

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

Antiinflammatorische Wirkung von Triptolid auf Ratten-Mikrogliazellen

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

vorgelegt von
Dr. rer. nat. Jessica Spreu
aus Kappeln

Kiel 2020

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Ralph Lucius

(Anatomisches Institut)

2. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. med. Frank Leypoldt

(Institut für Klinische Chemie)

Tag der mündlichen Prüfung:

01.03.2021

Zum Druck genehmigt:

Kiel, den 30.11.2020

Prof. Dr. Franziska Theilig

Vorsitzende des Ausschusses für Promotion

Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungsverzeichnis	III
II	Abbildungsverzeichnis	V
III	Tabellenverzeichnis	VI
1	Einleitung	S. 1
	1.1 Neurodegenerative Erkrankungen	S. 1
	1.2 Mikroglia	S. 3
	1.2.1 Aktivierung von Mikrogliazellen durch LPS	S. 5
	1.2.2 Eigenschaften aktivierter Mikrogliazellen	S. 5
	1.2.3 Mikrogliazellen und neurodegenerative Erkrankungen	S. 9
	1.2.4 Mikrogliazellen als therapeutisches Ziel	S. 11
	1.3 Triptolid als potentiell es Medikament für die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen	S. 11
	1.3.1 Pharmakokinetik und Nebenwirkung von Triptolid	S. 12
	1.4 Fragestellung	S. 13
2	Material und Methoden	S. 14
	2.1 Material	S. 14
	2.1.1 Definitionen	S. 14
	2.1.2 Geräte	S. 14
	2.1.3 Chemikalien	S. 16
	2.1.4 Verbrauchsmaterial	S. 16
	2.1.5 Versuchstiere	S. 16
	2.1.6 Gebrauchsfertige Reagenzien	S. 16
	2.1.7 Oligonukleotide für die RT-PCR	S. 18
	2.1.8 Lösungen für ELISA	S. 18
	2.2 Methoden	S. 18
	2.2.1 Molekulargenetische Methoden	S. 18
	2.2.2 Zellbiologische Methoden	S. 21

	2.3 Statistische Auswertung	S. 24
3	Ergebnisse	S. 25
	3.1 Einfluss von Triptolid auf die Expression proinflammatorischer Mediatoren	S. 25
	3.1.1 Einfluss von Triptolid auf die iNOS mRNA-Expression in Mikrogliazellen	S. 25
	3.1.2 Einfluss von Triptolid auf die Expression proinflammatorischer Zytokine in Mikrogliazellen	S. 26
	3.1.3 Einfluss von Triptolid auf die IL-6-Freisetzung von Mikrogliazellen	S. 28
	3.2 Triptolid beeinflusst die Expression von Chemokinen in Mikrogliazellen	S. 29
	3.3 Triptolid beeinflusst die Expression von Chemokinrezeptoren in Mikrogliazellen	S. 32
	3.4 Einfluss von Triptolid auf die Phagozytoseaktivität von Mikrogliazellen	S. 34
4	Diskussion	S. 36
5	Zusammenfassung	S. 42
6	Literaturverzeichnis	S. 44
7	Erklärung	S. 52
8	Danksagung	S. 53
9	Publikationsliste	S. 54

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AD	Morbus Alzheimer (engl.: Alzheimer disease)
ATP	Adenosintriphosphat
CCL	CC-Chemokinligand
CCR	CC-Chemokinrezeptor
CD	Unterscheidungsgruppen (engl.: Cluster of differentiation)
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl.: copy DNA)
CO ₂	Kohlendioxid
CXCL	CX-Chemokinligand
CXCR	CX-Chemokinrezeptor
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DMEM	engl.: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: Desoxyribonucleic acid)
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
ELISA	engl.: Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Engl.	Englisch
FACS	Durchflußzytometrie (engl.: Fluorescence activated cell sorting)
FCS	Fetales Kälberserum (engl.: Fetal calf serum)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl.: Forward scatter)
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare NO-Synthase

LPS	Lipopolysaccharid
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl.: Messenger ribonucleic acid)
MS	Multiple Sklerose
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
PAF	Plättchenaktivierender Faktor (engl.: platelet activating factor)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: Phosphate buffered saline)
PE	Phycoerythrin
PD	Morbus Parkinson (Parkinson's disease)
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
RT-PCR	Echtzeit-PCR (engl.: Realtime-PCR)
SN	Substantia nigra
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl.: Side scatter)
TLR	Toll-like Rezeptor (engl.: Toll-like receptor)
TNF	Tumornekrosefaktor
TREM	Immunregulatorische Trigger-Rezeptoren exprimiert auf myeloischen Zellen (engl.: Triggering receptor expressed on myeloid cells)
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Aktivierungsformen von Mikrogliazellen. S. 4
- Abb. 2: Chemische Struktur von Triptolid. S. 12
- Abb. 3: Triptolid reduziert die mRNA-Expression von iNOS in LPS-aktivierten Mikrogliazellen nach 6 und nach 24 Stunden. S. 26
- Abb. 4: Triptolid reduziert die mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine in LPS-aktivierten Mikrogliazellen nach sechs Stunden. S. 27
- Abb. 5: Triptolid hat keinen inhibitorischen Einfluss auf die mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine in LPS-aktivierten Mikrogliazellen nach 24 Stunden. S. 25
- Abb. 6: Triptolid beeinflusst die Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6 nach LPS-Stimulation in primären Mikrogliazellen auf Proteinebene (ELISA). S. 29
- Abb. 7: Triptolid reguliert die Expression von Chemokinen nach LPS-Stimulation in primären Mikrogliazellen nach sechs Stunden herunter. S. 30
- Abb. 8: Triptolid beeinflusst die Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine nach LPS-Stimulation in primären Mikrogliazellen. S. 31
- Abb. 9: Triptolid beeinflusst die Expression von Chemokinrezeptoren nach LPS-Stimulation in primären Mikrogliazellen. S. 32
- Abb. 10: Triptolid beeinflusst die Phagozytoseaktivität von stimulierten Mikrogliazellen nicht signifikant. S. 34

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Chemokine von Mikrogliazellen	S. 7
Tab. 2:	Zytokine von Mikrogliazellen	S. 8
Tab. 3:	Primer für die RT-PCR	S. 18

1. Einleitung

1.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen sind meist sporadisch auftretende Prozesse, die durch einen progredienten Verlust von Nervenzellen gekennzeichnet und von Entzündungsreaktionen begleitet sind.

Entzündungsreaktionen finden im Verlauf von vielen neurodegenerativen Erkrankungen statt. Es gibt eine Vielzahl an Faktoren, die eine Schädigung von Nervenzellen hervorrufen können, wobei bestimmte Toxine oder genetische Mutationen spezifisch für die jeweilige neurodegenerative Erkrankung sind. Früher wurde die stattfindende Entzündungsreaktion als passive Antwort auf eine Schädigung der Nervenzellen angesehen. Mittlerweile verdichten sich die Hinweise, dass die Entzündungsreaktion aktiv eine Schädigung bzw. Untergang der Neurone hervorrufen kann. Obwohl der Pathomechanismus der unterschiedlichen neurodegenerativen Erkrankungen verschieden ist, ist allen Erkrankungen die stattfindende Entzündungsreaktion gemeinsam (Guzman-Matinez et al. 2019).

Der Morbus Alzheimer (AD) ist eine chronische neurodegenerative Erkrankung des ZNS, die durch das klinische Erscheinungsbild eines progredienten Gedächtnisverlustes und kognitive Dysfunktion gekennzeichnet ist (Tiwari et al. 2019). AD ist mit etwa 60% die häufigste Demenzform im höheren Lebensalter und mit einer Prävalenz von 5% die vierthäufigste Alterserkrankung (Niu et al. 2017). Die Prävalenz steigt mit zunehmenden Lebensjahren an, so dass 20% der über 85-jährigen betroffen sind. Aufgrund der Tatsache, dass das Alter, neben einer genetischen Prädisposition, der größte Risikofaktor für das Auftreten von AD ist, geht man bei steigender Lebenserwartung der Menschen davon aus, dass sich die Anzahl an AD-Patienten zukünftig drastisch erhöhen wird. Als Kardinalsymptom gilt das allmähliche Auftreten von Gedächtnisstörungen gefolgt von Konzentrations- und Wortfindungsstörungen sowie zeitliche und räumliche Desorientierung. Histopathologische Grundlage der Symptomatik ist eine Abnahme der Hirnmasse sowie ein progressiver Neuronenverlust (Schneider et al. 2009).

Der Morbus Parkinson (PD) ist heutzutage, neben Alzheimer Demenz, die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung mit einer Prävalenz von etwa 0,3% in der Gesamtbevölkerungsschicht. Bei den über 60-jährigen steigt die Prävalenz auf 1% (De Lau und Breteler, 2006).

Die Parkinsonkrankheit ist charakterisiert durch die klinischen Kardinalsymptome bestehend aus Ruhetremor, Muskelsteifigkeit (Rigor) und Bewegungsarmut (Akinese) (Kandel et al. 1995). Des Weiteren können auch Störungen des Halte- und Stellreflexes (Bloem et al. 1992) sowie nicht-motorischen Symptome wie Demenz und Depression beobachtet werden (Weintraub et al. 2011). Die

motorischen Symptome sind Ausdruck einer progredienten und selektiven Degeneration der dopaminergen Neurone in der Substantia nigra pars compacta. Trotz intensiver Forschung ist die Ätiologie des Morbus Parkinson noch nicht vollständig aufgeklärt. Allerdings deuten viele Daten daraufhin, dass die sporadische Form der Parkinsonkrankheit auf ein Zusammenspiel von genetischer Prädisposition, Alterserscheinungen und Umweltfaktoren zurückzuführen ist (Olanow, 2007).

Die Ursache für den Untergang dopaminergener Neurone im Rahmen des Morbus Parkinson ist noch nicht abschließend geklärt. Es wird postuliert, dass aufgrund der Interaktion zwischen α -Synuclein und endogenem Dopamin neurotoxische Effekte resultieren (Mor et al. 2019).

α -Synuclein ist ein kleines, lösliches Protein, was physiologischerweise in den Synapsen von Nervenzellen vorkommt, wo es an der Ausschüttung von Dopamin beteiligt ist (George 2002; Abeliovich et al. 2000). Des Weiteren ist α -Synuclein auch der Hauptbestandteil der Lewy-Körperchen, die beim Morbus Parkinson, der Lewy-Körperchen-Demenz und anderen neurodegenerativen Erkrankungen auftreten. Der Mechanismus, der zur Bildung von Lewy-Körperchen und zur Aggregation von α -Synuclein führt, ist noch nicht abschließend geklärt (Kumar et al. 2017). Allerdings konnte gezeigt werden, dass das α -Synuclein für das neuroinflammatorische Geschehen verantwortlich ist, indem es Mikroglia aktiviert und es zur überschießenden Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren kommt (Teismann et al. 2003, Wilms et al. 2009).

Die Multiple Sklerose (MS), die auch als Enzephalomyelitis disseminata bezeichnet wird, ist eine chronisch-entzündliche Entmarkungserkrankung des ZNS mit einem mittleren Erkrankungsbeginn um das 30. Lebensjahr. Die Prävalenz liegt in Nordamerika und Europa bei $\geq 100/100\ 000$ Einwohnern (Leray et al. 2016).

Die klinischen Symptome der MS umfassen ein weites Spektrum und sind sehr heterogen. Als häufige Primärsymptome findet man Paresen, Störungen der Hirnnerven, Sensibilitätsstörungen und Kleinhirnsymptome wie Ataxie und Tremor (Goldenberg 2012).

Wichtige histopathologische Kennzeichen der MS sind lokal begrenzte Entmarkungsherde (Plaques) sowie gliöse Vernarbungen (Sklerose) in der weißen Hirnsubstanz (Lassmann et al. 2007).

Aktivierte T-Zellen nehmen eine zentrale Stellung in der Pathogenese von MS ein. Diese wandern über die Blut-Hirn-Schranke aus der Peripherie ins ZNS ein, wo es dann zu einem komplexen Zusammenspiel zwischen T- und B-Zellen sowie Makrophagen und Dendritischen Zellen mit den ZNS-ständigen Oligodendrozyten, Mikrogliazellen und Astrozyten kommt. Als Folge kommt es dann zur Zerstörung des Myelins und zu axonalen Schäden der Neurone (Meinl et al. 2006).

1.2 Mikroglia

Mikroglia wurden 1919 erstmalig von Rio-Hortega beschrieben als eine Zellpopulation, die sich von den klassischen Gliazellen und Neuronen unterscheidet (Rezaie und Male, 2002).

Mikrogliazellen gehören zum mononukleären phagozytotischen System im ZNS und machen etwa 10 – 15 % der gesamten Zellpopulation im Parenchym aus. Mikrogliazellen teilen viele Eigenschaften mit Makrophagen, so dass Mikrogliazellen als Teil des angeborenen Immunsystems vor allem an der frühen Erkennung und Abwehr gegen eindringende Mikroorganismen beteiligt sind noch bevor Lymphozyten aus der Peripherie einwandern können.

Die Herkunft der Mikrogliazellen wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Neue Daten weisen darauf hin, dass Mikrogliazellen von mesenchymalen Zellen abstammen und während der fetalen Periode und den frühen postnatalen Tagen in das ZNS einwandern (Chan et al. 2007). Diese Zellen stammen von monozytären Vorläufern ab, die aus dem Blut in das ZNS wandern (Ling et al. 1980). Am Ende der Entwicklung besiedeln Mikrogliazellen alle Regionen des ZNS inklusive der Retina.

Basierend auf funktionalen und morphologischen Charakteristika im gesunden und pathologischen ZNS werden Mikrogliazellen in verschiedene Aktivierungsstadien untergliedert. Im gesunden ZNS und unter physiologischen Bedingungen weisen Mikrogliazellen eine ramifizierte Morphologie auf und dienen der Überwachung des ZNS sowie der Abwehr. Diese ramifizierte Morphologie wird mit einem „ruhenden“ Funktionszustand der Mikrogliazellen assoziiert. Diese Zellen weisen beispielsweise keine phagozytotische Aktivität auf. Jedoch werden Mikrogliazellen durch pathologische Veränderungen des Mikromilieus, wie es beispielsweise bei Infektion, Trauma, Ischämie oder neurodegenerativen Prozessen der Fall ist, aktiviert. Die Aktivierung induziert Veränderungen in der Zellform, der Genexpression und im funktionellen Verhalten (Kreutzberg, 1996; Streit 2002). Ortsständige Mikrogliazellen nehmen ein kompaktes amöboides Erscheinungsbild an, werden beweglich und wandern entlang chemotaktischer Konzentrationsgradienten zum Ort der Läsion. Des Weiteren kommt es zu Veränderungen in der Expression von Oberflächenrezeptoren, die sowohl für die Zell-Zell- sowie der Zell-Matrix-Interaktion eine große Rolle spielen und zur Freisetzung proinflammatorischer und immunregulatorischer Moleküle.

Aktivierte Mikrogliazellen werden weiter, wie periphere Makrophagen auch, in den inflammatorischen M1- und den alternativ aktivierten M2-Phänotyp klassifiziert. M1 Mikrogliazellen sind assoziiert mit der Produktion und der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-6, IL-23, IL-1 β , IL-12, NO und Chemokinen (Loane und Byrnes, 2010). Im Gegensatz dazu exprimieren Mikrogliazellen mit dem immunsuppressivem Phänotyp M2 antiinflammatorische Moleküle wie IL-10, IL-4, IL-13 oder TGF- β und zeigen eine gesteigerte Phagozytoseaktivität und Gewebereparatur (Gray et al. 2020).

Weiterhin wird angenommen, dass M1 Mikroglia vornehmlich am Ort der Verletzung anzufinden sind, während Mikrogliazellen vom M2-Phänotyp erst später dazukommen und an den Reparaturprozessen beteiligt sind. Um Zelltrümmer und geschädigte Zellen zu beseitigen, weisen Mikrogliazellen vom M2 Phänotyp eine erhöhte phagozytotische Aktivität auf. Diese Einteilung in den M1- und den M2-Phänotyp ist ein stark vereinfachtes Modell, da Mikrogliazellen sowohl Gene des M1- als auch des M2-Phänotyps gleichzeitig exprimieren können (Tang und Le, 2016).

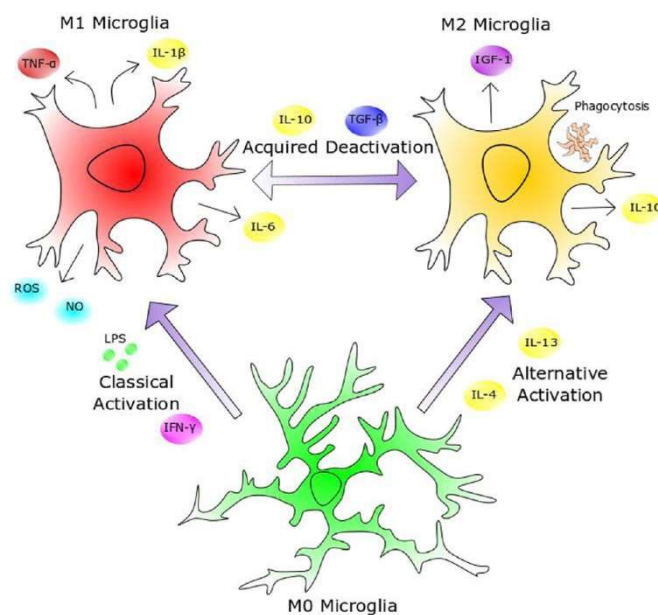


Abb. 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Aktivierungsformen von Mikrogliazellen.
(Quelle: Gray et al. 2020)

Obwohl Mikrogliazellen primär neuroprotektive Eigenschaften besitzen und die mikrogliale Aktivität selbstlimitierend ist, können diese, im Falle einer chronischen Aktivierung, zur Schädigung von neuronalen Zellen beitragen. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen das Gleichgewicht auf den klassisch aktivierten M1-Mikrogliazellen liegt mit der Folge der überwiegenden Bildung neurotoxischer Substanzen (Le und Tang, 2016).

