia jeweils nach 2 und 6 Stunden dargestellt.

Nach einer Stimulationszeit von 2 Stunden betragen die prozentualen Werte der TNF- α mRNA-Menge der unstimulierten Kontrolle 0,45% und die der Einzelstimulation mit 0,1 μ M Niacin 0,39%, verglichen mit den 100% der LPS-aktivierten Mikroglia. In der simultan mit 0,1 μ M Niacin und 10 ng/ml LPS behandelten Mikroglia wurde die TNF- α mRNA-Menge auf 91,50%, im Vergleich zu 100% der mit 10 ng/ml LPS-aktivierten Mikroglia, herabreguliert. Diese Werte zeigten, dass Niacin alleine keinen großen Einfluss auf die TNF- α mRNA-Synthese von unbehandelten Mikroglia nahm. Bei den zuvor mit LPS stimulierten Mikroglia hingegen, bewirkte 0,1 μ M Niacin schon nach 2 Stunden eine leichte Reduzierung der TNF- α mRNA-Synthese.

Diese Tendenz verstärkte sich nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden noch deutlicher. Die Werte der unstimulierten Kontrolle betragen 0,77% und die Werte der Einzelstimulation mit Niacin 2,33%. Die TNF- α mRNA-Menge der simultan mit 0,1 μ M Niacin und 10 ng/ml LPS behandelten Mikroglia sank auf 41,50%, im Vergleich zu 100% der mit LPS-aktivierten Mikroglia. Diese Ergebnisse zeigten, dass Niacin alleine auch nach 6 Stunden Stimulationszeit, im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen, keinen Einfluss auf die TNF- α mRNA-Syntheseaktivität der Mikroglia hatte. In der mit LPS-aktivierten Mikroglia hingegen, bewirkte Niacin nach 6-stündiger Stimulation eine signifikante Reduktion der TNF- α mRNA-Syntheseaktivität.

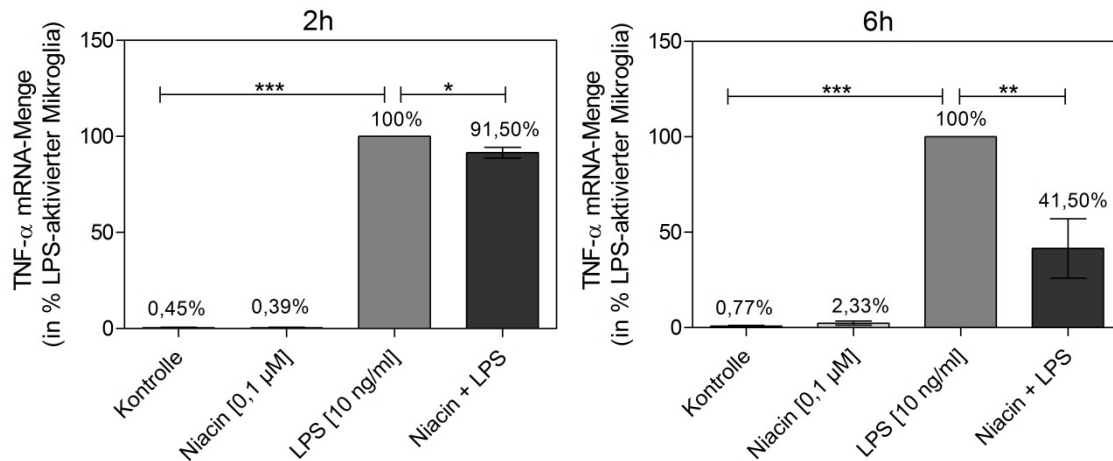


Abb. 3.7: Niacin reduzierte signifikant die TNF- α mRNA-Synthese von aktivierter Mikroglia nach 6 Stunden.

Nach RNA-Isolierung der Versuchsansätze (Kontrolle, Niacin [0,1 µM], LPS [10ng/ml], Niacin + LPS) und Umschreibung dieser in cDNA, erfolgte im Anschluss die relative qPCR mit Hilfe des TaqMan[®]-Systems. Die Messwertangaben erfolgten in % LPS-aktivierter Mikroglia. (Mittelwert \pm SEM; $n \geq 3$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$)

3.5.2 Niacin senkte die Synthese des Zytokines Interleukin-1 beta (IL-1 β)

In Abb. 3.8 ist die prozentual mittels qPCR ermittelte IL-1 β mRNA-Menge nach Stimulation mit und ohne Niacin in LPS-aktivierter Mikroglia jeweils nach 2 und 6 Stunden dargestellt.

Die unstimulierte Kontrolle wies nach 2-stündiger Stimulation geringe Werte von 1,12% auf. In der Einzelstimulation mit 0,1 µM Niacin wurden Werte von 4,05% detektiert. Bereits nach einer Stimulationszeit von 2 Stunden wurde die IL-1 β mRNA-Menge der simultan mit 0,1 µM Niacin und 10 ng/ml LPS behandelten Mikroglia auf 84,75%, im Vergleich zu 100% der mit 10 ng/ml LPS-aktivierten Mikroglia, herabreguliert. Diese Werte zeigten, dass Niacin alleine nur einen geringen Einfluss auf die IL-1 β mRNA-Synthese von unbehandelter Mikroglia nahm. Bei den zuvor mit LPS stimulierten Mikroglia hingegen, bewirkte 0,1 µM Niacin schon nach 2 Stunden eine deutliche Reduzierung der IL-1 β mRNA-Synthese.

Nach 6 Stunden betrug die Werte der unstimulierten Kontrolle 1,44% und die Werte der Einzelstimulation mit Niacin 1,51%. Die IL-1 β mRNA-Menge der simultan mit 0,1 µM Niacin und 10 ng/ml LPS behandelten Mikroglia sank auf 68,82%, im Vergleich zu 100% der mit LPS-aktivierten Mikroglia.

Damit wurde kein signifikanter Einfluss von Niacin allein im Vergleich zu unbehandelten Mikroglia nachgewiesen, jedoch eine signifikante Reduktion der IL-1 β mRNA-Synthese in LPS-aktivierter Mikroglia.

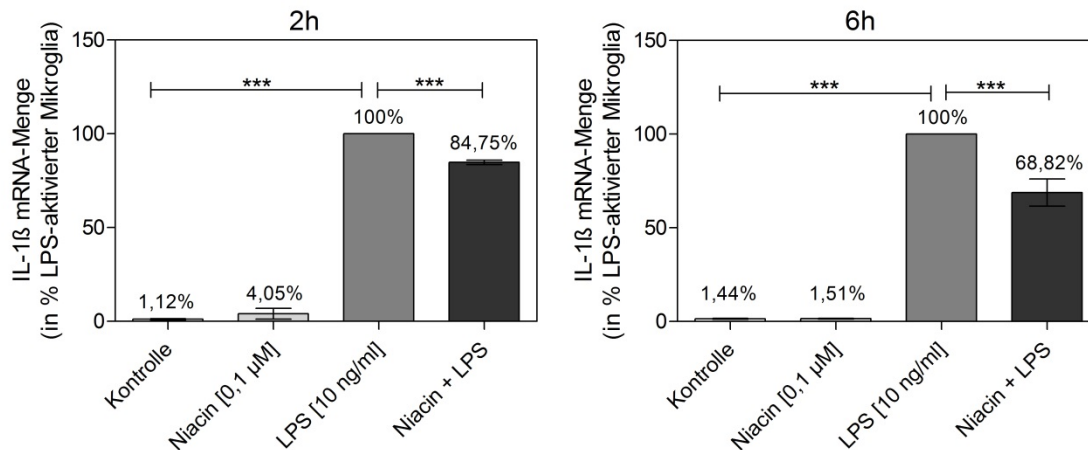


Abb. 3.8: Niacin reduzierte signifikant die IL-1 β mRNA-Synthese von aktivierter Mikroglia nach 2 und 6 Stunden.

Nach RNA-Isolierung der Versuchsansätze (Kontrolle, Niacin [0,1 μ M], LPS [10ng/ml], Niacin + LPS) und Umschreibung dieser in cDNA, erfolgte im Anschluss die qPCR mit Hilfe des TaqMan[®]-Systems. Die Messwertangaben erfolgten in % LPS-aktivierter Mikroglia. (Mittelwert \pm SEM; $n \geq 3$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$)

3.5.3 Niacin senkte die Synthese des Zytokines Interleukin-6 (IL-6) nach 6-stündiger Inkubation

In Abb. 3.9 ist die prozentual mittels qPCR ermittelte IL-6 mRNA-Menge nach Stimulation mit und ohne Niacin in LPS-aktivierter Mikroglia jeweils nach 2 und 6 Stunden dargestellt.

Nach einer Stimulationszeit von 2 Stunden wies die unstimulierte Kontrolle geringe Werte von 0,05% auf. In der Einzelstimulation mit 0,1 μ M Niacin wurden Werte von 0,11% detektiert. Nach 2 Stunden wurde die IL-6 mRNA-Menge der simultan mit 0,1 μ M Niacin und 10 ng/ml LPS behandelten Mikroglia, im Vergleich zu 100% der mit 10 ng/ml LPS-aktivierten Mikroglia, nicht signifikant herabreguliert (83,85%). Diese Werte zeigten, dass Niacin alleine keinen Einfluss auf die IL-6 mRNA-Synthese von unbehandelten Mikroglia nahm. Auch bei den zuvor mit LPS stimulierten Mikroglia, bewirkte 0,1 μ M Niacin nach 2 Stunden keine relevante Reduzierung der IL-6 mRNA-Synthese.

Nach einer 6-stündigen Stimulation betragen die Werte der unstimulierten Kontrolle 0,06% und die Werte der Einzelstimulation mit Niacin 0,09%. Bei der Simultanstimulation mit 0,1 μ M Niacin und 10 ng/ml LPS hingegen sank die IL-6 mRNA-Menge auf 63,19%, im Vergleich zu 100% der mit LPS-aktivierten Mikroglia. Damit wurde kein signifikanter Einfluss von Niacin allein im Vergleich zu unbehandelten Mikroglia nachgewiesen, jedoch eine signifikante Reduktion der IL-6 mRNA-Synthese nach 6-stündiger Inkubation in LPS-aktivierter Mikroglia.

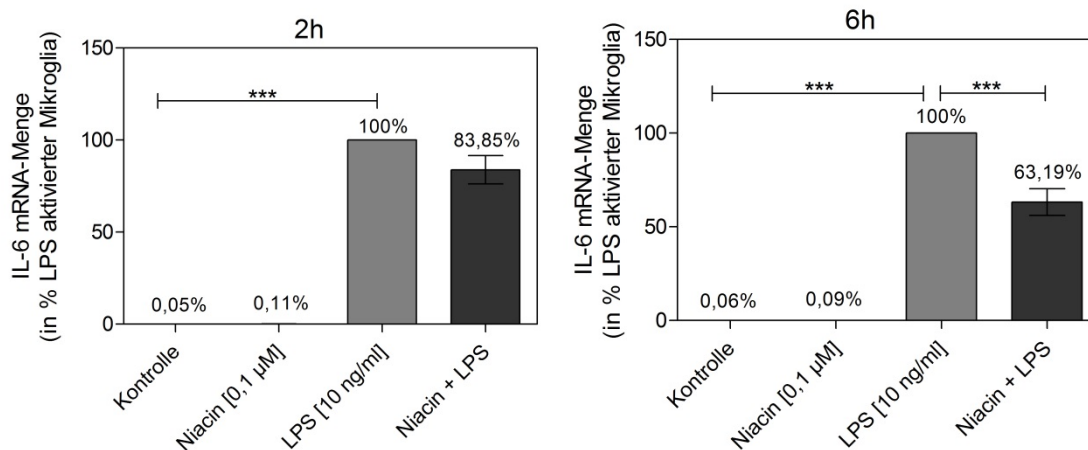


Abb. 3.9: Niacin reduzierte signifikant die IL-6 mRNA-Synthese von aktivierter Mikroglia nach 6 Stunden.

Nach RNA-Isolierung der Versuchsansätze (Kontrolle, Niacin [0,1 μ M], LPS [10ng/ml], Niacin + LPS) und Umschreibung dieser in cDNA, erfolgte im Anschluss die relative qPCR mit Hilfe des TaqMan®-Systems. Die Messwertangaben erfolgten in % LPS-aktivierter Mikroglia. (Mittelwert \pm SEM; $n \geq 3$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$)

3.6 Wirkung von Niacin auf Proteinebene

Um die Wirkung von Niacin auf der Proteinebene zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit enzymgekoppelte Absorptionstests (*Enzyme-linked-immunosorbent-assay*, *ELISA*), Western Blot Analysen und Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Mit Hilfe des Sandwich-ELISA ließ sich die Freisetzung der Zytokine TNF- α und IL-6 in Zellkulturüberständen nachweisen, was Aufschluss über die Sekretion dieser Zytokine unter dem Einfluss von Niacin in Mikroglia gab. Mittels Western Blot Analysen und Immunfluoreszenzfärbungen wurde die Wirkung von Niacin auf intrazelluläre MAPK-Signalwege bzw. auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B in Mikroglia untersucht.

