

Aus dem anatomischen Institut (Geschäftsführender Vorstand: Prof.
Dr. Jobst Sievers)
an der Christian –Albrechts- Universität zu Kiel

EINFLUSS VON TREFOIL-FAKTOR 3 AUF GLIAZELLEN

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

vorgelegt von

ANN-KRISTIN HELMERS

aus **Neumünster**

Kiel 2014

1. Berichtstatter: Prof. Lucius

2. Berichtstatter: PD Dr. Böttner

Tag der mündlichen Prüfung: 31.3.2015

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 31.3.2015

gez.:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Die Gliazellen des ZNS	1
1.1.1	Astroglia/Astrozyten	2
1.1.2	Mikroglia	3
1.2	Entzündliche Prozesse im ZNS unter pathologischen Bedingungen	5
1.3	Trefoil-Faktor-Familie	7
1.3.1	Vorkommen und Funktion von TFF3	8
1.4	Fragestellung und Zielsetzung	10

2. Material und Methoden

2.1	Chemikalien	11
2.2	Primärkultur von Mikroglia und Astrozyten	11
2.3	Primärkultur von Astrozyten	13
2.4	Stimulation von Zellen	14
2.5	Immunhistochemischer Nachweis von TFF3	14
2.6	Immunzytochemischer Nachweis von TFF3	16
2.7	Untersuchung der Zellen auf RNA-Ebene	16
2.7.1	qPCR	18
2.7.1.1	qPCR mit dem Sybr [®] Green-System	19
2.7.1.2	qPCR mit dem TaqMan-System [®]	20
2.8	Agarose-Gel-Elektrophorese	22
2.9	Messung von NO im Zellkulturüberstand	23
2.10	ELISA zum Nachweis von IL-6 und TNF- α	23
2.11	Western Blot	24
2.11.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	25
2.11.2	Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran	27
2.11.3	Immundetektion	27
2.12	Immunzytochemische Färbung zur Lokalisation von NF- κ B in Mikroglia	29
2.13	Statistische Auswertung und Berechnung	29

3. Ergebnisse

3.1	Nachweis von TFF3 in Zellen des ZNS	31
3.1.1	Immunhistochemischer Nachweis von TFF3-Protein in Hirnschnitten	31
3.1.2	Immunzytologischer Nachweis von TFF3-Protein in Astrozyten	33
3.1.3	Nachweis von TFF3-mRNA in Astrozyten	35
3.1.4	LPS führt zu einer Reduktion der TFF3-mRNA in Astrozyten	35
3.2	Einfluss von TFF3 auf die Aktivierung von Mikroglia	37
3.2.1	TFF3 führt zu einer Reduktion der iNOS-mRNA in stimulierten Mikroglia	37
3.2.2	Nachweis von NO im Zellkulturüberstand von Mikroglia	39
3.3	Einfluss von TFF3 auf die mRNA-Synthese proinflammatorischer Zytokinen	40
3.3.1	TFF3 führt zu einer Reduktion der IL-1 β -mRNA in stimulierten Mikroglia	41
3.3.2	TFF3 führt zu einer Reduktion der IL-6-mRNA in stimulierten Mikroglia	42
3.3.3	TFF3 führt zu einer Reduktion der TNF- α -mRNA in stimulierten Mikroglia	44
3.4	Einfluss von TFF3 auf die Freisetzung proinflammatorischer Zytokinen	46
3.4.1	TFF3 führt zu einer Reduktion der IL-6-Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand stimulierter Mikroglia	47
3.4.2	TFF3 führt zu einer Reduktion der TNF- α -Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand stimulierter Mikroglia	48
3.5	Einfluss von TFF3 auf die Phosphorylierung von MAP-Kinasen	50
3.6	Immunzytochemie zur Lokalisation von NF- κ B	51

4. Diskussion

4.1	Nachweis von TFF3 im ZNS	53
4.2	Einfluss von Entzündungsmediatoren auf die Transkription von TFF3-mRNA in Astrozyten	55
4.3	Einfluss von TFF3 auf die Aktivität von Mikroglia	57
4.3.1	Einfluss von TFF3 auf die Expression der iNOS und auf die Freisetzung von NO	57

4.3.2	Einfluss von TFF3 auf die Synthese und die Freisetzung proinflammatorische Zytokine	58
4.3.3	Einfluss von TFF3 auf die Phosphorylierung von MAP-Kinasen	60
4.3.4	Einfluss von TFF3 auf NF- κ B	61
4.4	Ausblick und Perspektiven	63
5.	Zusammenfassung	65
6.	Thesen	66
7.	Literaturverzeichnis	67

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Vereinfachte Darstellung eines TFF3-Dimers	8
Abb. 3.1:	Nachweis von TFF3 im Großhirn neugeborener Ratten	33
Abb. 3.2:	Nachweis von TFF3-Protein in Gliazellen des ZNS	34
Abb. 3.3:	Darstellung eines repräsentativen PCR-Gels zum TFF3 Nachweis	35
Abb. 3.4:	qPCR zur Bestimmung der TFF3-Konzentration in stimulierten Astrozyten	36
Abb. 3.5:	qPCR zur Bestimmung der iNOS-mRNA in Mikroglia nach 6 Stunden Stimulation	38
Abb. 3.6:	qPCR zur Bestimmung der iNOS-mRNA in Mikroglia nach 24 Stunden Stimulation	39
Abb. 3.7:	NO-Messung im Zellkulturüberstand von Mikroglia	40
Abb. 3.8:	qPCR zur Bestimmung IL-1 β -mRNA in Mikroglia nach 6 Stunden Stimulation	41
Abb. 3.9:	qPCR zur Bestimmung IL-1 β -mRNA in Mikroglia nach 24 Stunden Stimulation	42
Abb. 3.10:	qPCR zur Bestimmung IL-6-mRNA in Mikroglia nach 6 Stunden Stimulation	43
Abb. 3.11:	qPCR zur Bestimmung IL-6-mRNA in Mikroglia nach 24 Stunden Stimulation	44
Abb. 3.12:	qPCR zur Bestimmung TNF- α -mRNA in Mikroglia nach 6 Stunden Stimulation	45
Abb. 3.13:	qPCR zur Bestimmung TNF- α -mRNA in Mikroglia nach 24 Stunden Stimulation	46
Abb. 3.14:	Il-6-ELISA nach 6 stündiger Stimulation	47
Abb. 3.15:	Il-6-ELISA nach 24 Stunden Stimulation	48
Abb. 3.16:	TNF- α -ELISA nach 6 Stunden Stimulation	49
Abb. 3.17:	TNF- α -ELISA nach 24 Stunden Stimulation	50
Abb. 3.18:	Western-Blot zum Nachweis des Einflusses von TFF3 auf MAP-Kinasen nach 15 minütiger Stimulation	51
Abb. 3.19:	NF- κ B-Immunfluoreszenzfärbung in Mikroglia nach 60 minütiger Stimulation	52

Abkürzungsverzeichnis

A. bidest	Aqua bidestillatum
A. dest	Aqua destillatum
Abb.	Abbildung
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DAB	Diaminobenzidin
DMEM	Nährmedium (Dulbecco`s Modified Eagle Medium)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	DNA verdauendes Enzym
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzymgekoppelte Immunadsorptionstest
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
FAM	6-Carboxyfluoreszein
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	saures Gliafaserprotein
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettichperoxidase
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleukin 6
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
JNK	c-Jun-N-terminale Kinasen
LPS	Lipopolysaccharid
mA	Milliamper
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm

ml	Milliliter
mM	Millimol
M_r	relative Molekülmasse
mRNA	Boten-RNA
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	Kernfaktor κ B
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphate-gepufferte Salzlösung
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
Realtime-PCR	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAMRA	Tetramethylrhodamin
Taq	Thermus aquaticus
TBST	dreifach gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
TFF3	Trefoil-Faktor 3
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

1. Einleitung

Entzündliche und degenerative Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) steigen in ihrer Prävalenz und gehören zu den Erkrankungen mit einem hohen Leidensdruck.

Im Jahr 2011 waren zwischen 100 und 200 Personen pro 100.000 Einwohner in Deutschland an einem Morbus Parkinson erkrankt, in der Altersgruppe der über 65-jährigen lag die Prävalenz mit 1.800/100.000 noch deutlich höher (Eggert, 2011). Mit Veränderung der Altersstruktur der Bevölkerung ist in Zukunft mit einer stetig wachsenden Zahl an Patienten zu rechnen, die dramatische Einschränkungen ihrer Lebensqualität erfahren dürften.

Der demographische Wandel führt auch zu einer Erhöhung der Prävalenz der Demenzerkrankungen: Zurzeit leiden circa 1,4 Millionen Deutsche unter den verschiedenen Formen der Demenz und jedes Jahr werden fast 300.000 Neuerkrankungen diagnostiziert (Bickel, 2012). Nach Schätzung, die auf der Datenerhebung des Statistischen Bundesamts basieren, wird davon ausgegangen, dass im Jahr 2050 die Prävalenz der Demenz in Deutschland bei über 3 Millionen liegen wird (Bickel, 2012).

Eine andere Erkrankung des ZNS, die vor allem jüngere Menschen betrifft, ist die Multiple Sklerose, auch *Enzephalitis disseminata* genannt. Hier kommt es zur Zerstörung der Myelinscheiden durch entzündliche Prozesse im ZNS. Mit einer geschätzten Prävalenz von 100.000 bis 120.000 in Deutschland verursacht diese Erkrankung nicht nur bei den Betroffenen großes Leid, sondern hat auch erhebliche Sozialausgaben zur Folge (Hein *et al.*, 2000).

Um den Ausbruch dieser Erkrankungen und die damit verbundenen Folgen zu verhindern oder zumindest zu lindern, müssen die zellulären Vorgänge im ZNS besser verstanden werden. So könnten neue Erkenntnisse zur Entwicklung von Medikamenten und/oder neuen Therapiestrategien beitragen und die dramatischen Folgen eindämmen.

1.1 Die Gliazellen des ZNS

Zum ZNS gehören das Gehirn und das Rückenmark, die der Wahrnehmung und Verarbeitung von Reizen und der Koordination der entsprechenden Reaktion dienen.

Die wesentlichen zellulären Bestandteile des ZNS sind Neurone und Gliazellen, wobei die Gliazellen zahlenmäßig deutlich überlegen sind (Virchow, 1858).

Gliazellen wurden als erstes von Rudolf Virchow als Stützzellen (*glia*: griechisch für Leim) beschrieben. Er betrachtete diese Zellen nur als für den Zusammenhalt der Neurone wichtig, also als eine Art Bindegewebe. Heute ist bekannt, dass diese Vorstellung weit von der Realität abweicht. Gliazellen sind für die Funktion der Neurone von elementarer Bedeutung und haben je nach Spezifität unterschiedliche Funktionen (Kettenmann und Verkhratsky, 2011; Frischknecht und Gundelfinger, 2012).

So kann man die Gliazellen in Mikro- und Makroglia unterteilen, wobei zu den Makroglia die aus dem Neuralrohr entstammenden Astrozyten und die Oligodendrozyten zählen (Somjen, 1988).

1.1.1 Astroglia/Astrozyten

Ihren Namen verdanken die Astrozyten ihrem charakteristischen Aussehen. Dieses ähnelt nach Versilberung einem Stern, wofür viele dünne filamentreiche Zellausläufer sorgen. Aufgrund dieser Assoziation bezeichnete erstmals Michael Lenhossek sie so (Lenhossek, 1891). Die charakteristischen Zellausläufer verfügen über einen besonderen zytoskeletalen Bestandteil, das saure gliale fibrilläre Astrozytenprotein (GFAP). Dieses Astrozyten-spezifische Protein ist ein Intermediärfilament und gehört zu Klasse der Desmine (Eng *et al.*, 1971; Fuchs und Weber, 1994; Kimelberg, 2004). Der Gehalt an diesem Filament kann unterschiedlich ausgeprägt sein, sodass William Lloyd Andriezen die Astrozyten an Hand dieses Faktors differenzierte (Andriezen, 1893). Er unterschied einen fibrillären, der in der weißen Substanz dominiert, von einem protoplasmatischen Astrozyten, der vor allem in der grauen Substanz vorkommt. Beide Formen verfügen über interneuronal gelegene Zellausläufer, die über *Gap junctions* miteinander verbunden sind. So ergibt sich ein kommunizierendes Netzwerk, das sich durch das gesamte Gehirn zieht (Wolburg und Paulus, 2010). Diese Astrozyten-Fortsätze bilden die Grenzmembranen am Übergang vom Gehirn zur *Pia mater* oder zu den Blutgefäßen, wodurch sie einen wesentlichen Beitrag zur Blut-Hirn-Schranke leisten (Blackburn *et al.*, 2009). Hier nehmen sie Schlüsselfunktionen im Gehirnstoffwechsel ein, indem sie den Substanztransport kontrollieren (Liebner *et al.*, 2011). Erkrankungen wie Multiple Sklerose oder die bakterielle Meningitis verdeutlichen uns wie wichtig die Abschirmung des Gehirns von Krankheitserregern und Toxinen, aber auch vor dem eigenen Immunsystem sein kann. Dennoch muss dieses abgeschirmte Organ mit Nährstoffen versorgt und seine Abfallprodukte beseitigt werden, wofür ein System von verschiedensten Transportern erforderlich ist (Prat *et al.*, 2001). Um den Nährstoffzufluss

zum ZNS zu kontrollieren, scheinen Astrozyten auch an der Regulation des zerebralen Blutflusses beteiligt zu sein (Abbott *et al.*, 2010).