1.2.1 Aktivierung von Mikrogliazellen durch LPS

Die Aktivierung von Mikroglia durch den bakteriellen Zellwandbestandteil Lipopolysaccharid (LPS) wurde in der Literatur erstmals 1988 beschrieben (Hetier et al. 1988). Wie alle myeloiden Zellen, so antworten Mikrogliazellen auf die Aktivierung durch LPS mit der Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen, NO und Proteasen sowie mit Proliferation, Migration und Phagozytose.

Zur Erkennung von Pathogenen exprimieren Mikrogliazellen Toll-like Rezeptoren (TLR), die die Expression der inflammatorischen Antwort regulieren. LPS wird vom TLR4 erkannt und ist verantwortlich für neuronale Schäden bei chronischer Stimulation (Lehnardt et al. 2003).

1.2.2 Eigenschaften aktivierter Mikrogliazellen

Migration (Chemokine)

Eine sehr frühe Antwort von Mikrogliazellen auf einen aktivierenden Stimulus ist die Migration an den Ort der Verletzung oder der Entzündung. Verletzungen oder Entzündungsreaktion im ZNS führen zur Freisetzung von einer Vielzahl an chemotaktisch aktiven Faktoren, die größtenteils zur Familie der Chemokine zählen (Bachelier et al. 2014).

Chemokine bilden eine wachsende Familie kleiner basischer Proteine (6-14 kDa), die unter physiologischen und pathologischen Bedingungen eine wichtige Rolle bei der Zellmigration spielen. Seit der ersten Beschreibung im Jahre 1987 von IL-8 als Neutrophilenattraktans nimmt die Liste der Chemokine kontinuierlich zu, so dass mittlerweile mehr als 50 Chemokine in der Literatur beschrieben sind (Sokol und Luster, 2015).

Chemokine besitzen spezifische Cysteinreste in ihrer Aminosäuresequenz. Anhand der Lokalisation von vier konservierten Cysteinresten in der aminoterminalen Region werden die Chemokine strukturell in vier Klassen unterteilt: in α CXC, β CC, γ C und δ CX3C (Premack und Schall, 1996; Baggiolini et al. 1997; Bazan et al. 1997). Hierbei gibt das C die Anzahl der Cysteinreste an und X die Anzahl der Aminosäuren, die zwischen den ersten Cysteinresten liegen (Zlotnik und Yoshie, 2000).

Eine andere Einteilung erfolgt anhand der physiologischen Eigenschaften der Chemokine. Demnach unterscheidet man zwischen inflammatorischen (induzierbaren) und homeostatischen (konstitutiven) Chemokinen. Chemokine, die sowohl inflammatorische als auch homeostatische Eigenschaften aufweisen, werden als Chemokine mit „dualer Funktion“ bezeichnet (Moser und Willmann, 2004).

Ursprünglich wurde angenommen, dass Chemokine nur eine Rolle bei der Migration und Reifung sowie der Rekrutierung von Immunzellen spielen. Neuere Daten weisen darauf hin, dass Chemokine eine Fülle an Funktionen aufweisen. So sind diese beispielsweise beteiligt an der Kontrolle der Zelladhäsion, der Regulation von Apoptose und Phagozytose als auch in mehreren Signalkaskaden involviert (Lopez-Cotarelo et al. 2017).

Die Wirkung der Chemokine wird durch heptahelikale G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt, die aufgrund ihrer Chemokinbindungseigenschaft in vier Gruppen unterteilt werden: CXC-, CC-, CX3C- und C-Rezeptoren.

Chemokine sind in ihrer Wirkung redundant. Das bedeutet, dass ein Chemokin an mehrere Chemokinrezeptoren binden kann und mehrere Chemokine können denselben Chemokinrezeptor aktivieren. Beispielsweise binden die Chemokine CCL2, CCL7, CCL12 und CCL13 an den Chemokinrezeptor CCR2 und umgekehrt bindet das Chemokin CCL2 noch an die Rezeptoren CCR1 und CCR3 (Mantovani, 1999).

Chemokine können entweder konstitutiv oder induziert exprimiert werden. Konstitutiv exprimierte Chemokine sind überwiegend an der Entwicklung und Differenzierung des Gehirns sowie an der Migration und Proliferation von Neuronen und Gliazellen beteiligt.

Induzierbare Chemokine werden als Antwort auf entzündliche oder pathologische Prozesse gebildet und bewirken dadurch die Migration von Zellen an den Ort des Geschehens

Neuere Daten deuten immer mehr darauf hin, dass Chemokine, die bei Entzündungsprozessen ausgeschüttet werden, mit neurodegenerativen Prozessen assoziiert sind. Bei fast allen neurodegenerativen Erkrankungen wurde neben der Aktivierung von Gliazellen auch eine Verschiebung der Chemokinexpression beschrieben. In den letzten Jahren hat sich zunehmend herauskristallisiert, dass Chemokine eine wichtige Rolle in der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen, wie beispielsweise AD oder MS, spielen und sie Einfluss auf die Aktivierung von Mikrogliazellen nehmen (Gebicke-Harterter et al. 2001, Trebst et al. 2008).

Tabelle 1: Chemokine von Mikrogliazellen

Chemokin	Name	Rezeptor	Referenz
CCL2	MCP-1	CCR2	Galasso et al. 2000; Simpson et al. 2000
CCL3	MIP-1 α	CCR1/5	Simpson et al. 2000; Power und Proudfoot 2001
CCL4	MIP-1 β	CCR1/5/8	Simpson et al. 2000; Power und Proudfoot 2001
CCL5	RANTES	CCR1/3/5	Albright et al. 1999
CCL19	MIP-3 β	CCR7	Columba-Cabezas et al. 2003
CCL22	MDC	CCR4	Columba-Cabezas et al. 2002
CXCL1	GRO α /KC	CXCR2	Janabi et al. 1999
CXCL8	IL-8	CXCR1/2	Flynn et al. 2003
CXCL10	IP-10	CXCR3	Flynn et al. 2003
CX₃CL1	Fractalkine	CX ₃ CR1	Bacon und Harrison 2000

Phagozytose

Mikrogliazellen sind die dominanten Phagozyten im ZNS, indem sie Mikroben umschließen und Proteinfragmente auf ihrer Oberfläche den patrouillierenden T-Zellen präsentieren. Mikrogliazellen phagozytieren darüber hinaus auch pathologische Ablagerungen wie die A β -Plaques bei AD. Neben der Entfernung von Mikroben und pathologischen Proteinablagerungen spielt die Phagozytoseeigenschaft der Mikrogliazellen eine große Rolle bei der Beseitigung von Zelltrümmern und apoptotischen Zellen.

Wie Mikrogliazellen zu phagozytierende Zellelemente erkennen, ist noch nicht abschließend geklärt. Die Interaktion von Phosphatidylserin auf apoptotischen Zellen mit den Mikrogliazellrezeptoren Vitronectin und CD36 ist ein Weg, um Phagozytose zu induzieren (Witting et al. 2000; Stolzing und Grune; 2004). Ein anderer Mechanismus für die Induktion von Phagozytose ist die Aktivierung des Rezeptors TREM-2 (*triggering receptor expressed on myeloid cells 2*). Die Aktivierung von TREM-2 induziert Phagozytose bei gleichzeitiger Hemmung der Zytokinfreisetzung. Genetische Studien haben gezeigt, dass bestimmte TREM-2 Varianten mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert sind. So sind bestimmte TREM-2-Mutationen mit einem erhöhten Risiko verbunden an AD zu erkranken (Zheng et al. 2018).

Zytokinsekretion

Eine weitere Gruppe wichtiger Signalmoleküle bildet die Klasse der Zytokine. Zytokine sind kleine Peptide, die im ZNS hauptsächlich von aktivierten Mikrogliazellen sekretiert werden und vor allem eine regulatorische Funktion bei Entzündungsprozessen haben.

Mehrere Faktoren sind in der Lage, die Expression von Zytokinen in Mikrogliazellen zu induzieren. Zu den exogenen Faktoren zählen virale Hüllproteine, bakterielle Zellwandbestandteile wie LPS und LTA (*Lipoteichonsäure*), bakterielle DNA und extrazelluläre Proteinaggregate wie das A β -Peptid bei AD oder das Prionprotein. Auch endogene Faktoren wie PAF (*platelet-activating factor*) Lipide, Serumproteine, Komplementfaktoren, ATP oder erhöhte Kaliumkonzentrationen können Mikrogliazellen aktivieren und so die Sekretion von Zytokinen induzieren (Colonna und Butovsky, 2017).

Tabelle 2: Zytokine von Mikrogliazellen

Zytokin	Zytokinrezeptor	Referenz
IL-1a/b	IL-1R	Pinteaux et al. 2002
IL-3	IL-3R	Appel et al. 1995
IL-4	IL-4R	Park et al. 2005
IL-5	IL-5R	Lee et al. 2002
IL-6	IL-6R	Lee et al. 2002
IL-8	IL-8R	Lee et al. 2002
IL-10	IL-10R	Lee et al. 2002
IL-12	IL-12R	Lee et al. 2002
IL-13	IL-13R	Lee et al. 2002
IL-15	IL-15R	Lee et al. 2002
IL-16		Liebrich et al. 2007
IL-17		Kawanokuchi et al. 2008
IL-18	IL-18R	Andre et al. 2003
IL-23	IL-23R	Sonobe et al. 2008
IL-27		Sonobe et al. 2005
TNF- α	TNFR	Kuno et al. 2005
TGF- β	TGFR	De Groot et al. 1999
IFN- γ	IFN- γ R	Kawanokuchi et al. 2006

IL-1 und IL-6 sind zwei proinflammatorische Zytokine, die von Mikrogliazellen sekretiert werden und eine wichtige Rolle während der Initiation der Neuroinflammation spielen. IL-1 und IL-6 induzieren die

Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen, die für die Einwanderung der Leukozyten essentiell sind (Saud et al. 2005).

IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin mit pro- und antiinflammatorischen Eigenschaften und ist weitestgehend für die zellvermittelte humorale Immunreaktion verantwortlich.

Auf der anderen Seite sekretieren Mikrogliazellen auch antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 und TGF- β , die die Expression von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und ROS herunterregulieren.

1.2.3 Mikrogliazellen und neurodegenerative Erkrankungen

Alzheimer Erkrankung (AD)

Die Alzheimer Erkrankung (Alzheimer's disease AD) ist die häufigste neurodegenerative Erkrankung, die zur Demenz führt. Der Verlust der Nervenzellen beginnt im temporalen sowie parietalen Teil des zerebralen Cortex und breitet sich mit fortschreitender Erkrankung Richtung Hippocampus und Amygdala aus (Braak und Braak 1994). Als Folge der Degeneration kommt es zur Einschränkung der Sprachfähigkeit, zu Gedächtnisverlust und schließlich zu Wahnvorstellungen.

Die Diagnose AD geht mit drei histopathologischen Befunden einher: 1. neurotoxische Plaques aus β -Amyloidaggregaten, 2. neurofibrilläre Bündel bestehend aus dem hyperphosphorylierten Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau und 3. Neuroinflammation induziert durch (Mikro-)gliose

Zum Verständnis der Alzheimerpathologie entwickelten Hardy und Selkoe die „Amyloid-Hypothese“. Laut dieser Hypothese stellt die gestörte Prozessierung des Amyloid-Precursor Proteins (APP) den zentralen Pathomechanismus dar. Aufgrund der gestörten Prozessierung kommt es zur Bildung von Amyloid- β Fragmenten, die sich zu extrazellulären Amyloidplaques formieren. Die Bildung der neurofibrillären Bündel erfolgt über eine weitere Kaskade und ist Inhalt der Taupathologie. Die neurofibrillären Bündel bestehen überwiegend aus dem hyperphosphorylierten Zytoskelettprotein Tau, welches helikal gewundene Fragmente in den Nervenzellen bildet. Normalerweise ist das Tauprotein ein Zytoskelett-assoziiertes Protein, das an der Erhaltung der Zellstruktur und den intrazellulären Transportvorgängen beteiligt ist. Bei AD kommt es zu einer Hyperphosphorylierung des Tauproteins und somit zu einer Abschwächung der Interaktion zwischen dem Tauprotein und dem Zytoskelett, so dass das hyperphosphorylierte Tauprotein abdissoziiert und neurofibrilläre Bündel entstehen.

Des Weiteren beschrieb McGeer et al. (1987), dass vermehrt aktivierte Mikrogliazellen in den A β -Plaques in postmortem Gehirnen von AD Patienten zu finden sind. Ursprünglich wurde die Ansammlung der Mikrogliazellen in den A β -Plaques als passive Antwort auf den Zelltod der Neurone angesehen. Es konnte gezeigt werden, dass die Antwort der Mikrogliazellen auf die A β -Plaques entscheidend für das Überleben der Neurone ist (Combs et al. 2000). AD war die erste neurodegenerative Erkrankung an der gezeigt werden konnte, dass Neurotoxizität mit der Aktivierung von Mikrogliazellen assoziiert ist, so dass mittlerweile das Bild von der passiven Rolle der Mikrogliazellen revidiert wurde und diese nun als aktive Mediatoren von Neurodegeneration akzeptiert sind. Die A β -Plaques rekrutieren und aktivieren Mikrogliazellen, so dass diese neurotoxische Moleküle sekretieren wie bspw. NO, TNF- α und Superoxide (Minter et al. 2016).

Parkinsonerkrankung (PD)

Parkinson ist charakterisiert durch den Untergang dopaminerger Neurone in der Substantia nigra und der projizierenden Bahnen im Striatum (Olanow und Tatton 1999). In der Substantia nigra von PD Patienten wurden erhöhte Konzentrationen von IFN- γ , TNF- α und IL-1 β gefunden. Eine Quelle dieser proinflammatorischer Zytokine stellen aktivierte Mikrogliazellen dar. Die Aktivierung von Mikrogliazellen ist eines der frühen Ereignisse im Pathomechanismus von PD und es wurde gezeigt, dass Mikrogliazellen dopaminerge Neurone in der SN phagozytieren. Die Aktivierung von Mikrogliazellen in PD erfolgt hauptsächlich durch drei Faktoren, die von geschädigten Neuronen freigesetzt werden: MMP-3, α -Synuclein und Neuromelanin. MMP-3 induziert die Bildung von Superoxiden und TNF α (Kim und Joh 2006), wohingegen α -Synuclein die Bildung von ROS sowie neuroregulatorischen Proteinen induziert. Neuromelanin hat chemotaktische Funktion und verstärkt die Sekretion von TNF- α , IL-6, und NO in Mikrogliazellen (Wilms et al. 2007).

Multiple Sklerose

Multiple Sklerose (MS) ist häufigste Entzündungs-vermittelte demyelinisierende Erkrankung. MS ist eine Erkrankung, die sich meist in der 2. – 3. Lebensdekade manifestiert. Bei 10% der Patienten kommt es im Verlauf der Erkrankung zur Verschlimmerung der Symptome unterbrochen von Perioden der Remission. Die ersten klinischen Symptome beginnen mit Schwindel, Müdigkeit, Optikusneuritis und Schwäche in den unteren Extremitäten bis hin zu Ataxie, Paraparese und Spasmen. Die mit MS assoziierte Neurodegeneration äußert sich als Läsion in der weißen Substanz des ZNS. Dabei kommt es zur Schädigung der Myelinscheiden durch autoreaktive T-Zellen. Die Ursache von MS ist immer noch

nicht abschließend geklärt, allerdings gibt es eine klare Entzündungskomponente. Eine erhöhte Mikrogliaaktivität konnte bei MS Patienten um Läsionen nachgewiesen werden (Banati et al. 2000). Die aktivierten Mikrogliazellen weisen eine erhöhte Expression von COX-2 sowie von iNOS auf (Rose et al. 2004). Heutzutage nimmt man an, dass Mikrogliazellen sowohl an der Initiation als auch an dem Fortschreiten von MS eine wichtige Rolle spielen.

1.2.4 Mikroglia als therapeutisches Ziel

Die durch Mikrogliazellen vermittelte Neuroinflammation und die damit verbundene neuronale Dysfunktion spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen, so dass die Hemmung der überschießenden proinflammatorischen Antwort durch Mikroglia einen vielversprechenden Ansatzpunkt für die Therapie neurodegenerativer Erkrankungen bietet. Beispielsweise konnte in Tiermodellen für PD gezeigt werden, dass anti-inflammatorische Reagenzien die Degeneration von nigrostrialen dopaminergen Neurone reduzieren können. Des Weiteren wurde in einer klinischen Studie beobachtet, dass die Inzidenz der idiopathischer PD bei Patienten, die nicht-steroidale anti-inflammatorische Medikamente erhielten, um fast 50% geringer war als in der Kontrollgruppe (Lu et al. 2010). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass Substanzen mit einem anti-inflammatorischen Effekt vielversprechende Kandidaten in der Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen sind.

1.3 Triptolid als potentiellles Medikament für die Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen

Es wird momentan angenommen, dass eine dysregulierte Antwort des Neuroimmunsystems hauptverantwortlich für das Fortschreiten von neurodegenerativen Erkrankungen ist. Basierend auf diesem Konzept wird nach Wirkstoffen gesucht, die die überschießende Antwort und die damit assoziierte Produktion von neurotoxischen Molekülen wie proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen supprimieren, wohingegen die die nützliche Aktivierung von Mikrogliazellen erhalten bleibt.

Triptolid ist ein Extrakt aus der chinesischen Kletterpflanze Wilfords Dreiflügelfrucht (*Tripterygium wilfordii*). Das Extrakt, bestehend aus mehr als 300 Inhaltsstoffen, verwenden chinesische Heilkundige traditionell für die Therapie von Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise Arthritis und bei Fieber. Triptolid wurde aus dem Extrakt als bioaktive Substanz 1972 isoliert und ist hauptverantwortlich für die glucocorticoidähnliche, immunsuppressive und entzündungshemmende Wirkung des Extrakts.