3.6.1 Niacin regelte die TNF- α Sekretion in Mikroglia herab

In den Abb. 3.10 sind die in den Zellkulturüberständen mittels ELISA prozentual ermittelten TNF- α -Mengen nach Stimulation mit und ohne Niacin in LPS-aktivierter Mikroglia jeweils nach 2, 6 und 24 Stunden dargestellt.

Die Werte der unstimulierten Kontrolle betragen nach 2-stündiger Inkubation 0% und die der Einzelstimulation mit 0,1 μ M Niacin ebenfalls 0%. Nach 2 Stunden Inkubation war noch kein signifikanter Rückgang der TNF- α Sekretion im gemeinsamen Stimulationsansatz von 0,1 μ M Niacin und 10 ng/ml LPS, im Vergleich zu 100% der mit LPS stimulierten Mikroglia, wahrzunehmen. Der Wert betrug 96,25%. Somit hatte Niacin alleine, im Vergleich zur unbehandelten Mikroglia, keinen Einfluss auf die TNF- α Sekretion von Mikroglia. Aber auch auf die TNF- α Sekretion von LPS-aktivierter Mikroglia konnte Niacin nach 2-stündiger Inkubation noch keinen signifikanten Einfluss nehmen.

Nach 6-stündiger Inkubation zeigte die unstimulierte Kontrolle Werte von 0% und die Einzelstimulation mit 0,1 μ M Niacin Werte von 0,76%. Die prozentualen Werte der TNF- α -Menge der simultan mit 0,1 μ M Niacin und 10 ng/ml LPS stimulierten Mikroglia sank auf 78,58%, im Vergleich zu 100% der mit 10 ng/ml LPS-aktivierten Mikroglia. Damit wurde kein Einfluss von Niacin allein im Vergleich zu unbehandelten Mikroglia nachgewiesen, jedoch eine signifikante Reduktion der TNF- α Sekretion in LPS-aktivierter Mikroglia.

Die Werte der unstimulierten Kontrolle betragen nach 24-stündiger Inkubation 0% und die der Einzelstimulation mit 0,1 μ M Niacin ebenfalls 0%. Die prozentualen Werte der TNF- α -Menge der simultan mit 0,1 μ M Niacin und 10 ng/ml LPS stimulierten Mikroglia sanken auf 93,53%, im Vergleich zu 100% der mit 10 ng/ml LPS-aktivierten Mikroglia. Folglich zeigte sich auch hier kein alleiniger Einfluss von Niacin auf Mikroglia verglichen mit den unbehandelten Kontrollzellen. Die TNF- α Sekretion in LPS-aktivierter Mikroglia wurde durch 0,1 μ M Niacin merklich reduziert, jedoch nicht so stark wie nach der 6-stündigen Stimulation.

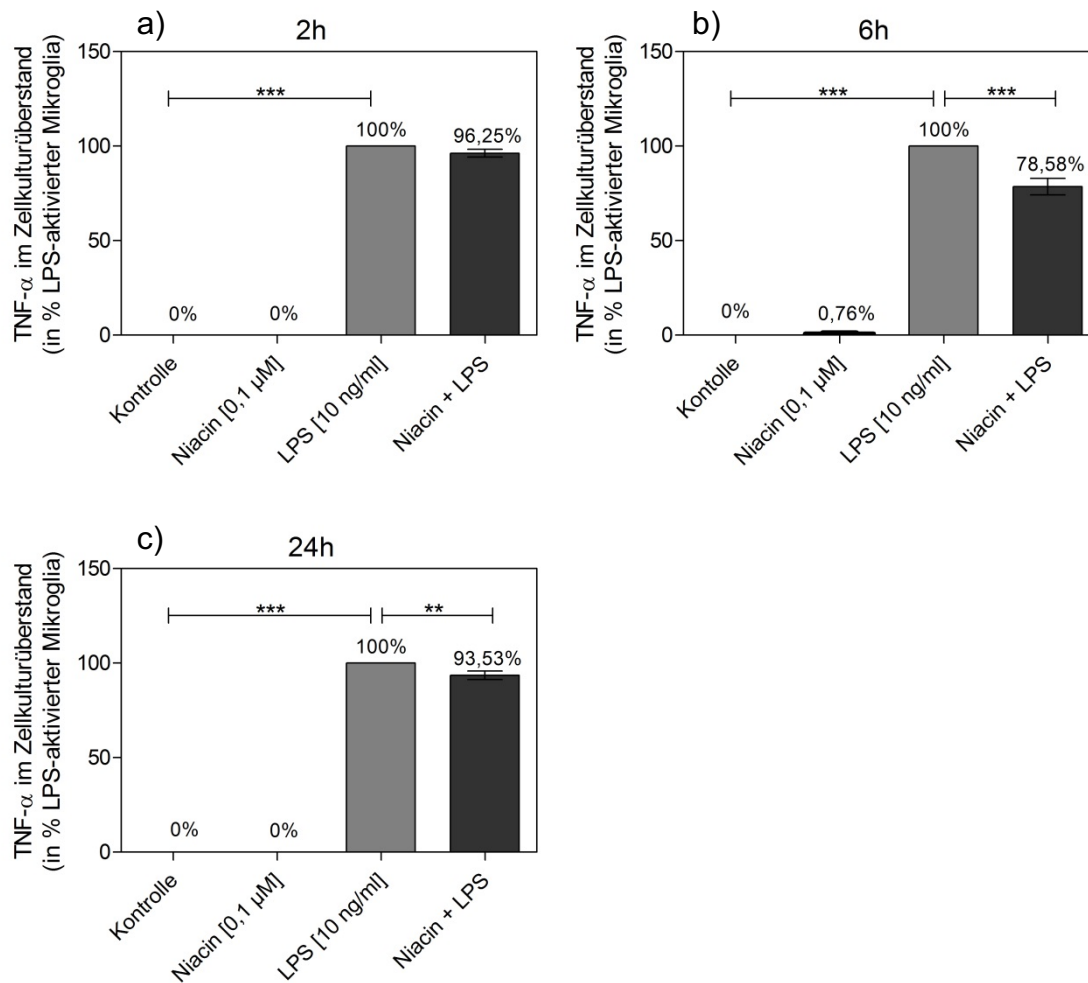


Abb. 3.10: Einfluss von Niacin auf die TNF- α Sekretion auf Proteinebene.

Nach den Stimulationszeiten von 2, 6 und 24 Stunden erfolgte der Proteinnachweis von TNF- α in den Zellkulturüberständen der Versuchsansätze mittels ELISA. Die Messwertangaben erfolgten in % LPS-aktivierter Mikroglia. (Mittelwert \pm SEM; $n \geq 3$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$)

3.6.2 Niacin regelte die IL-6 Sekretion in Mikroglia herab

In den Abb. 3.11 sind die in den Zellkulturüberständen mittels ELISA prozentual ermittelten IL-6 Mengen nach Stimulation mit und ohne Niacin in LPS-aktivierter Mikroglia jeweils nach 2, 6 und 24 Stunden dargestellt.

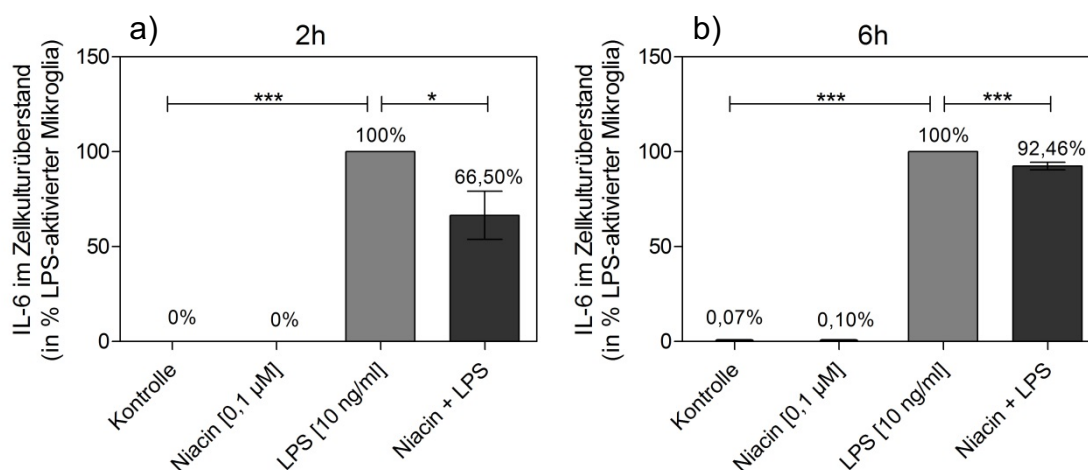
Die Werte der unstimulierten Kontrolle betragen nach 2 Stunden Stimulation 0% und die der Einzelstimulation mit 0,1 μ M Niacin ebenfalls 0%. Bereits nach den 2 Stunden Inkubation wurde die IL-6 Sekretion der simultan mit 0,1 μ M Niacin und 10 ng/ml LPS stimulierten Mikroglia auf 66,50%, im Vergleich zu 100% der mit LPS stimulierten Mikroglia, reduziert. Somit hatte Niacin alleine, im Vergleich zur unbehandelten Mikroglia, keinen Einfluss auf die IL-6 Sekretion von Mikroglia. Auf die Regulation der

IL-6 Sekretion in LPS-aktivierter Mikroglia konnte Niacin jedoch bereits nach 2-stündiger Inkubation signifikanten Einfluss nehmen, indem es dessen Sekretion deutlich verringerte.

Nach 6-stündiger Inkubation zeigte die unstimulierte Kontrolle prozentuale Werte von 0,07% und die Einzelstimulation mit 0,1 μ M Niacin Werte von 0,10%. Die Sekretion der IL-6 Menge der simultan mit 0,1 μ M Niacin und 10 ng/ml LPS stimulierten Mikroglia wurde auf 92,46%, im Vergleich zu 100% der mit 10 ng/ml LPS-aktivierten Mikroglia, reduziert.

Damit wurde kein Einfluss von Niacin allein im Vergleich zu unbehandelten Mikroglia nachgewiesen, jedoch eine geringe Reduktion der IL-6 Sekretion nach 6 Stunden in LPS-aktivierter Mikroglia.

Die Werte der unstimulierten Kontrolle betragen nach 24-stündiger Stimulation 0% und die der Einzelstimulation mit 0,1 μ M Niacin ebenfalls 0%. Die Sekretion der IL-6 Menge in der simultan mit 0,1 μ M Niacin und 10 ng/ml LPS stimulierten Mikroglia sank auf 84,21%, im Vergleich zu 100% der mit 10 ng/ml LPS-aktivierten Mikroglia. Folglich zeigte sich auch hier kein alleiniger Einfluss von Niacin auf Mikroglia verglichen mit den unbehandelten Kontrollzellen. Die IL-6 Sekretion in LPS-aktivierter Mikroglia wurde jedoch nach 24 Stunden durch 0,1 μ M Niacin erneut reduziert, verglichen mit den Werten nach 6-stündiger Inkubation (92,46%).



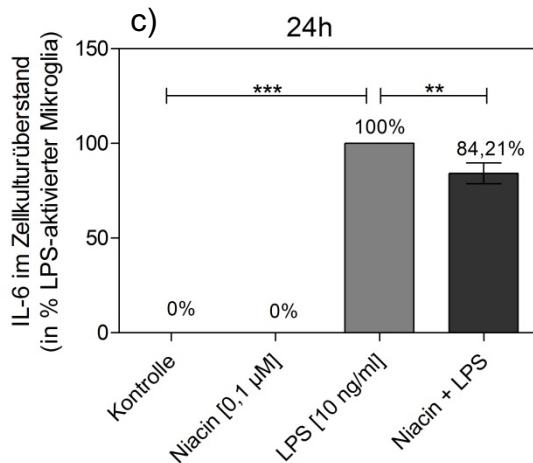


Abb. 3.11: Einfluss von Niacin auf die IL-6 Sekretion auf Proteinebene.