Eine weitere Funktion der Astrozytenfortsätze ist für die Entwicklung des Nervensystems von großer Bedeutung: Sie geben den unreifen Neuronen ihre Richtung vor, indem sie als Leitstruktur fungieren (Blackburn *et al.*, 2009) und fördern die Neurogenese (Song *et al.*, 2002). Außerdem spielen sie eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung von Synapsen (Nagler *et al.*, 2001), entfernen das neurotoxische Glutamat aus dem synaptischen Spalt (Anderson und Swanson, 2000) und produzieren Glutamin, eine Vorstufe für die Neurotransmitter Glutamat und γ -Aminobuttersäure (GABA) (Zou *et al.*, 2010). Außerdem modulieren Astrozyten die neuronale Übertragung, was den Begriff der „*tripartite synapse*“, einem Dreigestirn bestehend aus Astrozyten und der prä- und der postsynaptischen Membran hervorbrachte (Perea und Araque, 2005). Durch diesen Einfluss wird auch die neuronale Plastizität deutlich moduliert (Rossi und Volterra, 2009). Mittlerweile wird vermutet, dass die Neurotransmission nicht nur durch Astrozyten, sondern auch durch Kommunikation der anderen Zelltypen untereinander beeinflusst wird, was jedoch derzeit noch erforscht wird.

Weiterhin obliegt den Astrozyten die Regulation des pH-Wertes und des Elektrolythaushalts: So nehmen sie Kalium-Ionen über Ionenkanäle oder Kalium-Chlorid-Kotransporter auf und entfernen sie so aus dem extrazellulären Milieu.

Unter pathologischen Bedingungen wie bei Verletzungen von Nerven kann es zur Ausbildung einer Glianarbe kommen, die durch Hypertrophie der Zelleiber, eine veränderte Genexpression und eine veränderte Expression von GFAP und Vimentin gekennzeichnet ist (Ridet *et al.*, 1997; Kamphuis *et al.*, 2012). Diese Glianarben stellen ein großes Hindernis bei der Heilung Querschnittsgelähmter dar, da sie das erneute Aussprossen der Axone behindern. Des Weiteren können Astrozyten an entzündlichen Vorgängen beteiligt sein und diese aufrechterhalten, wobei die genauen Prozesse noch unklar sind.

1.1.2 Mikroglia

5-20 % der gesamten Gliazellpopulation besteht aus Mikroglia (Perry und Gordon, 1988; Streit und Kincaid-Colton, 1995). Diese Zellen kommen im ZNS ubiquitär vor, wobei in der grauen Substanz deutlich mehr vertreten sind (Perry und Gordon, 1988; Lawson *et al.*, 1993). Der Ursprung dieses Zelltyps war lange unklar: Einige Wissenschaftler vertraten die Meinung, Mikroglia würden sich wie die Makroglia aus dem Neuroektoderm entwickeln, andere vertraten die Ansicht eines mesenchymalen Ursprungs. Mittlerweile gilt eine

Abstammung von den mononukleären Zellen des Blutes als am wahrscheinlichsten (Kaur *et al.*, 2001; Chan *et al.*, 2007; Prinz und Mildner, 2012). Grundlage für diese Annahme ist die Ähnlichkeit im molekularen Aufbau des Zytoskeletts (Stoll und Jander, 1999). Somit werden die Vorläufer der Mikroglia wie die aller Makrophagen in der frühen Fetalphase in der Leber und später im Knochenmark gebildet. Perinatal wandern die Vorläuferzellen dann in das ZNS ein, wo sie zu ramifizierten Mikroglia differenzieren (Lawson *et al.*, 1993; Chan *et al.*, 2007; Saijo und Glass, 2011). Diese Form entspricht dem ruhenden Aktivitätszustand und zeichnet sich durch feine Fortsätze bei zartem Zelleib aus, wobei die 5 bis 10 μm großen Zellen gleichmäßig im ZNS verteilt sind (Kreutzberg, 1996). Des Weiteren zeigen sich bei dieser Zellmorphologie kleine heterochromatinreiche Zellkerne und ein elektronendichtes Zytoplasma (Streit und Kincaid-Colton, 1995).

Aber diese als inaktiv bezeichneten Zellen sind nicht gänzlich ruhend: Sie können proliferative Substanzen, die das Überleben von Neuronen fördern, produzieren (Morgan *et al.*, 2004).

Wird die Mikroglia durch eine Infektion, eine Verletzung oder bei Erkrankungen wie bei der Alzheimer-Krankheit oder dem Morbus Parkinson aktiviert, ändert sich ihre Form (Brown, 2009). Die aktivierte Form hypertrophiert und hat einen deutlich plumperen rundlich bis ovalen Zelleib mit vielen Lysosomen und Phagosomen (Kaur und Ling, 1992). Diese aktivierte Mikroglia soll als immunkompetente Zelle das ZNS schützen. So besitzen Mikroglia die Fähigkeit zur Phagozytose und zur Produktion von Stickstoffmonoxid (NO), um etwa eingedrungene Krankheitserreger zu eliminieren oder Zelltrümmer abzuräumen. Des Weiteren können aktivierte Mikroglia unter physiologischen Bedingungen neuroprotektive Stoffe wie z.B. den *transforming growth factor* β (TGF- β) oder andere antiinflammatorische Substanzen sezernieren (Streit *et al.*, 1988; Stoll und Jander, 1999; Lull und Block, 2010). Weiterhin können Mikroglia als Antigen-präsentierende Zellen fungieren und so die Produktion von Antikörpern fördern, als einen weiteren Schutzmechanismus (Frei *et al.*, 1987; Kettenmann und Verkhratsky, 2011).

Unter pathologischen Bedingungen kann es jedoch zu einer überschießenden Immunantwort und damit zur Schädigung von Neuronen kommen.

1.2 Entzündliche Prozess im ZNS unter pathologischen Bedingungen

Unter pathophysiologischen Bedingungen wie bei einer Enzephalitis, dem Morbus Parkinson oder der Multiplen Sklerose kann es zu einer überschießenden Immunantwort kommen, die zum Absterben von Neuronen führt (Streit, 2002). Hier konnte eine verstärkte Aktivierung der Mikroglia, was zu einer verstärkten Produktion proinflammatorischer Zytokine führt, nachgewiesen werden. So wurden im Liquor von Parkinsonpatienten erhöhte Spiegel der proinflammatorischen Zytokinen Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6) gefunden (Mogi *et al.*, 1994; Muller *et al.*, 1998; Long-Smith *et al.*, 2009).

Das von Mikroglia, Astrozyten und Neuronen produzierte IL-1 β ist unter physiologischen Bedingungen unter anderem an der Langzeitpotenzierung, sowie an der neuronalen Entwicklung beteiligt, reguliert aber auch Körpertemperatur, Schlaf und Appetit (Zhao und Schwartz, 1998; Allan *et al.*, 2005).

Die Wirkung von IL-1 β kann durch IL-6 antagonisiert werden. Dies führt neben den proinflammatorischen Eigenschaften dieses von Astrozyten, Neuronen und Mikroglia produzierten Zytokins auch zu antiinflammatorischen Effekten (Ulich *et al.*, 1991; Spooren *et al.*, 2011). So fördert IL-6 z.B. die Revaskularisierung des ZNS nach Trauma in Mäusen (Swartz *et al.*, 2001). Allerdings wurde es auch bei Alzheimerpatienten in erhöhter Konzentration um die Amyloid-Plaques gefunden (Wood *et al.*, 1993; Swartz *et al.*, 2001). Vermutlich spielt bei der Differenzierung anti- oder proinflammatorischer Wirkung die An- oder Abwesenheit eines zweiten Signals eine wesentliche Rolle. Eine weitere wichtige Rolle bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen spielt das zytotoxische NO, das von der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) produziert wird (Liu *et al.*, 2002). Für die Aktivierung ist nicht nur der Kontakt zu Noxen verantwortlich, sondern auch die Beeinflussung durch Neurone oder Astrozyten. So verändert z.B. das von Neuronen produzierte Chemokin Fraktalkin die intrazellulären Kalziumspiegel in Mikroglia und kann so neuroprotektiv wirken (Harrison *et al.*, 1998; Desforges *et al.*, 2012). Weitere neuroprotektive Eigenschaften werden z.B. dem extrazellulären Glykoprotein Tenascin R (Polazzi *et al.*, 2001; Morgan *et al.*, 2004; Liao *et al.*, 2005) zugesprochen. Allerdings kann die mikrogliale Aktivität auch gefördert werden, wobei das proinflammatorische Zytokin TNF- α eine wesentliche Rolle spielt. Es kann sowohl von Astrozyten und Mikroglia als auch von Neuronen produziert werden und nimmt eine Schlüsselposition in der Entstehung chronischer Neuroinflammation ein (Sawada *et al.*, 1989; Park und Bowers, 2010). TNF- α fördert die

Apoptose und beeinflusst die neuronale Plastizität (Zhao *et al.*, 2001; Beattie *et al.*, 2002). Außerdem scheint TNF- α bei der Entstehung der Multiplen Sklerose eine wesentliche Rolle zu spielen (Beck *et al.*, 1988). Allerdings kann es bei Abwesenheit eines zweiten Signals auch antiinflammatorisch wirken. Andere Zytokine wie Interleukin-4 und Interleukin-10 wirken antiinflammatorisch, indem die Bildung von Immunglobulinen gefördert und die zelluläre Immunreaktion gehemmt wird (Woodroffe, 1995). Wesentlich an der Regulation von Entzündungsvorgängen beteiligt sind außerdem die mitogen aktivierten Kinasen (MAP-Kinasen). Diese steuern einen Großteil der intrazellulären Prozesse, u.a. auch Proliferation, Apoptose und Zelldifferenzierung. Es werden 3 Gruppen von MAP-Kinasen unterschieden: Die extrazellulär regulierten Kinasen (ERKs), die p38-mitogenaktivierten Kinasen und die c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK). MAP-Kinasen werden selbst durch Phosphorylierung aktiviert. Dies führt zur weiteren Phosphorylierung verschiedener Proteinen und einer Reihe von Kinasen, die für die Steuerung von Transkriptionsfaktoren verantwortlich sind und so eine direkte Regulation der Genexpression ermöglichen. Die Aktivierung von MAP-Kinasen kann z.B. über Mitogene, Stress oder Entzündungsmediatoren stattfinden.

ERKs werden im ZNS vor allem von Neuronen exprimiert und sind unter anderem an der Regulation der synaptischen Übertragung, der neuronalen Entwicklung und an Lern- und Gedächtnisprozessen sowie an der neuronalen Differenzierung beteiligt (Samuels *et al.*, 2009). Allerdings werden über diesen Signalweg auch proinflammatorische Substanzen wie IL-1 β und NO verstärkt freigesetzt (Blanchette *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2007).

P38-MAP-Kinasen werden durch Entzündungsmediatoren, aber auch durch LPS und verschiedene Wachstumshormone aktiviert. Dies führt zu einer verstärkten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (Hommes *et al.*, 2003).

Ein weiterer Signalweg, der eine zentrale Rolle bei Neuroinflammation, Neurodegeneration, neuronaler Entwicklung und synaptischer Plastizität spielt, ist der nukleare Faktor- κ B (NF- κ B). Dieser Transkriptionsfaktor wird durch Zytokine (IL-1 und TNF- α), oxidativen Stress, LPS oder UV-Strahlung aktiviert (O'Neill und Kaltschmidt, 1997). Eine zentrale Aufgabe von NF- κ B ist Regulation der Apoptose, ein essentieller Prozess sowohl für die Immunantwort, aber auch für die Onkogenese (Kucharczak *et al.*, 2003).

Zahlreiche Erkrankungen des ZNS gehen also mit einer verstärkten Mikroglia-Aktivierung einher, wobei nicht immer zu klären ist, ob dies reaktiv oder ursächlich ist. Außerdem ist unklar welche Rolle die anderen Zellen des ZNS bei der Aktivierung spielen, da es sich hier um sehr komplexe Wechselwirkungen handelt, deren genaue Zusammenhänge noch nicht vollständig entschlüsselt werden konnten (Brown, 2009).

1.3 Trefoil-Faktor-Familie

Zur Trefoil-Faktor-Familie gehören mehrere Proteine, deren Gemeinsamkeit die Trefoil-Domäne ist (Thim, 1997).

Diese Domäne führt zu Ausbildung der charakteristischen kleeblattähnlichen Tertiärstruktur. Sie besteht aus 38 bis 39 Aminosäuren, die durch Verknüpfungen der schwefelhaltigen Aminosäure Cystein in 1-5-, 2-4-, und 3-6-Konfiguration mittels Disulfidbrücken ihre namensgebende Form erhalten (Thim, 1997).

Kodiert sind die Gene für die humanen Proteine in einer 55 Kilobasen-umfassenden Region auf dem langen Arm von Chromosom 21 (Seib *et al.*, 1997).

Bis jetzt wurden die im Säugetier nachgewiesenen Faktoren 1 bis 3 häufig in der Literatur beschrieben. Die Trefoilfaktoren (TFF) zeigen eine hoch konservierte Struktur. So sind 70 % der Aminosäuren eines TFF2 der Maus identisch mit dem menschlichen Molekül (Itoh *et al.*, 1996). Die 3 Proteine unterscheiden sich von einander in ihrem Aufbau: Während TFF1 und 3 über je eine Trefoil-Domäne verfügen, zeichnet sich TFF2 durch 2 Trefoil-Domänen aus.

Allerdings liegen die Faktoren 1 und 3 im Gegensatz zu dem monomeren Faktor 2 hauptsächlich als Dimere vor, welche über eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen stabilisiert wird (Thim, 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde der 13 kDa große Trefoil-Faktor 3 (TFF3) für Versuche verwendet.