Triptolid, auch PG490 genannt, ist ein Diterpen mit drei Epoxidgruppen und ist aufgrund seiner geringen molekularen Größe und lipophilen Eigenschaften gut ZNS-gängig, was es zu einer potentiellen neuroprotektiven Substanz macht.

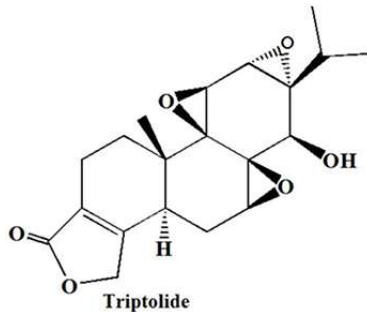


Abb. 2: Chemische Struktur von Triptolid (Wang et al. 2016).

Mehrere Studien konnten zeigen, dass Triptolid immunsuppressive Wirkungen hat, indem es die Proliferation von T-Lymphozyten und die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6 und IL-8 reduziert (Lu et al. 2010). Weiterhin wurde gezeigt, dass Triptolid einen ähnlichen Effekt auf die Freisetzung von Zytokinen, wie TNF α und IL-1 β , durch LPS-stimulierte Mikrogliazellen hat. Neben der Reduktion der Zytokinfreisetzung wurde gezeigt, dass Triptolid ebenfalls die Expression der proinflammatorischen Enzyme iNOS und COX-2 inhibiert (Zhou et al. 2003).

Der Wirkungsmechanismus von Triptolid wurde bisher noch nicht hinreichend untersucht. In der Literatur sind mehrere mögliche Mechanismen beschrieben. Triptolide können die Bindung der Transkriptionsfaktoren NFAT und NF κ B reduzieren (Yinjun et al. 2005), kovalent an ein unspezifisches nukleäres 90 kDa Protein binden (McCallum et al. 2007) oder direkt den Ca²⁺-Influx durch die Bindung an den Polycystin-2-like Ca²⁺-Kanal modulieren (Leuenroth et al. 2007).

1.3.1 Pharmakokinetik und Nebenwirkungen von Triptolid

Triptolide werden bei oraler Applikation hauptsächlich im Intestinum absorbiert und relativ langsam ($t_{0,5} = 59,5$ Stunden) renal eliminiert. Da Triptolide einer nichtlinearen Pharmakokinetik gehorchen, kann es bei Applikation von zu hohen Dosen zu einer kumulativen Intoxikation kommen.

Für Triptolide wurden mehrere dosisabhängige Nebenwirkungen beschrieben. Triptolide können toxisch auf die Leber (Entwicklung einer Fettleber), auf den gastrointestinalen Trakt (Anorexie, Nausea

und Diarrhö), auf die Nieren (Niereninsuffizienz) und auf das kardiale System (Myokardschäden) wirken. Des Weiteren kommt es bei einer Langzeitanwendung von Triptoliden zu einer reversiblen Infertilität bei Männern und Amenorrhö bei Frauen (Shu et al. 1987).

1.4 Fragestellung

Aufgrund der immunsuppressiven Eigenschaften sowie der guten ZNS-Gängigkeit soll in dieser Arbeit überprüft werden, ob die Substanz Triptolid die durch LPS-induzierte inflammatorische Antwort in einem Modellsystem vermindern und dadurch die neuronale Schädigung verringern kann.

Es soll die Wirkung von Triptolid auf die inflammatorische Antwort in einem *in vitro* Modell mit kultivierten und LPS-aktivierten Ratten-Mikrogliazellen untersucht werden.

Da nicht nur proinflammatorische Zytokine eine Rolle im Pathomechanismus neurodegenerativer Erkrankungen spielen, sondern auch das Chemokinsystem und deren verändertes Chemokin- und Chemokinrezeptormuster einen Einfluss auf neuroinflammatorische Geschehen hat, soll ebenfalls in diesem Modell der Einfluss von Triptolid auf ausgewählte Chemokine und die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 untersucht werden.

Da auch eine veränderte Phagozytoseaktivität von Mikrogliazellen im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen spielt, soll der Einfluss von Triptolid auf die Genexpression von Phagozytoserezeptoren und auf die Phagozytoseaktivität von Mikrogliazellen hin untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Definitionen

Dalton

Dalton Ein Dalton (Da) entspricht der Masse eines Wasserstoffatoms.

$$1 \text{ Da} = 1,66018 \times 10^{-24} \text{ g}$$

Enzymaktivität

Allgemeine Definition Eine Enzyeinheit (1U) ist die Enzymmenge, die 1 μmol Substrat pro Minute bei Raumtemperatur umsetzt.

Kilobasen

Definition 1 kb = 1000 Basenpaare

Mol

Definition Stoffmenge, die aus so vielen Teilchen besteht wie Atome in 12 g ^{12}C enthalten sind.

Die Teilchenzahl pro Mol beträgt: $6,221415 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$.

Molmasse M

Definition Masse von einem Mol eines Stoffes [g/mol].

2.1.2 Geräte

Durchflusszytometer FACScalibur; Becton Dickinson

ELISA-Reader Spectramax 340; Molecular Devices

Heizblock Thermomixer 5436; Eppendorf

Kochplatte IKA Labortechnik

Kühlzentrifuge Megafuge 1R; Heraeus

Lichtmikroskop Leica DMIL

Mikrowelle	Bosch
Multipipette	Micronic Systems (25 – 200 µl)
pH-Meter	Calimatic Knick GmbH
Pipettierhilfe	Pipetboy; Integra Biosciences
Präzisionswaage	BC210S; Sartorius GmbH
Potter	Sartorius GmbH
Quarzküvette	Quarzküvette SUPRASIL (Schichtdicke 1 cm); Hellma
Rotator	Bachofer
Schüttelinkubator	Multitron HAT; INFORS AG Bottmingen
Sequenzierer	ABI PRISM 310 Genetic Analyser; Applied Biosystems
Sonifizierer	Branson Sonifier 250; Heinemann
Standzentrifuge	Megafuge; Heraeus
Spannungsquelle	Power Supply EPS 2000; Pharmacia Biotech
Sterilbank	3F150-II GS, Tecnoflow; Integra Biosciences
<i>Thermocycler</i>	PCR-Sprint: Hybaid Ltd. Großbritannien
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 R; Eppendorf
Ultrazentrifuge	Sorvall RC 5C Plus
UV/VIS-Spektrometer	Ultrospec 3000; Amersham-Pharmacia Europe GmbH
UV-Transilluminator	AGS Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH
Vortexer	Minishaker MS1; IKA-Works, Inc.
Wasserbad	GFL
Zellkulturinkubator	Water-Jacketed Incubator 3250; Labotect
Zellzentrifuge	Labofuge 400; Heraeus Instruments
Neubauer-Zählkammer	Neubauer

2.1.3 Chemikalien

Standardlaborchemikalien wurden von den Firmen Gibco (Detroit, USA), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Serotech (Berlin) und Sigma-Aldrich (München) meist in höchster Qualitätsstufe bezogen. Chemikalien und Reagenzien weiterer Hersteller sind gesondert bei den entsprechenden Methoden vermerkt.

2.1.4 Verbrauchsmaterial

Sterile Einwegmaterialien für die Zellkultur und allgemeine Plastikwaren wurden von den Firmen Amersham, Eppendorf, Falcon, Greiner, Nunc und Sarstedt bezogen, falls nicht anders an entsprechenden Stellen gesondert vermerkt wurde.

2.1.5 Versuchstiere

Für die Gewinnung primärer Zellkulturen wurden Albinolaborratten des Inzuchtstammes Wistar aus hauseigener Zucht verwendet. Diese wurden unter Standardbedingungen im Tierstall der Universität Kiel gehalten: Raumtemperatur, 12 stündiger Hell-/Dunkelrhythmus, Rattenzuchtfutter, Wasser ad libitum. Eine Tierversuchsgenehmigung des Ministeriums für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein lag vor (V312-7224.121-13).

2.1.6 Gebrauchsfertige Reagenzien

Medien, Lösungen und Zusätze für die Zellkultur

DMEM	Sigma
Dulbecco's PBS	Cambrex BioScience
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco
Natriumpyruvat	c.c.pro GmbH
Penicillin/Streptomycin	Cambrex BioScience (100U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)

Medien für die Zellkultur

DMEM-Kulturmedium

DMEM

10%	(v/v)	FCS
1	mM	Natriumpyruvat
100	U/ml	Penicillin
100	µg/ml	Streptomycin

Puffer und Lösungen

Lösungen für eukaryotische Zellkultur

Trypanblau

PBS

0,05%	(w/v)	Trypanblau
0,02%	(w/v)	Azid

Lösungen für die Durchflusszytometrie

FACS-Puffer

PBS

2%	(v/v)	FCS
2	mM	EDTA
0,01%	(w/v)	NaN ₃

2.1.7 Oligonukleotide für die RT-PCR

Die verwendeten Oligonukleotide wurden alle von der Firma eurofins mwg operon bezogen.

Tab. 3: Primer für die RT-PCR

Primer	Sequenz 5' – 3'
iNOS	CTA TTC CCA GCC CAA CAA CAC AGG A
IL-1 β	AGC CAA CAA GTG GTA TTC TCC ATG A
IL-6	CGA GCC CAC CAG GAA CGA AAG TC
TNF- α	ACC CTC ACA CTC AGA TCA TCT TCT C
IL-23	AGG TCT CAA GGA CAA CAG CCA
CCL2	ATG CAG GTC TCT GTC ACG CT
CCL3	ATG AAG GTC TCC ACC ACT
CCL5	CGA AGG GAA CCG CCA AGT GTG
CCL7	CCA AGA GGA ATC TCA AGA GTT ACA G
CXCL10	AGT GCT GCT GTC GTT CTC TG
CXCR4	AGT GGC TGA CCT CCT CTT TGT
CCR5	CAC CCT GTT TCG CTG TAG GAA TG
Fc γ R1	TGG ATC ATA CTG GTG CGA GGT A
GAP-DH	GTG CTG AGT ATG TCG TGG AGT CT

2.1.8 Lösungen für ELISA

coating-Puffer	0,1 M Natriumcarbonat pH 9,5
Verdünnungslösung	PBS + 10% FCS
Waschpuffer	PBS + 0,05% Tween 20
Stopplösung	0.1 M H ₂ SO ₄

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Isolierung von RNA aus Zellen

Die Isolierung von RNA aus Zellen ermöglicht die Analyse der momentanen Zelltätigkeit, da nur RNA von Genen vorliegt, die gerade transkribiert und für die Zellfunktion benötigt werden. Für die Isolierung von mRNA wurden die Mikrogliazellen in einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro 12-Napf-Mikrotiterplatte ausgesät und entsprechend stimuliert.

Die Isolierung der mRNA erfolgte nach dem *single step*-Prinzip von Chomzynski und Sacchi (1987) unter Verwendung von 1 ml des Reagenz TRIzol, welches Guanidiniumthiozyanat und Phenol enthält. Das

Guanidiniumthiozyanat lysiert die Zellen und inaktiviert gleichzeitig RNA-abbauende Enzyme, die RNasen. DNA und Proteine lösen sich in Phenol. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform und anschließender Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Phasentrennung mittels Zentrifugation für 15 Minuten bei 12 000 x g und 4°C in eine obere, RNA-haltige wässrige Phase, in eine DNA-haltige Interphase und in eine proteinhaltige untere Phase. Nach Abnahme der oberen Phase wird die darin enthaltene RNA durch Zugabe von 1 µl Glykogen (70 mg/ml) und 500 µl Isopropanol durch Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation für 10 Minuten bei 12 000 x g und 4°C gefällt. Die isolierte RNA wird zweimal durch Zugabe von 500 µl Ethanol und Zentrifugation für 5 Minuten bei 7 500 x g und 4°C gewaschen und abschließend in RNase-freies Wasser aufgenommen und bei -80°C gelagert.

Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgt photometrisch, indem die optische Dichte bei der Wellenlänge $\lambda = 260 \text{ nm}$ (OD_{260}) und $\lambda = 280 \text{ nm}$ (OD_{280}) gemessen wird. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren (DNA und RNA) liegt bei $\lambda = 260 \text{ nm}$, wohingegen Proteine bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ absorbieren. Die Reinheit der RNA-Isolierung wird durch den Quotienten aus OD_{260} und OD_{280} ermittelt, wobei ein Quotient von 2 für eine reine RNA-Isolierung spricht.

Eine von $OD_{260} = 1$ entspricht 40 µg/ml RNA, kann man die RNA-Konzentration nach folgender Formel berechnen:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor.}$$

cDNA-Synthese

Bei der Herstellung von cDNA findet eine reverse Transkription (RT) der mRNA mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase statt. Als Startpunkt der Reaktion dienen sogenannte *random hexamer primers*, einer Mischung einzelsträngiger Nukleotidsequenzen mit einer zufälligen Basenabfolge, die sich komplementär an die entsprechenden mRNA-Sequenzen anlagern.

Vor Beginn der cDNA-Synthese wird die isolierte mRNA einem DNase-Verdau unterzogen. Dazu wurde 1 µg RNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 7 µl gebracht und zusammen mit 1 µl 10 x Reaktionspuffer und 1 µl DNase (10 000 U) für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA und Inkubation für 15 Minuten bei 65°C abgestoppt.

Im Anschluss an den DNase-Verdau wurde zu dem Ansatz 1 μl *random hexamer primer* (200 ng) gegeben und für 5 Minuten bei 70°C inkubiert, um die RNA zu denaturieren und danach auf Eis gekühlt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 4 μl Reaktionspuffer (5-fach), 2 μl dNTPs (10 nM) und 1 μl RNase-freiem Wasser. Dieser Ansatz wurde für 5 Minuten bei 25°C inkubiert, um den Primern eine Anlagerung an die mRNA zu ermöglichen. Danach erfolgte die Zugabe der Reversen Transkriptase und eine Inkubation für 10 Minuten bei 25°C und 60 Minuten bei 42°C. Die Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgte in einem finalen Schritt, indem die Temperatur für 10 Minuten auf 70°C erhöht wurde.

Quantitative Echtzeit-PCR (*real-time* PCR)

Die *real-time* PCR basiert auf dem gleichen Prinzip wie die konventionelle PCR und wurde 1992 das erste Mal von Higuchi beschrieben. Im Gegensatz zur konventionellen PCR wird die Entstehung der Amplifikate in Echtzeit gemessen. Dafür macht man sich zunutze, dass bestimmte Farbstoffe sich in doppelsträngige DNA interkalieren und nach Anregung mit UV-Licht fluoresziert. Die DNA-Menge kann somit anhand des emittierten Lichtsignals quantifiziert werden.

Die hier durchgeführte *real-time* PCR basiert auf der Verwendung von SYBR Green, einem interkalierenden Farbstoff, der nach Anregung bei 470 nm mit einer Wellenlänge von 585 nm Fluoreszenzsignale emittiert, das am Ende der Elongationsphase gemessen wird. Die PCR-Reaktion erfolgte in einem Endvolumen von 25 μl mit einem Reaktionsmix bestehend aus: 4 μl cDNA (1:5 verdünnt), 12.5 μl SYBR Green, 1.5 μl sense-Primer (10 μM), 1.5 μl antisense-Primer (10 μM) und 5.5 μl Wasser.

Die Vervielfältigung und Auswertung erfolgte im ABI Prism-7500 *fast real-time*-Thermocycler unter folgenden Amplifikationsbedingungen. Nach einer dreiminütigen Denaturierung der DNA bei 94°C folgten 45 Zyklen mit einer Denaturierungsphase bei 94°C für 20 Sekunden, die Primeranlagerung bei 65°C für 30 Sekunden, einer Extensionsphase bei 72°C für 30 Sekunden und einer anschließenden Fluoreszenzmessung für 15 Sekunden. Abschließend erfolgte der terminale Schritt bei 72°C für 5 Minuten.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

Isolierung von Mikrogliazellen

Isolierung und Kultur primärer Mikroglia

Primäre Mikrogliazellen wurden am 2. postnatalen Tag aus den Rattengehirnen isoliert. Die Isolierung der Mikrogliazellen wurde mit leichten Modifikationen nach der Methode von Guliano und Baker (Guliano und Baker, 1986) durchgeführt.

Am postnatalen Tag 2 wurden die Gehirne aus der Schädelhöhle entfernt, in sterilem PBS gespült und die Großhirnhemisphären von Meningen sowie Blutgefäßen befreit. Anschließend erfolgte die enzymatische Dissoziation. Dafür wurden die Gehirne für 15 min bei 37°C in Dissoziationslösung inkubiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt und anschließend erfolgte die mechanische Dissoziation mittels einer feuerpolierten Pasteurpipette. Danach wurden die Zellen durch ein 20 µm Nylonfilter gegeben und etwa 5×10^6 Zellen in 8 ml Kulturmedium aufgenommen und kultiviert.

Kultivierung von Mikrogliazellen

Mikrogliazellen wurden in Zellkulturflaschen im entsprechenden Medium unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (engl.: *fetal calf serum*, FCS), 1 mM Natriumpyruvat und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin propagiert. Die Kultivierung erfolgte im Inkubator in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre bei 37°C und 7,5% CO₂-Sättigung.

Bei den in Suspension auf dem adhären Astrozytenrasen wachsende Mikrogliazellen wurde, je nach Zelldichte, alle 2 bis 3 Tage das Medium gewechselt. Hierzu wurden die Mikrogliazellen durch Klopfen gegen die Kulturflasche angelöst und aus der Kulturflasche mit dem Medium in 12 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 500 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert und entsprechend in die Kulturflaschen gegeben.

Bestimmung der Lebendzellzahl

Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte mikroskopisch in einer Neubauer-Zählkammer durch Ausschlussfärbung mit dem Azofarbstoff Trypanblau. Trypanblau kann durch Zellmembranen ins Innere der Zellen diffundieren. Lebende Zellen transportieren den Farbstoff aktiv aus dem Zellinneren heraus, während tote Zellen angefärbt werden.