Nach den Stimulationszeiten von 2, 6 und 24 Stunden erfolgte der Proteinnachweis von IL-6 in den Zellkulturüberständen der Versuchsansätze mittels ELISA. Die Messwertangaben erfolgten in % LPS-aktivierter Mikroglia. (Mittelwert \pm SEM; $n \geq 3$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$)

3.6.3 Niacin unterdrückte die Aktivierung intrazellulärer Signalwege (ERK_{1/2}-Kaskade)

Die extrazellulär regulierte Kinase 1 und 2 (ERK_{1/2}) gehören zur Familie der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP-Kinasen). Der konventionelle Aktivierungsweg läuft über drei Phosphorylierungen ab. Die MAPK-Signalwege können durch eine Vielzahl von extrazellulären und intrazellulären Reizen aktiviert werden, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokine und LPS. Nach Aktivierung durch die Phosphorylierungen kann pERK_{1/2} unter anderem Zellproliferation, Zelldifferenzierung oder Zellmigration bewirken. ERK_{1/2} katalysiert die Phosphorylierung von vielen zytoplasmatischen und nukleären Substanzen, wie auch Transkriptionsfaktoren und kann somit auch zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokinen führen (Kim und Choi 2010).

In dieser Arbeit wurde eine mögliche Beeinflussung des MAPK-Signalweges mittels Western Blot Analysen nach 15, 30 und 60 Minuten untersucht und densitometrisch ausgewertet.

In Abb. 3.12 ist der Einfluss von Niacin auf den MAPK-Signalweg nach 15 Minuten dargestellt. Nach der 15-minütigen Inkubation, lagen die Mengen an pERK_{1/2} in der unstimulierten Kontrolle bei 14,52% und die der Einzelstimulation mit Niacin bei 11,93%. In der Kostimulation mit 0,1 µM Niacin und 10 ng/ml LPS zeigte sich nach 15

Minuten ein Rückgang der pERK_{1/2} Menge auf 60,91%, im Vergleich zu den 100% der mit LPS-aktivierten Mikroglia (b).

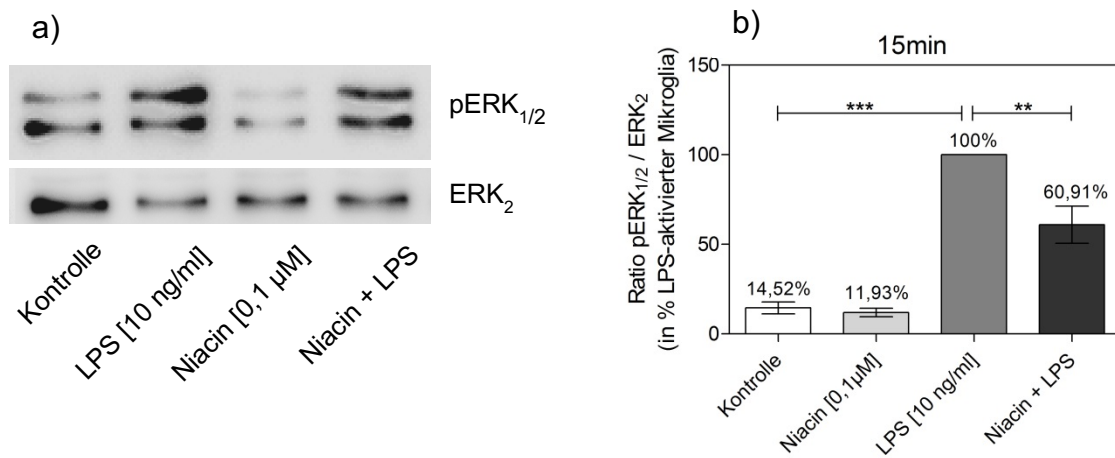


Abb. 3.12: Einfluss von Niacin nach 15 Minuten auf den MAPK-Signalweg in Mikroglia.

a): Darstellung eines repräsentativen Blots von $n \geq 3$ Versuchen. Die Ergebnisse aller Versuche wurden densitometrisch ausgewertet und als Ratio von PERK_{1/2} / ERK2 mit LPS-aktivierter Mikroglia =100% dargestellt (**b**) (Mittelwert \pm SEM; $n \geq 3$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

In der Abb. 3.13 ist der Einfluss von Niacin auf den MAPK-Signalweg nach 30 Minuten dargestellt. Die Mengen an pERK_{1/2} in der unstimulierten Kontrolle betragen 12,28% und die der Einzelstimulation mit Niacin 9,08%. In der Kostimulation mit 0,1 µM Niacin und 10 ng/ml LPS zeigte sich nach 30 Minuten ein Rückgang der pERK_{1/2} Menge auf 78,85%, im Vergleich zu den 100% der mit LPS-aktivierten Mikroglia. Verglichen mit den Werten der 15-minütigen Stimulation, bei der die pERK_{1/2} Menge der Simultanstimulation 60,91% betrug, zeigte sich ein leichter Anstieg der pERK_{1/2} Menge in der simultanen Stimulation nach 30 Minuten auf 78,85%.

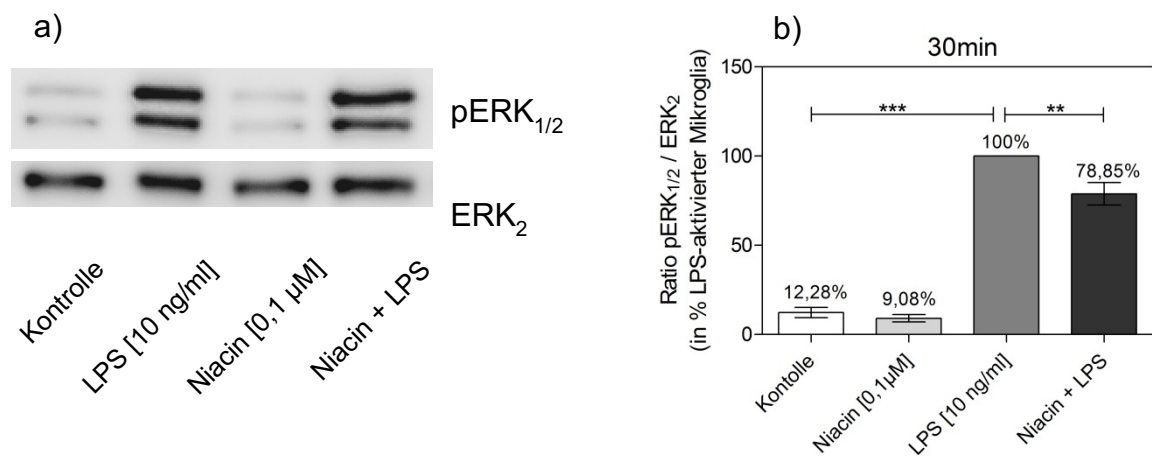


Abb. 3.13: Einfluss von Niacin nach 30 Minuten auf den MAPK-Signalweg in Mikroglia.

a): Darstellung eines repräsentativen Blots von $n \geq 3$ Versuchen. Die Ergebnisse aller Versuche wurden densitometrisch ausgewertet und als Ratio von PERK1/2 / ERK2 mit LPS-aktivierter Mikroglia = 100% dargestellt **(b)** (Mittelwert \pm SEM; $n \geq 3$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

In Abb. 3.14 ist der Einfluss von Niacin auf den MAPK-Signalweg nach 60 Minuten dargestellt. Die Mengen an pERK_{1/2} in der unstimulierten Kontrolle betragen 17,01% und die der Einzelstimulation mit Niacin 12,70%. In der Kostimulation mit 0,1 µM Niacin und 10 ng/ml LPS zeigte sich nach 60 Minuten ein Rückgang der pERK_{1/2} Menge auf 81,05%, im Vergleich zu den 100% der mit LPS-aktivierten Mikroglia.

Betrachtet man alle Ergebnisse der Kostimulationen der drei unterschiedlichen Zeiten zusammen, fällt auf, dass die pERK_{1/2} Menge nach 15 Minuten Inkubationszeit am geringsten ausfällt.

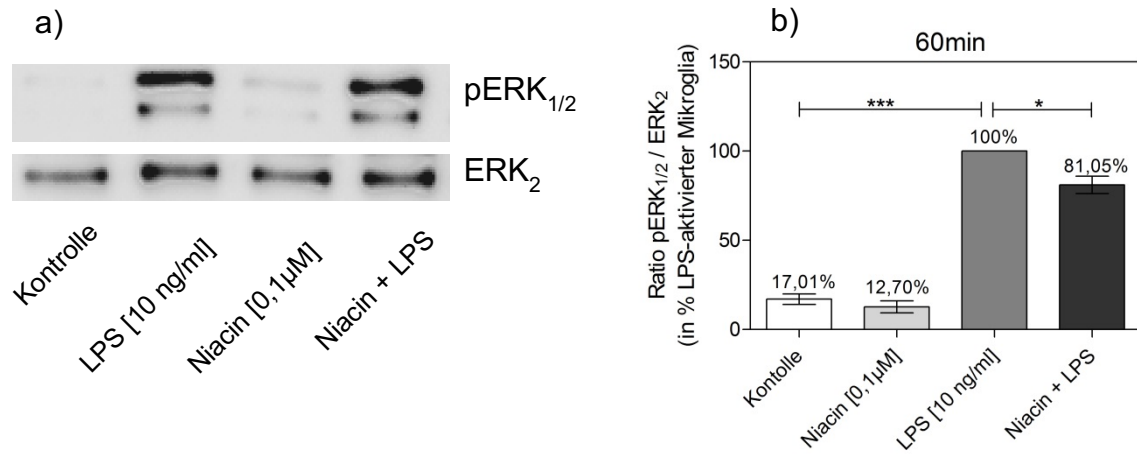


Abb. 3.14: Einfluss von Niacin nach 60 Minuten auf den MAPK-Signalweg in Mikroglia.

a): Darstellung eines repräsentativen Blots von $n \geq 3$ Versuchen. Die Ergebnisse aller Versuche wurden densitometrisch ausgewertet und als Ratio von PERK1/2 / ERK2 mit LPS-aktivierter Mikroglia =100% dargestellt (b) (Mittelwert \pm SEM; $n \geq 3$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3.6.4 Niacin verringerte die nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B (p65)

RelA (p65), ein Mitglied der Nuclear factor- κ B (NF- κ B) Familie, gehört zu einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die nach ihrer Aktivierung zum Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose führen. NF- κ B ist außerdem an der Expression zahlreicher Zytokine beteiligt, die an der Regulierung der Immunantwort beteiligt sind und eine Rolle bei entzündlichen Prozessen spielen. NF- κ B liegt bei unstimulierten Zellen inaktiv, gebunden an I κ Bs (inhibitors of NF- κ B), im Zytosol vor und transloziert erst nach Aktivierung in den Zellkern. Diese Bindung wird auf einen Reiz hin durch eine Phosphorylierung gelöst und der Transkriptionsfaktor kann in den Zellkern gelangen. Dort löst er die Transkription seiner Zielgene aus (Liang u. a. 2004).

In dieser Arbeit wurde mittels Immunfluoreszenz der Einfluss von Niacin auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktor NF- κ B (p65) untersucht. Dafür wurden die p65-Untereinheit von NF- κ B mit einem spezifischen Antikörper detektiert und anschließend mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff markiert. Zur Darstellung der Zellkerne wurden die Mikroglia zusätzlich mit dem blau fluoreszierenden Farbstoff Bisbenzimid behandelt. Die Ergebnisse wurden mikroskopisch ausgewertet und im Anschluss fotografiert.

Der Abbildung 3.15 ist zu entnehmen, dass bei der unstimulierten Mikrogliazellkultur, die als Kontrolle diente und den einzeln mit 0,1 μ M Niacin stimulierten Mikroglia nach 6-stündiger Stimulation NF- κ B ausschließlich im Zytosol lokalisiert ist. Erst eine Inkubation mit 10 ng/ml LPS bewirkte eine deutlich vermehrte nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern. Diese wurde jedoch durch die Zugabe von 10 ng/ml Niacin deutlich reduziert, wie es die Abbildung 3.15.