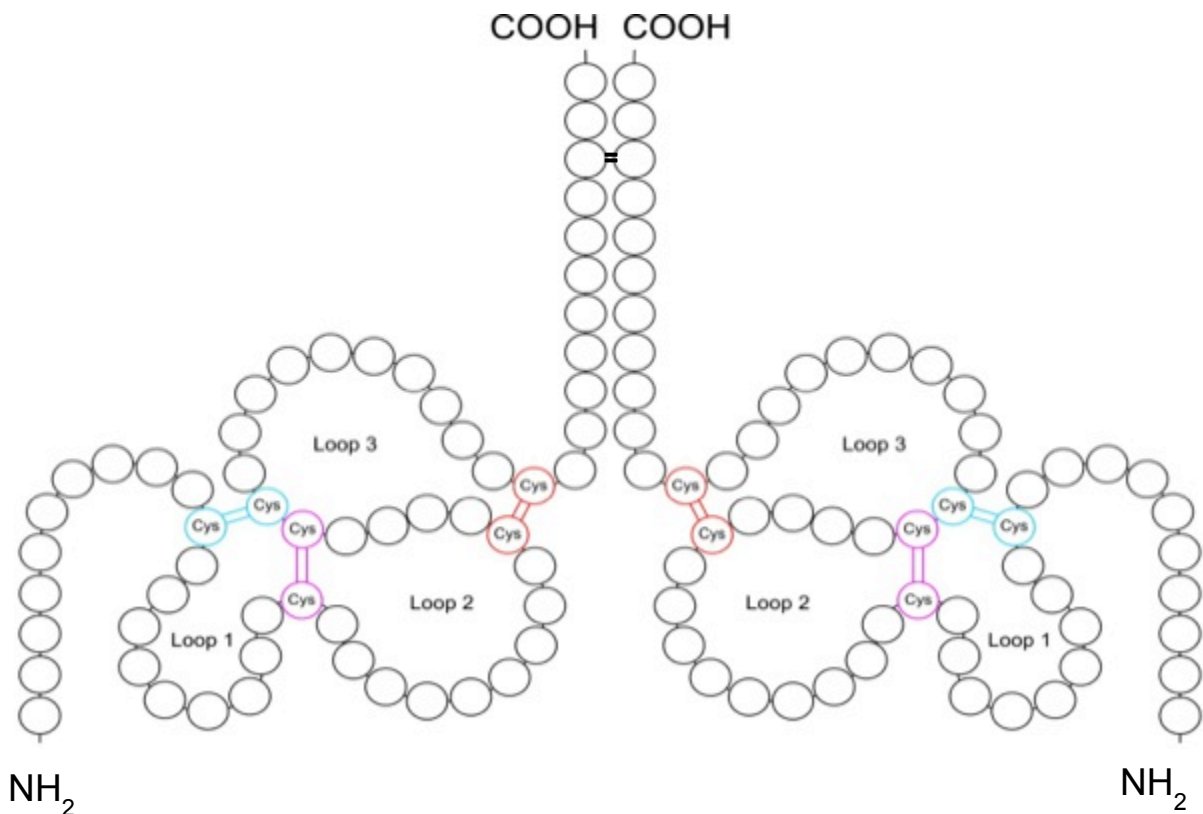


Abb. 1.1: Vereinfachte Darstellung eines TFF3-Dimers. Die charakteristische Struktur entsteht durch jeweils 3 Disulfidbrücken in jedem Monomer (Thim *et al.*, 1995).

1.3.1 Vorkommen und Funktion von TFF3

TFF3, früher bekannt unter dem Namen „intestinaler Trefoil-Faktor“, kommt vor allem in der Mukosa des Gastrointestinaltraktes vor (Suemori *et al.*, 1991; Matsuoka *et al.*, 1999; Hoffmann *et al.*, 2001), wurde aber auch im Respirationstrakt (Wiede *et al.*, 1999; dos Santos Silva *et al.*, 2000), im Pankreas (Guppy *et al.*, 2012) und im Urogenitaltrakt (Rinnert *et al.*, 2010) nachgewiesen.

Weitere Arbeitsgruppen lokalisierten TFF3 in der Mamma (Poulsom *et al.*, 1997), im Uterus und in der Endozervix (Wiede *et al.*, 2001) sowie im Amnion-Gewebe (Schulze *et al.*, 2010). Andere Fundorte sind die Speicheldrüsen (Jagla *et al.*, 1999; Devine *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2014), die ableitenden Tränenwege (Paulsen *et al.*, 2002) und das lymphatische Gewebe (Cook *et al.*, 1999).

Des Weiteren erfolgte der Nachweis in (chronisch) entzündeten oder verletzten Geweben wie z.B. in der heilenden Kornea (Paulsen *et al.*, 2008; Schulze *et al.*, 2010), dem arthritisch veränderten Gelenkknorpel (Rosler *et al.*, 2010), der metaplastisch veränderten Barrett

Schleimhaut des Ösophagus (Kjellev, 2009) und bei chronischer Peridontitis (Chaiyarit *et al.*, 2011).

Es liegen einige Arbeiten zum Vorkommen von TFF3 im ZNS vor. So konnte das Vorkommen von TFF3 in der Hypophyse und dem Hypothalamus nachgewiesen werden (Jagla *et al.*, 2000; Schwarz *et al.*, 2001). Außerdem wurden erhöhte Konzentrationen von TFF3 in Cerebellum, Hippocampus und temporalem Cortex beschrieben, wobei die Autoren postulierten, dass TFF3 für die Entwicklung des Kleinhirns von essentieller Bedeutung sei, da die höchsten Konzentrationen von TFF3 mRNA in Kleinhirnen von 15 Tage alten Mäusen gefunden wurden (Hinz *et al.*, 2004). Welcher Zelltyp TFF3 produziert und welche Rolle dieser Faktor im ZNS spielt, ist jedoch nach wie vor unklar.

TFF3 scheint im Gastrointestinaltrakt proliferative Wirkungen zu haben: Bei TFF3-defizienten Mäusen konnte eine deutlich erhöhte Apoptoserate in den Krypten der Kolonmukosa gezeigt werden (Kinoshita *et al.*, 2000). Des Weiteren konnten Experimente mit Mäusen eine Verbesserung der Gedächtnisfunktion nach intraperitonealer Applikation von TFF3 demonstrieren (Shi *et al.*, 2011). Außerdem moduliert TFF3 die Immunantwort und fördert als Therapeutikum auch die Regeneration der Mukosa bei nekrotisierender Enterokolitis in Mäusen (Zhang *et al.*, 2003; Vandenbroucke *et al.*, 2004). Des Weiteren wird die Mukosabarriere durch TFF3 verstärkt (Meyer zum Buschenfelde *et al.*, 2006), die Zellen vor Hypoxie (Furuta *et al.*, 2001) geschützt und die Angiogenese gefördert (Rodrigues *et al.*, 2003).

Allgemein scheint TFF3 eine große Rolle bei der Regeneration und Restitution des Gastrointestinaltraktes (Wong *et al.*, 1999), aber auch der Kornea (Paulsen *et al.*, 2008) und des Myokards nach Ischämie (Liu *et al.*, 2011) zu spielen.

Diese Eigenschaften haben jedoch nicht nur positive Effekte. So konnte TFF3 auch in entartetem Gewebe nachgewiesen werden (z.B. im Hepatozellulären Karzinom), wobei ein hoher TFF3-Gehalt mit einer schlechten Differenzierung einherging (Khoury *et al.*, 2005). Ähnliches trifft auf Tumore des Magens zu. Hier zeigte die Überexpression von TFF3 in den Epithelzellen eine Korrelation mit einer kurzen Überlebenszeit (Ding *et al.*, 2013). Beim Mamma-Karzinom wird vermutet, dass TFF3 eine Resistenz gegen die anti-hormonelle Therapie vermittelt (Kannan *et al.*, 2010). Außerdem ist der erhöhte TFF3-Spiegel nach Radiochemotherapie des kolorektalen Karzinoms ein negativer Prädiktor für das krankheitsfreie Intervall (Casado *et al.*, 2012) und es wurden erhöhte Serumspiegel für TFF3 bei Patienten mit Lungen-Karzinomen gefunden (Qu *et al.*, 2012). Der Verdacht, dass TFF3 onkogene Effekte vermittelt, wird durch die Förderung der Zellmigration (Meyer zum

Buschenfelde *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2011) verstärkt. Des Weiteren konnte in Magen-Karzinomen eine Korrelation zwischen TFF3-Expression und dem Grad der Vaskularisierung des Tumors nachgewiesen werden (Dhar *et al.*, 2005).

Aber auch eine proinflammatorische Wirkung und damit einhergehend eine erhöhte Apoptoserate konnte gezeigt werden. So werden Matrixmetalloproteasen im arthritisch veränderten Gelenkknorpel durch TFF3 aktiviert, was zur Knorpeldestruktion beiträgt (Rosler *et al.*, 2010). Außerdem wird durch TFF3 die Produktion von NO durch intestinale Zellen erhöht (Tan *et al.*, 1999).

Letztendlich scheint die genaue Funktion der Trefoil-Faktoren von ihrer Umgebung abhängig zu sein, inwieweit ähnliche Verhältnisse auch im ZNS eine Rolle spielen, soll in dieser Arbeit untersucht werden.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

In dieser Arbeit soll zunächst der Fragestellung nachgegangen werden, welche Zellen des ZNS in der Lage sind TFF3 zu produzieren. Nachfolgend soll geklärt werden, ob TFF3 möglicherweise antiinflammatorisch auf Mikroglia wirken kann.

Zur Klärung dieser Fragen sollen folgende *in vitro* Untersuchungen durchgeführt werden:

1. Untersuchungen zum Nachweis von TFF3 in primären Astrozyten- und Mikroglia-Zellkulturen der Ratte sowie an Paraffinschnitten von Rattenhirnen.
2. Untersuchungen zum Nachweis des Einflusses entzündlicher Prozesse auf die Produktion von TFF3.
3. Untersuchungen zum Einfluss auf die TFF3-induzierte Produktion proinflammatorischer Enzyme und Zytokine.
4. Untersuchungen zu möglichen Signaltransduktionswegen

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Die für die Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen. Alle wiesen den Reinheitsgrad pro analysis auf.

Die weiteren Bezugsquellen von Medien, Antikörpern, Enzymen und Kits sind im nachfolgenden Text angegeben. Das verwendete TFF3-Protein wurde freundlicherweise von Dr. Kathy Devaney vom Massachusetts General Hospital (Boston, USA) zur Verfügung gestellt.

2.2 Primärkultur von Mikroglia und Astrozyten

Für die nachfolgenden Experimente wurden ausschließlich Zellen aus Primärkulturen verwendet, die aus Gehirnen von 1 bis 3 Tage alten Wistar-Ratten (Viktor-Hensen-Haus der vorklinischen Institute, CAU Kiel) hergestellt wurden. Bis zur Gewebeentnahme wurden die Tiere unter Bedingungen gehalten, die einen 12 Stunden- Hell-Dunkel-Rhythmus beinhielten. Die Arbeiten mit den Zellkulturen fanden unter der Sterilwerkbank (HERASafe[®]; Heraeus, Hanau) statt.

Gewebepräparation. Zur Entnahme des Gewebes wurden die Ratten kurz zuvor durch Dekapitierung getötet. Nach Eröffnung der Schädeldecken wurden die Gehirne mittels Spatel entnommen, in Petrischalen (Sarstedt, Nürnberg) gesammelt und in Dulbecco's PBS (PAA, Österreich) gespült.

Die weiteren Präparationsschritte wurden unter dem Biokular (STEMI SV8; Carl Zeiss, Göttingen) durchgeführt. Nach Entfernung der Hippocampi ließen sich die Meningen von den Gehirnen trennen. Diese sowie auch die Dienzephalien, die Kleinhirne und die Bulbi olfactorii wurden verworfen. Anschließend wurden die Kortexhälften präpariert, das vordere Mesenzephalon wurde entfernt und separat weiter verarbeitet.

Die Kortizes und Mesenzephalien wurden getrennt in Petrischalen in 3 ml Dulbecco's PBS gesammelt und dann mechanisch mittels Einmal-Skalpell zerkleinert. Anschließend wurden die Gewebeteilchen jeweils in mehrere 12 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nürnberg) überführt und das Dulbecco's PBS nach dem Absetzen der Organteilchen abgesaugt. Die weitere Zell-Separation erfolgte mittels einer Dissoziationslösung bestehend aus 24 mg Hepes, 20 mg Trypsin (aus Rinderpankreas) und 2 mg Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und 35 µl DNase I (aus Rinderpankreas, 1 mg/ml; Roche Applied Science, Mannheim) in 10 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen, Karlsruhe). Die Inkubation mit der Dissoziationslösung erfolgte für 30 Minuten im Wasserbad bei 37 °C, wobei zu Beginn sowie nach 15 Minuten die Zelllösung aufgeschüttelt wurde.

Anschließend wurde die Dissoziationslösung abgesaugt und durch das Mikroglia-Kulturmedium ersetzt. Dieses bestand aus 500 ml DMEM supplementiert mit 60 ml fetalem Kälberserum (FKS; Invitrogen, Karlsruhe), 5 ml L-Glutamin (200 mM) und 6 ml Penicillin (10000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml) (Pen/Strep; PAA, Österreich), wobei das verwendete FKS vor der Nutzung durch Erhitzen im Wasserbad über eine halbe Stunde bei steigender Temperatur (44 °C bis 53 °C) inaktiviert worden war.

Nachdem die Trypsinaktivität der Dissoziationslösung durch Zugabe des serumhaltigen Mikroglia-Kulturmediums gestoppt worden war, wurde die Zellsuspension mehrfach mittels unterschiedlich dicker Glas-Pasteurpipetten (Sarstedt, Nürnberg), die durch Einschmelzen über der Glasflamme (Fireboy S10000; Techomare, Wallosellen) verengt worden waren, resuspendiert und die Zellen weiter vereinzelt.

Kultivierung. Es erfolgte die Kultivierung in Zellkulturflaschen, wobei pro 75 cm² Zellkulturflasche (Sarstedt, Nürnberg) 2 Kortizes in 10 ml Mikroglia-Kulturmedium verwendet wurden. Die separat verarbeiteten Mesenzephalien wurden ebenfalls in 75 cm² Flaschen mit 10 ml Mikroglia-Kulturmedium kultiviert, wobei für 2 Mesenzephalien eine Flasche genutzt wurde. Die Zellen wurden im Inkubator (Hera Cell 150; Heraeus, Hanau) bei 37 °C und 8,4 % CO₂ für ca. 10 Tage kultiviert, bevor sie geerntet und für die Versuche eingesetzt wurden. Während dieses Zeitraums wurde im 48 stündigem Abstand das Kulturmedium gewechselt.