Ein Teil einer homogenen Zellsuspension wurde mit Trypanblau-Lösung und 10 µl dieser Verdünnung in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Anzahl der Zellen in den acht Großquadraten der Neubauer-Kammer wurde durch Auszählung unter dem Lichtmikroskop ermittelt und daraus der Mittelwert gebildet. Die relative Zellzahl errechnete sich aus der Multiplikation des Mittelwertes mit dem Kammer- und dem Verdünnungsfaktor. Der Kammerfaktor beträgt 10^4 bei der Verwendung einer Zählkammer mit einer Höhe von 0,1 mm und einer Großquadratfläche von 1 mm².

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert der Zellzahl in 8 Großquadraten} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Stimulation von Mikrogliazellen

Nachdem die ausgesäten Mikroglia für 24 Stunden im Inkubator kultiviert wurden, wurden die Zellen für die Versuche verwendet. Alle Versuchsansätze, die Triptolid enthielten, wurden mit dieser Substanz 30 Minuten vor der LPS-Stimulation vorinkubiert. Die Stimulation erfolgte im Inkubator bei 37°C und 8,4 % CO₂. Es wurden jeweils vier Ansätze untersucht und diese entsprechend der Experimente entweder für weitere sechs oder 24 Stunden inkubiert.

1. Kontrolle: unstimulierte Zellen
2. LPS [10 ng/ml]
3. Triptolid [10 nM]
4. Triptolid [10 nM] + LPS [10 ng/ml]

Durchflusszytometrische Untersuchung

Die Durchflusszytometrie stellt eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften dar.

Zur Analyse werden die Zellen in einer Einzelzellsuspension durch einen Flüssigkeitsstrom fokussiert und mit einem Argonlaser, der Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 488$ nm emittiert, bestrahlt. Durch die Interaktion der Zelle mit dem einfallenden Lichtstrahl wird die Richtung des anregenden Lichts verändert. Das in einem geringen Winkel ($3 - 10^\circ$) zum einfallenden Lichtstrahl gestreute Licht wird als Vorwärtsstreulicht (engl.: *forward scatter; FSC*) bezeichnet. Es gibt Auskunft über die Größe der Zelle. Licht, das im rechten Winkel (90°) zum einfallenden Lichtstrahl gestreut wird, heißt Seitwärtsstreulicht

(engl.: *side scatter*; SSC) und ist abhängig von der Granularität der Zelle. Mit diesen beiden Parametern können unterschiedliche Populationen in einer heterogenen Zellsuspension identifiziert werden.

Für die weitere Charakterisierung der Zellen werden Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, deren Exzisionsmaximum bei 488 nm liegt und die über ein charakteristisches Emissionsspektrum verfügen. Häufig werden die Farbstoffe Fluorescein-isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) verwendet, deren Fluoreszenzstrahlung um 520 nm (FITC) und 575 nm (PE) liegt. Diese Farbstoffe sind an Antikörper gekoppelt, die entweder direkt an Oberflächenstrukturen auf der Zelle binden oder sekundär an primäre Antikörper. Mittels Fluoreszenzfarbstoff-markierter Antikörper lässt sich die relative Expression einer Oberflächenstruktur innerhalb einer Zellpopulation bestimmen.

Die gemessenen Daten von Streulicht und Fluoreszenzstrahlung können unterschiedlich dargestellt werden. Die Einparameterdarstellung beschreibt die Verteilung eines Parameters innerhalb einer Population. In einem Häufigkeitsdiagramm (Histogramm) wird die Anzahl der Zellen gegen das gemessene Signal aufgetragen. In einem Zweiparameterpunktediagramm (Punktplot) wird die Relation zweier verschiedener Zelleigenschaften zueinander dargestellt.

Alle Färbe-, Inkubations- und Waschschrte erfolgten in einer 96-Napf-Rundbodenplatte (Costar) bei 4°C. Die zu analysierenden Zellen wurden mit einer Konzentration von $1 - 2 \times 10^5$ Zellen pro Ansatz in eine 96-Napf-Rundbodenplatte überführt und zwei Waschschrten unterworfen. Das Waschen umfasste das Zentrifugieren der Zellen (500 x g, 3 min, 4°C), das Abkippen des Überstandes und das Resuspendieren der Zellen in 200 µl FACS-Puffer.

Die Messung erfolgte an einem FACSCalibur Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson, die Datenauswertung an der dazugehörigen CellQuest Software.

ELISA

ELISA (engl.: *enzyme-linked immunosorbent assay*) ist eine immunologische Methode, mit der spezifisch verschiedene Moleküle nachgewiesen und quantifiziert werden können. Es gibt verschiedene Varianten der ELISA-Technik. Die hier verwendete Technik entspricht dem sogenannten *sandwich*-ELISA.

Dafür wurde der *capture*-Antikörper in *coating*-Puffer gegen das nachzuweisende Protein auf dem Boden der 96-Napf-Mikrotiterplatte über Nacht bei 4°C immobilisiert. Nach Absättigung freier Bindungsstellen durch Inkubation mit 10% FCS in PBS bei Raumtemperatur wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit den Zellkulturüberständen von stimulierten Mikrogliazellen für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach erneutem fünfmaligem Waschen wurde der Detektionsantikörper hinzugegeben und für 1 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und danach erneut fünfmal gewaschen. Im Anschluss wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit HRP-

konjugiertem Streptavidin inkubiert. Nichtgebundenes Streptavidin-HRP wurde durch siebenmaliges Waschen entfernt und TMB Substrat hinzugegeben. Nach 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Stopplösung hinzugegeben, und es erfolgte die quantitative Auswertung am ELISA-reader.

Phagozytose

Die Mikrogliazellen wurden mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro Ansatz in einer 6-Napf-Mikrotiterplatte ausgesät und über Nacht bei 37°C im Inkubator kultiviert. Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen dreimal mit serumfreien Medium gewaschen und vor der Stimulation für 2 Stunden in 0,5 ml serumfreien Medium inkubiert. Sofort nach der Stimulation wurden 1×10^6 beads pro Ansatz (10 µl/Ansatz) hinzugegeben und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem FACS-Puffer gewaschen, mit dem Zellschaber abgelöst und bei für 5 Minuten bei 500 x g bei 4°C zentrifugiert.

2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter der Zuhilfenahme des Programms R (Version 3.5.3). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM (Standardabweichung des Mittelwerts) dargestellt. Es wurden ANOVA- und ggf. Tukey-Tests durchgeführt inklusive Varianzanalyse mittels Levene. Es wurde ein 5%-Signifikanz-Niveau ($\alpha < 0,05$) festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von Triptolid auf die Expression proinflammatorischer Mediatoren

Da eine Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen mit chronischen neuroinflammatorischen Prozessen assoziiert sind und mit der Aktivierung von Mikrogliazellen einhergehen, wurde für die Untersuchung des Einflusses von Triptolid auf das Verhalten von Mikrogliazellen das *in vitro* LPS-Modell verwendet. Mikrogliazellen aus Primärkulturen wurden mittels LPS (10 ng/ml) aktiviert und nachfolgend wurde zunächst die Expression ausgewählter Aktivierungsmarker sowie Zytokine und Chemokine mittels RT-PCR zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht.

Neben Veränderungen in der Zytokin- und Chemokinsekretion sowie der Expression der Chemokinrezeptoren ist eine veränderte Phagozytoseaktivität ein weiteres gemeinsames Merkmal neurodegenerativer Erkrankungen, so dass wir den Einfluss von Triptolid auf die Expression eines Phagozytoserezeptors und auf die Phagozytoseaktivität hin untersucht haben.

3.1.1 Einfluß von Triptolid auf die iNOS mRNA-Expression in Mikrogliazellen

Als Indikator für die Aktivierung von Mikrogliazellen wird die NO-Produktion herangezogen. Da NO in aktivierten Mikrogliazellen durch die iNOS gebildet wird, kann indirekt über die iNOS-mRNA-Expression auf den Aktivierungszustand der Mikrogliazellen geschlossen werden.

Mittels RT-PCR wurde die iNOS-Expressionsrate nach sechs und nach 24 Stunden ermittelt und in Relation zu LPS-aktivierten Mikrogliazellen (100%) grafisch dargestellt (Abb. 3). Es konnte gezeigt werden, dass Triptolid keinen Einfluß auf die mRNA-Expression von iNOS hat und somit nicht zu einer vermehrten Mikrogliaaktivierung beiträgt, jedoch die LPS-induzierte Stimulation signifikant reduzieren kann.

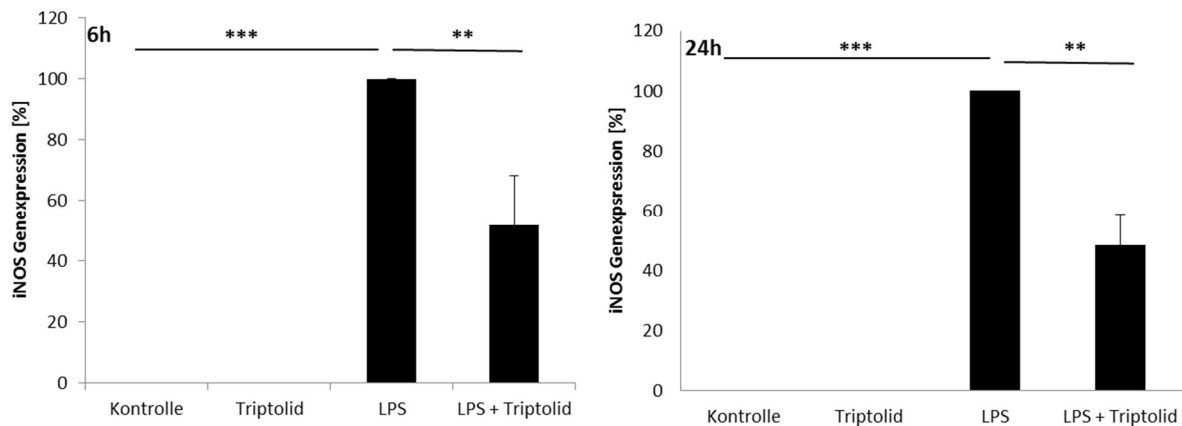


Abb. 3: Triptolid reduziert die mRNA-Expression von iNOS in LPS-aktivierten Mikrogliazellen nach 6 und nach 24 Stunden. Unstimulierte (Kontrolle) und stimulierte (LPS) Mikrogliazellen (6 und 24 Stunden) wurden lysiert, RNA isoliert und mittels RT-PCR die Expression von iNOS analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte in % bezogen auf die LPS-Stimulation (100%) \pm SEM (n =3); ** p < 0,01, *** p < 0,001.

3.1.2 Einfluß von Triptolid auf die Expression proinflammatorischer Zytokine in

Mikrogliazellen

Der Einfluß von Triptolid auf die Expression proinflammatorischer Zytokine in Mikrogliazellen wurde anhand von IL-1 β , IL-6, TNF- α und IL-23 zu zwei verschiedenen Zeitpunkten mittels Real-time PCR untersucht. Die Ergebnisse aus den Versuchen nach 6-stündiger Inkubation sind in Abb. 4 dargestellt. Als Kontrolle dienten jeweils unstimulierte und mit Triptolid behandelte Zellen. Es ließ sich kein Einfluss von Triptolid auf die basale Expressionsrate von IL-1 β , IL-6, TNF- α oder IL-23 nach sechs Stunden nachweisen. Durch LPS wurde die Expression der proinflammatorischen Zytokine induziert. Bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit LPS und Triptolid zeigte sich eine signifikante Reduktion der Expressionsrate von IL-1 β , IL-6 und TNF- α . Die LPS-induzierte Expression von IL-23 konnte nicht durch die Koinkubation mit Triptolid reduziert werden. Im Gegenteil zeigte sich eine verstärkte IL-23 Expressionsrate in Mikrogliazellen bei simultaner Inkubation der Zellen mit LPS und Triptolid, wohingegen eine alleinige Inkubation mit Triptolid keine Änderung der Expressionsrate zu unstimulierten Zellen zeigte.

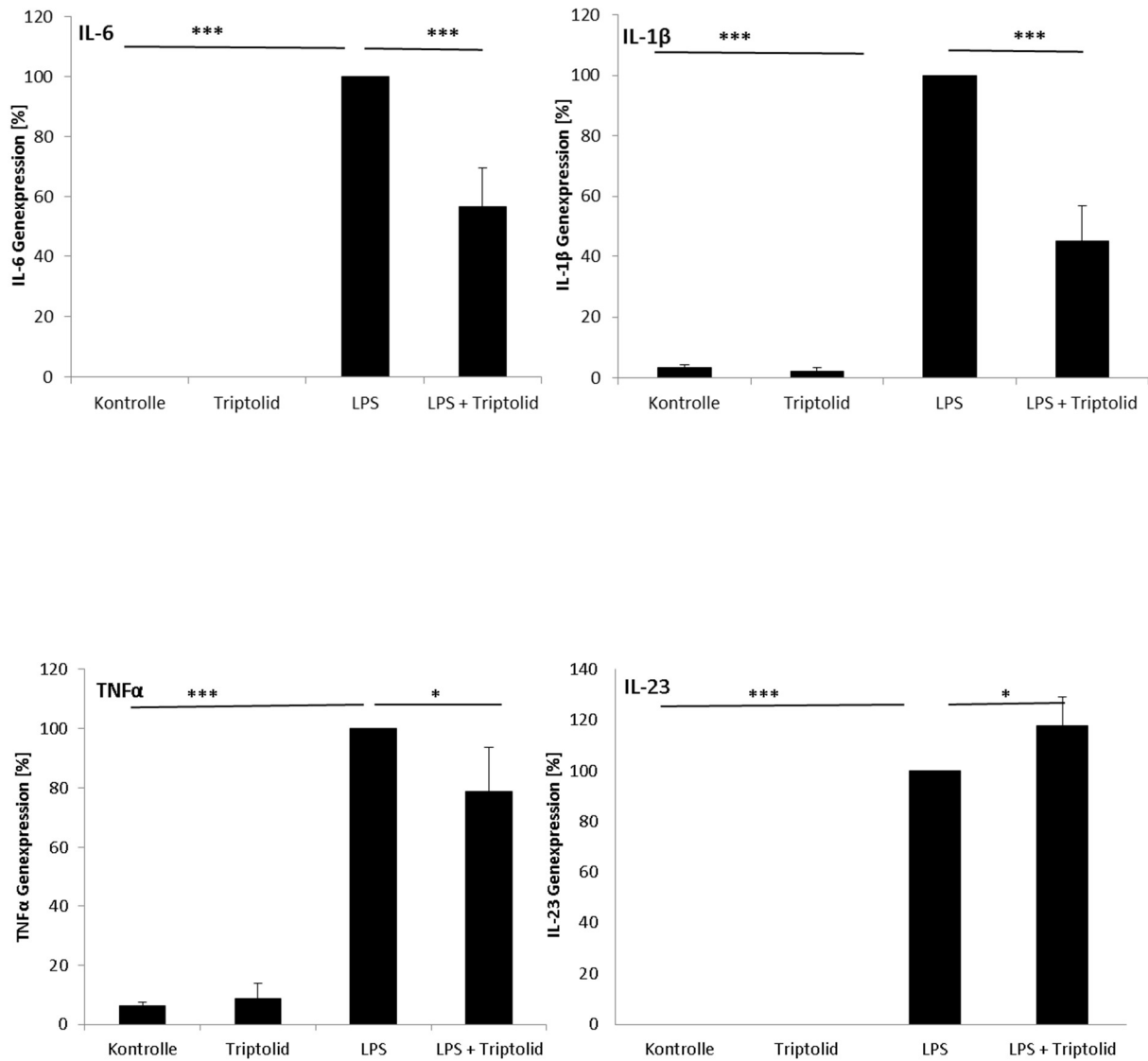


Abb. 4: Triptolid reduziert die mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine in LPS-aktivierten Mikrogliazellen nach sechs Stunden. Unstimulierte (Kontrolle) und stimulierte (LPS) Mikrogliazellen wurden lysiert, RNA isoliert und mittels RT-PCR die Expression von IL-6, IL-1β, TNF-α und IL-23 analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte in % bezogen auf die LPS-Stimulation (100%) \pm SEM (n = 3). *** p < 0,001.

Der Einfluss von Triptolid auf die Expressionsrate der proinflammatorischen Zytokine IL-1β, IL-6 und TNF-α wurde auch nach 24 Stunden analysiert. Es zeigte sich, dass Triptolid in LPS-stimulierten Mikrogliazellen die Expressionsrate von IL-1β, IL-6 und TNF-α nicht reduzieren konnte (Abb. 5).