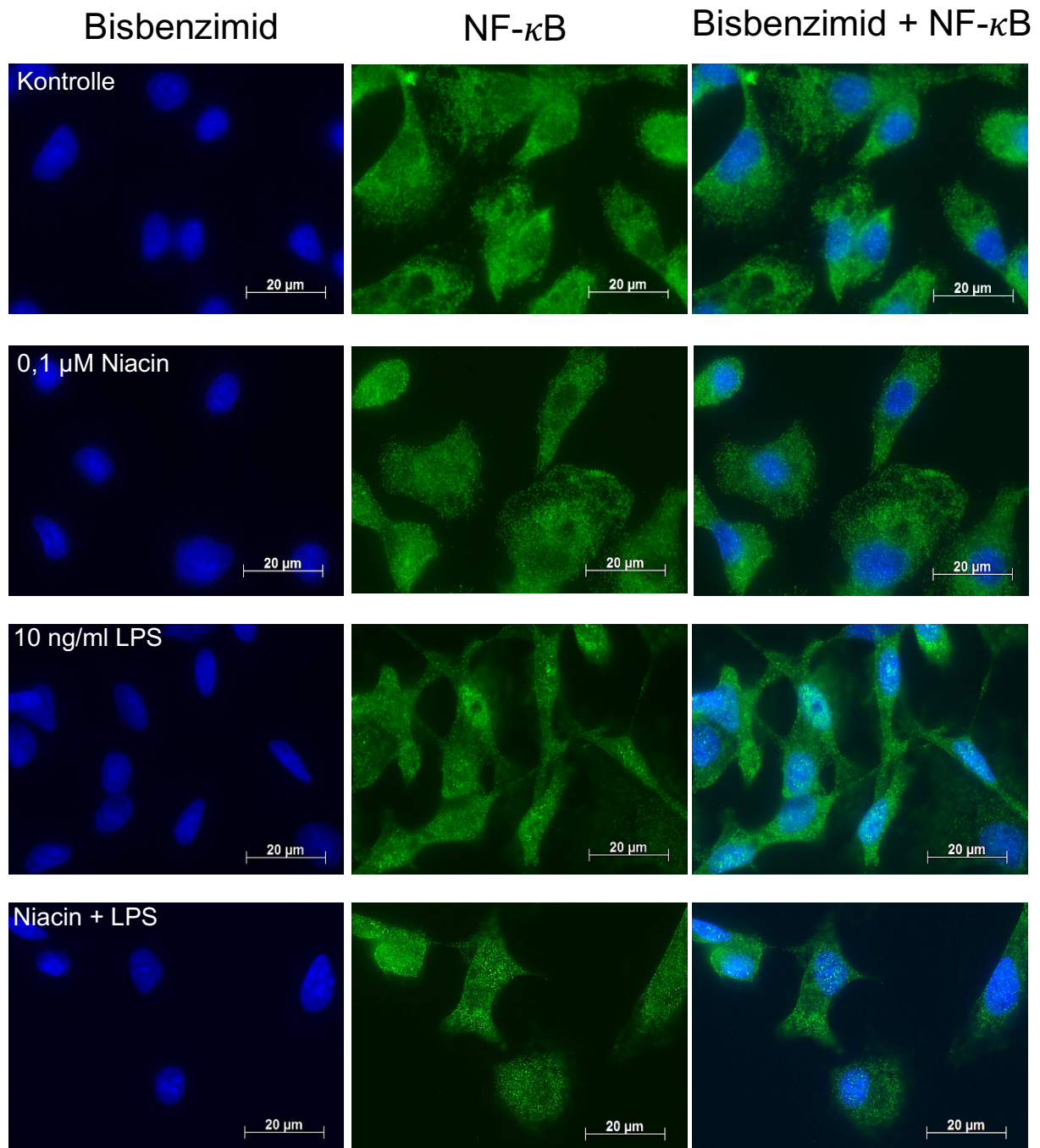


Abb. 3.15: Niacin verringerte die Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern nach 6-stündiger Stimulation.

Nach einer 6-stündigen Stimulation der Versuchsansätze (Kontrolle, Niacin [0,1 μ M], LPS [10ng/ml], Niacin + LPS) wurde der Transkriptionsfaktor NF- κ B in den Mikroglia mittels Immunfluoreszenz detektiert (grün) Die Zellkern wurden mit Bisbenzimid gefärbt (blau). Aus einer unabhängigen Versuchszahl von n=10 wurden verschiedene Ausschnitte der Präparate fotografiert, von denen jeweils eines hier repräsentiert wird.

4 Diskussion

Mikroglia sind die ortsständigen Makrophagen des ZNS und sie bilden dort die erste Instanz der angeborenen Immunabwehr des Körpers. Diese erfüllen vielzählige Aufgaben, die das ZNS bei Verletzungen oder Erkrankungen schützen sollen. Mikroglia „scannen“ kontinuierlich ihre Umgebung und kommunizieren mit dem sie umgebenden Gewebe. Sie tragen zur Aufrechterhaltung der lokalen Gewebshomöostase bei, indem sie u.a. Fremdkörper oder Zelldebris phagozytieren. Sie besitzen zahlreiche Rezeptoren und Komplexe auf ihrer Zelloberfläche, die sie u.a. dazu befähigen, Antigene anderen Zellen zu präsentieren (Traschütz und Heneka 2015).

Mikroglia können abhängig von dem sie umgebendem Milieu, oder durch unterschiedliche Faktoren, von denen sie stimuliert werden, verschiedene Phänotypen annehmen. Dieser Phänotypenwechsel wird auch M1/M2 Paradigma genannt und bezeichnet die unterschiedlichen Antwortmöglichkeiten der Mikroglia auf Entzündungsreize (Tang und Le 2016).

Bei neurodegenerativen Erkrankungen ist bekannt, dass eine anhaltende chronische Neuroinflammation, die u.a. durch aktivierte Mikroglia unterhalten wird, zum Fortschreiten der Erkrankung führt. Im M1 Aktivierungszustand schütten Mikroglia vermehrt proinflammatorische Zytokine aus, die neuroinflammatorische Prozesse unterstützen. Somit stellt die Dämpfung dieser proinflammatorischen Wirkung einen interessanten Ansatzpunkt in der Behandlung neurodegenerativer Veränderungen dar (Brown und Vilalta 2015).

In dieser Dissertation wurde solch eine mögliche dämpfende Wirkung des Vitamins Niacin auf die Ausschüttung entzündungsfördernder Mediatoren untersucht. Die Ergebnisse der Versuche werden im folgenden Abschnitt in Hinblick auf die aktuelle Literatur betrachtet und erörtert.

4.1 Niacin wirkt positiv auf das Zellüberleben von primärer Mikroglia

Zu Beginn der Versuchsreihe wurde eine mögliche zytotoxische Wirkung von Niacin auf primäre Mikroglia getestet. Mittels MTT-Test konnte *in vitro* keine toxische Wirkung

von Niacin in der Konzentration von 0,1 μ M festgestellt werden. Weder in der Einzelstimulation mit Niacin, noch in der Kostimulation der primären Mikroglia mit 10 ng/ml LPS und 0,1 μ M Niacin. Bei der Einzelstimulation mit LPS und bei der Kostimulation ergaben sich sogar Werte über 100 %, was für eine gesteigerte Syntheseleistung der Mikroglia spricht. Diese Steigerung der Syntheseleistung kann durch eine leichte Zellproliferation zustande gekommen sein. Je mehr Zellen metabolisch aktiv sind, desto mehr MTT wird zu Formazan reduziert.

Bei Niacin handelt es sich um das wasserlösliche Vitamin B3, das auch physiologischerweise im Körper eine Rolle spielt. Niacin stellt u.a. eine Quelle für die NAD⁺ Synthese dar und ist somit wichtig bei vielen Reaktionsschritten im Stoffwechsel (Meyer-Ficca und Kirkland 2016).

Die empfohlene durchschnittliche Zufuhr, die für katabolische und anabolische Prozesse nötig ist, liegt für Erwachsene pro 1000 kcal aufgenommener Nahrung zwischen 5,5 bis 6,6 mg. Die pharmakologischen Dosen von Niacin liegen bei 1500-3000 mg pro Tag. In diesen Mengen kann es für die Behandlung von chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie z.B. Atherosklerose, eingesetzt werden. Ebenfalls ergeben sich unter der Niacin Therapie positive Einflüsse auf den weiteren Verlauf nach einem Myokardinfarkt (Montserrat-de la Paz u. a. 2017).

Darüber hinaus ist es seit mehr als 50 Jahren als Cholesterin senkendes Medikament auf dem Markt. In Kombination mit Statinen steigert es die HDL-Werte und senkt die Triglyzeride im Blut (Dunbar und Gelfand 2010).

Niacin hat aber auch eine andere Seite. Niacin ist als Vitaminpräparat frei verkäuflich und kann in hohen Dosen lebensbedrohliche Auswirkungen auf den menschlichen Organismus haben. Daul und Beuhler 2011 berichteten von einem jungen Mann, der in die Notaufnahme eingeliefert wurde, nachdem er über 2 Tagen verteilt insgesamt 22,5 g Niacin zu sich genommen hatte. Er stellte sich mit einer veränderten geistigen Leistung, generalisierter Schwäche, Übelkeit und Erbrechen vor. Aus früheren Berichten ist bekannt, dass eine Niacin Überdosis zu einer Reihe von Dysfunktionen und Schäden der Leber führen kann und damit hepatotoxisch ist. Auch geringere Mengen von Niacin (3g pro Tag) können über einen längeren Zeitraum verabreicht eine Niacin-induzierte Hepatitis bewirken (Etchason u. a. 1991). Ebenso wurde eine

gestörte Blutzuckerregulation dokumentiert. Neu jedoch war die Manifestation der Überdosis in Form der Thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP). Eine lebensbedrohliche Erkrankung, bei der die entstandenen thrombozytenreichen Blutgerinnsel Kapillaren vor allem von Gehirn und Nieren verstopfen können. Ebenfalls litt der Patient an einer disseminierten intravasalen Koagulopathie (DIC). Dabei handelt es sich um eine übermäßig stark ablaufende Blutgerinnung, bei der die Gerinnungsfaktoren verbraucht werden, woraus schließlich eine erhöhte Blutungsneigung resultiert (Daul und Beuhler 2011).

In einem anderen Fall wurde von einer jungen Frau berichtet, die über 2 Wochen täglich 10 *Energy Drinks* konsumierte, die vor allem Vitamin B Präparate (30 mg Niacin pro Portion) enthielten und an einer akuten Hepatitis erkrankte (Vivekanandarajah u. a. 2011). Neben den Leberschäden kann eine zu hohe Dosis an Niacin auch eine Insulinresistenz bewirken (McCarty 2000).

Insgesamt gesehen sind die Nebenwirkung von Niacin zwar zahlreich, aber es kommt nur in bestimmten Kombinationstherapien oder falscher Dosierung zu bedrohlichen Folgen. Somit stellt Niacin immer noch ein wertvolles Medikament unter anderem zur Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen dar (Guyton und Bays 2007).

4.2 Zellmorphologische Veränderungen unter dem Einfluss von Niacin

Mittels Coomassie-Blau Färbung ließ sich die Wirkung von Niacin auf die Zellgestalt von primärer Mikroglia darstellen.

Da es sich in dieser Arbeit um *in vitro* Versuche mit primärer Mikroglia handelt, sind der morphologischen Auswertung Grenzen gesetzt. Die verwendeten primären Mikrogliazellkulturen stellen eine Mischkultur aus jungen, mittleren und alten Mikroglia dar. Da die Zellen je nach Alter unterschiedlich schnell und in unterschiedlicher Intensität auf einen Stimulus reagieren, kann sich ein uneinheitliches Bild ihres Aktivierungszustandes ergeben. Aber im Gegensatz zu einer Zelllinienkultur bilden die unterschiedlichen Altersstufen der Mikroglia eher eine dem ZNS vergleichbare Situation ab, da im Gehirn ebenfalls Mikroglia verschiedenen Alters nebeneinander vorkommen. Darüber hinaus sind die physiologischen Bedingungen im ZNS hoch komplex und können in einem *in vitro* Modell nur bedingt nachempfunden werden.

Mikroglia erkennen zudem das Zellkulturmilieu als fremd, womit die Eigenschaften der Mikroglia durch die *in vitro* Versuche nicht gänzlich nachvollziehbar sind (Kettenmann u. a. 2011).