Ernte. Nach mindestens 9 Tagen in Kultur wurden die Mikroglia-Zellen geerntet. Dafür wurden die frei flottierenden Mikroglia-Zellen durch Schütteln der Zellkulturflaschen und anschließendem Dekantieren der Zellsuspension in 50 ml Zentrifugenröhrchen vom

Astrozyten-Rasen getrennt. Folgend wurde die Zellsuspension für 5 Minuten mit 5000 x g (Centrifuge 5804 R; Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert.

Die Überstände wurden entfernt, die Mikroglia-Zell-Pellets mit ein wenig restlichem Medium resuspendiert und alle Pellets sowohl von den Kortizes als auch von den Mesenzephalien in einem Zentrifugenröhrchen vereinigt.

Aussaat. Um die Aussaat einer definierten Zellzahl zu ermöglichen, wurden 10 µl der Zellsuspension mit gefiltertem Trypan-Blau im Verhältnis 1:1 gefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer (Roth, Karlsruhe) ausgezählt. Trypan-Blau färbt avitale Zellen, sodass die Aussaat einer konstanten Menge vitaler Zellen sichergestellt wurde. Die Mikroglia wurden in einer Dichte von 1 Million/Napf in 12-Napf-Platten oder in einer Dichte von 200.000 /Glas Zellen auf Deckgläser (2,6 x 2,6 cm; Roth, Karlsruhe) ausgesät. Die Zellen wurden für einen Tag weiter kultiviert und anschließend für die Experimente verwendet.

2.3 Primärkultur von Astrozyten

Kultivierung. Die Zellsuspension wurde in Kulturflaschen (25 cm²; Sarstedt, Nürnberg) gegeben, wobei hier pro Tier 3 Kulturflaschen verwendet wurden.

Zur Herstellung von Astrozyten-Kulturmedium wurde neben 500 ml DMEM und 6 ml Pen/Strep 60 ml FKS verwendet, welches zuvor bei 56 °C inaktiviert worden war.

In der folgenden Zeit wurde 9 Tage lang jeden zweiten Tag das Medium gewechselt. Nach 9 Tagen Kultur wurden die Zellen für 24 Stunden mit dem Rotationschüttler (Typ R0 01; Gerhard, Bonn) geschüttelt. Danach wurde das Kulturmedium gewechselt und dem neuen Astrozyten-Kulturmedium 1 µl pro 1 ml des Mitosehemmstoffs 5- Fluor-2-Desoxyuridine (10 µM) hinzugegeben. Nach 2 Tagen wurde diese Prozedur wiederholt und die Zellen einen Tag später ausgesät.

Aussaat. Die Astrozyten wurden nach dem Zählvorgang in einer Dichte von 150.000 Zellen/ml auf 12-Napf-Platten und in einer Dichte von 20.000 Zellen/Deckglas auf Deckgläser ausgesät. Die Astrozyten in den 12-Napf-Platten wurden vor der nachfolgenden Stimulation der Zellen für eine Woche kultiviert, die auf den Deckgläsern für einen Tag.

2.4 Stimulation von Zellen

Zur Stimulation wurde das serumhaltige Medium entfernt und die Zellen jeweils mit ihrem Kulturmedium ohne FKS (Stimulationsmedium) gespült.

Es wurden folgende Versuchsansätze verwendet:

1. Kontrolle 1 ml Stimulationsmedium
2. LPS 10 ng/ml in 1 ml Stimulationsmedium
3. TFF3 500 bzw. 50 ng/ml in 1 ml Stimulationsmedium
4. TFF3 500 bzw. 50 ng/ml und LPS 10 ng/ml in 1 ml Stimulationsmedium

Eine Vorstimulation erfolgte für die Versuchsansätze 3 und 4 durch 30 minütige Inkubation mit TFF3 in den Konzentrationen 500 ng/ml oder 50 ng/ml in jeweils 1 ml Stimulationsmedium. Anschließend wurde den Versuchsansätzen 2 und 4 das Stimulanz Lipopolysaccharid (LPS *Salmonella typhorum*, 10 ng/ml in Dulbecco's PBS) hinzugegeben. Hierbei handelt es sich um ein Endotoxin aus gramnegativen Bakterien, das als Induktor für entzündliche Prozesse *in vitro* und *in vivo* anerkannt ist.

Die Zellen wurden für die verschiedenen Untersuchungen unterschiedlich lange stimuliert, wobei die Stimulationszeiten im Ergebnisteil angegeben sind.

2.5 Immunhistochemischer Nachweis von TFF3

Aus der Literatur war sowohl das Vorkommen im Gastrointestinaltrakt als auch im Gehirn bekannt, jedoch konnte TFF3 bisher keiner Zellart zugeordnet werden. Um das Vorkommen von TFF3 näher einzugrenzen, wurden 7 µm dicke Paraffinschnitte von Gehirnen der zwei Tage alten Ratte immunhistochemisch gefärbt. Als Kontrolle dienten hierbei Schnitte vom Kolon der Ratte (p2). Zur Entparaffinierung wurden die Paraffinschnitte drei Mal für je 5 Minuten in eine Xylol-Lösung gelegt und anschließend für je 5 Minuten in einer absteigende Alkoholreihe (100, 100, 80, 70 und 50 % Ethanol) entparaffiniert. Anschließend wurden die Objektträger in einer Wasserstoffperoxid-Lösung (30 % H₂O₂ in Methanol) getränkt und nachfolgend dreimalig mit Dulbecco's PBS gespült. Nach Abschluss der Entparaffinierung wurden die Schnitte drei Mal mit Dulbecco's PBS gespült und anschließend zur

Permeabilisierung der Zellmembranen in Zitratpuffer (500 ml A. dest; 1,05 g Zitronensäure Monohydrat; ph 6) bei 800 Watt für 1,5 Minuten und dann bei 140 Watt für weitere 14 Minuten in der Mikrowelle (Severin 800; Severin, Sunden) erhitzt. Es schlossen sich drei Waschschrte mit Dulbecco's PBS für je 5 Minuten an, nach denen die unspezifischen Bindungsstellen durch eine 10 minütige Inkubation in 1 % bovinem Serumalbumin (BSA; Serva, Heidelberg) in Dulbecco's PBS abgesättigt wurden. Anschließend wurden die Objektträger mit dem polyklonalen Primärantikörper (TFF3: Kaninchen-anti-Ratte, FL-80, 200 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) in einer Verdünnung von 1:200 über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein Schnitt ohne Primärantikörper nur mit 1 % BSA in Dulbecco's PBS überschichtet. Nach der Inkubation wurden die Schnitte zur Entfernung von ungebundenen Antikörpern drei Mal für je 5 Minuten mit Dulbecco's PBS gespült. Folgend wurde ein biotinylierter Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen IgG, 1,5 mg/ml; Vector Laboratories, UK) in einer Verdünnung von 1:300 aufgebracht und für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der ungebundene Antikörper durch dreimaliges Spülen mit Dulbecco's PBS entfernt. Zum Sichtbarmachen des gebundenen biotinylierten Antikörpers erfolgte eine Inkubation mit ABC-Reagenz (Vectastain Elite ABC Kit; Vector Laboratories, UK) nach Herstellerangaben für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Dieses Reagenz enthält eine Avidin-gebundene Meerrettichperoxidase, welche durch das Avidin mit hoher Affinität an den biotinylierten Sekundärantikörper bindet und ihn braun markiert. Es schloss sich das dreimalige Spülen mit Dulbecco's PBS an, wonach auf die Objektträger für 10 Minuten das Chromogen Diaminobenzidin (DAB) aus dem DAB Kit (Peroxidase Substrate Kit DAB; Vector Laboratories, UK) gegeben wurde. Im Anschluss wurde die Lösung entfernt und die Schnitte für 3 Minuten mit filtriertem Hämalaun inkubiert. Danach wurden die Schnitte drei Mal mit A. dest gewaschen, für 5 Minuten fließend gewässert, um die Blaureaktion von Hämalaun zu starten, und anschließend mit A. dest gespült. Die Objektträger wurden folgend für jeweils 3 Minuten in aufsteigenden Ethanolkonzentrationen (50, 70, 80, 90, 100 %) inkubiert, wobei die Inkubation mit 100 % Ethanol zwei Mal durchgeführt wurde. Die Schnitte wurden anschließend in Iso-Mount (Thermo-Scientific, USA) eingebettet. Anschließend wurden die Präparate mit dem Axiophot-Mikroskop (Carl Zeiss, Göttingen) untersucht und mit der Axiocam Fotokamera (Carl Zeiss, Göttingen) fotografiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software Axio Vision 4.2 (Carl Zeiss, Göttingen).

2.6 Immunzytochemie zum Nachweis von TFF3

Zur genaueren Spezifizierung der mittels der Immunhistochemie angefärbten Zellen, wurden Astrozyten und Mikroglia immunzytochemisch untersucht. Hierfür wurden die auf den Deckgläsern ausgesäten Mikroglia bzw. Astrozyten mit Dulbecco's PBS dreimalig gewaschen und anschließend mit gekühlter Zamboni-Lösung (2 % Paraformaldehyd; 15 % gesättigte Pikrinsäure in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4) für 30 Minuten bei Raumtemperatur vorfixiert. Anschließend wurde zwei Mal mit Dulbecco's PBS gewaschen und die Deckgläser für 10 Minuten in Methanol inkubiert. Nach dreimaligem Spülen mit Dulbecco's PBS wurden die Zellen mit 100 µl des polyklonalen Primärantikörpers (TFF3: Kaninchen-anti-Ratte, FL-80, 200 µg/ml) in einer Verdünnung von 1:50 für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Auf Grund der Sensibilität des Antikörpers gegen Licht wurde dieser Schritt in Dunkelheit durchgeführt. Nachdem drei Mal mit Dulbecco's PBS gespült worden war, wurden die Deckgläser für 45 Minuten mit dem Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen IgG, Alexa-Fluor 488, 1 mg/ml; Invitrogen, Karlsruhe) in einer Verdünnung von 1:700 bei Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser drei Mal mit Dulbecco's PBS gespült.

Zur Anfärbung der Zellkerne wurden die Zellen auf den Deckgläsern für 5 Minuten mit Bisbenzimid (Sigma, Heidelberg) inkubiert und folgend dreimal mit A. dest gespült. Die Deckgläser wurden mit Immu-Mount (Thermo Scientific, USA) eindeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovision Zeiss 200 M; Carl Zeiss, Göttingen) betrachtet, wobei die Bilder mit der Kamera (AxioCam Fotokamera; Carl Zeiss, Göttingen) dokumentiert und mit Hilfe der Software Axio Vision 4.7.2 (Carl Zeiss, Göttingen) begutachtet wurden.

2.7 Untersuchung der Zellen auf RNA-Ebene

Um den Einfluss von Inflammation, hier simuliert durch die Applikation von LPS, auf die TFF3-Expression in Astrozyten zu klären, wurden quantitative Echtzeit-PCR-Untersuchungen (qPCR) durchgeführt. Diese Methode wurde auch genutzt, um den Einfluss von TFF3 auf den mRNA-Gehalt proinflammatorischer Zytokine in Mikroglia zu untersuchen. Hierfür musste die mRNA zunächst aus den Zellen isoliert und anschließend in complementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden.

RNA-Isolierung. Die RNA-Isolierung erfolgte nach der single-step-Methode (Chomczynski und Sacchi, 1987). Hierfür wurden die Zellen zunächst zwei Mal mit Dulbecco's PBS gespült und dann in 1 ml Quiazol (Qiagen, Hilden) lysiert. Dieses enthält als Lysanz Guanidiniumthiocyanat, das gleichzeitig auch RNasen inaktiviert. Die Zelllysate wurden anschließend in Eppendorf-Gefäße (1,5 ml; Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) überführt, mit 200 µl Chloroform pro 1 ml Quiazol versetzt und für 15 Sekunden per Hand geschüttelt. Es folgte die Inkubation für 2-3 Minuten bei 15-30 °C im Wärmeblock (Thermomixer Compact; Eppendorf, Hamburg). Nach der folgenden 15 minütigen Zentrifugation mit 12000 x g bei 2-8 °C (Centrifuge 5415R; Eppendorf, Hamburg), befand sich unten eine rote Phenol-Chloroform-Phase, in der sich die DNA und das Protein gelöst hatten, es folgte die Interphase sowie eine farblose wässrige Phase mit RNA, die ungefähr 60 % der ursprünglichen Quiazol-Lösung entsprach.

Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 1 µl Glykogen, sowie 500 µl Isopropylalkohol vermischt. Nach 10 minütiger Inkubation bei 15-30 °C wurde das Gemisch für 10 Minuten mit 12000 x g bei 2-8 °C zentrifugiert. Die RNA befand sich nach dieser Prozedur als gelartiges Pellet am Boden. Nach Entfernung des Überstandes wurde zu dem RNA-Pellet 1 ml 75 %-iger Ethanol pro 1 ml Qiazol gegeben, woran sich die abschließende 5 minütige Zentrifugation mit 7500 x g bei 2-8 °C anschloss. Der Überstand wurde nachfolgend verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Das RNA-Pellet wurde anschließend in 20 µl RNase-freiem A. bidest resuspendiert und gelöst. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei 55-60 °C erfolgte die photometrische Bestimmung der RNA-Menge. Bis zur Verwendung wurde die RNA bei -70 °C gelagert.