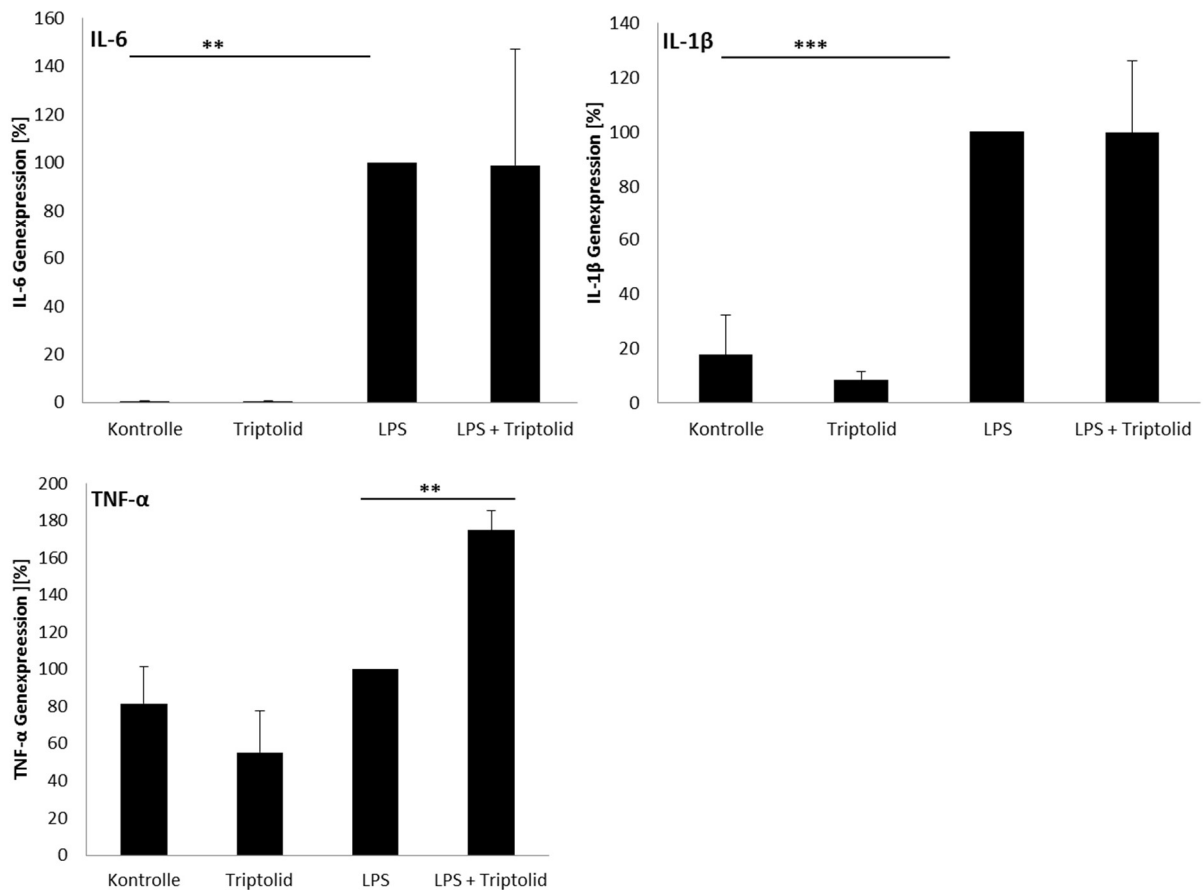


Abb. 5: Triptolid hat keinen inhibitorischen Einfluss auf die mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine in LPS-aktivierten Mikrogliazellen nach 24 Stunden. Unstimulierte (Kontrolle) und stimulierte (LPS) Mikrogliazellen wurden lysiert, RNA isoliert und mittels RT-PCR die Expression von IL-1 β , IL-6 und TNF- α analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte in % bezogen auf die LPS-Stimulation (100%) \pm SEM (n = 3). **p < 0,01, *** p < 0,001.

Zusammenfassend zeigen diese Versuche, dass durch LPS die mRNA-Expressionsrate der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1 β und TNF- α sowie IL-23 signifikant gesteigert wird und dass Triptolid die LPS-induzierte mRNA-Expression dieser Zytokine, mit Ausnahme von IL-23, in Mikroglia nach sechs Stunden signifikant reduziert.

3.1.3 Einfluß von Triptolid auf die IL-6 Freisetzung durch Mikrogliazellen

Neben der mRNA-Expression wurde auch die Expression exemplarisch für das Zytokin IL-6 auf Proteinebene mittels ELISA untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit Triptolid die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins durch Mikrogliazellen nach sechs Stunden signifikant reduziert wurden (Abb. 6). Triptolid reduzierte im Mittel die IL-6-Freisetzung nach LPS-Stimulation von 32 ng/ml auf 14 ng/ml.

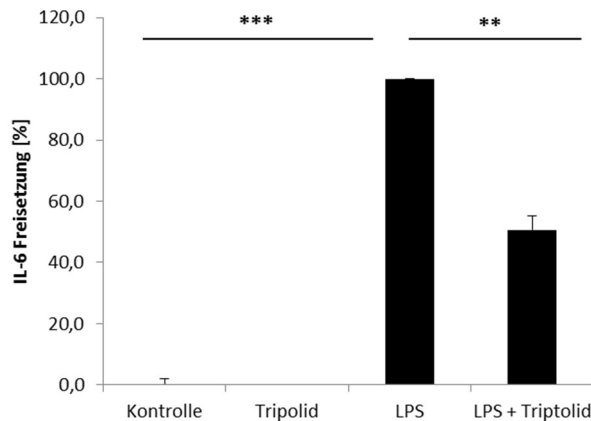


Abb. 6: Triptolid beeinflusst die Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6 nach LPS-Stimulation in primären Mikrogliazellen auf Proteinebene (ELISA). *Unstimulierte und stimulierte Mikrogliazellen (sechs Stunden) wurden auf die Sekretion von IL-6 in den Zellkulturüberstand hin untersucht. Dargestellt ist der Mittelwert in % der LPS aktivierten Mikrogliazellen \pm SEM (n = 3). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.*

3.2 Triptolid beeinflusst die Expression von Chemokinen in Mikrogliazellen

Neben proinflammatorischen Zytokinen spielen die Chemokine eine weitere wichtige Rolle im Pathomechanismus der Neuroinflammation. Exemplarisch wurden in dieser Arbeit die Chemokine CCL2, CCL3, CCL5, CCL7 und CXCL10 untersucht.

Die Stimulation mit LPS führte in den Mikrogliazellen zu einer vermehrten Genexpression der Chemokine CCL2, CCL3, CCL5, CCL7 und CXCL10, wohingegen Triptolid alleine keinen Effekt auf die Chemokinexpression der hier untersuchten Chemokine hat (Abb. 7). Bei Koinkubation von LPS und Triptolid wurde die LPS-induzierte Expression der Chemokine in den Mikrogliazellen nach sechs Stunden signifikant reduziert. Den stärksten Effekt hat Triptolid auf die LPS-induzierte CCL2-Expression in Mikrogliazellen, wo diese von 100% auf 26% reduziert werden konnte.

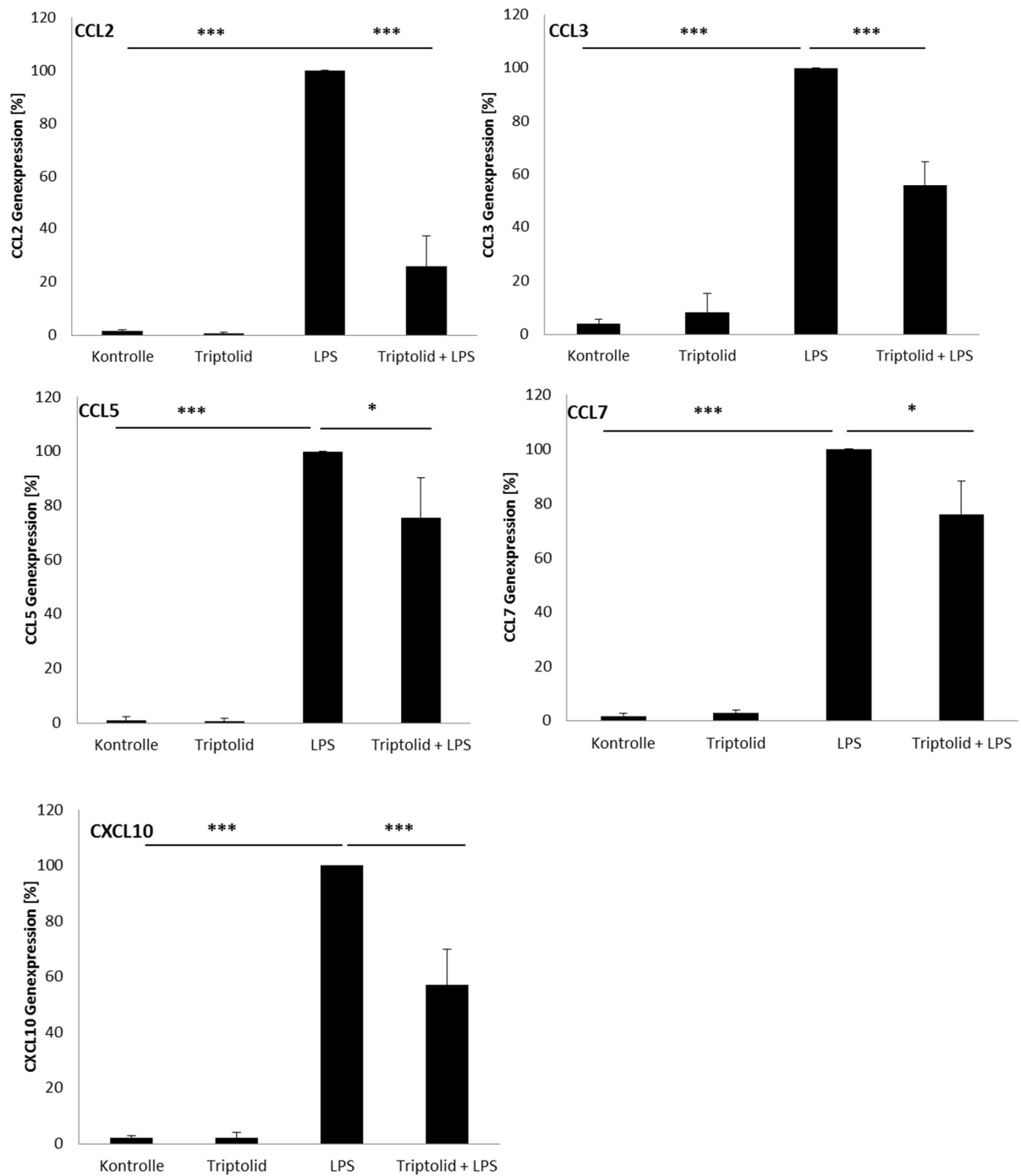
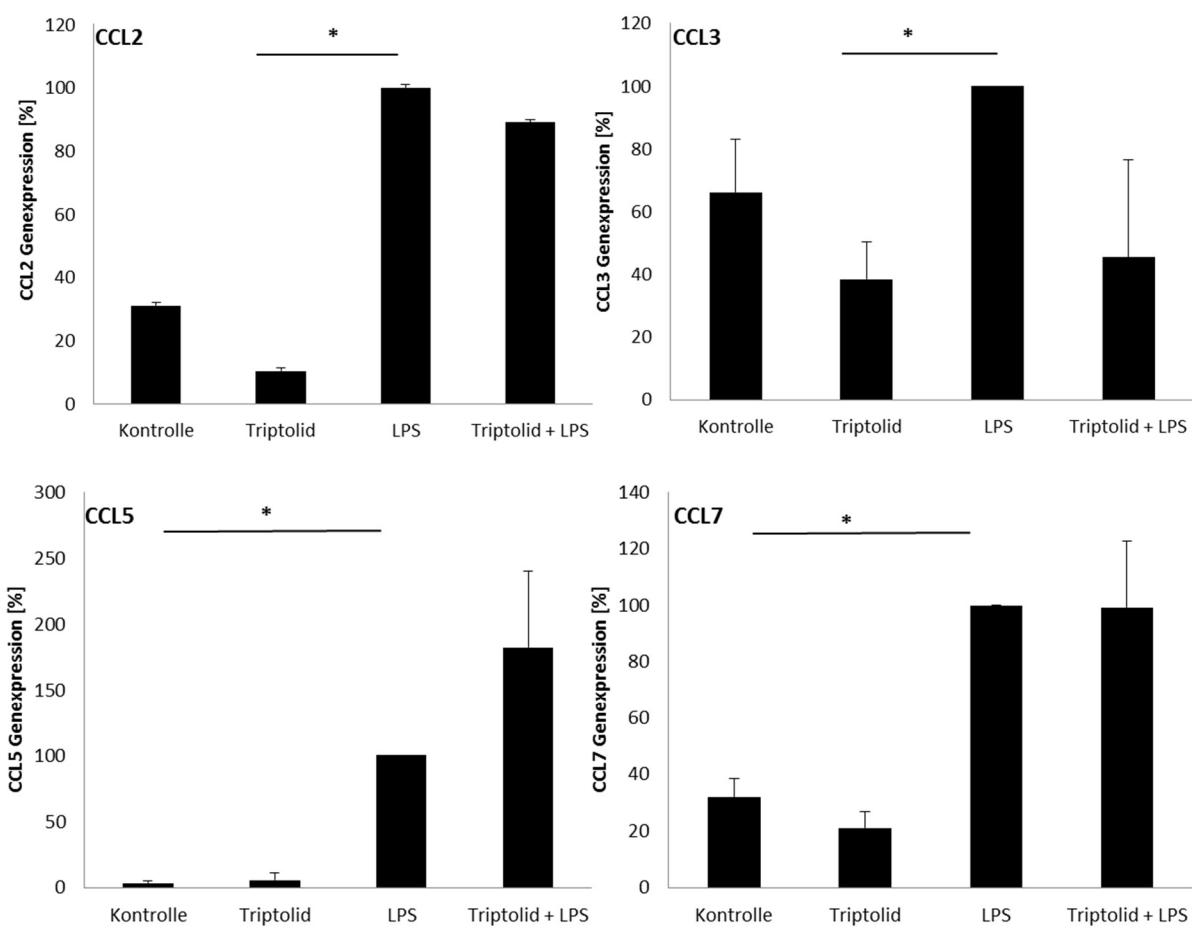


Abb. 7: Triptolid reguliert die Expression von Chemokinen nach LPS-Stimulation in primären Mikrogliazellen nach sechs Stunden herunter. *Unstimulierte und stimulierte Mikrogliazellen (sechs Stunden) wurden lysiert, RNA isoliert und mittels RT-PCR die Expression ausgewählter Chemokine analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert in % der LPS aktivierten Mikrogliazellen \pm SEM (n = 3). * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.*

Der Effekt von Triptolid auf die Inhibition der LPS-induzierten Expression der Chemokine wurde auch nach 24 Stunden untersucht. Es zeigte sich, dass auch nach 24 Stunden die Expression der Chemokine CCL2, CCL3, CCL5, CCL7 und CXCL10 in den LPS-aktivierten Mikrogliazellen höher war als in den unstimulierten Kontrollzellen. Triptolid hatte nur einen signifikanten Effekt auf die CXCL10-Expression von aktivierten Mikrogliazellen. Auch die CCL2- und die CCL3-Expression wurden durch Triptolid reduziert. Allerdings waren diese Effekte nicht signifikant (Abb. 8).



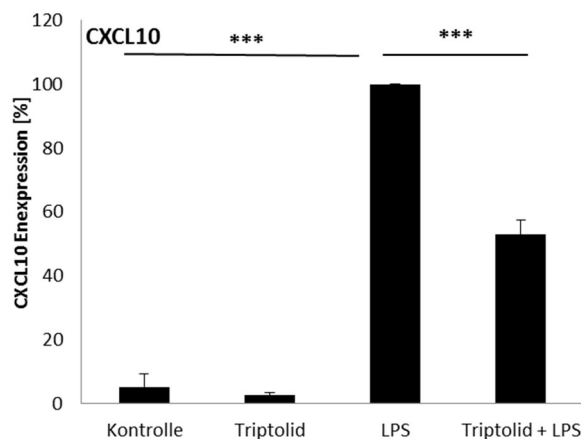
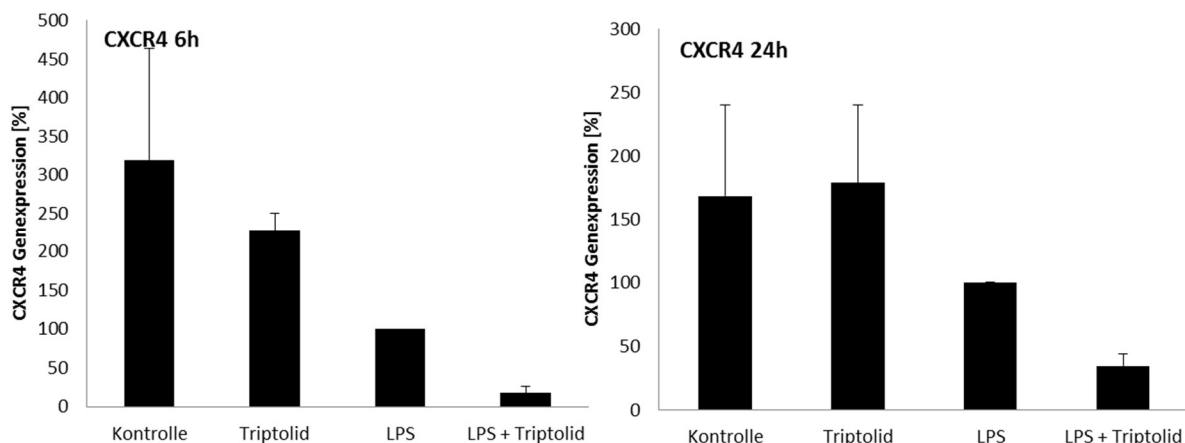


Abbildung 8: Triptolid beeinflusst die Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine nach LPS-Stimulation in primären Mikrogliazellen. Unstimulierte und stimulierte Mikrogliazellen (24 Stunden) wurden lysiert, RNA isoliert und mittels RT-PCR die Expression ausgewählter Chemokine analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert in % der LPS aktivierten Mikrogliazellen \pm SEM ($n = 3$). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

3.3 Triptolid beeinflusst die Expression von Chemokinrezeptoren in Mikrogliazellen

Neben den Chemokinen wurden auch der Einfluß von Triptolid auf die Expression von zwei ausgewählten Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 untersucht. Die Expression des Rezeptors CXCR4 wurde durch die LPS-Behandlung in den Mikroglia nicht signifikant herunterreguliert. Dieser Effekt wurde durch die Zugabe von Triptolid sowohl nach 6 als auch nach 24 Stunden verstärkt. Durch die Stimulation von Mikrogliazellen mit LPS wurde die Expression des Chemokinrezeptors CCR5 tendenziell und nicht signifikant erhöht. Nach 24 Stunden wurde weniger CCR5 Expression in den Mikroglia nach Stimulation detektiert als in den Kontrollzellen. In beiden Fällen war die CCR5 Expression auf mRNA-Ebene in den Mikrogliazellen geringer, wenn diese mit Triptolid inkubiert wurden. Diese Effekte waren allerdings nicht signifikant (Abb. 9).