Eine morphologische Veränderung der LPS-aktivierten Mikroglia durch 0,1 µM Niacin, lässt sich trotz der oben beschriebenen Einschränkungen des *in vitro* Modells feststellen. Je nach Aktivierungszustand liegt die Mikroglia in einer anderen Konformation vor. Es wird eine ramifizierte Form von einer aktivierten, amöboiden Form unterschieden. Die unterschiedlichen Aktivierungszustände lassen sich an den unterschiedlichen zellmorphologischen Erscheinungsbildern ablesen. In der ramifizierten Form besitzt die Mikroglia wenig Soma und viele feine zelluläre Ausläufer. Dieses Bild zeigte sich in der unstimulierten Kontrolle nach 6 und 24 Stunden. In diesem Zustand ist die Mikroglia aber keineswegs inaktiv. Sie kontrollieren kontinuierlich ihr Umfeld, wie z.B. synaptische Verbindungen und die Homöostase im ZNS. Somit sind sie jederzeit bereit auf einen Reiz hin in eine aktive Form überzugehen. In dieser aktiven, amöboiden Form wirken die Zellen voluminöser, sie besitzen nur noch wenige plumpe Zellausläufer und die Plasma-Kern-Relation ist auf die Seite des Plasmas verschoben. Diese Aktivierung wurde in der vorliegenden Arbeit durch LPS provoziert. Dadurch wurde z.B. eine Infektion mit gramnegativen Bakterien simuliert und die Mikroglia zur Reaktion angeregt. Auf diesen Reiz hin setzte die so aktivierte Mikroglia chemoaktive Faktoren frei, um z.B. Leukozyten anzulocken und somit das ZNS zu schützen (Kettenmann u. a. 2011; Perry und Teeling 2013; Rock u. a. 2004). Auch hier zeigte sich eine der Literatur entsprechende morphologische Veränderung der aktivierten Mikroglia. Wobei nach 6-stündiger Stimulation sich noch ein uneinheitliches Bild ergab. Offensichtlich waren noch nicht alle Zellen in den aktivierten Zustand übergegangen. Nach 24 Stunden zeigte sich ein einheitliches Bild. Dies kann wie oben angesprochen an dem unterschiedlichen Alter der Zellen liegen, je nachdem wie jung oder alt sie sind, können sie schneller auf den Stimulus reagieren. Die aktivierte Mikroglia muss man jedoch auch in diesem Zustand erneut unterteilen. Je nach Aktivierung kann man einen M1 oder einen M2 Phänotypen unterscheiden. Durch proinflammatorische Zytokine, sowie Zelldebris, oder bakterielle Bestandteile, wird der M1 Phänotyp angeregt. In diesem Funktionszustand übt die Mikroglia entzündungsfördernde Einflüsse aus. Es werden proinflammatorische Zytokine wie

TNF- α und IL-1 β freigesetzt, Antigene präsentiert und die Expression von iNOS wird für eine gesteigerte NO-Produktion erhöht. Dies alles soll fremde Pathogene zerstören und die T-Zellen dazu anregen, eine adaptierte Immunantwort zu vermitteln. Der M2 Phänotyp beschreibt einen entzündungsdämpfenden Funktionszustand. Durch eine Stimulation mit IL-4/ IL-10 wird die Mikroglia angeregt, antiinflammatorische Zytokine, wie IL-4, IL-10, IL-13, zu synthetisieren. Damit soll eine Entzündungsreaktion gedrosselt und die Reparatur des Gewebes gefördert werden (Orihuela u. a. 2016). Die Bilder der Kostimulation mit LPS und 0,1 M Niacin zeigten morphologisch nach 6 und 24 Stunden ein gemischtes Bild der Mikroglia, wobei nach 6 Stunden noch deutlich mehr Mikroglia im aktiviertem, amöboiden Zustand vorlagen und nach 24 Stunden die Zellen eher im ramifizierten Zustand zu sein schienen. Niacin soll über seinen HCA₂-Rezeptor auch in Mikroglia einen antiinflammatorischen Effekt bewirken (Graff u. a. 2016) und scheint dazu zu führen, dass aktivierte Mikroglia wieder in eine inaktivere, ramifizierte Form übergehen.

4.3 Niacin beeinflusst die NO-Freisetzung der Mikroglia über die Herabregulation der iNOS

Das Enzym Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) katalysiert die Synthese von NO aus der Aminosäure L-Arginin und molekularem Sauerstoff. Es wurden drei Isoformen des Enzyms identifiziert, nämlich die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) und induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS). In Endothelzellen und Neuronen werden eNOS und nNOS kontinuierlich exprimiert und durch Calcium und Calmodulin aktiviert. Das Enzym iNOS wird in Makrophagen, Astrozyten und Mikroglia erst in Reaktion auf immunstimulierende Zytokine, bakterielle Produkte wie z.B. LPS oder Infektionen exprimiert. Hauptsächlich scheint iNOS von Mikroglia exprimiert zu werden, nachdem sie durch entzündungsfördernde Faktoren aktiviert wurden (Sierra u. a. 2014). Es wurde kürzlich berichtet, dass amöboide Mikroglia auch während der normalen Gehirnentwicklung das Enzym iNOS exprimieren (Crain u. a. 2013).

NO ist ein fettlösliches Radikal, das frei durch Zellmembranen diffundiert und als zelluläres Signalmolekül fungiert. Es ist an verschiedenen biologischen Prozessen beteiligt, ohne einen spezifischen Membranrezeptor zu benötigen. Es spielt eine

entscheidende Rolle bei der Regulierung der Immunabwehr. Ebenfalls ist es an der Modulation der vaskulären Funktion und des Blutflusses beteiligt und kann als Neurotransmitter Einfluss nehmen. In Mikroglia trägt es u.a. zur Schädigung der phagozytierten Erreger bei. Es wurde gezeigt, dass NO aber auch an neurotoxischen Vorgängen beteiligt ist. Jedoch nicht NO als solches ist schädlich. Die Halbwertszeit von NO ist sehr kurz, aber es ist in der Lage in kürzester Zeit viele reaktive Spezies wie Nitrate (NO_3) und Nitrogenoxide (NO_2) zu bilden. Erst bei einer simultanen Produktion von NO und Superoxid (O_2^-) durch aktivierte Mikroglia und deren Verbindung, kommt es so zur Bildung von Peroxynitrit (ONOO^-). Peroxynitrit ist ein starkes Oxidationsmittel, das z.B. den Tod von Neuronen bewirken kann. Viele der biologischen Effekte, die auf NO zurückzuführen sind, werden tatsächlich durch Peroxynitrit und andere oxidative Metaboliten von NO vermittelt. Dadurch kann die doppelte Wirkungsweise von NO erklärt werden.

Im Organismus herrscht normalerweise ein Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien. Ein zelluläres Ungleichgewicht, das sich in Richtung Oxidantien verschiebt, führt zu oxidativem Stress. Oxidativer Stress hat eine Veränderung von Proteinen, Lipiden, DNA und Zuckern zur Folge. Wichtige Mitspieler in der Entstehung des oxidativen Stresses sind die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und die reaktiven Stickstoffspezies (RNS).

Zu den RNS gehört auch NO und sein Folgeprodukt ONOO^- . Durch die Schädigung auf Protein-, Lipid- und DNA-Ebene kommt es zu einer gestörten Proteolyse. Das kann zur Proteinaggregation und Neurodegeneration führen (Dasuri u. a. 2013).

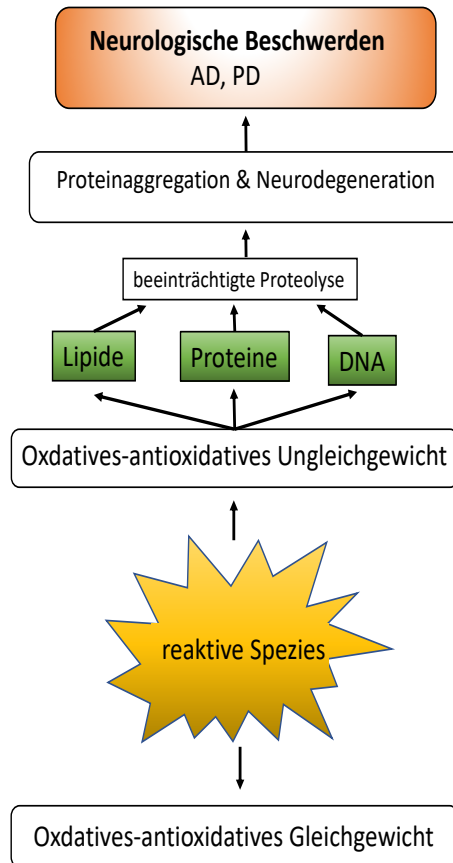


Abb. 4.1: Quellen von ROS/ RNS und ihre zellulären Wirkungen.

Ist das Gleichgewicht hin zu den Oxidantien verschoben, führt das zu oxidativen Stress. Das kann zu einer Veränderung von Lipiden, Proteinen und in der DNA führen. Dadurch kommt es zu einer gestörten Proteolyse, was Proteinaggregation und Neurodegeneration zur Folge hat. Die Folgen davon kann sich in neurologischen Beschwerden äußern (modifiziert nach Dasuri u. a. 2013).

Niacin kann auch hier einen positiven Einfluss auf das Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien ausüben. Niacin hat u.a. antioxidative Eigenschaften. Es erhöht die zelluläre Verfügbarkeit von NADPH, was die Fähigkeit der Glutathion-Reduktase erhöht, Glutathion im reduzierten Zustand zu halten, wodurch die Fähigkeit der Zellen, Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu entgiften, verbessert wird (Depeint u. a. 2006).

NO ist an der Ausprägung verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen wie z.B. Morbus Parkinson beteiligt. Die schädliche Wirkung von NO wird wieder durch die Reaktion mit Superoxid zu Peroxynitrit erzeugt. Peroxynitrit kann die Nitrierung der Tyrosinhydroxylase, welche das geschwindigkeitsbegrenzende Enzym der Dopamin-Biosynthese darstellt, induzieren. Das führt zu einer Hemmung der Enzymaktivität der Tyrosinhydroxylase und somit zur Störung der Dopaminsynthese (Pacher u. a. 2007).

Das bakterielle Endotoxin LPS wird schon lange in *in vitro* Untersuchungen verwendet, um eine Aktivierung der Mikroglia zu bewirken. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden primäre Mikroglia durch LPS-Stimulation aktiviert. Ein Ausdruck ihrer Aktivierung ist unter anderem die vermehrte Freisetzung von NO. Da die NO-Freisetzung somit einen Hinweis auf die Aktivität der Mikroglia gibt, wurden mittels Griess-Reagenz in den Zellkulturüberständen der Stimulationsansätze so die Einflüsse von Niacin auf Mikroglia getestet.

Die Ergebnisse zeigten keine gesteigerte NO-Freisetzung der Mikroglia nach einer Einzelstimulation mit Niacin. Daraus lässt sich schließen, dass Niacin alleine keine Aktivierung der Mikroglia bewirkt. In der Kostimulation von LPS und Niacin, zeigte sich nach 24 Stunden ein Rückgang der NO-Freisetzung. Um herauszufinden, ob die reduzierte NO-Freisetzung durch Niacin über die iNOS reguliert wird, wurden qPCRs durchgeführt.

Wie im oberen Abschnitt erwähnt, wird NO durch das Enzym iNOS in Mikroglia gebildet. Eine gesteigerte iNOS Expression äußert sich folglich in einer gesteigerten NO-Freisetzung und umgekehrt. Breits nach 6 Stunden war die iNOS mRNA-Menge in LPS-aktivierter Mikroglia in der Kostimulation mit Niacin und LPS im Vergleich zu den 100 % der Einzelstimulation mit LPS deutlich reduziert. Folglich wirkt Niacin senkend auf die mRNA-Synthese der iNOS in aktivierter Mikroglia.

LPS bindet in Makrophagen und Monozyten an den membranständigen Rezeptor CD14 und bewirkt die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der dadurch aktiviert wird und in den Zellkern wandert. Dort induziert er die Expression von iNOS und führt damit zur gesteigerten NO-Freisetzung (Aktan 2004). Niacin kann vielleicht in diese NF- κ B-vermittelte, gesteigerte iNOS Expression dämpfend eingreifen.

4.4 Vermittlung der antiinflammatorischen Effekte von Niacin über den HCA₂-Rezeptor

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Niacin auf primäre Mikroglia, die durch LPS aktiviert wurden, einen entzündungshemmenden Einfluss hat. Sowohl auf mRNA-Ebene, als auch auf Proteinebene konnte nachgewiesen werden, dass Niacin die Zytokinausschüttung der aktivierten Mikroglia dämpft.

Unter pathologischen Bedingungen im ZNS sezernieren aktivierte Mikroglia große Mengen der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-1 β . Diese Zytokine sollen durch Stimulation neuroinflammatorischer Prozesse schädliche Agenzien inaktivieren und so deren negative Wirkung auf das ZNS hemmen. Diese Reaktion der Mikroglia kann als angeborener Immunmechanismus verstanden werden.

Bei neurodegenerativen Erkrankungen ist sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunantwort nicht in der Lage, die auslösenden Faktoren zu beseitigen. Somit besteht das neuroinflammatorische Milieu fort, was in eine chronischen Neuroinflammation übergeht (Olmos und Lladó 2014). Die Aufrechterhaltung dieses chronischen Zustands durch aktivierte Mikroglia kann die Degeneration der dopaminergen Neurone in der *Substantia nigra pars compacta* fördern, was zur Ausprägung der Parkinson-Erkrankung führt (Hirsch u. a. 2012; Tiwari und Pal 2017b). Bei der Parkinson-Erkrankung wurden aktivierte Mikroglia in der *Substantia nigra pars compacta* gefunden, die proinflammatorische Enzyme wie iNOS oder die proinflammatorische Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-1 β verstärkt exprimieren (Fu u. a. 2015).