Quantifizierung der RNA-Menge. Zur photometrischen Quantifizierung der gewonnenen RNA wurde das Multi-Volume-Spektroskop Epoch (Biotek, Bad Friedrichshall) verwendet. Jeweils 2 µl der extrahierten RNA wurden auf eine Multivolumenplatte gegeben. Anschließend erfolgte die automatische Messung mit Wellenlängen von 260 nm und 280 nm, wobei die Messung bei 260 nm die RNA-Menge ergab. Die Reinheit der RNA ergab sich aus dem Quotienten der Messungen bei 260 nm und 280 nm. Angestrebt wurde ein Quotient $\geq 1,7$.

Die auf diese Weise isolierte mRNA wurde in complementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dieser Schritt war für die spätere qPCR nötig.

Reverse Transkription. Zur Herstellung einer cDNA wurden zunächst mögliche Verunreinigungen durch genomische DNA beseitigt. Dafür wurde zu 1 µg RNA in 8 µl A. bidest 1 µl DNase (RNase freie DNase 1U/µl; Promega, USA) sowie 1 µl Puffer (RNase freie DNase 10x Reaktionspuffer; Promega, USA) gegeben und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Zur Inaktivierung des Enzyms wurde 1 µl Stopplösung (Promega, USA) bestehend aus 25 mM EDTA hinzugegeben und das Gemisch für 10 Minuten auf 65 °C erhitzt.

Anschließend wurde die reine mRNA für die reverse Transkription mit 1 µl Random Hexamer-Primer-Gemisch (Fermentas, St. Leon-Rot) vermischt und für 5 Minuten bei einer Temperatur von 70 °C denaturiert und anschließend auf 37 °C äquilibriert. Das Gemisch wurde anschließend mit 7 µl Transkriptions-Mix versetzt.

Transkriptions-Mix pro Versuchsansatz:

- 4 µl 5x Reaktionspuffer (Fermentas, USA)
- 2 µl dNTP-Mix 10mM (Bioline, Luckenwalde)
- 1 µl A. bidest

Nach 5 minütigem Primer-Annealing bei 25 °C wurde 1 µl Reverse Transkriptase (RevertAcid™ H Minus M-MuLV; Fermentas, St. Leon-Rot) hinzugegeben und die Inkubation für weitere 10 Minuten bei 25 °C fortgeführt. Es folgte die reverse Transkription für 60 Minuten bei 42 °C, sowie die Inaktivierung des Enzyms durch ein anschließendes 10 minütiges Erhitzen auf 70 °C. Diese Prozesse wurden im Thermocycler (Gene Amp PCR System 9700; Applied Biosystems, USA) durchgeführt, wobei alle Zwischenschritte unter Kühlung auf Eis erfolgten. Die synthetisierte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.7.1 qPCR

Um sowohl die Expression von TFF3-mRNA nachzuweisen als auch den Einfluss von TFF3 auf die Aktivität und auf die Synthese proinflammatorischer Zytokine zu klären, wurde eine qPCR eingesetzt. Bei dieser Methode wird die Akkumulation des PCR-Produktes über die Messung der Fluoreszenzstärke in jedem Zyklus bestimmt. Hier zeigt sich zunächst eine lineare Zunahme der Signalstärke. In dieser Phase ist das Verhältnis von Template zu Primern und Polymerase nicht ausgewogen, sodass ein schnelleres Fortschreiten der Reaktion nicht

möglich ist. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer exponentiellen Zunahme des Signals, woran sich ein linearer Verlauf anschließt, wenn die Menge des PCR-Produkts die Menge der Primer und Polymerasen deutlich übersteigt. Die exponentielle Phase kann erst erreicht werden, wenn ausreichend DNA amplifiziert wurde, da alle benötigten Stoffe dann in einem optimalen Verhältnis vorliegen. Es gilt somit: Je höher die Quantität des PCR-Produktes ist, desto früher wird die exponentielle Phase erreicht. Die Stärke des Fluoreszenzsignals wird zur Berechnung der Quantität des PCR-Produktes mit einem Referenzgen verglichen und nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet (Livak und Schmittgen, 2001). Als Referenzgen wurde in dieser Arbeit entweder ein Genabschnitt der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH) oder ein Abschnitt des 'Housekeeping Gens' 18s-rRNA genutzt. GAP-DH ist ein zytosolisches Enzym, welches die Umwandlung von Glyceraldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Biphosphonat in der Glykolyse katalysiert. Die Expression dieses Schlüsselenzyms unterliegt nur geringfügiger Regulation, sodass eine Verwendung als Standard in Frage kommt. 18s-rRNA ist ein Bestandteil eukaryonter Zellen und wird zur 40S-Untereinheit prozessiert. Dieses Gen wird konstitutiv exprimiert, sodass die Messung des PCR-Produktes in Relation zu diesem Gen stattfinden konnte. Die Werte wurden jeweils in Prozent der unstimulierten Kontrollproben angegeben.

Zur Durchführung dieser Untersuchung wurde in dieser Arbeit die qPCR zum einen mit dem Sybr[®]Green-System (Applied Biosystems, USA) und zum anderen mit dem TaqMan[®] Gene Expression Assay (Applied Biosystems, USA) durchgeführt.

2.7.1.1 qPCR mit dem Sybr[®]Green-System

Um das Ergebnis der immunchemischen Färbungen zu verifizieren, sollte mit Hilfe des Sybr[®]Green-System (Applied Biosystems, USA) TFF3-mRNA in Astrozyten und Mikroglia nachgewiesen werden. Der Sybr[®]Green PCR Master Mix beinhaltet einen Fluoreszenzfarbstoff, der an die kleine Furche von doppelsträngiger DNA bindet.

Während der PCR wird ein DNA-Abschnitt amplifiziert, wodurch die Zahl der doppelsträngigen Kopien kontinuierlich zunimmt. Hieran lagert sich der Fluoreszenzfarbstoff an, wodurch das Fluoreszenzsignal ständig stärker wird. Diese Signalverstärkung wurde mit Hilfe der qPCR-Methode gemessen, wobei der Zeitpunkt des Übergangs zur exponentiellen Phase bestimmt wurde (C_T -Wert).

Zur Vervielfältigung der DNA wurden 4 µl cDNA 1:20 mit A. bidest verdünnt, mit dem unten beschriebene Amplifikationsmix in PCR-Platten (96-Well- Multiply; Sarstedt, Nürnberg) angesetzt und anschließend im Thermo Cycler weiterbearbeitet.

Amplifikationsmix pro Versuchsansatz:

- 12,5 µl Power Sybr[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA)
- 1,5 µl Primer (vorwärts)
- 1,5 µl Primer (rückwärts)
- 5,5 µl RNase-freies A. bidest
- 4 µl cDNA 1:20 in A. bidest verdünnt

Nach 2 minütiger Vorinkubation bei 50 °C folgten 40 PCR-Zyklen bestehend aus der Aktivierung der Polymerase für 10 Minuten bei 95 °C, der Denaturierung für 15 Sekunden bei 95 °C und der Anlagerung für 60 Sekunden bei 66 °C. Diese Schritte fanden im Thermocycler (ABI Prism 7000 Sequence Detection System 700; Applied Biosystems, USA) statt.

Primer. Die Primer wurden mit dem Programm Primer3 erstellt und von der Firma MWG synthetisiert. Sie wurden in einer Konzentration von 10 pmol verwendet, diese Arbeitsverdünnung wurde kurz vor der Verwendung hergestellt.

Primer	Sequenz	Produktlänge
TFF3	vorwärts 5'-GCGTGCTGCCATGGAGACCAG-3' rückwärts 5'-TGGGCTTTGCAGGAGGACC-3'	80 bp
GAP-DH	vorwärts 5'-TCTACCCACGGCAAGTTCAAC-3' rückwärts 5'-TCTCCGCTCCTGGAAGATGGT-3'	223 bp

Das entstandene PCR-Produkt wurde mittels der Gel-Elektrophorese weiter untersucht (2.8).

2.7.1.2 qPCR mit dem TaqMan-System[®]

Das TaqMan[®]-System wurde verwendet, um den Einfluss von TFF3 auf die Aktivität von Mikroglia bzw. auf die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen zu klären. Das TaqMan[®]-System enthält neben den Nukleotiden und den spezifischen Sonden noch eine signalgebende Polymerase mit Exonukleaseaktivität. Diese ist am 5'-Ende mit einem

Reporterfarbstoff (6-Carboxy-Fluorecein (FAM)) und am 3'-Ende mit einem Quencher Farbstoff (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin (TAMRA)) versehen. Bei intakter Sonde unterdrückt der Quencher-Farbstoff das Fluoreszenz-Signal des Reporterfarbstoffes. Die Sonde kann sich spezifisch an die cDNA anlagern, aufgrund von einer Phosphorylierung am 3'-Ende kann sie jedoch nicht als Primer fungieren. Während die DNA-Taq-Polymerase den neu zu synthetisierenden Strang in Richtung Sonde verlängert, wird durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Reporterfarbstoff abgespalten. Infolge räumlicher Dissoziation verliert der Quencher-Farbstoff sein Potential, das Fluoreszenzsignal zu unterdrücken. Die Menge des PCR-Produktes lässt sich durch die Proportionalität zum Fluoreszenzsignal jederzeit bestimmen. Bestimmt wird hier der Zeitpunkt, ab dem das Signal das Hintergrundsignal deutlich übersteigt (C_T -Wert).

4 μ l der cDNA wurden 1:20 in A. bidest gelöst und mit 10 μ l TaqMan[®] Master Mix (Applied Biosystems, USA) in der PCR-Platte vermischt. Den jeweiligen Proben wurden erst 1 μ l Assay-on-Demand (Applied Biosystems, USA) und dann 5 μ l A. bidest zugefügt. Die in dem Assay-on-Demand enthaltenen Primer sind in Tabelle 2.1 aufgeführt, wobei die Kontrolle mit 18s-rRNA erfolgte.

Primer	ID	Sequenz 5'-3'
TFF3	Rn00564851_m1	CTCTGCAAGAGACAGAATGTACATT
18s-rRNA	Hs99999901_s1	CCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA
iNos	Rn00561646_m1	CTATTCCCAGCCCAACAACACAGGA
Il-1 β	Rn00580432_m1	AGCCAACAAGTGGTATTCTCCATGA
Il-6	Rn00561420_m1	TGAGAAAAGAGTTGTGCAATGGCAA
TNF- α	Rn99999017_m1	ACCCTCACACTCAGATCATCTTCTC

Die RT-PCR wurde im Thermocycler (Abi Prism 7000Sequence Detection System, Applied Biosystems) durchgeführt, wobei das Protokoll wie folgt aussah:

Thermocycler-Programm:

Vorinkubation	2 min	50 °C	} 40 Zyklen
Aktiveringung der DNA-Taq-Polymerase	10 min	95 °C	
Denaturierung	15 sec	95 °C	
Annealing/Extension	1 min	66 °C	

2.8 Agarose-Gel-Elektrophorese

Zur Überprüfung der Spezifität des mittels der qPCR unter Zuhilfenahme des Sybr[®]Green-System hergestellten PCR-Produktes wurde eine Gel-Elektrophorese durchgeführt.

Hierfür wurden die DNA-Fragmente auf ein Agarose-Gel gegeben und durch Anlegen eines elektrischen Feldes entsprechend ihrer Länge aufgetrennt. Auf Grund des hohen Gehaltes an negativ geladenen Zuckerphosphatresten wandert die DNA im elektrischen Feld zur Anode (Mueller *et al.*, 2001). Auf Grund der unterschiedlichen Größen geschieht dies mit verschiedenen Geschwindigkeiten, sodass sich die Größe der einzelnen DNA-Fragmente an Hand ihrer zurückgelegten Strecke bestimmen lässt.

Gel-Herstellung. Die Agarose wurde zur Herstellung des Gels mit 1-fach Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer, bestehend aus 40 mM Trishydroxymethylaminomethan (TRIS); 20 mM Essigsäure und 1 mM EDTA; ph 8,0) in der Mikrowelle (Severin 800; Severin, Sunden) aufgeköcht. Anschließend wurde das Gemisch in einen Gelgießstand (Bio-Rad, München) gegeben. Sofort wurde ein Gelkamm eingesetzt, der nach dem vollständigen Aushärten des Gels wieder entfernt wurde. Das Gel wurde nach dem Aushärten in eine Elektrophoresekammer (Bio-Rad, München), die mit 1-fach TAE-Puffer gefüllt war, eingesetzt.

Probenauffrennung. Die Geltaschen wurden mit 10 µl eines Gemisches aus 10 µl der zu untersuchenden Probe und 3 µl DNA-Ladungspuffer versehen. Um die Größe der

untersuchten DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurden neben den Proben 5 µl eines Größenstandards (100 bp Ladder; Promega, USA) mit Bromphenolblau gemischt aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in der Elektrophoresekammer bei einer Spannung von 120 V und einer Stromstärke von 160 mA solange bis das Bromphenolblau den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

Färbung. Die Anfärbung erfolgte durch Inkubation mit Ethiumbromid (1 µl/ml Ethiumbromid in A. dest) für 20 Minuten. Anschließend erfolgte die Auswertung unter UV-Licht. Hierfür wurde das Gel-Dokumentationssystem E.A.S.Y RH, das Computerprogramm EASY Win 32 (Herolab, Wiesloch) und eine Digitalkamera (429 k, Herolab, Wiesloch) verwendet.

2.9 Messung von NO im Zellkulturüberstand

Nach der Bestimmung des Einflusses von TFF3 auf die mRNA-Quantität der iNOS, wurde der Einfluss auf die NO-Freisetzung untersucht. Es erfolgte hierfür die Bestimmung von Nitrit, welches durch Reaktion von NO mit Wasser und Hydroxid-Ionen neben Nitrat gebildet wird. Dabei handelt es sich um ein stabiles Produkt von NO, bei dem davon auszugehen ist, dass die Menge des Nitrits proportional zu der des NO ist.

Zur Messung der Nitrit-Konzentration wurde Griess-Reagenz (Romero-Graillet *et al.*, 1997), bestehend aus 1 % Sulfanilamid und 0,1 % 1-Naphthylethylendiamin, beides gelöst in 5 %-iger Phosphorsäure verwendet. Über den Zwischenschritt eines Diazoniumsalzes wird hierbei ein rotes Azo-Produkt durch Reaktion des Diazoniumsalzes mit N-(1-Naphtyl)-ethylendiamin gebildet.