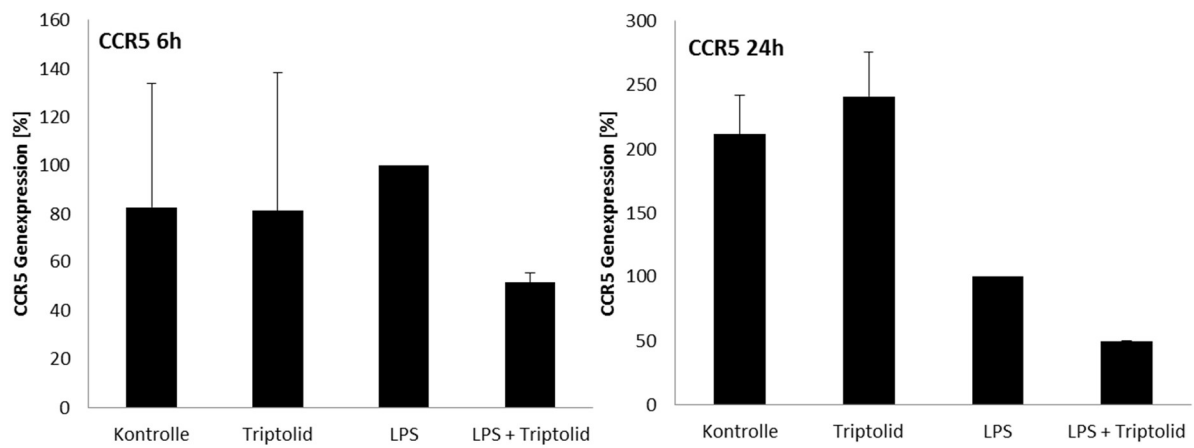


Abb. 9: Triptolid beeinflusst die Expression von Chemokinrezeptoren nach LPS-Stimulation in primären Mikrogliazellen. *Unstimulierte und stimulierten Mikrogliazellen (sechs Stunden und 24 Stunden) wurden lysiert, RNA isoliert und mittels RT-PCR die Expression ausgewählter Chemokinrezeptoren analysiert.*

3.4 Einfluss von Triptolid auf die Phagozytoseaktivität von Mikrogliazellen

Die Phagozytoseaktivität von Mikrogliazellen wurde mittels PE-markierter Latexkügelchen im Durchflusszytometer analysiert. Die Mikrogliazellen wurden mit Triptolid vor der LPS-Stimulation vorinkubiert. Anschließend wurden die Latexkügelchen dazugegeben und nach 1 Stunde die Aufnahme der markierten Latexkügelchen durch die Mikrogliazellen durchflusszytometrisch analysiert. Nach LPS-Stimulation verringert sich die Phagozytoseaktivität der Mikrogliazellen. Durch Vorinkubation der Mikrogliazellen mit Triptolid wurde die durch LPS-induzierte Hemmung der Phagozytose tendenziell wieder aufgehoben (Abb. 10A).

Des Weiteren wurde die Expression von Rezeptoren, die am Phagozytoseprozess beteiligt sind, untersucht. Unstimulierte und mit Triptolid vorinkubierte Mikrogliazellen exprimieren konstitutiv den Fc γ -Rezeptor 1 und die Expression wird sechs Stunden nach LPS-Stimulation mit oder ohne Vorinkubation mit Triptolid stark herunterreguliert. 24 Stunden nach LPS-Stimulation war die Expression des Fc γ -Rezeptors 1 im Gegensatz zu den unstimulierten Zellen stark erhöht. Durch die Vorinkubation mit Triptolid wurde die Expression des Rezeptors nicht signifikant vermindert (Abb. 10B).

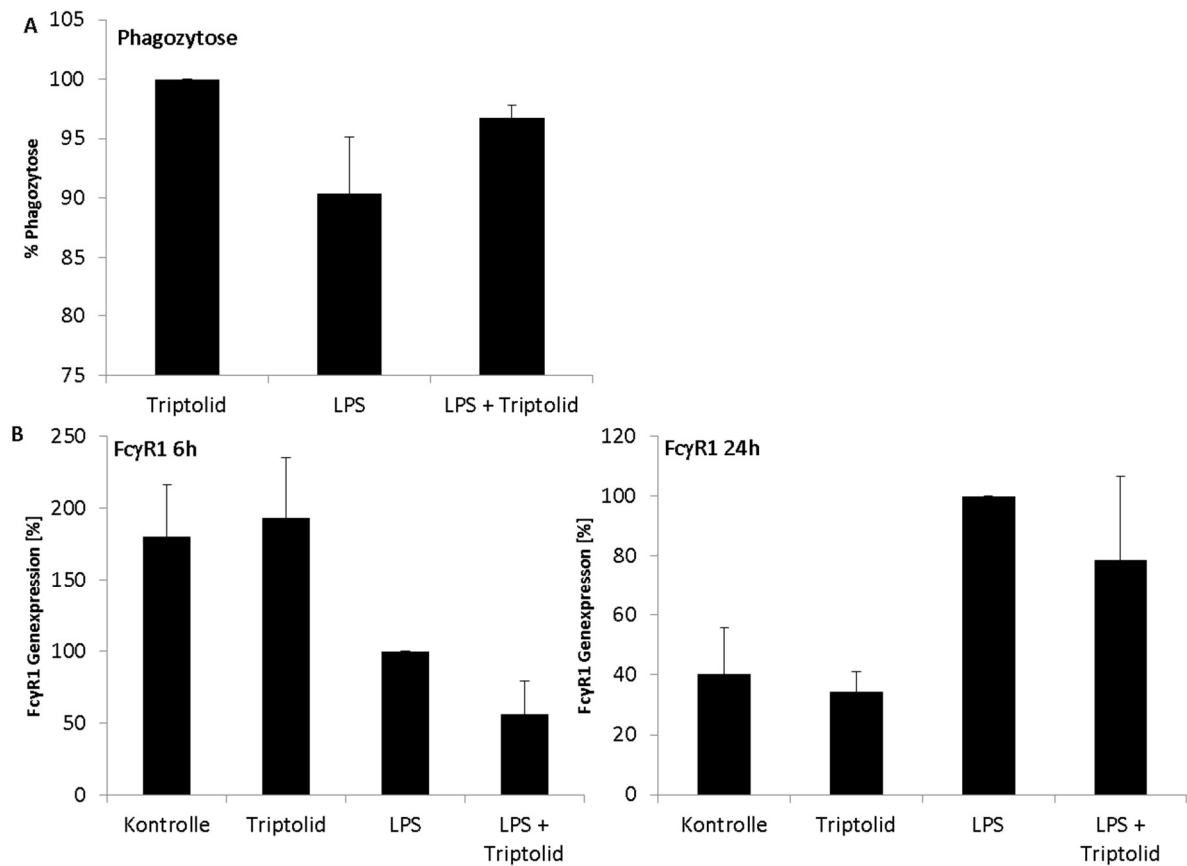


Abb. 10: Triptolid beeinflusst die Phagozytoseaktivität von stimulierten Mikrogliazellen nicht signifikant. A) Die Phagozytoseaktivität von Mikrogliazellen wurde im Durchflusszytometer unter Verwendung von PE-markierten Latexkügelchen analysiert. Die Graphen repräsentieren den prozentualen Mittelwert der Bindung bzw. Phagozytose der fluoreszenzmarkierten Latexkügelchen ($n = 3$). B) Primäre Mikrogliazellen wurden 30 Minuten vor LPS-Stimulation ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) mit Triptolid (10nM) vorbehandelt und die Expression des Fc γ -Rezeptors 1 wurde nach 6 und 24 Stunden mittels RT-PCR analysiert ($n = 3$).

4. Diskussion

Triptolid ist ein bioaktiver Inhaltsstoff aus der traditionellen chinesischen Kletterpflanze Wilfords Dreiflügelfrucht *Tripterygium wilfordii* Hook F. Es ist schon seit einiger Zeit für seine immunsuppressive, anti-inflammatorische und anti-proliferative Wirkung bekannt (Brinker et al. 2007; Shui G et al. 2010).

In dieser Arbeit wurde in einem Modellsystem getestet, ob Triptolide als mögliches Therapeutikum für inflammatorisch getriggerte Erkrankungen des ZNS in Frage kommen könnten.

Die *in vitro* Stimulation von Ratten-Mikrogliazellen mit dem Inflammagen LPS induziert die Produktion neurotoxischer Substanzen wie beispielsweise TNF- α , IL-1 β , Stickoxid (NO) und Superoxide, was zum Untergang von neuronalen Zellen führt. Aufgrund seiner immunsuppressiven und anti-inflammatorischen Wirkung wurde in dieser Arbeit getestet, ob Triptolid die inflammatorische Antwort von Ratten-Mikrogliazellen inhibieren kann und ob Triptolid einen Einfluß auf die Sekretion und Expression von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Chemokinrezeptoren sowie auf die Phagozytoseaktivität hat.

Stickoxid (NO) ist eine neurotoxische Substanz sowie ein Mediator der Neuroinflammation und wird vermehrt bei neurodegenerativen Erkrankungen gebildet (Zhao, 2019). In post-mortem Untersuchungen an M. Parkinson-Patienten wurde eine vermehrte iNOS-Expression in Mikrogliazellen nachgewiesen und dass die Hemmung dieser Synthase das Sterben dopaminerger Neurone reduziert (Hunot et al. 1996). Auch wurde in Alzheimer-Modellen an Mäusen gezeigt, dass eine Hemmung der Synthase zu einer verminderten Aggregation von A β -Proteinen führt (Kummer et al. 2011).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die iNOS-Genexpressionsrate in LPS-aktivierten Mikrogliazellen induziert wird und diese durch Zugabe von Triptolid signifikant reduziert wird. Diese Ergebnisse sind konform mit den Untersuchungen von Zhou et al. (2003), in denen auch eine reduzierte iNOS-Expression nach Zugabe von Triptolid nachgewiesen werden konnte.

Die massive Freisetzung proinflammatorischer Zytokine stellt einen wesentlichen Pathomechanismus neurodegenerativer Erkrankungen dar (Tang und Le, 2016). Deswegen wurde in dieser Arbeit ebenfalls der Einfluss von Triptolid auf ausgewählte proinflammatorische Zytokine untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass Triptolid die LPS-induzierte Expression der Zytokine IL-1 β und TNF- α signifikant reduziert. Diese Ergebnisse stehen ebenfalls im Einklang mit den Ergebnissen von Zhou et al. (2003).

Ein weiteres wichtiges Zytokin ist das IL-6. IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin, das eine Schlüsselrolle in der Regulation der immunologischen Antwort und der Entzündungsreaktionen einnimmt. Es wurde beschrieben, dass IL-6 sowohl als proinflammatorisches Zytokin wirken kann, indem es durch Induktion

der Chemokinsynthese und Hochregulation von Adhäsionsmolekülen Leukozyten aus der Peripherie in den Liquor rekrutiert als auch unter bestimmten Umständen anti-inflammatorisch wirkt, indem es die TNF- α -Expression inhibiert. IL-6 wird auch im ZNS von Patienten mit Multipler Sklerose und Morbus Alzheimer in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen (Rothaug et al. 2016). Allerdings liegen auch gegensätzliche Daten vor, bei denen keine erhöhten IL-6-Konzentrationen im ZNS von Patienten mit Morbus Alzheimer gefunden worden sind (März et al. 1997). IL-6 wird im ZNS sowohl von Astrozyten als auch Mikrogliazellen und Neuronen gebildet (März et al. 1998, Suzumura et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Triptolid auf die Mikrogliazellen untersucht und es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Triptolid die Expression von IL-6 nicht nur auf mRNA-Ebene sondern auch auf Proteinebene signifikant reduziert (Abb. 6). Da Astrozyten als Hauptquelle der IL-6 Produktion im ZNS beschrieben wurden, sollte in weiterführenden Arbeiten zusätzlich der Effekt von Triptolid auf die IL-6-Expression von Astrozyten untersucht werden.

Neben den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β , TNF- α und IL-6 gibt es noch ein weiteres Zytokin IL-23, das von Mikrogliazellen im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen exprimiert wird. So wurde bei Patienten mit Multipler Sklerose eine erhöhte Expression von IL-23 im ZNS gefunden, die auf Mikrogliazellen zurückzuführen ist (Li et al. 2007). Auch wurde für den Morbus Alzheimer beschrieben, dass die genetische Deletion von IL-23 in einem Mausmodell zu einer Reduktion von A β -Plaques führt (vom Berg et al. 2012). Hier wurde der Einfluss von Triptolid auf die IL-23-Expression in Mikrogliazellen untersucht. Durch LPS konnte die IL-23-Expression in den Mikrogliazellen induziert, jedoch nicht durch Triptolid inhibiert oder reduziert werden (Abb. 4). Deswegen wurde auf die Untersuchung nach 24 Stunden verzichtet.

Neben der Bildung von proinflammatorischen Zytokinen ist die Migration der Zellen zu dem Ort der Schädigung ein weiterer zentraler Mechanismus in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen. Die Zellmigration wird vornehmlich durch die Expression von Chemokinen und deren Rezeptoren bestimmt.

Da Studien gezeigt haben, dass Mikrogliazellen, die aus Hirnautopsien von AD Patienten isoliert worden sind, nach Zugabe von A β eine dosisabhängige Expression der Chemokine CCL2 und CCL3 bewirken (Sokolova et al. 2009, Tripathy et al. 2010), wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Mikrogliazellen CCL2 und CCL3 exprimieren und welchen Einfluss Triptolid auf die LPS-induzierte Chemokinexpression hat.

CCL2, auch bekannt als MCP-1, wird vornehmlich von Astrozyten exprimiert und induziert in Mikrogliazellen eine proinflammatorische Zytokinexpression sowie die Ausreifung des M1-Phänotyps (He et al. 2016). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass aktivierte Mikrogliazellen selbst CCL2

exprimieren und somit eventuell selber in einem Autoregulationsprozess zur Aktivierung und zur Attraktion anderer Mikrogliazellen zum Ort des Geschehens beitragen. Da wir zeigen konnten, dass Triptolid die CCL2-Expression in Mikrogliazellen reduzieren kann, könnte dies dazu beitragen die Selbstaktivierung und M1-Polarisation sowie die Migration zu limitieren. Da bereits gezeigt werden konnte, dass eine Inhibition der CCL2-Expression in Astrozyten zu einer verminderten Aktivierung von Mikrogliazellen führt, sollte zukünftig der Effekt von Triptolid, insbesondere auch auf Astrozyten, untersucht werden.

CCL3 (MIP-1 α) ist ein weiteres Mitglied der Chemokinfamilie, welches eine Rolle am Entzündungsgeschehen unter neuropathologischen Bedingungen spielt und sowohl von Neuronen als auch von Mikrogliazellen gebildet wird. Es wirkt als chemotaktisches Molekül über die Rezeptoren CCR1, CCR4 und CCR5 (Passos et al. 2009) und ist an der Rekrutierung der Zellen an den Ort des neuroinflammatorischen Geschehens beteiligt. Es wird angenommen, dass CCL3 eine wichtige Rolle bei der Neurodegeneration bei AD Patienten spielt. Zum einen gehen erhöhte CCL3-Serumkonzentrationen bei AD Patienten mit Persönlichkeitsstörungen und Stimmungsschwankungen einher (Geppert et al. 2010) und zum anderen wird berichtet, dass ein CCL3-Polymorphismus mit AD assoziiert ist (Flex et al. 2014). Des Weiteren zeigen Mikrogliazellen aus AD Patienten, dass diese nach A β -Exposition vermehrt CCL3 exprimieren (Smits et al. 2002). In diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass Triptolid signifikant die Genexpression von CCL3 in LPS-aktivierten Mikrogliazellen nach sechs Stunden reduzieren kann und somit als Modulator der Chemokinexpression in Frage kommt.

Ein weiteres Mitglied der MCP-Familie wie CCL2 (MCP-1) ist CCL7 (MCP-3), ein Chemokin, das hauptsächlich für die Rekrutierung von Leukozyten verantwortlich ist. CCL7 ist wie CCL2 bei mehreren ZNS-Erkrankungen, die mit einer überschießenden Entzündungsreaktion assoziiert sind, hochreguliert. CCL7 leitet wie CCL2 seine biologischen Signale über die Bindung an den CCR2-Rezeptor weiter (Bose und Cho, 2013). Eine Minderung der Genexpression von CCL2 und CCL7, wie wir es in dieser Arbeit durch Triptolid in Mikrogliazellen zeigen konnten, bietet einen Angriffspunkt für die Modulation der CCL2/CCL7-CCR2-Achse im neuroinflammatorischen Geschehen.

Auch CCL5 ist ein Chemokin, das im ZNS konstitutiv exprimiert wird und eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase im ZNS spielt. So wurde auch für CCL5 beschrieben, dass es Immunzellen an den Ort der Läsion im ZNS rekrutiert, wodurch es zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion kommt (Glabinski et al. 1998). Allerdings wurde auch für CCL5 im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen ein gegenteiliger Effekt beschrieben. CCL5 kann auch eine neuroprotektive Wirkung auf Neuronen ausüben. Diese dichotome Wirkungsweise kann durch die Bindung von Chemokinen an unterschiedliche Rezeptoren erklärt werden. Ob eine Verminderung der

CCL5-Genexpression im Rahmen einer Triptolidbehandlung im Rahmen einer neurodegenerativen Erkrankung hat, müssen weitergehende Studien zeigen.

CXCL10 ist ein Chemokin, das über die Bindung an CXCR3 vor allem für die Rekrutierung von Leukozyten und insbesondere von aktivierten T-Zellen an den Ort des Entzündungsgeschehens verantwortlich ist. Interessanterweise kann CXCL10 sowohl einen schädlichen als auch einen protektiven Einfluss ausüben, je nach Ätiologie und Kontext der Neuroinflammation (Michlmayr und Lim, 2014).