Um die Einflüsse von Niacin auf die Zytokinsynthese aktivierter Mikroglia *in vitro* zu untersuchen, wurden qPCRs nach 2 und 6 Stunden für die Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-1 β durchgeführt. Bei allen drei untersuchten Zytokinen war nach 6 Stunden die mRNA-Menge in den Kostimulationsansätzen mit Niacin und LPS deutlich reduziert im Vergleich zu 100 % der Einzelstimulation mit LPS.

Auch auf Proteinebene konnte mittels ELISA gezeigt werden, dass die Sekretion von IL-6 und TNF- α nach 6 und 24 Stunden einen deutlichen Rückgang unter dem Einfluss von Niacin aufweist.

Nun stellt sich die Frage, über welche Mechanismen Niacin diese antiinflammatorischen Wirkungen auf aktivierte Mikroglia ausübt.

Niacin ist ein Agonist des HCA₂-Rezeptors (*hydroxycarboxylic acid receptor 2*), der auch als Niacin Rezeptor 1, oder GPR109A bezeichnet wird. Er gehört zur Familie der Hydroxycarbonsäure (HCA)-Rezeptoren, die aus den Mitgliedern HCA₁, HCA₂ und HCA₃ besteht. Die verschiedenen HCA-Rezeptoren helfen die Homöostase unter sich verändernden metabolischen und diätischen Bedingungen aufrechtzuerhalten, u.a. durch die Kontrolle von Stoffwechsel- und Immunfunktionen (Offermanns 2017).

Um nachzuweisen, dass Niacin HCAR₂-vermittelt Einfluss auf Mikroglia nimmt, wurden qPCRs nach 6 Stunden durchgeführt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass aktivierte Mikroglia den Rezeptor vermehrt exprimieren. Nach 6 Stunden reduzierte Niacin die HCAR₂ mRNA-Menge in mit LPS-aktivierter Mikroglia deutlich. Das spricht dafür, dass in Anwesenheit des Agonisten Niacin die Rezeptordichte von HCAR₂ auf Mikroglia herabreguliert wird. Dieses Ergebnis ist auf eine agonisten-induzierte Internalisierung des HCA₂-Rezeptors zurückzuführen. Die Internalisierung findet Clathrin-vermittelt statt und die Rezeptoren können im Anschluss wieder recycelt werden (Li u. a. 2010).

Der HCA₂-Rezeptor ist ein G_i-Protein gekoppelter Rezeptor und wird vor allem auf Adipozyten und Immunzellen wie Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und dermalen, dendritischen Zellen exprimiert. Er ist aber auch auf retinalen Pigmentepithelien, Kolonepithelzellen, Keratozyten, Brustgewebe und Mikroglia vorhanden.

Die am besten bekannten Einflüsse hat HCAR₂ bei Adipozyten, dort bewirkt er die Hemmung der Lipolyse. Nach Aktivierung von HCAR₂ auf Adipozyten wird die Aktivität der Adenylatzyklase gehemmt und führt zu reduziertem cAMP-Spiegel, reduzierter Aktivität der Proteinkinase A (PKA) und zu einer schnellen Reduzierung der Aktivität des lipolytischen Enzyms hormone-sensitive Lipase (HSL). Das alles bewirkt eine Verringerung der Lipolyse und eine reduzierte Freisetzung von freien Fettsäuren durch Adipozyten (Graff u. a. 2016).

Der Ketonkörper β -Hydroxybutyrat und Butyrat sind endogene Liganden des HCAR₂ und stellen für Zellen eine Nährstoffquelle unter verschiedenen physiologischen Bedingungen dar. β -Hydroxybutyrat wird in der Leber produziert und kann als alternative Brennstoffquelle für nicht-neuronale Zellen in Zeiten von Hunger oder negativer Energiebilanz dienen. Butyrat ist eine kurzkettige Fettsäure, die durch

bakterielle Fermentation von Ballaststoffen im Dickdarm produziert wird. Es stellt eine wichtige Energiequelle für die Epithelzellen des Dickdarms dar und übt zusätzlich nützliche metabolische Effekte aus, wie eine verbesserte Insulinempfindlichkeit. Diese vorteilhaften metabolischen Wirkungen und zusätzliche antiinflammatorischen Eigenschaften können auf eine Butyrat-vermittelte Aktivierung des HCAR₂ auf Kolonepithelzellen zurückzuführen sein (Graff u. a. 2016; Singh u. a. 2014).

Aber es gibt auch exogene Liganden für den HCA₂-Rezeptor. Ein schon seit über 50 Jahren bekanntes Therapeutikum und Agonist des Rezeptors ist der Lipidsenker Niacin. Leider hat es in den therapeutischen Dosen unerwünschte Nebenwirkungen, wie die oben beschriebene Flush-Symptomatik. Diese Reaktion wird durch eine HCAR₂-Aktivierung in Keratozyten und dermalen dendritischen Zellen herbeigeführt. Die Aktivierung von HCAR₂ führt zur Bildung der Prostaglandine D₂ und E₂, welche dann in der Haut eine verstärkte Vasodilatation bewirken (Benyó u. a. 2005; Graff u. a. 2016).

Weitere exogene Liganden sind Dimethylfumurat (DMF) und Monomethylfumurat (MMF). DMF kommt als orales immunmodulatorisches Medikament bei der Therapie von Multipler Sklerose (MS) zum Einsatz. Außerdem verringert DMF die Synthese proinflammatorischer Mediatoren in aktivierter Mikroglia und Astrozyten (Wilms u. a. 2010). MMF wird in der Therapie von Psoriasis eingesetzt. Parodi et al. konnten zeigen, dass MMF den Phänotypenwechsel aktivierter Mikroglia durch die Hemmung des NF- κ B-Weges über den AMP-aktivierten Proteinkinase/ Sirtuin-1 (AMPK/ Sirt1)-Weg moduliert. Diese Modulation ist also HCAR₂-vermittelt. MMF bindet an HCAR₂ und führt so zur Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in aktivierter Mikroglia (Parodi u. a. 2015). NF- κ B kontrolliert die Expression vieler proinflammatorischer Zytokine wie auch IL-6, TNF- α und IL- β . Diese Hemmung von NF- κ B führt somit zur geringeren Synthese der Zytokine IL-6, TNF- α und IL- β in aktivierter Mikroglia, was insgesamt in einer geringeren inflammatorischen Wirkung der Mikroglia resultiert. Wir konnten ebenfalls nachweisen, dass es unter Niacin Einfluss zu einer geringeren Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in LPS-aktivierter Mikroglia kommt. Die dazu durchgeführten immunzytologischen Untersuchungen mittels Immunfluoreszenzaufnahmen zeigten nach 6 Stunden eine verringerte Lokalisation

des Transkriptionsfaktors im Zellkern, was auf eine geringere Aktivität des Transkriptionsfaktors schließen lässt.

Der für MMF beschriebene Weg der NF- κ B Hemmung kann vielleicht auch von Niacin als HCAR₂-Agonist eingeschlagen werden. Das wäre ein möglicher Erklärungsansatz zur antiinflammatorischen Wirkung des Niacins. Ebenfalls benötigt das Enzym Sirtuin-1 NAD⁺ für die Deacetylierung von NF- κ B (p65) an Lysin 310, wodurch die Aktivität von NF- κ B gehemmt wird. Da Niacin ein Lieferant von NAD⁺ ist, könnte die Hemmung von NF- κ B auch durch ein vermehrtes Angebot von NAD⁺ und eine dadurch erhöhte Aktivität von Sirt1 verstärkt werden (vgl. Abb. 4.2).

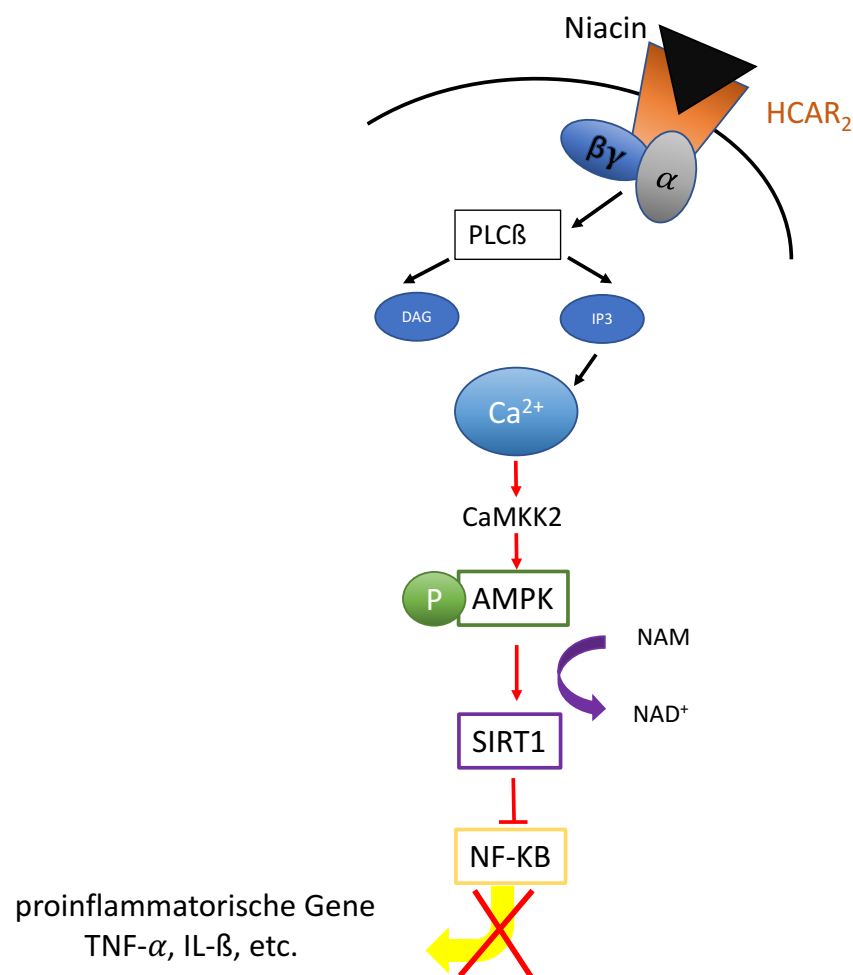


Abb. 4.2: Möglicher Signalweg für Niacin durch die Bindung des HCA2-Rezeptors.

Die Aktivierung von HCAR₂ führt zur Aktivierung der G_i-Protein-Signalkaskade. Die Loslösung der $\beta\gamma$ -Untereinheit führt zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Das bewirkt einen Anstieg von Ca^{2+} , was zu einer Aktivierung von der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) durch Phosphorylierung durch die Calcium/ Calmodulin-abhängigen Proteinkinase (CaMKK2) führt. Die Aktivierung von AMPK führt zum Anstieg von NAD⁺ was wiederum zur Aktivierung der Sirt1 führt, welche durch eine NAD⁺-abhängige

Deacetylierung von NF- κ B zu dessen Hemmung führt. Diese Hemmung mündet u.a. in einer geringeren Expression der Zytokine TNF- α , IL-1 β (modifiziert nach Parodi u. a. 2015).

Die β -Hydroxybutansäure soll ebenfalls HCAR₂-vermittelt antiinflammatorische Effekte sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* Modellen der Parkinson-Krankheit haben. Auch hier wurde gezeigt, dass diese antiinflammatorische Wirkung des HCAR₂ Liganden durch eine Modulation des Transkriptionsfaktors NF- κ B zustande kommt. β -Hydroxybutansäure führte zu einer reduzierten Synthese proinflammatorischer Zytokine in aktivierter Mikroglia durch die Inaktivierung von NF- κ B. Insgesamt kann so eine durch aktivierte Mikroglia vermittelte Neuroinflammation abgemildert und somit die dopaminergen Neurone geschützt werden. Es ließ sich nachweisen, dass diese neuroprotektive Wirkung der β -Hydroxybutansäure gegen eine LPS-induzierte Neurotoxizität über die Regulierung des HCAR₂-Signalwegs vermittelt wird (Fu u. a. 2015; Rahman u. a. 2014).

Diese Ergebnisse stimmen mit unseren Versuchen für den Liganden Niacin überein. Auch Niacin bindet an HCAR₂ und zeigte in allen von uns durchgeführten Versuchen eine dämpfende Wirkung auf die proinflammatorische Aktivität der mit LPS-aktivierten primären Mikroglia. Das macht den HCAR₂-vermittelten Signalweg zu einem interessanten Ansatzpunkt für therapeutische Interventionen, vor allem mit Blick auf eine Verlangsamung des Fortschreitens neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Parkinson.