Für diese Untersuchung wurden zu 100 µl des Zellkulturüberstandes 100 µl Griess-Reagenz gegeben und die Menge des entstandenen Azo-Produktes nach einer 15 minütigen Inkubation photometrisch im Mikrotiterplatten-Photometer (SLT Reader 340 ATTC; SLA Laborinstrumente, Karlsheim) bei einer Wellenlänge von 540 nm bestimmt.

2.10 ELISA zum Nachweis von IL-6 und TNF-α

Nachdem der Einfluss von TFF3 auf die Synthese proinflammatorischer Zytokine untersucht worden war, sollte der Einfluss von TFF3 auf die Freisetzung dieser Zytokine auf

Proteinebene untersucht werden. Hierzu wurde der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest (*enzyme-linked-immunosorbent-assay*, ELISA) in Form des Sandwich-ELISA verwendet. Hierfür wurde jeweils ein fertiges Antikörperset (IL-6-Elisa-Set BD OptEIA™ für Ratten; BD Biosciences, USA/ TNF- α -Elisa-Set OptEIA™ für Ratten; BD Biosciences, USA) nach Herstellerangaben verwendet und zur Verbesserung der Sensitivität die (Strept-)Avidin-Biotin-Methode angewendet.

Um die Bindung der Proteine an die 96-Mikrotiter-Platten (Nunc MaxiSorp™, USA) zu ermöglichen, wurden die Platten mit dem jeweiligen Capture-Antikörper, der an ein spezifisches Epitop der Proteine bindet, beschichtet: Die Vertiefungen wurden hierfür mit 100 μ l Capture Antikörper (1:125 verdünnt in Dulbecco's PBS) pro Vertiefung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Vertiefungen fünf Mal für 15 Sekunden mit Waschpuffer (80,00 g NaCl; 11,60 g Na₂HPO₄; 2,0 g KH₂PO₄; 2,00 g KCl ad 10 l A. dest) von dem überschüssigen Antikörpern gereinigt. Zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen wurden 200 μ l Assay-Diluent (Dulbecco's PBS mit 10 % FKS) hinzugegeben und das Gemisch für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Vertiefungen wurden wiederum fünf Mal für 15 Sekunden mit Waschpuffer gewaschen.

Nachdem die Präparation der Platten abgeschlossen war, wurden 50 μ l des Zellkulturüberstandes mit Assay Diluent 1:20 verdünnt. 100 μ l der Proben wurden in die Vertiefungen einpipettiert, wobei in die Leerfelder nur Assay Diluent gegeben wurde. Zusätzlich wurde jeweils eine Standard-Konzentrationsreihe mit 100 μ l rekombinantem IL-6 (5000-75 pg/ml) bzw. TNF- α (1000-31,3 pg/ml) in Assay Diluent auf die Platten gegeben.

Die Platte wurde folgend abgeklebt und für 2 Stunden bei 37 °C (IL-6) bzw. bei Raumtemperatur (TNF- α) inkubiert. Die Platte wurde anschließend fünf Mal für 15 Sekunden gewaschen und 100 μ l des 1:250 (IL-6) bzw. 1:500 (TNF- α) in Dulbecco's PBS verdünnten Detektions-Antikörpers (Biotin-konjugiert) hinzugegeben. Es folgte die Inkubation bei 37 °C (IL-6) bzw. bei Raumtemperatur (TNF- α) für 60 Minuten.

Nach Entfernung der ungebundenen Antikörper durch Waschen der Platte, wurden 100 μ l Enzymreagenz (Sav-HRP, *horseradish peroxidase*, engl. Meerrettich-Peroxidase; 1:250) in jede Vertiefung gegeben und die Platte 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem anschließenden Waschen wurde zum Starten der Reaktion 100 μ l TMB-Assay (TMB Substrate Kit; bestehend aus Peroxidase Lösung und Peroxidase Substrat; 1:1 gemischt; Thermo Scientific, USA) hinzugefügt.

Das in der Lösung enthaltene Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und das Tetramethylbenzidin (TMB) reagierten in einer von der HPR katalysierten Oxidationsreaktion zu einem blauen

Farbstoff. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Stopplösung (*Stop-Solution*, 2N H₂SO₄) nach 10 Minuten beendet. Es folgte die Auswertung im Mikrotiterplatten-Photometer bei 450 nm (Referenz: 570 nm) Wellenlänge.

2.11 Western-Blot

Mit Hilfe des Western-Blots wurde der Einfluss von TFF3 auf die Aktivierung der zur Familie der MAP-Kinasen zählenden Kinasen ERK 1/2 in Mikroglia untersucht.

Um diese Untersuchung durchführen zu können, mussten die Gesamtproteine aus den Zellen isoliert werden. Hierfür wurden die Zellen zunächst durch zweimaliges Spülen mit eiskaltem Dulbecco's PBS, Hinzugabe von 100 µl Lysispuffer (50 mM TRIS (pH7,5); 100 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% Triton) und anschließendes Abschaben in einer Richtung (Cell Craper TPP®; Sarstedt, Nürnberg) von der Platte gelöst. Die auf diese Weise abgelösten Zellen wurden in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß gesammelt und der Proteingehalt nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt.

Proteinbestimmung nach Bradford. Bei dieser Methode wurde der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau (Bio-Rad, München), der in saurer Lösung an kationische und unpolare Epitope von Proteinen bindet, verwendet. Durch die Bindung ändert sich das Absorptionsspektrum von 470 nm (ungebunden) zu 595 nm.

Zur photometrischen Bestimmung der Menge an gebundenem Farbstoff wurden 10 µl der Probe mit 790 µl A. bidest und 200 µl Biorad-Protein-Assay-Lösung (Bio-Rad, USA) vermengt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Aus drei Standards (1 µg/ml BSA) wurde anschließend der Mittelwert ermittelt und in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Probe} : \text{Mittelwert} \times 100 = \mu\text{g} / \text{ml Protein}$$

Nach Abschluss der Proteinbestimmung wurden 5 µg Protein mit SDS-Probenpuffer auf 20 µl aufgefüllt und für 5 Minuten bei 99 °C im Thermoblock (Thermomixer compact; Eppendorf, Hamburg) denaturiert. Dieses Gemisch wurde entweder direkt verwendet oder aber bis zur weiteren Verwendung bei -18 °C eingefroren.

2.11.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um die in den Lysaten enthaltenen Proteine ihrer relativen Molekülmasse entsprechend aufzutrennen, wurde die SDS-Polyacrylamid-Methode verwendet. Unter Einsatz des anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) wurden die Proteine denaturiert, wobei SDS im Überschuss in einem Verhältnis von 1,4 g SDS zu 1 g Protein an die Proteine bindet. Dies führt zu einer negativen Ladung der Proteine, sodass alle Protein-SDS-Komplexe zur Anode wandern.

Die Molekularsiebeeigenschaften der verwendeten Gele führten zu einer Masse-abhängigen Wanderungsgeschwindigkeit, die dem dekadischen Logarithmus der relativen Molekularmasse (M_r) umgekehrt proportional war. Zur besseren Auflösung wurde über das Trenngel ein Sammelgel gegeben, in welchem vor der Auftrennung eine Bündelung in enge Banden erfolgte.

Herstellung der Gele für die SDS-Page. Die 10 %-igen Trenngele und die 4,5 %-igen Sammelgele wurden nach dem Prinzip von Lämmli (Laemmli, 1970) hergestellt. Das Trenngel wurde durch Mischen von 2,15 ml A. bidest, 1,66 ml einer 30 %-igen Acryl-/Bisacrylamidlösung (29:1; Bio-Rad) und 1,3 ml Trenngel-Puffer (45,43 g TRIS; 1 g SDS ad 250 ml A. dest, ph 8,8) hergestellt. Zum Starten der Polymerisierung wurden 15 μ l N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (Temed) und 30 μ l Ammoniumpersulfat-Lösung (10 %-ig, gelöst in A. bidest) hinzugefügt. Die durch zwei abgedichtete Abstandshalter getrennten Glasplatten wurden vor Einfüllung des angesetzten Trenngels gründlich mit 70 % Alkohol entfettet. Das Trenngel wurde bis zur 7 cm-Markierung eingegossen und mit Propanol überschichtet. Während der 15 minütigen Polymerisierung wurde das Sammelgel angesetzt. Das Sammelgel wurde hergestellt, indem 2,89 ml A. bidest und 0,835 ml einer 30 %-igen Acryl-Bisacryllösung (29:1) mit 1,3 ml Sammelgel-Puffer (15,10 g TRIS; 1,00 g SDS ad 250 ml A. dest; ph 6,8) vermischt wurden. Analog zur Produktion des Trenngels wurde die Polymerisierung mit 15 μ l Temed und 30 μ l Ammoniumpersulfat-Lösung (10 %-ig, gelöst in A. bidest) gestartet. Das Propanol über dem Trenngel wurde abgesaugt und das Sammelgel bis zum Rand auf das polymerisierte Trenngel gegossen. Anschließend wurde sofort der Gelkamm eingesetzt, um Taschen für die vorbereitenden Proteinproben zu schaffen, und das Gel wurde mit Propanol überschichtet. Nach Abschluss der 15 minütigen Polymerisierung wurde der Gelkamm entfernt, das Propanol entfernt und die Gelplatte, nach Entfernung des Alkohols, in die Elektrophoresekammer (Bio-Rad, USA) eingesetzt.

Vorbereitung und Auftrennung der Proben. Zu den zu bearbeitenden Proteingemischen wurde SDS-Probenpuffer (0,23 g SDS in 7,25 ml A.dest gelöst; 1,25 ml Sammelgelpuffer; 1 ml Glycerin; 50 mM Dithiothreitol (DTT) ad 10 ml A.dest) hinzugegeben und das Gemisch nochmals für 3 Minuten bei 99 °C denaturiert. Die Gel-Probentaschen wurden anschließend mit 20 µl der vorbereiteten Probe bestückt. Um nach Ablauf der Elektrophorese das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine bestimmen zu können, wurden außerdem 5 µl eines Proteinstandards (PAGERuler™ Prestained Protein Ladder; Fermentas, St. Leon-Rot) aufgetragen. Dieser Standard bestand aus 10 rekombinanten Proteinen mit einem Molekulargewicht zwischen 10 kD und 170 kD, wobei die genaue Zusammensetzung firmenintern ist. Anhand dieser Proteine mit bekanntem Molekulargewicht konnte das Gewicht der untersuchten Proteine bestimmt werden. Die Gel-Probentaschen wurden vorsichtig mit Elektrodenpuffer (12,2 g TRIS; 57,6 g Glycin; 4,0 g SDS ad 4 l A. dest; pH 8,2) überschichtet und die Laufkammer mit Elektrodenpuffer gefüllt. Zum Sichtbarmachen der Lauflinie wurden dem Elektrodenpuffer 10 µl Bromphenolblau-Lösung hinzugefügt. Die Probenauftrennung erfolgte in der Gelelektrophoresekammer (Power Pac 200; Bio-Rad, München) bei 400 V und 125 mA, wobei die Gelelektrophorese gestoppt wurde, wenn das Bromphenolblau das untere Ende des Gels erreicht hatte.

2.11.2 Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran

Mittels des Western-Blot-Verfahrens wurden die durch das SDS-PAGE-Verfahren aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Diese Übertragung erfolgte durch Anlegen eines elektrischen Feldes, wodurch sich eine exakte Wiedergabe des Original-Gels erreichen ließ. Die Übertragung hatte den Vorteil, dass die erhaltenen Membranen über längere Zeit gelagert werden konnten oder aber direkt immunologischen Untersuchungen zugänglich waren.

Für diese Übertragung der aufgetrennten Proteine auf die Nitrozellulosemembran im *Semidryblot*-Verfahren wurde eine Elektrodenkammer (Trans-Blot® SD Electrophoretic Transfer Cell; Bio-Rad, USA) verwendet. Um den Proteintransfer zu erleichtern wurde die PVDF-Membran (7,5 x 7 cm, Hybound-P PVDF Membrane; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) vorbereitet, indem sie für 60 Sekunden in Methanol eingeweicht und anschließend nach Entfernung des Methanols für mindestens 15 Minuten in Transferpuffer äquilibriert wurde. Auf die Kathodenplatte wurden zunächst zwei in Transferpuffer angefeuchtete Whatman-Pappen (Whatman Biometra, Göttingen) und anschließend die Membran und das

Polyacrylamid-Gel gelegt. Die Anodenplatte wurde ebenfalls mit zwei in Transferpuffer angefeuchtete Whatman-Pappen versehen und auf das Gel gelegt. Anschließend wurde der Proteintransfer bei 25 V und 340 mA für ca. 75 Minuten gestartet.

2.11.3 Immundetektion

Zur Detektion von ERK 1/2 wurde neben einem Primärantikörper, der spezifisch an Epitope des gewünschten Proteins bindet, ein an Meerrettich-Peroxidase gebundener Sekundärantikörper verwendet. Durch Zugabe von Luminol konnte eine Peroxidase-abhängige Oxidationsreaktion gestartet werden. Das oxidierte Luminol emittiert Photonen im blauen Lichtspektrum, wobei die Signalstärke proportional zur Quantität der Epitope ist.

Vor der Immundetektion wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch 60 minütige Inkubation in Blockierungspuffer unter ständigem Schütteln abgesättigt. Der Blockierungspuffer bestand aus 5 % Magermilchpulver (Reformhaus) in TBST-Puffer (20,00 mM TRIS; 0,14 M NaCl; 1,00 mM EDTA; 0,1 % Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate (Tween 20 ad 2,5 l A. dest, ph 7,5)).