In unserer Arbeit war CXCL10 das einzige Zytokin, dessen Genexpression sowohl nach sechs Stunden als auch nach 24 Stunden durch LPS induziert und durch Koinkubation mit Triptolid reduziert werden konnte. Da eine vermehrte CXCL10-Expression in neurodegenerativen Erkrankungen nachgewiesen wurde, kann Triptolid durch die Reduktion der CXCL10-Expression modulierend in das neuroinflammatorische Geschehen eingreifen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Triptolid die Genexpression von CCL2, CCL3, CCL5, CCL7 und CXCL10 kurzfristig nach sechs Stunden reduzieren kann, jedoch bei der gewählten Dosis und einmaliger Gabe keinen Langzeiteffekt hat. Für einen therapeutischen Einsatz von Triptolid bei neurodegenerativen Erkrankungen sollte weiterführend untersucht werden, ob die anti-inflammatorische Wirkung und die Modulation des Chemokinmusters bei höheren Konzentrationen und mehrmaliger Gabe länger anhält und ob bei dieser Dosierung noch keine unerwünschten Nebenwirkungen auftreten. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob eine Kombination von therapeutischen Substanzen in Erwägung zu ziehen ist und wie sich dies auf die Zellen des ZNS auswirkt.

Da in der Literatur beschrieben worden ist, dass der CCR5/CCL3-Signalweg eine Rolle in der Pathogenese der Alzheimerdemenz spielt (Martin und Delarasse 2018), haben wir auch den Einfluss von Triptolid auf die Expression des Rezeptors CCR5 untersucht. Erstaunlicherweise haben wir feststellen können, dass die CCR5-Expression in unserem Modell durch Behandlung der Mikrogliazellen für sechs Stunden mit LPS nicht moduliert wird und bei Koinkubation mit LPS und Triptolid lediglich tendenziell und nicht signifikant reduziert wird. Interessanterweise zeigte sich in unserem Modell, dass die Expression von CCR5 24 Stunden nach LPS-Simulation geringer ist, als in unstimulierten Zellen. Diese Beobachtung ist konform mit den Ergebnissen von Lively und Schlichter (2018), die ebenfalls eine verminderte Expression von CCR5 nach LPS Stimulation von Ratten-Mikrogliazellen beobachten konnten. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass die Rolle von CCR5 in dem Pathomechanismus der AD weiterhin kontrovers diskutiert wird, da es unterschiedliche Ergebnisse dazu gibt (Li und Zhu, 2019). In einigen Studien wird gezeigt, dass die CCR5-Expression eine Rolle in der Pathogenese der AD

spielt (Lee et al. 2009), wohingegen es auch Studien gibt, die keinen Zusammenhang zwischen CCR5 und dem Risiko an AD zu erkranken postulieren (Huerta et al. 2004). In weiterführenden Arbeiten sollte untersucht werden, ob der inhibitorische Effekt von Triptolid auch hier nach Mehrfachgabe und Dosisanpassung aufrechterhalten werden kann und wie der Einfluss auf die CCR5-Expression in Mikrogliazellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten ist.

Da CXCR4 der Rezeptor für das pleiotrope Chemokin CXCL12 ist, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Triptolid einen Effekt auf die CXCR4-Expression in Mikrogliazellen hat. Es wurde beschrieben, dass durch LPS-Aktivierung von Ratten-Mikrogliazellen, die CXCR4-Expression verstärkt wird. Bei genauerer Betrachtung der Ergebnisse sieht man jedoch, dass die verstärkte CXCR4-Expression in den Mikrogliazellen nur bei geringen LPS-Konzentrationen erreicht wird. Bei 5 ng/ml LPS als Stimulus, wie es in dieser Arbeit verwendet wurde, wird keine Modulation der CXCR4-Expression gesehen. Somit sind unsere Ergebnisse konform mit denen von Lipfert et al. (2013) und auch wenn keine verstärkte CXCR4-Expression durch die hier gewählte LPS-Konzentration erzielt werden konnte, so senkt Triptolid die CXCR4-Expression in Mikrogliazellen bei Koinkubation mit LPS. Dies deutet darauf hin, dass Triptolid in der Lage ist, die CXCR4-Expression in Ratten-Mikrogliazellen zu modulieren. Ob Triptolid auch einen Einfluss auf die funktionelle Eigenschaften der CXCR4-exprimierenden Mikrogliazellen hat, sollte beispielsweise in Migrationsversuchen untersucht werden.

Einen weiteren Pathomechanismus im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen stellt die Phagozytose dar. Da Mikrogliazellen die Makrophagen des ZNS sind, sind sie hauptverantwortlich für die Beseitigung von Abfallstoffen und Zellresten durch Phagozytose. Ob eine gesteigerte Phagozytose bei neurodegenerativen Erkrankungen von Vorteil ist, wird weiterhin kontrovers diskutiert.

In einigen Studien wird die chronische Inflammation und die Aktivierung der Mikroglia, einhergehend mit einer erhöhten Phagozytosekapazität, als weiterer pathognomischer Faktor angesehen (Neniskyte et al. 2011). Bisher wurde angenommen, dass die Beseitigung der A β -Plaques beim Morbus Alzheimer vorteilhaft ist, da dadurch die Mikroglia-vermittelte Entzündungsreaktion eingedämmt werden kann. Allerdings wurde in Untersuchungen auch gezeigt, dass eine Immunisierung mit A β zwar die A β -Plaques reduziert, aber nicht vor einem Progress der Krankheit schützt (Holmes et al. 2008).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Triptolid auf die Expression des Fc γ -Rezeptors 1 (CD64) untersucht. Der Fc γ -Rezeptor 1 ist lediglich einer von mehreren Rezeptoren, die an dem Prozess der Phagozytose beteiligt sind. Die Ergebnisse dazu sind konträr. Sechs Stunden nach Aktivierung der Mikrogliazellen wird eine verminderte Fc γ R1-Expression detektiert, die tendenziell durch die Koinkubation mit Triptolid weiter reduziert wird. 24 Stunden nach Aktivierung wurde die Fc γ R1-Genexpression induziert, auf die Triptolid allerdings keinen modulatorischen Einfluss hat. Auch in dem

funktionellen Test kam es zu keinen signifikanten Ergebnissen. Tendenziell wird die Phagozytoseaktivität der Mikrogliazellen nach LPS-Stimulation erniedrigt und durch die Behandlung mit Triptolid wieder verstärkt. Diese nicht eindeutigen Ergebnisse könnten darauf zurückzuführen sein, dass in dieser Arbeit die Phagozytoseaktivität an Mikrogliazellen des M1-Typs untersucht wurde. Es ist beschrieben, dass Mikrogliazellen des M2a-Phänotyps eine gesteigerte Phagozytoseaktivität zeigen (Tang und Le, 2016). Der M2-Phänotyp kann durch die Behandlung der Zellen mit IL-4 oder IL-13 induziert werden, so dass der Einfluss von Triptolid auf Mikrogliazellen des M2a-Phänotyps in weiteren Studien untersucht werden sollte.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit in einem *in vitro*-Modellsystem mit primären Ratten-Mikrogliazellen gezeigt, dass Triptolid eine potentiell neuroprotektive Wirkung hat, indem es einen Einfluss auf die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und deren Rezeptoren beeinflusst sowie die Phagozytoseaktivität von Mikrogliazellen moduliert. In weiteren Studien muss gezeigt werden, ob Triptolid auch *in vivo* die neuroinflammatorischen Reaktionen protektiv beeinflussen kann, so dass der Progress der Neurodegeneration verlangsamt oder aufgehalten werden kann.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Triptolid auf Mikrogliazellen in einem *in vitro* Modell untersucht mit der Fragestellung, ob diese Substanz in der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen eingesetzt werden kann.

Die steigende Prävalenz neurodegenerativer Erkrankungen wie der M. Alzheimer und der M. Parkinson macht die Erforschung neuer Therapieoptionen notwendig. Neurodegenerativen Erkrankungen ist gemeinsam, dass diesen eine Dysregulation des lokalen Immunsystems zugrunde liegt, die zu einer chronischen Inflammation mit Neuronenverlust und damit Progredienz der Erkrankung führt. Eine Eindämmung der Neuroinflammation, an der hauptsächlich Mikrogliazellen beteiligt sind, ist somit ein vielversprechender Therapieansatz.

Triptolid, eine bioaktive Komponente aus der chinesischen Kletterpflanze Wilfords Dreiflügelfrucht (*Tripterygium wilfordii*) wird traditionell in der chinesischen Medizin zur Behandlung von entzündungsvermittelten Erkrankungen, wie bspw. Arthritis, eingesetzt.

In dieser Arbeit wurde Triptolid in einem neuroinflammatorischen *in vitro* Modell untersucht, ob es zu einer Veränderung der Zytokinsekretion, der Proliferation und Migration sowie der Phagozytoseaktivität kommt, wenn primäre Mikrogliazellen aus den Hirnen neugeborener Ratten mit LPS stimuliert und mit Triptolid kokubiert wurden.

Es wurde eine signifikante Reduktion der Expression von iNOS in LPS-stimulierten Mikroglia nach Kokubation mit Triptolid nachgewiesen. Auch die Untersuchungen des Genexpressionsprofils der proinflammatorischen Zytokine in aktivierten Mikrogliazellen zeigte, dass die Expression der Zytokine IL-6, IL-1 β und TNF- α durch Triptolid signifikant gesenkt wurde. Auf Proteinebene wurde ebenfalls eine signifikante Reduktion der Freisetzung von IL-6 in Mikrogliazellen nachgewiesen.

Neben proinflammatorischen Zytokinen ist auch das Chemokinsystem mit dem neuroinflammatorischen und neurodegenerativem Geschehen im ZNS assoziiert. Veränderungen im Chemokinmuster kann eine Grundlage der chronischen Inflammationsreaktion darstellen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Triptolid modulierend auf das Chemokinsystem wirkt, indem es die Genexpression der Chemokine CCL2, CCL3, CCL5, CCL7 und CXCL10 in aktivierten Mikrogliazellen signifikant reduziert. Einen weniger ausgeprägten Effekt hat Triptolid auf die Expression der Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4. Hier reduziert Triptolid lediglich die Genexpression des Rezeptors CXCR4 im Vergleich zu ruhenden Mikrogliazellen.

Ein weiterer Faktor, der eine Rolle in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen spielt, ist eine veränderte Phagozytoseaktivität von Mikrogliazellen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Triptolid keinen Einfluss auf die Genexpression des Phagozytoserezeptors Fc γ R1 in LPS-aktivierten Mikrogliazellen hat und dass es tendenziell die durch LPS-induzierte verminderte Phagozytoseaktivität von Mikrogliazellen wieder aufheben kann.

Zusammenfassend ist die Neuroinflammation ein komplexer Prozess, der eine zentrale Rolle bei verschiedenen ZNS-Erkrankungen spielt. Triptolid stellt aufgrund seiner antiinflammatorischen Wirkungsweise und seinen modulierenden Effekt auf Mikrogliazellen eine vielversprechende Substanz in der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen dar.

6. Literaturverzeichnis

Abeliovich A, Schmitz Y, Fariñas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, Sulzer D, Rosenthal A. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*. 2000;25(1):239–252.

Albright AV, Shieh JT, Itoh T, Lee B, Pleasure D, O'Connor MJ, Doms RW, Gonzalez-Scarano F. Microglia express CCR5, CXCR4, and CCR3, but of these, CCR5 is the principal coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 dementia isolates. *J Virol*. 1999;73(1):205–213.

Andre R, Wheeler RD, Collins PD, Luheshi G, Pickering-Brown S, Kimer I, Rothwell NJ, Pinteaux E. Identification of a truncated IL-18R beta mRNA: a putative regulator of IL-18 expressed in rat brain. *J Neuroimmunol*. 2003;145(1-2):40–45.

Appel K, Honegger P, Gebicke-Haerter PJ. Expression of interleukin-3 and tumor necrosis factor-beta mRNAs in cultured microglia. *J Neuroimmunol*. 1995;60(1-2):83–91.

Bacon KB, Harrison JK. Chemokines and their receptors in neurobiology: perspectives in physiology and homeostasis. *J Neuroimmunol*. 2000;104(1):92–97.

Bachelier F, Graham GJ, Locati M, Mantovani A, Murphy PM, Nibbs R, Rot A, Sozzani S, Thelen M. New nomenclature for atypical chemokine receptors. *Nat Immunol*. 2014;15(3):207–208.

Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:675–705.

Banati RB, Newcombe J, Gunn RN, Cagnin A, Turkheimer F, Heppner F, Price G, Wegner F, Giovannoni G, Miller DH, Perkin GD, Smith T, Hewson AK, Bydder G, Kreutzberg GW, Jones T, Cuzner ML, Myers R. The peripheral benzodiazepine binding site in the brain in multiple sclerosis: quantitative in vivo imaging of microglia as a measure of disease activity. *Brain*. 2000;123 (Pt 11):2321–2337.

Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*. 1997;385(6617):640–644.

Bloem BR, Van Dijk JG, Beckley DJ, Roos RA, Remler MP, Bruyn GW. Altered postural reflexes in Parkinson's disease: a reverse hypothesis. *Med Hypotheses*. 1992;39(3):243–247.

Bose S, Cho J. Role of chemokine CCL2 and its receptor CCR2 in neurodegenerative diseases. *Arch Pharm Res*. 2013;36(9):1039–1050.

Braak H, Braak E. Morphological criteria for the recognition of Alzheimer's disease and the distribution pattern of cortical changes related to this disorder. *Neurobiol Aging*. 1994;15(3):355–380.

Brinker AM, Ma J, Lipsky PE, Raskin I. Medicinal chemistry and pharmacology of genus *Tripterygium* (Celastraceae) [published correction appears in *Phytochemistry*. 2007 Jul;68(13):1819]. *Phytochemistry*. 2007;68(6):732–766.

Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P. The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev*. 2007;53(2):344–354.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156–159.

- Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol*. 2017;35:441–468.
- Columba-Cabezas S, Serafini B, Ambrosini E, Aloisi F. Lymphoid chemokines CCL19 and CCL21 are expressed in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the maintenance of chronic neuroinflammation. *Brain Pathol*. 2003;13(1):38–51.
- Columba-Cabezas S, Serafini B, Ambrosini E, Sanchez M, Penna G, Adorini L, Aloisi F. Induction of macrophage-derived chemokine/CCL22 expression in experimental autoimmune encephalomyelitis and cultured microglia: implications for disease regulation. *J Neuroimmunol*. 2002;130(1-2):10–21.
- Combs CK, Johnson DE, Karlo JC, Cannady SB, Landreth GE. Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: inhibition of beta-amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPARgamma agonists. *J Neurosci*. 2000;20(2):558–567.
- De Groot CJ, Montagne L, Barten AD, Sminia P, Van Der Valk P. Expression of transforming growth factor (TGF)-beta1, -beta2, and -beta3 isoforms and TGF-beta type I and type II receptors in multiple sclerosis lesions and human adult astrocyte cultures. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1999;58(2):174–187.
- De Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2006;5(6):525–535.
- Flex A, Giovannini S, Biscetti F, Liperoti R, Spalletta G, Straface G, Landi F, Angelini F, Caltagirone C, Ghirlanda G, Bernabei R. Effect of proinflammatory gene polymorphisms on the risk of Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis*. 2014;13(4):230–236.
- Flynn G, Maru S, Loughlin J, Romero IA, Male D. Regulation of chemokine receptor expression in human microglia and astrocytes. *J Neuroimmunol*. 2003;136(1-2):84–93.
- Galasso JM, Miller MJ, Cowell RM, Harrison JK, Warren JS, Silverstein FS. Acute excitotoxic injury induces expression of monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor, CCR2, in neonatal rat brain. *Exp Neurol*. 2000;165(2):295–305.
- Galvin JE. Interaction of alpha-synuclein and dopamine metabolites in the pathogenesis of Parkinson's disease: a case for the selective vulnerability of the substantia nigra. *Acta Neuropathol*. 2006;112(2):115–126.
- Gebicke-Haerter PJ, Spleiss O, Ren LQ, Dichmann S, Norgauer J, Boddeke HW. Microglial chemokines and chemokine receptors. *Prog Brain Res*. 2001;132:525–532.
- George JM. The synucleins. *Genome Biol*. 2002;3(1):REVIEWS3002.
- Geppert AM, Losy J, Przedpelska-Ober E, Kozubski W. CCL3 correlates with the number of mood disturbances and personality changes in patients with Alzheimer's disease. *Psychiatry Res*. 2010;176(2-3):261–264.
- Glabinski AR, Tani M, Aras S, Stoler MH, Tuohy VK, Ransohoff RM. Regulation and function of central nervous system chemokines. *Int J Dev Neurosci*. 1995;13(3-4):153–165.
- Goldenberg MM. Multiple sclerosis review. *P T*. 2012;37(3):175–184.