Wakade et al. berichteten, dass in Leukozyten (gewonnen aus Vollblut) und in der *Substantia nigra* von PD Patienten die Expression von HCAR₂ hochreguliert ist. Diese Hochregulation des Rezeptors in Mikroglia (in der *Substantia nigra*) von Parkinson Patienten weist auf die Notwendigkeit einer HCAR₂-Agonisten Therapie hin. Ein erfolgversprechender Kandidat könnte Niacin sein. Der Rezeptornachweis von HCAR₂ könnte aber auch einen guten Marker zur Prognose von PD darstellen und so ein pharmazeutisches Ziel bei der Behandlung von PD sein. Die Verabreichung von Niacin könnte aber nicht nur im antiinflammatorischem Wirkungsbereich effektiv sein, Niacin erhöht auch den NAD⁺-Spiegel, was wichtig für mitochondriale Funktionen und auch für die Dopaminsynthese ist (Wakade u. a. 2014).

4.5 Einfluss von Niacin auf weitere intrazelluläre Signalwege

Nicht nur die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch einen HCAR₂-vermittelten Weg kann von Niacin moduliert werden. Auch auf die Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 hat Niacin Einfluss. In den durchgeführten Western Blot Untersuchungen zeigte sich nach 15, 30 und 60 Minuten, dass Niacin in aktivierter Mikroglia die Aktivierung von ERK1/2 unterdrückt.

Die Regulierung dieses Signalwegs könnte ebenfalls einen interessanten Therapieansatz bei der Behandlung neurodegenerativer Veränderungen darstellen. Denn je nach Grad der Aktivierung kann ERK1/2 Zellproliferation oder aber auch Apoptose bewirken. Eine ERK1/2-induzierte neuronale Degeneration ist in verschiedenen Modellen zur Neurodegeneration festgestellt worden. Es wurden auch granuläre zytoplasmatische Aggregate von aktiviertem ERK1/2 in der *Substantia nigra* von PD-Patienten gefunden (Roskoski 2012; Subramaniam und Unsicker 2010). Eine gedämpfte oder reduzierte Aktivierung von ERK1/2 durch Niacin in aktivierter Mikroglia könnte so das Fortschreiten der neuronalen Degeneration verhindern.

5 Zusammenfassung

Durch eine gute und flächendeckende medizinische Aufklärung und Versorgung der Bevölkerung in den westlichen Industrieländern steigt die allgemeine Lebenserwartung immer weiter an. Mit zunehmendem Alter jedoch nimmt auch die Anzahl der altersbedingten Erkrankungen zu. Dazu gehören auch die neurodegenerativen Erkrankungen. Im normalen Prozess des Alterns kommt es zu Umbauvorgängen im ZNS. Aber auch Umwelteinflüsse spielen eine Rolle bei den Alterungsprozessen im Gehirn. So kommt es zur Degeneration von Neuronen und zu Ablagerungen im Gehirn, die nicht mehr ausreichend durch die immunologischen Abwehrmechanismen abgebaut werden können. Durch solche Reize steigt die Aktivierung der Immunantwort im ZNS und kann über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten werden. Eine so bedingte chronische Neuroinflammation kann die Ausprägung oder das Fortschreiten von neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer fördern. Eine zentrale Rolle bei der Immunantwort des ZNS nehmen Mikroglia ein. Sie sind die ortsständigen Makrophagen des ZNS und stellen die erste Instanz der angeborenen Immunantwort im ZNS dar. Auf einen stimulierenden Reiz hin setzen die so aktivierten Mikroglia u.a. verschiedene proinflammatorische Mediatoren frei, um so das ZNS vor den eingedrungenen Mikroorganismen oder nach Verletzungen zu schützen. Die übermäßige Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine (z.B. IL-6, IL-1 β , TNF- α) wird aber auch für das Entstehen und Fortschreiten der neurodegenerativen Erkrankungen mitverantwortlich gemacht. Um einen möglichen antiinflammatorischen Einfluss des Vitamins Niacin auf primäre mit LPS-aktivierte Mikroglia der Ratte zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit qPCRs des Enzyms iNOS und der Zytokine IL-6, IL-1 β , TNF- α durchgeführt. Ebenfalls wurden ELISAs für IL-6 und TNF- α aus den Zellkulturüberständen angefertigt. So konnten wir zeigen, dass Niacin die mRNA-Synthese der iNOS in LPS-aktivierter Mikroglia herab reguliert, was zu einer geringeren Freisetzung von NO führt. Ebenfalls bewirkt Niacin eine Senkung der mRNA- und Proteinsynthese proinflammatorischer Zytokine in aktivierter Mikroglia. Weiterhin konnte mittels Western Blot Untersuchungen nachgewiesen werden, dass Niacin die Phosphorylierung der intrazellulären MAP-Kinasen senkt. Durch die Anfertigung von Immunfluoreszenzaufnahmen konnte gezeigt werden, dass Niacin die

Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B moduliert. Es führt zu einer geringeren Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern, wodurch es zu einer geminderten Expression seiner Zielgene wie z.B. IL-6, IL-1 β , TNF- α kommt. Demnach bietet Niacin einen interessanten Therapieansatz für die Behandlung oder auch Prävention neuroinflammatorischer Erkrankungen.

6 Summary

Due to advanced and comprehensive medical education and care within western industrialized countries, life expectancy increases continuously. With rising age, however, the occurrence of age-related diseases also increases. This phenomenon includes neurodegenerative diseases. In the normal course of aging, the CNS is exposed to alterations. Environmental influences also play a role in the aging processes of the brain. This leads to a degeneration of neurons and deposits in the brain, which can no longer be sufficiently degraded by the immunological defense mechanisms. Such stimuli increase the activation of the immune response in the CNS and can be sustained over longer time periods. Such conditioned chronic neuroinflammation may intensify the characteristic or progression of neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease or Alzheimer's disease. Microglia play a pivotal role in the immune response of the CNS. They are the local macrophages of the CNS and represent the first instance of the innate immune response. In response to a stimulus, the activated microglia release various proinflammatory mediators to protect the CNS from intrusive microorganisms or injuries. The excessive release of proinflammatory cytokines (e.g., IL-6, IL-1 β , TNF- α) is also found to be associated with the emergence and progression of neurodegenerative diseases. To investigate a possible antiinflammatory effect of the vitamin niacin on primary LPS-activated microglia of the rat, qPCRs of the enzyme iNOS and the cytokines IL-6, IL-1 β , TNF- α were performed in this work. ELISAs for IL-6 and TNF- α were also prepared from the cell culture supernatants. Thus, we were able to show that niacin down-regulates the mRNA synthesis of iNOS in LPS-activated microglia, resulting in a lower release of NO. Niacin also reduces mRNA and protein

synthesis of proinflammatory cytokines in activated microglia. Furthermore, Western Blot studies have shown that niacin lowers the phosphorylation of intracellular MAP-kinases. Immunofluorescence investigations showed that niacin modulates the activity of the transcription factor NF- κ B. It leads to a lower translocation of the transcription factor into the cell nucleus, where it can be used to express its target genes, e.g. IL-6, IL-1 β , TNF- α . Accordingly, niacin offers an interesting therapeutic approach for the treatment or prevention of neuroinflammatory diseases.

7 Literaturverzeichnis

Aktan, Fugen (2004): „iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation“. In: *Life Sciences*. 75 (6), S. 639–653, doi: 10.1016/j.lfs.2003.10.042.

Beckman, Kenneth B.; Ames, Bruce N. (1998): „The Free Radical Theory of Aging Matures“. In: *Physiological Reviews*. 78 (2), S. 547–581.

Benyó, Zoltán; Gille, Andreas; Kero, Jukka; u. a. (2005): „GPR109A (PUMA-G/HM74A) mediates nicotinic acid-induced flushing“. In: *Journal of Clinical Investigation*. 115 (12), S. 3634–3640, doi: 10.1172/JCI23626.

Bilimoria, Parizad M.; Stevens, Beth (2015): „Microglia function during brain development: New insights from animal models“. In: *Brain Research*. (WHAT DOES IMMUNOLOGY HAVE TO DO WITH BRAIN DEVELOPMENT AND NEUROPSYCHIATRIC DISORDERS), 1617 (Supplement C), S. 7–17, doi: 10.1016/j.brainres.2014.11.032.

Brown, Guy C.; Vilalta, Anna (2015): „How microglia kill neurons“. In: *Brain Research*. 1628 , S. 288–297, doi: 10.1016/j.brainres.2015.08.031.

Cantó, Carles; Menzies, Keir J.; Auwerx, Johan (2015): „NAD⁺ Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus“. In: *Cell Metabolism*. 22 (1), S. 31–53, doi: 10.1016/j.cmet.2015.05.023.

Colonna, Marco; Butovsky, Oleg (2017): „Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration“. In: *Annual Review of Immunology*. 35 (1), S. 441–468, doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052358.

Crain, Jessica M.; Nikodemova, Maria; Watters, Jyoti J. (2013): „Microglia express distinct M1 and M2 phenotypic markers in the postnatal and adult CNS in male and female mice“. In: *Journal of neuroscience research*. 91 (9), S. 1143–1151, doi: 10.1002/jnr.23242.

Dasuri, Kalavathi; Zhang, Le; Keller, Jeffrey N. (2013): „Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis“. In: *Free Radical Biology and Medicine*. (Neurodegeneration), 62 (Supplement C), S. 170–185, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.016.

Daul, Anne M.; Beuhler, Michael C. (2011): „Niacin Toxicity Resulting from Urine Drug Test Evasion“. In: *The Journal of Emergency Medicine*. 41 (3), S. e65–e68, doi: 10.1016/j.jemermed.2009.11.029.

Depeint, Flore; Bruce, W. Robert; Shangari, Nandita; u. a. (2006): „Mitochondrial function and toxicity: Role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism“. In: *Chemico-Biological Interactions*. (Mitochondrial Toxicity), 163 (1), S. 94–112, doi: 10.1016/j.cbi.2006.04.014.

Dunbar, Richard L.; Gelfand, Joel M. (2010): „Seeing red: flushing out instigators of niacin-associated skin toxicity“. In: *Journal of Clinical Investigation*. 120 (8), S. 2651–2655, doi: 10.1172/JCI44098.

Elvehjem, C. A. (1940): „The Biological Significance of Nicotinic Acid“. In: *Bulletin of the New York Academy of Medicine*. 16 (3), S. 173–189.

Etchason, JEFF A.; Miller, TODD D.; Squires, RAY W.; u. a. (1991): „Niacin-Induced Hepatitis: A Potential Side Effect With Low-Dose Time-Release Niacin“. In: *Mayo Clinic Proceedings*. 66 (1), S. 23–28, doi: 10.1016/S0025-6196(12)61171-9.

Fahn, Stanley (2003): „Description of Parkinson’s Disease as a Clinical Syndrome“. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 991 (1), S. 1–14, doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07458.x.

Fu, Shou-Peng; Wang, Jian-Fa; Xue, Wen-Jing; u. a. (2015): „Anti-inflammatory effects of BHBA in both in vivo and in vitro Parkinson’s disease models are mediated by GPR109A-dependent mechanisms“. In: *Journal of Neuroinflammation*. 12 , S. 1–14, doi: 10.1186/s12974-014-0230-3.

Gell, Lena; Wäger, Michael (2016): „Niacin - ein unterschätztes Vitamin im Fokus“. In: *Erfahrungsheilkunde*. 65 (04), S. 192–196, doi: 10.1055/s-0042-109041.

Gerlach, Manfred; Reichmann, Heinz; Riederer, Peter; u. a. (2007): *Die Parkinson-Krankheit: Grundlagen, Klinik, Therapie*. 4., überarb. und erw. Aufl. Wien: Springer.

Ghasemi, Mehdi; Fatemi, Ali (2014): „Pathologic role of glial nitric oxide in adult and pediatric neuroinflammatory diseases“. In: *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 45 , S. 168–182, doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.06.002.

Graff, Emily C.; Fang, Han; Wanders, Desiree; u. a. (2016): „Anti-inflammatory effects of the hydroxycarboxylic acid receptor 2“. In: *Metabolism*. 65 (2), S. 102–113, doi: 10.1016/j.metabol.2015.10.001.

Grune, Tilman; Stein, Katrin (2013): „Neurodegeneration und Alterungsprozesse“. In: Haller, Dirk; Rimbach, Gerald; Grune, Tilman (Hrsg.) *Biofunktionalität der Lebensmittelinhaltsstoffe*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg S. 145–159, doi: 10.1007/978-3-642-29374-0_10.