Folgend wurde die geblockte Membran mit 1 ml Primärantikörper-Lösung (ERK 1/2, 200 µl/ml; Cell Signaling Technology, USA oder p38, 200 µl/ml; Cell Signaling Technology, USA) in einer Verdünnung von 1:2000 in TBST-Puffer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurde die Membran zur Entfernung überschüssiger Antikörper mindestens drei Mal für je 15 Minuten mit TBST-Puffer gespült. Zur quantitativen Bestimmung der gebundenen Primärantikörper wurde für 1 Stunde mit dem an Meerrettich-Peroxidase gebundenen Sekundärantikörper inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde drei Mal für jeweils 15 Minuten gespült und die Membran anschließend mit 2,5 ml Substratlösung (ECL Western blotting reagents; Amersham Pharmacia, UK) behandelt, was zum Start der Enzym-Substrat-Reaktion und somit zur Freisetzung von Chemilumineszenz führte.

Nach Abschluss der Inkubation wurde die Flüssigkeit abgekippt und die Membran in Frappan eingeschlagen in einer lichtdichten Röntgenkassette (Hypercassette; Amersham Pharmacia, UK) positioniert. Die Membran wurde mit einem Chemilumineszenz-Film (Hyperfilm TM-ECLTM; Amersham Pharmacia, UK) belegt bis zum Erreichen der optimalen Signalstärke. Die Entwicklung fand nach Hersteller-Angaben statt. Um genauere Bestimmungen der ERK 2-Proteinmengen zu ermöglichen, wurde statt zwei unterschiedlicher Gele ein Gel weiter bearbeitet („*strippen*“, engl. abziehen). Hierfür wurde der Primärantikörper durch Einweichen der Membran in Methanol für 60 Sekunden und anschließendes Waschen in TBST-Puffer für

15 Minuten entfernt. Des Weiteren wurde drei Mal für jeweils 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,1 M Glycin und anschließend drei Mal für je 15 Minuten mit 0,1 M TRIS bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Blockade der unspezifischen Bindungsstellen in Blockierungspuffer und die Inkubation mit dem neuen Primärantikörper (pERK, 200 µl/ml; Cell Signaling Technology, USA oder pp38, 200 µl/ml; Cell Signaling Technology, USA). Auch hier erfolgte das Sichtbarmachen der Banden durch eine Peroxidasereaktion wie oben beschrieben.

Die erhaltenen Aufnahmen wurden mit Hilfe eines Scanners (Epson Perfection V750 Pro; Epson, Düsseldorf) digitalisiert und im Computer mit Hilfe der PCBAS 2.09 Software (Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt) quantifiziert.

2.12 Immunzytochemische Färbung zur Lokalisation von NF-κB in Mikroglia

NF-κB (engl.: *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) ist ein Transkriptionsfaktor, der bei Aktivierung vom Zytosol in den Kern transloziert. Um einen Anhalt für die Aktivierung der Mikroglia zu erhalten, wurden immunzytochemische Färbungen zur Lokalisation von NF-κB angefertigt. Die Deckgläschen mit den Mikroglia-Zellen wurden hierfür nach der 1 stündigen Stimulation mit Dulbecco's PBS gewaschen und anschließend mit gekühlter Zamboni-Lösung (2% Paraformaldehyd; 15% gesättigte Pikrinsäure in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4) für 30 Minuten bei Raumtemperatur vorfixiert. Anschließend wurde zwei Mal mit Dulbecco's PBS gewaschen und die Deckgläser in Glasschalen mit 3 ml Aceton überführt. Hier wurden sie 10 Minuten lang inkubiert, um die Anfärbung von Kernproteinen zu ermöglichen. Nach zwei Waschschritten mit Dulbecco's PBS wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch 20 minütige Inkubation mit 150 µl einer Lösung, die aus 1% BSA in Dulbecco's PBS bestand, abgesättigt. Anschließend wurde die Lösung entfernt und mit dem Primärantikörper (NF-κB Kaninchen polyklonal IgG, p65, 200 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) in einer Verdünnung von 1:100 für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte nach dreimaligem Waschen mit Dulbecco's PBS die 45 minütige Inkubation mit dem 1:700 verdünnten Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen IgG, Alexa-Fluor 488, 1 mg/ml). Die Inkubation fand auf Grund der hohen Sensibilität des Antikörpers gegenüber Licht in Dunkelheit statt. Wiederum wurden die Deckgläschen drei Mal mit Dulbecco's PBS gespült und anschließend

mit destilliertem Wasser überschichtet. Die Objektträger wurden mit dem Eindeckmedium Immu-Mount (Thermo Scientific, UK) versehen und die abgetropften Deckgläser mit der Zellseite nach unten auf den Objektträger gelegt und im Kühlschrank ausgehärtet. Nach der mindestens 2 stündigen Aushärtung wurden zur Auswertung der Immunzytochemie und zur Erzeugung digitaler Bilder das Fluoreszenzmikroskop Axiophot (Carl Zeiss, Göttingen) und die Axiocam Fotokamera (Carl Zeiss, Göttingen) verwendet. Zur Beurteilung wurde die Software Axio Vison 4.7.2 (Carl Zeiss, Göttingen).

2.13 Statistische Auswertung und Berechnung

Zur graphischen Darstellung wurde neben Microsoft Excel GraphPad Prism (Version 5.04) verwendet. Alle Experimente wurden mindestens drei Mal durchgeführt und mit der Varianzanalyse (ANOVA) mit nachfolgendem Bonferroni-Test ausgewertet. Der Vergleich von zwei Parametern erfolgte mit dem t-Test, wobei hier eine Wahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ als signifikant angenommen wurde. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM (*standard error of the mean*) dargestellt.

3. Ergebnisse

Aus der Literatur war die Expression von TFF3 im ZNS bereits bekannt (Hinz *et al.*, 2004), eine Aussage über die Zugehörigkeit zu den einzelnen Zelltypen konnte bisher allerdings nicht getroffen werden. Zum Nachweis von TFF3 in Gliazellen wurde neben den immunhistochemischen und immunzytochemischen Färbungen auch eine qPCR durchgeführt.

3.1 Nachweis von TFF3 in Zellen des ZNS

3.1.1 Immunhistochemischer Nachweis von TFF3-Protein in Hirnschnitten

Um die Frage zu beantworten, in welchen Zellen des ZNS eine TFF3-Expression nachzuweisen ist, wurden immunhistochemische Färbungen an Paraffinschnitten (7 μm) des Großhirns von zwei Tage alten Ratten durchgeführt. Dafür wurden diese mit einem spezifischen Antikörper gegen TFF3 inkubiert und die spezifische Antikörperbindung anschließend mit einem biotinylierten Sekundärantikörper und dem Chromogen DAB gezeigt. Es wurden Färbekontrollen mitgeführt. Als Positivkontrolle dienten Paraffinschnitte des Kolons, welches für seine Expression von TFF3 hinreichend bekannt und beschrieben ist. Als Negativkontrolle wurden die Färbungen der Gewebe ohne den spezifischen TFF3-Primärantikörper durchgeführt.

Abb. 3.1 zeigt eine Braunfärbung von TFF3-Protein in einem repräsentativen Hirnschnitt (A) und wie erwartet in der Positivkontrolle des Kolons (C). In den Negativkontrollen wurde keinerlei Braunfärbung detektiert (B, C), sodass davon ausgegangen werden kann, dass TFF3 spezifisch im Großhirn und Kolon von 2 Tage alten Ratten nachgewiesen wurde. Die TFF3 positiven Zellen im Hirnschnitt (A) haben hauptsächlich eine Größe ca. 18 μm . In der Literatur wird die Größe von Astrozyten in Ratten mit einer Durchschnittsgröße von 56 μm angegeben (Oberheim *et al.*, 2009). Allerdings bezieht sich diese Angabe auf Astrozyten in adulten Ratten und auf die gesamte Zellgröße (Zellkörper und Fortsätze), sodass es sich bei den hier relativ großen gefärbten Zellen um Astrozyten handeln kann.

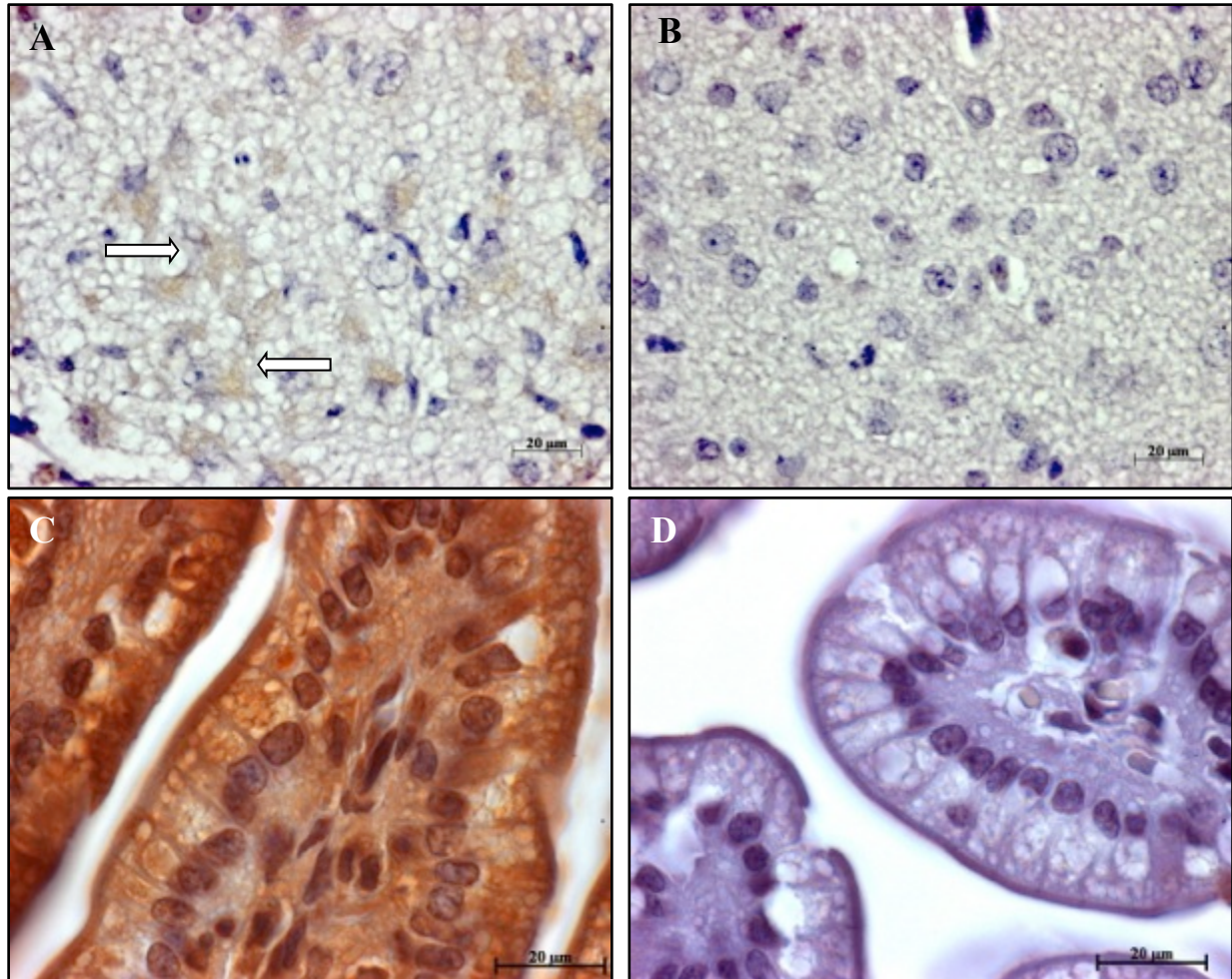


Abb. 3.1: Nachweis von TFF3 im Großhirn neugeborener Ratten. Mittels Immunhistochemie wurde in den Schnitten vom Großhirn 2 Tage alter Ratten relativ große, spezifisch braun gefärbte (TFF3-positive Zellen im Neuropil detektiert (A). Auf Grund der Größe wurde davon ausgegangen, dass es sich hierbei um Astrozyten handelt (Pfeile). Die Kontrolle zeigt lediglich die durch die Gegenfärbung mit Hämalaun hervorgerufene Blaufärbung der Zellkerne und die unspezifische Hintergrundfärbung (B). In der Positivkontrolle (Kolon) wurde TFF3 in der gesamten Mukosa und insbesondere in den Becherzellen nachgewiesen (C). Die zugehörige Kontrolle zeigt keinerlei Braunfärbung (D).

3.1.2 Immunzytologischer Nachweis von TFF3-Protein in Astrozyten

Um die Hypothese, dass es sich bei den in Abb. 3.1 (A) gefärbten Zellen um Astrozyten handelt, zu bestätigen, wurden weitere Untersuchungen an Astrozyten und Mikroglia aus Primärkulturen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen auf Deckgläser ausgesät und mit einem spezifischen Antikörper gegen TFF3 inkubiert. Die spezifische Antikörperbindung wurde anschließend mit einem Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper, der nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 493 nm grünes Licht emittiert, gezeigt. Die Zellkerne wurden mit Bisbenzimid, einem durch UV-Anregung blau fluoreszierenden Farbstoff, der mit

Thymidin und Adenin interkaliert, gefärbt (Abb. 3.2). Es wurden Negativ-Färbekontrollen ohne spezifischen TFF3-Antikörper mitgeführt.

In den Astrozyten zeigte sich eine starke Grünfärbung des Zytoplasmas (A), welche in den Mikroglia (C) deutlich schwächer ausgeprägt war. In den Negativkontrollen wurden lediglich die Zellkerne blau angefärbt, was die Spezifität der Färbung zeigt (C, D). Somit bestätigt der immunzytologische Nachweis von TFF3-Protein in Astrozyten die anhand der immunhistochemischen Färbung aufgestellte Hypothese.