- Gray SC, Kinghorn KJ, Woodling NS. Shifting equilibriums in Alzheimer's disease: the complex roles of microglia in neuroinflammation, neuronal survival and neurogenesis. *Neural Regen Res.* 2020;15(7):1208–1219.
- Guzman-Martinez L, Maccioni RB, Andrade V, Navarrete LP, Pastor MG, Ramos-Escobar N. Neuroinflammation as a Common Feature of Neurodegenerative Disorders. *Front Pharmacol.* 2019;10:1008.
- He M, Dong H, Huang Y, Lu S, Zhang S, Qian Y, Jin W. Astrocyte-Derived CCL2 is Associated with M1 Activation and Recruitment of Cultured Microglial Cells. *Cell Physiol Biochem.* 2016;38(3):859–870.
- Hetier E, Ayala J, Denèfle P, Bousseau A, Rouget P, Mallat M, Prochiantz A. Brain macrophages synthesize interleukin-1 and interleukin-1 mRNAs in vitro. *J Neurosci Res.* 1988;21(2-4):391–397.
- Holmes C, Boche D, Wilkinson D, Yadegarfar G, Hopkins V, Bayer A, Bullock JR, Love S, Neal JW, Zotova E, Nicoll JAR. Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet.* 2008;372(9634):216–223.
- Huerta C, Alvarez V, Mata IF, Coto E, Ribacoba R, Martínez C, Blázquez M, Guisasola LM, Salvador C, Lahoz CH, Peña J. Chemokines (RANTES and MCP-1) and chemokine-receptors (CCR2 and CCR5) gene polymorphisms in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2004;370(2-3):151–154.
- Hunot S, Boissière F, Faucheux B, Brugg B, Mouatt-Prigent A, Agid Y, Hirsch EC. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience.* 1996;72(2):355–363.
- Janabi N, Hau I, Tardieu M. Negative feedback between prostaglandin and alpha- and beta-chemokine synthesis in human microglial cells and astrocytes. *J Immunol.* 1999;162(3):1701–1706.
- Kandel ER, Schwartz J, Jessel T. Neurowissenschaften eine Einführung. *Spektrum Akademischer Verlag.* 1995; 1-786.
- Kawanokuchi J, Shimizu K, Nitta A, Yamada K, Mizuno T, Takeuchi H, Suzumura A. Production and functions of IL-17 in microglia. *J Neuroimmunol.* 2008;194(1-2):54–61.
- Kim YS, Joh TH. Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Mol Med.* 2006;38(4):333–347.
- Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 1996;19(8):312–318.
- Kummer MP, Hermes M, Delekarte A, Hammerschmidt T, Kumar S, Terwel D, Walter J, Pape HC, König S, Roeber S, Jessen F, Klockgether T, Korte M, Heneka MT. Nitration of tyrosine 10 critically enhances amyloid beta aggregation and plaque formation. *Neuron.* 2011;71(5):833–844.
- Kuno R, Wang J, Kawanokuchi J, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A. Autocrine activation of microglia by tumor necrosis factor-alpha. *J Neuroimmunol.* 2005;162(1-2):89–96.
- Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol.* 2007;17(2):210–218.

- Lee YK, Kwak DH, Oh KW, Nam SY, Lee BJ, Yun YW, Kim YB, Han SB, Hong JT. CCR5 deficiency induces astrocyte activation, Abeta deposit and impaired memory function. *Neurobiol Learn Mem.* 2009;92(3):356–363.
- Lee YB, Nagai A, Kim SU. Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia. *J Neurosci Res.* 2002;69(1):94–103.
- Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(14):8514–8519.
- Leray E, Moreau T, Fromont A, Edan G. Epidemiology of multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris).* 2016;172(1):3–13.
- Leuenroth SJ, Okuhara D, Shotwell JD, et al. Triptolide is a traditional Chinese medicine-derived inhibitor of polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(11):4389–4394.
- Li T, Zhu J. Entanglement of CCR5 and Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2019;11:209.
- Li Y, Chu N, Hu A, Gran B, Rostami A, Zhang GX. Increased IL-23p19 expression in multiple sclerosis lesions and its induction in microglia. *Brain.* 2007;130(Pt 2):490–501.
- Liebrich M, Guo LH, Schluesener HJ, Schwab JM, Dietz, K, Will BE, Meyermann R. Expression of interleukin-16 by tumor-associated macrophages/activated microglia in high-grade astrocytic brain tumors. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2007;55(1):41–47.
- Ling EA, Penney D, Leblond CP. Use of carbon labeling to demonstrate the role of blood monocytes as precursors of the 'ameboid cells' present in the corpus callosum of postnatal rats. *J Comp Neurol.* 1980; 193, 631–657.
- Lipfert J, Ödemis V, Wagner DC, Boltze J, Engle J. CXCR4 and CXCR7 form a functional receptor unit for SDF-1/CXCL12 in primary rodent microglia. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2013;39(6):667–680.
- Lively S, Schlichter LC. Microglia Responses to Pro-inflammatory Stimuli (LPS, IFN γ +TNF α) and Reprogramming by Resolving Cytokines (IL-4, IL-10). *Front Cell Neurosci.* 2018;12:215.
- Loane DJ, Byrnes KR. Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics.* 2010;7(4):366–377.
- López-Cotarelo P, Gómez-Moreira C, Criado-García O, Sánchez L, Rodríguez-Fernández JL. Beyond Chemoattraction: Multifunctionality of Chemokine Receptors in Leukocytes. *Trends Immunol.* 2017;38(12):927–941.
- Lu L, Li F, Wang X. Novel anti-inflammatory and neuroprotective agents for Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2010;9(2):232–240.
- März P, Heese K, Hock C, Golombowski F, Müller-Spahn F, Rose-John S, Otten U. Interleukin-6 (IL-6) and soluble forms of IL-6 receptors are not altered in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett.* 1997;239(1):29–32.
- März P, Cheng JG, Gadiant RA, Patterson PH, Stoyan T, Otten U, Rose-John S. Sympathetic neurons can produce and respond to interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(6):3251–3256.

- Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today*. 1999;20(6):254–257.
- Martin E, Delarasse C. Complex role of chemokine mediators in animal models of Alzheimer's Disease. *Biomed J*. 2018;41(1):34–40.
- McCallum C, Kwon S, Leavitt P, Shen DM, Liu W, Gurnett A. Triptolide binds covalently to a 90 kDa nuclear protein. Role of epoxides in binding and activity. *Immunobiology*. 2007;212(7):549–556.
- McGeer PL, Itagaki S, Tago H, McGeer EG. Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR. *Neurosci Lett*. 1987;79(1-2):195–200.
- Meinl E, Krumbholz M, Hohlfeld R. B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Ann Neurol*. 2006;59(6):880–892.
- Michlmayr D, Lim JK. Chemokine receptors as important regulators of pathogenesis during arboviral encephalitis. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:264.
- Minter MR, Taylor JM, Crack PJ. The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2016;136(3):457–474.
- Mor DE, Daniels MJ, Ischiropoulos H. The usual suspects, dopamine and alpha-synuclein, conspire to cause neurodegeneration. *Mov Disord*. 2019;34(2):167–179.
- Moser B, Willimann K. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann Rheum Dis*. 2004;63 Suppl 2(Suppl 2):ii84–ii89.
- Neniskyte U, Neher JJ, Brown GC. Neuronal death induced by nanomolar amyloid β is mediated by primary phagocytosis of neurons by microglia. *J Biol Chem*. 2011;286(46):39904–39913.
- Niu H, Álvarez-Álvarez I, Guillén-Grima F, Aguinaga-Ontoso I. Prevalence and incidence of Alzheimer's disease in Europe: A meta-analysis. Prevalencia e incidencia de la enfermedad de Alzheimer en Europa: metaanálisis. *Neurologia*. 2017;32(8):523–532.
- Olanow CW, Tatton WG. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci*. 1999;22:123–144.
- Park KW, Lee DY, Joe EH, Kim SU, Jin BK. Neuroprotective role of microglia expressing interleukin-4. *J Neurosci Res*. 2005;81(3):397–402.
- Passos GF, Figueiredo CP, Prediger RD, Pandolfo P, Duarte FS, Medeiros R, Calixto JB. Role of the macrophage inflammatory protein-1 α /CC chemokine receptor 5 signaling pathway in the neuroinflammatory response and cognitive deficits induced by beta-amyloid peptide. *Am J Pathol*. 2009;175(4):1586–1597.
- Pinteaux E, Parker LC, Rothwell NJ, Luheshi GN. Expression of interleukin-1 receptors and their role in interleukin-1 actions in murine microglial cells. *J Neurochem*. 2002;83(4):754–763.
- Power CA, Proudfoot AE. The chemokine system: novel broad-spectrum therapeutic targets. *Curr Opin Pharmacol*. 2001;1(4):417–424.

- Premack BA, Schall TJ. Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nat Med*. 1996;2(11):1174–1178.
- Rezaie P, Male D. Mesoglia & microglia--a historical review of the concept of mononuclear phagocytes within the central nervous system. *J Hist Neurosci*. 2002;11(4):325–374.
- Rose JW, Hill KE, Watt HE, Carlson NG. Inflammatory cell expression of cyclooxygenase-2 in the multiple sclerosis lesion. *J Neuroimmunol*. 2004;149(1-2):40–49.
- Rothaug M, Becker-Pauly C, Rose-John S. The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(6 Pt A):1218–1227.
- Saud K, Herrera-Molina R, Von Bernhardi R. Pro- and anti-inflammatory cytokines regulate the ERK pathway: implication of the timing for the activation of microglial cells. *Neurotox Res*. 2005;8(3-4):277–287.
- Schneider JA, Arvanitakis Z, Leurgans SE, Bennett DA. The neuropathology of probable Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Ann Neurol*. 2009;66(2):200–208.
- Shu HY, Zhang CF, Huang GY, Lee JH, Kim SU, Gwag BJ, Lee YB.. Effects of *Tripterygium Wilfordii* Hook F. on menstruation: A clinical analysis of 83 cases. *Acta Univ. Med. Tongji*. 1987;5:352–353.
- Shui G, Wan Y, Jiang C, Zhang H, Chen P, Yao J. Progress in *Tripterygium Wilfordii* and its bioactive components in the field of Pharmacodynamics and Pharmacology. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2010;35(4):515–520.
- Simpson J, Rezaie P, Newcombe J, Cuzner ML, Male D, Woodroffe MN. Expression of the beta-chemokine receptors CCR2, CCR3 and CCR5 in multiple sclerosis central nervous system tissue. *J Neuroimmunol*. 2000;108(1-2):192–200.
- Smits HA, Rijmsmus A, van Loon JH, Wat JWY, Verhoef J, Boven LA, Nottet HSLM. Amyloid-beta-induced chemokine production in primary human macrophages and astrocytes. *J Neuroimmunol*. 2002;127(1-2):160–168.
- Sokol CL, Luster AD. The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(5):a016303.
- Sokolova A, Hill MD, Rahimi F, Warden LA, Halliday GM, Shepherd CE. Monocyte chemoattractant protein-1 plays a dominant role in the chronic inflammation observed in Alzheimer's disease. *Brain Pathol*. 2009;19(3):392–398.
- Sonobe Y, Liang J, Jin S, Zhang G, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A. Microglia express a functional receptor for interleukin-23. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;370(1):129–133.
- Sonobe Y, Yawata I, Kawanokuchi J, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A. Production of IL-27 and other IL-12 family cytokines by microglia and their subpopulations. *Brain Res*. 2005;1040(1-2):202–207.
- Stolzinger A, Grune T. Neuronal apoptotic bodies: phagocytosis and degradation by primary microglial cells. *FASEB J*. 2004;18(6):743–745.
- Streit WJ. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia*. 2002;40(2):133–139.

- Suzumura A, Sawada M, Marunouchi T. Selective induction of interleukin-6 in mouse microglia by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Brain Res.* 1996;713(1-2):192–198.
- Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol.* 2016;53(2):1181–1194.
- Teismann P, Tieu K, Cohen O, Choi DK, Wu DC, Marks D, Vila M, Jackson-Lewis V, Przedborski S. Pathogenic role of glial cells in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2003;18(2):121–129.
- Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, Yndart A, Nair M. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Int J Nanomedicine.* 2019;14:5541–5554.
- Trebst C, König F, Ransohoff R, Brück W, Stangel M. CCR5 expression on macrophages/microglia is associated with early remyelination in multiple sclerosis lesions. *Mult Scler.* 2008;14(6):728–733.
- Tripathy D, Thirumangalakudi L, Grammas P. RANTES upregulation in the Alzheimer's disease brain: a possible neuroprotective role. *Neurobiol Aging.* 2010;31(1):8–16.
- Vom Berg J, Prokop S, Miller KR, Obst J, Kälin RE, Lopategui-Cabezas I, Wegner A, Mair F, Schipke CG, Peters O, Winter Y, Becher B, Heppner FL. Inhibition of IL-12/IL-23 signaling reduces Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. *Nat Med.* 2012;18(12):1812–1819.
- Wang C, Liu B, Xu X, Zhuang B, Ki H, Yin J, Cong M, Xu W, Lu. Toward targeted therapy in chemotherapy-resistant pancreatic cancer with a smart triptolide nanomedicine. *Oncotarget.* 2016;7(7):8360–8372.
- Wang HK, Park UJ, Kim SY, Lee JH, Kim SU, Gwag BJ, Lee YB. Free radical production in CA1 neurons induces MIP-1 α expression, microglia recruitment, and delayed neuronal death after transient forebrain ischemia. *J Neurosci.* 2008;28(7):1721–1727.
- Weintraub D, Mamikonyan E, Papay K, Shea JA, Xie SX, Siderowf A. Questionnaire for Impulsive-Compulsive Disorders in Parkinson's Disease-Rating Scale. *Mov Disord.* 2012;27(2):242–247.
- Wilms H, Rosenstiel P, Romero-Ramos M, Arlt A, Schäfer H, Seegert D, Kahle PJ, Odoy S, Claasen JH, Holzknecht C, Brandenburg LO, Deuschl G, Schreiber S, Kirik D, Lucius R. Suppression of MAP kinases inhibits microglial activation and attenuates neuronal cell death induced by alpha-synuclein protofibrils. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2009;22(4):897–909.
- Wilms H, Zecca L, Rosenstiel P, Sievers J, Deuschl G, Lucius R. Inflammation in Parkinson's diseases and other neurodegenerative diseases: cause and therapeutic implications. *Curr Pharm Des.* 2007;13(18):1925–1928.
- Witting A, Müller P, Herrmann A, Kettenmann H, Nolte C. Phagocytic clearance of apoptotic neurons by Microglia/Brain macrophages in vitro: involvement of lectin-, integrin-, and phosphatidylserine-mediated recognition. *J Neurochem.* 2000;75(3):1060–1070.
- Yinjun L, Jie J, Yungui W. Triptolide inhibits transcription factor NF-kappaB and induces apoptosis of multiple myeloma cells. *Leuk Res.* 2005;29(1):99–105.
- Zhao B. Nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Bioscience.* 2019; 10: 454-461.
- Zheng H, Cheng B, Li Y, Li X, Chen X, Zhang Y. TREM2 in Alzheimer's Disease: Microglial Survival and Energy Metabolism. *Front Aging Neurosci.* 2018; 10: 395.

Zhou HF, Niu DB, Xue B, Li FQ, Liu XY, He QH, Wang XH, Wang XM. Triptolide inhibits TNF-alpha, IL-1 beta and NO production in primary microglial cultures. *Neuroreport*. 2003;14(7):1091–1095.

Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000;12(2):121–127.

7. Erklärung

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

Kiel, 27.02.2020

Jessica Spreu

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ralph Lucius danke ich von ganzem Herzen für die Möglichkeit diese Doktorarbeit an seinem Institut durchführen zu dürfen, für die exzellente Betreuung und das permanente Interesse und unermüdliche Engagement am Fortgang sowie den Abschluss dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Anatomischen Instituts danke ich für die immer gute Arbeitsatmosphäre und die kooperative Zusammenarbeit.

Besonders danke ich Frau Dr. rer. nat. Uta Rickert für ihre Unterstützung, die Ratschläge und die zahlreichen Diskussionen.

Ich danke auch Frau Rosemarie Sprang und Frau Monika Grell für die freundliche Aufnahme im Labor, die praktische Anleitung sowie die Unterstützung bei der Versuchsdurchführung.

9. Publikationsliste

- 1: **Spreu J**, Stehle T, Steinle A. Human cytomegalovirus-encoded UL16 discriminates MIC molecules by their alpha2 domains. *J Immunol.* 2006;177(5):3143–3149.
- 2: **Spreu J**, Kienle EC, Schrage B, Steinle A. CLEC2A: a novel, alternatively spliced and skin-associated member of the NKC-encoded AICL-CD69-LLT1 family. *Immunogenetics.* 2007;59(12):903–912.
- 3: Wittenbrink, M, **Spreu J**, Steinle A. 2009. Differential NKG2D binding to highly related human NKG2D ligands ULBP2 and RAET1G is determined by a single amino acid in the alpha2 domain. *Eur J Immunol.* 39(6): 1642-1651.
- 4: **Spreu J**, Kuttruff S, Stejfova V, Dennehy KM, Schitteck B, Steinle A. Interaction of C-type lectin-like receptors NKp65 and KACL facilitates dedicated immune recognition of human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(11):5100–5105.
- 5: Rickert U, Grampp S, Wilms H, **Spreu J**, Knerlich-Lukoschus F, Held.-Feindt J, Lucius R. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Family Members Reduce Microglial Activation via Inhibiting p38MAPKs-Mediated Inflammatory Responses. *J Neurodegener Dis.* 2014;2014:369-468.
- 6: Bauer B, **Spreu J**, Rohe C, Vogler I, Steinle A. Key residues at the membrane-distal surface of KACL, but not glycosylation, determine the functional interaction of the keratinocyte-specific C-type lectin-like receptor KACL with its high-affinity receptor NKp65. *Immunology.* 2015;145(1):114–123.
- 7: Rickert U, Wilms H, Arnold P, **Spreu J**, Lucius R. The influence of rasagiline, a clinically effective drug in Parkinson's disease, on microglia and astrocytes in vitro. Posterpräsentation, 31. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg 2015.
- 8: Arnold P, Rickert U, Helmers AK, **Spreu J**, Schneppenheim J, Lucius R. Trefoil factor 3 shows anti-inflammatory effects on activated microglia. *Cell Tissue Res.* 2016;365(1):3–11.
- 9: Kühnel I, Vogler I, Leibelt S, Born C, Bauer B, Neuss S, **Spreu J**, Bönig H, Bürger C, Döring C, Hansmann M-L, Steinle A. Selective NKp65 expression sustained by IL-7 signaling hallmarks human ILC3. 2019 *Submitted*
10. **Spreu J**, Rickert U, Lucius R. Influence of Triptolide on primary microglia *in vitro*. Posterpräsentation, International Cluster Symposium "Inflammation at Interfaces" and "Precision Medicine in Chronic Inflammation" (PMI) in Hamburg 2020.