Guyton, John R.; Bays, Harold E. (2007): „Safety Considerations with Niacin Therapy“. In: *The American Journal of Cardiology*. (Report of the National Lipid Association's Safety Task Force: The Nonstatins), 99 (6, Supplement 1), S. S22–S31, doi: 10.1016/j.amjcard.2006.11.018.

Harry, G. Jean (2013): „Microglia During Development and Aging“. In: *Pharmacology & therapeutics*. 139 (3), S. 313–326, doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.04.013.

Hegyí, Juraj; Schwartz, Robert A.; Hegyí, Vladimír (2004): „Pellagra: Dermatitis, dementia, and diarrhea“. In: *International Journal of Dermatology*. 43 (1), S. 1–5, doi: 10.1111/j.1365-4632.2004.01959.x.

Heid, C. A.; Stevens, J.; Livak, K. J.; u. a. (1996): „Real time quantitative PCR.“. In: *Genome Research*. 6 (10), S. 986–994, doi: 10.1101/gr.6.10.986.

Hirsch, Etienne C.; Vyas, Sheela; Hunot, Stéphane (2012): „Neuroinflammation in Parkinson’s disease“. In: *Parkinsonism & Related Disorders*. (Proceedings of WFN XIX World Congress on Parkinson’s Disease and Related Disorders), 18 (Supplement 1), S. S210–S212, doi: 10.1016/S1353-8020(11)70065-7.

Jacobson, Elaine L.; Kim, H.; Kim, M.; u. a. (2012): „Niacin: Vitamin and Antidyslipidemic Drug“. In: *Water Soluble Vitamins*. Springer, Dordrecht (Subcellular Biochemistry), S. 37–47, doi: 10.1007/978-94-007-2199-9_3.

Jahn, Thomas; Werheid, Katja (2015): *Demenzen*. Hogrefe Verlag.

Kalia, Lorraine V; Lang, Anthony E (2015): „Parkinson’s disease“. In: *The Lancet*. 386 (9996), S. 896–912, doi: 10.1016/S0140-6736(14)61393-3.

Kettenmann, Helmut; Hanisch, Uwe-Karsten; Noda, Mami; u. a. (2011): „Physiology of Microglia“. In: *Physiological Reviews*. 91 (2), S. 461–553, doi: 10.1152/physrev.00011.2010.

Kim, Eun Kyung; Choi, Eui-Ju (2010): „Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 1802 (4), S. 396–405, doi: 10.1016/j.bbadis.2009.12.009.

Koellhoffer, Edward C.; McCullough, Louise D.; Ritzel, Rodney M. (2017): „Old Maids: Aging and Its Impact on Microglia Function“. In: *International Journal of Molecular Sciences*. 18 (4), S. 1–25, doi: 10.3390/ijms18040769.

Latz, Eicke; Kummer, Markus P.; Heneka, Michael T. (2014): „Innate immune activation in neurodegenerative disease“. In: *Nature Reviews Immunology*. 14 (7), S. 463–477, doi: 10.1038/nri3705.

Li, Guo; Shi, Ying; Huang, Haishan; u. a. (2010): „Internalization of the Human Nicotinic Acid Receptor GPR109A Is Regulated by Gi, GRK2, and Arrestin3“. In: *Journal of Biological Chemistry*. 285 (29), S. 22605–22618, doi: 10.1074/jbc.M109.087213.

Liang, Yan; Zhou, Yang; Shen, Pingping (2004): „NF-kappaB and its regulation on the immune system“. In: *Cellular & Molecular Immunology*. 1 (5), S. 343–350.

London, Anat; Cohen, Merav; Schwartz, Michal (2013): „Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair“. In: *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 7 , S. 1–10, doi: 10.3389/fncel.2013.00034.

McCarty, M. F. (2000): „Co-administration of equimolar doses of betaine may alleviate the hepatotoxic risk associated with niacin therapy“. In: *Medical Hypotheses*. 55 (3), S. 189–194, doi: 10.1054/mehy.1999.1011.

Meyer-Ficca, M.; Kirkland, J. B. (2016): „Niacin“. In: *Advances in Nutrition: An International Review Journal*. 7 (3), S. 556–558, doi: 10.3945/an.115.011239.

Montserrat-de la Paz, Sergio; Naranjo, M. Carmen; Lopez, Sergio; u. a. (2017): „Niacin and its metabolites as master regulators of macrophage activation“. In: *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 39 , S. 40–47, doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.09.008.

Mosmann, Tim (1983): „Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays“. In: *Journal of immunological methods*. 65 (1–2), S. 55–63.

Mosser, Coralie-Anne; Baptista, Sofia; Arnoux, Isabelle; u. a. (2017): „Microglia in CNS development: Shaping the brain for the future“. In: *Progress in Neurobiology*. 149–150 (Supplement C), S. 1–20, doi: 10.1016/j.pneurobio.2017.01.002.

Nayak, Debasis; Roth, Theodore L.; McGavern, Dorian B. (2014): „Microglia Development and function“. In: *Annual review of immunology*. 32 , S. 367–402, doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120240.

Nimmerjahn, Axel; Kirchhoff, Frank; Helmchen, Fritjof (2005): „Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo“. In: *Science*. 308 (5726), S. 1314–1318, doi: 10.1126/science.1110647.

Offermanns, Stefan (2017): „Hydroxy-Carboxylic Acid Receptor Actions in Metabolism“. In: *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 28 (3), S. 227–236, doi: 10.1016/j.tem.2016.11.007.

Offermanns, Stefan; Schwaninger, Markus (2015): „Nutritional or pharmacological activation of HCA2 ameliorates neuroinflammation“. In: *Trends in Molecular Medicine*. 21 (4), S. 245–255, doi: 10.1016/j.molmed.2015.02.002.

Olmos, Gabriel; Lladó, Jerònia (2014): „Tumor Necrosis Factor Alpha: A Link between Neuroinflammation and Excitotoxicity“. *Mediators of Inflammation*. doi: 10.1155/2014/861231.

Orihuela, Ruben; McPherson, Christopher A; Harry, Gaylia Jean (2016): „Microglial M1/M2 polarization and metabolic states: Microglia bioenergetics with acute polarization“. In: *British Journal of Pharmacology*. 173 (4), S. 649–665, doi: 10.1111/bph.13139.

Pacher, PÁL; BECKMAN, JOSEPH S.; LIAUDET, LUCAS (2007): „Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease“. In: *Physiological reviews*. 87 (1), S. 315–424, doi: 10.1152/physrev.00029.2006.

Parodi, Benedetta; Rossi, Silvia; Morando, Sara; u. a. (2015): „Fumarates modulate microglia activation through a novel HCAR2 signaling pathway and rescue synaptic dysregulation in inflamed CNS“. In: *Acta Neuropathologica*. 130 (2), S. 279–295, doi: 10.1007/s00401-015-1422-3.

Perry, V. Hugh; Teeling, Jessica (2013): „Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration“. In: *Seminars in Immunopathology*. 35 (5), S. 601–612, doi: 10.1007/s00281-013-0382-8.

Rahman, Mahbubur; Muhammad, Sajjad; Khan, Mahtab A.; u. a. (2014): „The β -hydroxybutyrate receptor HCA2 activates a neuroprotective subset of macrophages“. In: *Nature Communications*. 5 , S. 1–11, doi: 10.1038/ncomms4944.

Richter, Gerhard (2003): *Praktische Biochemie: Grundlagen und Techniken; 19 Tabellen*. Georg Thieme Verlag.

Rock, R. Bryan; Gekker, Genya; Hu, Shuxian; u. a. (2004): „Role of microglia in central nervous system infections“. In: *Clinical Microbiology Reviews*. 17 (4), S. 942–964, table of contents, doi: 10.1128/CMR.17.4.942-964.2004.

Roskoski, Robert (2012): „ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation“. In: *Pharmacological Research*. 66 (2), S. 105–143, doi: 10.1016/j.phrs.2012.04.005.

Sierra, Ana; Navascués, Julio; Cuadros, Miguel A.; u. a. (2014): „Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) in Microglia of the Developing Quail Retina“. In: *PLOS ONE*. 9 (8), S. e106048, doi: 10.1371/journal.pone.0106048.

Singh, Nagendra; Gurav, Ashish; Sivaprakasam, Sathish; u. a. (2014): „Activation of the receptor (Gpr109a) for niacin and the commensal metabolite butyrate suppresses colonic inflammation and carcinogenesis“. In: *Immunity*. 40 (1), S. 128–139, doi: 10.1016/j.immuni.2013.12.007.

Subramaniam, Srinivasa; Unsicker, Klaus (2010): „ERK and cell death: ERK1/2 in neuronal death“. In: *FEBS Journal*. 277 (1), S. 22–29, doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07367.x.

Tang, Yu; Le, Weidong (2016): „Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases“. In: *Molecular Neurobiology*. 53 (2), S. 1181–1194, doi: 10.1007/s12035-014-9070-5.

Tiwari, Prafulla Chandra; Pal, Rishi (2017): „The potential role of neuroinflammation and transcription factors in Parkinson disease“. In: *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 19 (1), S. 71–80.

Traschütz, A.; Heneka, M. (2015): „Neuroinflammation bei neurodegenerativen Erkrankungen“. In: *Aktuelle Neurologie*. 42 (07), S. 402–410, doi: 10.1055/s-0035-1552714.

Varnum, Megan M.; Ikezu, Tsuneya (2012): „The Classification of Microglial Activation Phenotypes on Neurodegeneration and Regeneration in Alzheimer’s Disease Brain“. In: *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 60 (4), S. 251–266, doi: 10.1007/s00005-012-0181-2.

Vivekanandarajah, Abhirami; Ni, Shirley; Waked, Alain (2011): „Acute hepatitis in a woman following excessive ingestion of an energy drink: a case report“. In: *Journal of Medical Case Reports*. 5 , S. 1–3, doi: 10.1186/1752-1947-5-227.

Wakade, Chandramohan; Chong, Raymond; Bradley, Eric; u. a. (2015): „Low-dose niacin supplementation modulates GPR109A, niacin index and ameliorates Parkinson’s disease symptoms without side effects“. In: *Clinical Case Reports*. 3 (7), S. 635–637, doi: 10.1002/ccr3.232.

Wakade, Chandramohan; Chong, Raymond; Bradley, Eric; u. a.; Block, Michelle L. (Hrsg.) (2014): „Upregulation of GPR109A in Parkinson’s Disease“. In: *PLoS ONE*. 9 (10), S. e109818, doi: 10.1371/journal.pone.0109818.

Wilms, Henrik; Sievers, Jobst; Rickert, Uta; u. a. (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“. In: *Journal of Neuroinflammation*. 7 , S. 30, doi: 10.1186/1742-2094-7-30.

Zhou, Ershun; Li, Yimeng; Yao, Minjun; u. a. (2014): „Niacin attenuates the production of pro-inflammatory cytokines in LPS-induced mouse alveolar macrophages by HCA2 dependent mechanisms“. In: *International Immunopharmacology*. 23 (1), S. 121–126, doi: 10.1016/j.intimp.2014.07.006.

8 Erklärung

Isabel Demmer
wohnhaft in 24105 Kiel
Holtenauer Str. 200

Ehrenwörtliche Erklärung zu meiner Dissertation mit dem Titel:
„Untersuchungen zum Einfluss von Niacin auf primäre Mikroglia der Ratte *in vitro*“

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit eigenständig von mir angefertigt wurde und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt wurden. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich meine Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Ort, Datum

Unterschrift

9 Danksagung

Besonders danken möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Ralph Lucius für das Überlassen des Themas meiner Promotion, seiner stets freundlichen und interessierten Betreuung und das zur Verfügung stellen des Laborarbeitsplatzes und der Materialien zum Anfertigen dieser Arbeit.

Ich danke Frau Dr. rer. nat. Uta Rickert, welche die Betreuung meines Themas übernahm und mir bei jeder Frage oder bei jedem Problem, das sich ergab, zur Seite stand. Ebenfalls danken möchte ich ihr für die wertvollen wissenschaftlichen Hinweise und Ratschläge und für ihre Korrekturtätigkeit.

Danken möchte ich auch dem Team der wissenschaftlichen Mitarbeiter der AG Lucius für ihren hilfsbereiten und geduldigen Beistand. Mein besonderer Dank gilt Frau Gaby Steinkamp, die mich mit den Methoden und Laborgeräten vertraut machte und immer ein offenes Ohr für mich hatte. Ebenfalls danken möchte ich Frau Monika Grell für ihre Hilfe mit der Zellkultur und den Färbungen.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen und während des Studiums. Sie schafften es mich immer wieder zu motivieren und halfen mir an meine Stärken zu glauben.