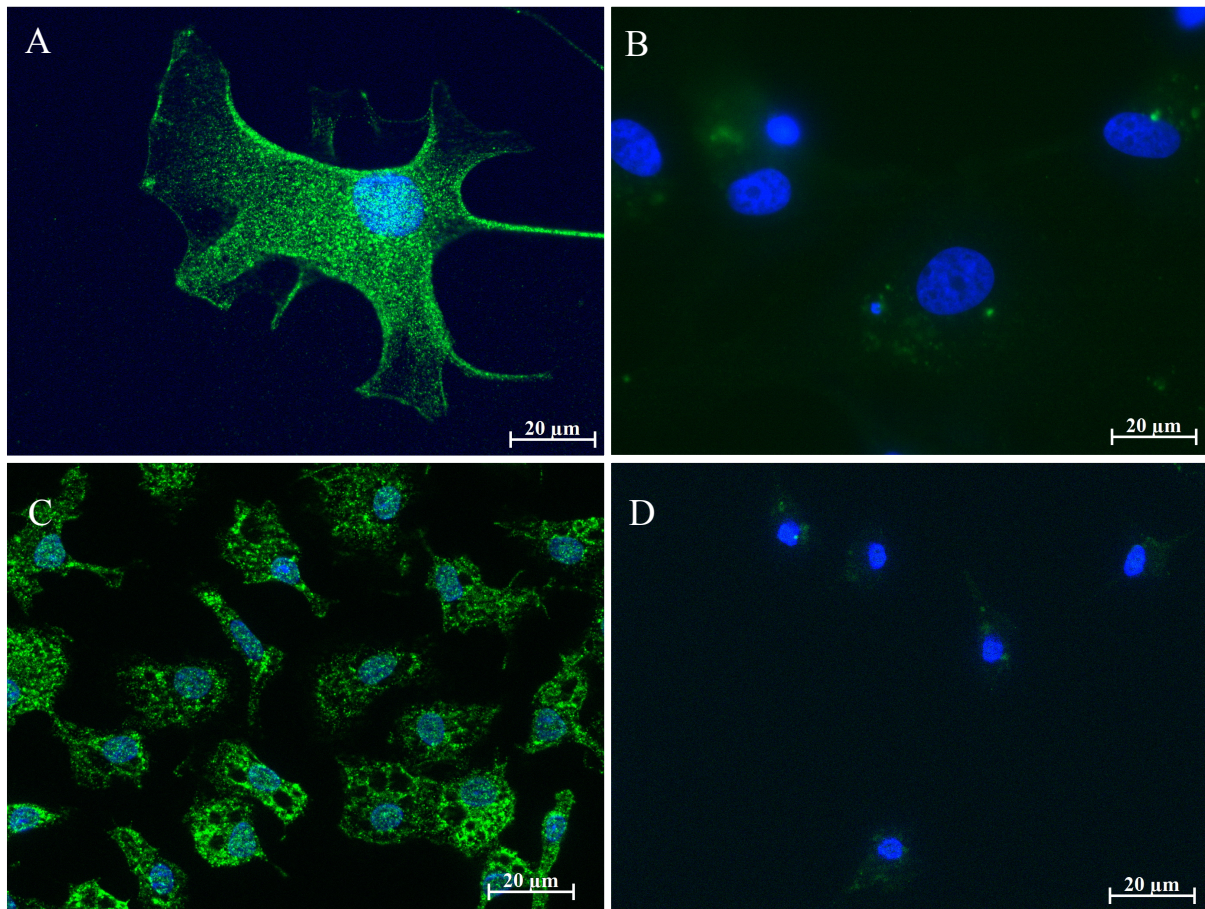


Abb. 3.2: Nachweis von TFF3-Protein in Gliazellen des ZNS. Mittels Immunfluoreszenzfärbung wurden in primären Astrozyten große Mengen an TFF3-Protein detektiert (A), wohingegen in Mikroglia nur geringe Mengen nachgewiesen werden konnten (C). Die Negativ-Färbekontrollen zeigten kaum grüne Fluoreszenz, nur blau fluoreszierende Zellkerne mit etwas unspezifischer Hintergrundfärbung (B, D).

3.1.3 Nachweis von TFF3-mRNA in Astrozyten

Nachdem der eindeutige Nachweis von TFF3 auf Proteinebene erbracht worden war, wurden Astrozyten und Mikroglia mittels spezifischer Primer und Syber®-Green-System hinsichtlich einer TFF3-Synthese mittels qPCR untersucht. Zum Nachweis der Spezifität des PCR-Produktes erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung mit anschließender Färbung mit Ethiumbromid und Auswertung unter UV-Licht. Die Abbildung 3.3 zeigt eine spezifische Bande für TFF3 (80 bp) in Astrozyten, jedoch nicht in Mikroglia. Das *Housekeeping-Gen* GAP-DH wurde in Astrozyten und Mikroglia mit einer spezifischen Bande von 223 bp detektiert. Hiermit wurde erneut bestätigt, dass Astrozyten sowohl auf mRNA- als auch auf Proteineben TFF3 exprimieren.

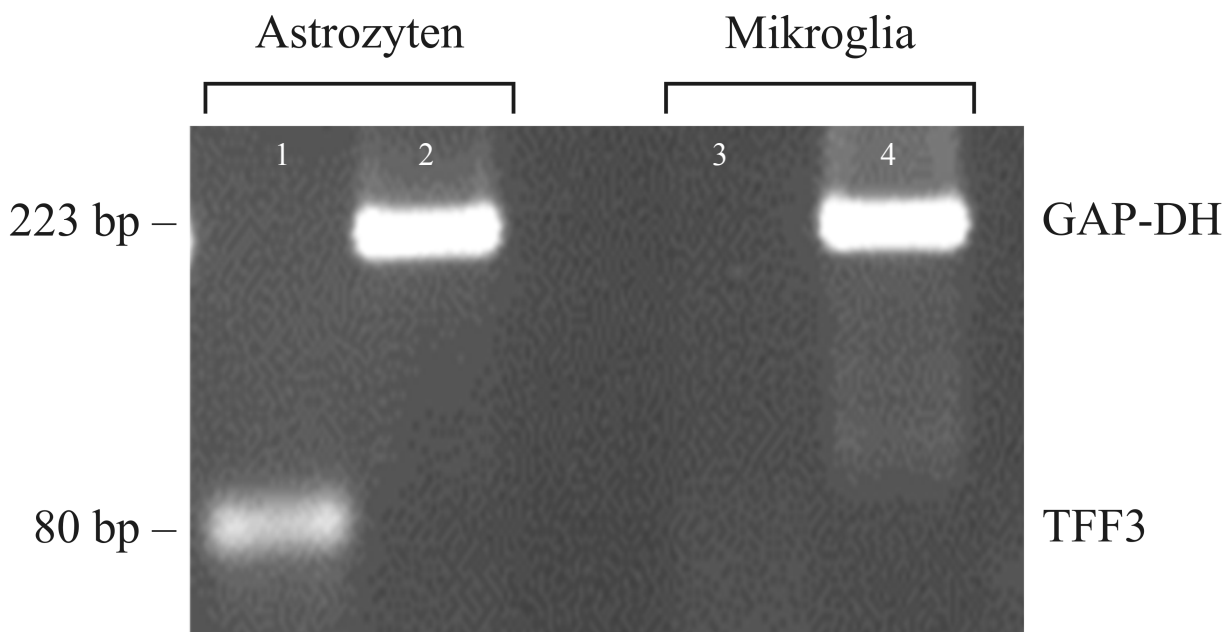


Abb. 3.3: Darstellung eines repräsentativen PCR-Gels zum TFF3-Nachweis. TFF3 konnte in Astrozyten eindeutig nachgewiesen werden, was die spezifische Bande (Bahn 1) zeigt. Für Mikroglia konnte dieser Nachweis nicht erbracht werden (Bahn 3). In beiden Zelltypen wurde GAP-DH mit einer Bande von 223 bp als Kontrolle detektiert (Bahn 2 und 4).

3.1.4 LPS führt zu einer Reduktion der TFF3-mRNA in Astrozyten

Um die Reaktion von Astrozyten und Mikroglia auf entzündliche Prozesse, hier nachgestellt durch die Gabe von LPS, hinsichtlich ihrer TFF3-mRNA-Synthes zu untersuchen, wurden die Astrozyten und Mikroglia mit LPS stimuliert und die TFF3-mRNA-Menge nach 6 und nach 24 Stunden mittels qPCR unter Verwendung des TaqMan®-Systems im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle bestimmt.

Es zeigte sich sowohl nach 6 als auch nach 24 Stunden eine signifikante Reduktion der TFF3-mRNA in den LPS-stimulierten Astrozyten (Abb. 3.5), wobei nach 6 Stunden die TFF3-mRNA-Quantität von 100 % auf 74,2 % und nach 24 Stunden weiter auf 36 % reduziert wurde. In den Mikroglia konnte keine TFF3-mRNA detektiert werden (ohne Abbildung).

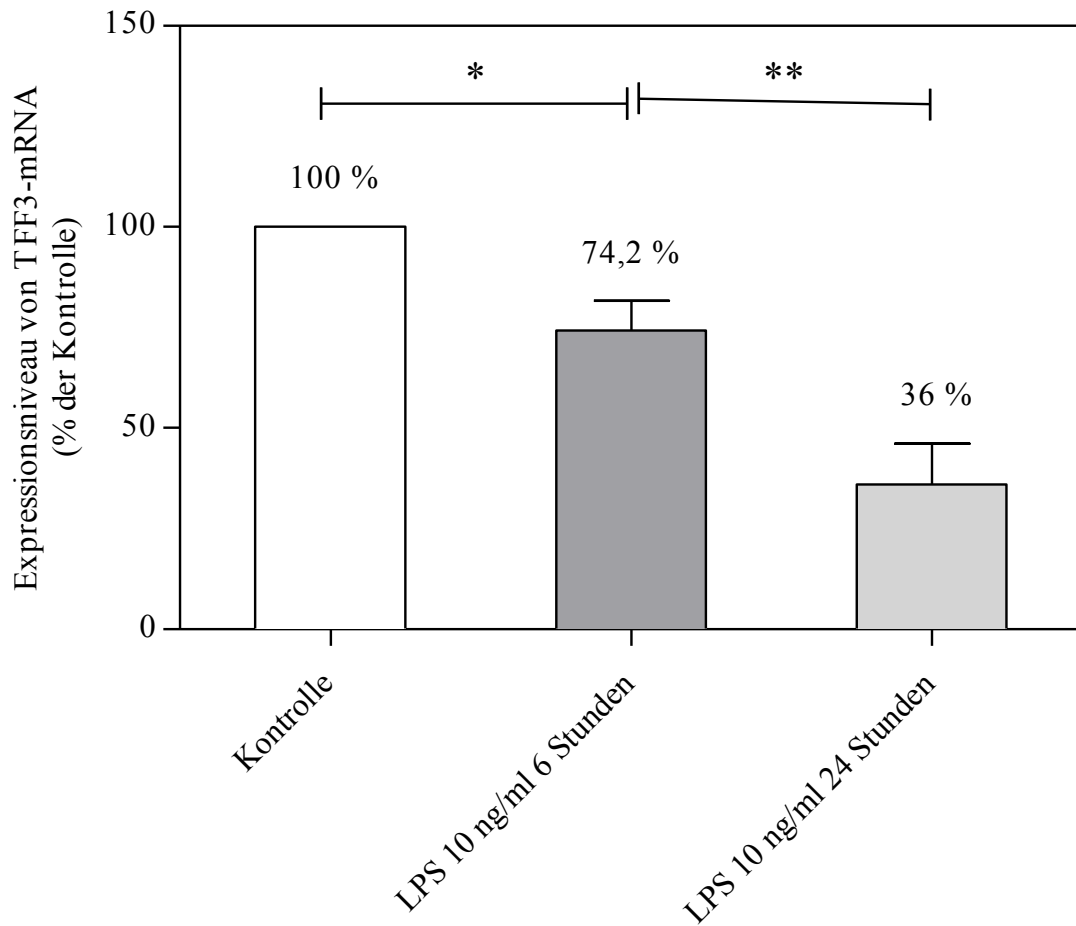


Abb. 3.4: qPCR zur Bestimmung der TFF3-Konzentration in stimulierten Astrozyten. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zeigte sich in den LPS-stimulierten Astrozyten nach 6 Stunden eine signifikante Reduktion der TFF3-mRNA von 100 % auf 74,2 % und nach 24 Stunden von 100 % auf 36 %. (Mittelwert \pm SEM, $n = 3$, $p^* < 0,05$, $p^{**} < 0,01$)

3.2 Einfluss von TFF3 auf die Aktivierung von Mikroglia

Nachdem sowohl der Nachweis der TFF3-Expression in Astrozyten auf RNA- und Proteinebene, als auch der einer verminderten mRNA-Expression nach LPS-Gabe erbracht worden war, stellte sich die Frage, ob von Astrozyten gebildetes TFF3 mikrogliale Zellfunktionen beeinflussen kann. Für diese Untersuchungen wurden Mikroglia mit TFF3 in den Konzentrationen 500 ng/ml oder 50 ng/ml in An- und Abwesenheit von LPS [10 ng/ml] stimuliert. Zunächst wurde die Veränderung der iNOS bestimmt, indem die Menge der iNOS-mRNA mittels qPCR unter Verwendung des TaqMan[®]-Systems gemessen wurde. Anschließend wurde das Produkt der iNOS durch NO-Messungen mittels Griess-Reagenz quantitativ bestimmt.

3.2.1 TFF3 führt zu einer Reduktion der iNOS-mRNA in stimulierten Mikroglia

Bei Zugabe von TFF3 in einer Konzentration von 500 ng/ml zeigte sich nach einer Stimulationsdauer von 6 Stunden eine signifikante Reduktion von 100 % auf 67,7 %. Bei einer TFF3-Konzentration von 50 ng/ml war die Menge der iNOS-mRNA von 100 % auf 66,3 % vermindert (Abb. 3.6). Die Werte sind in Prozent der mit LPS [10 ng/ml] stimulierten Zellen dargestellt.

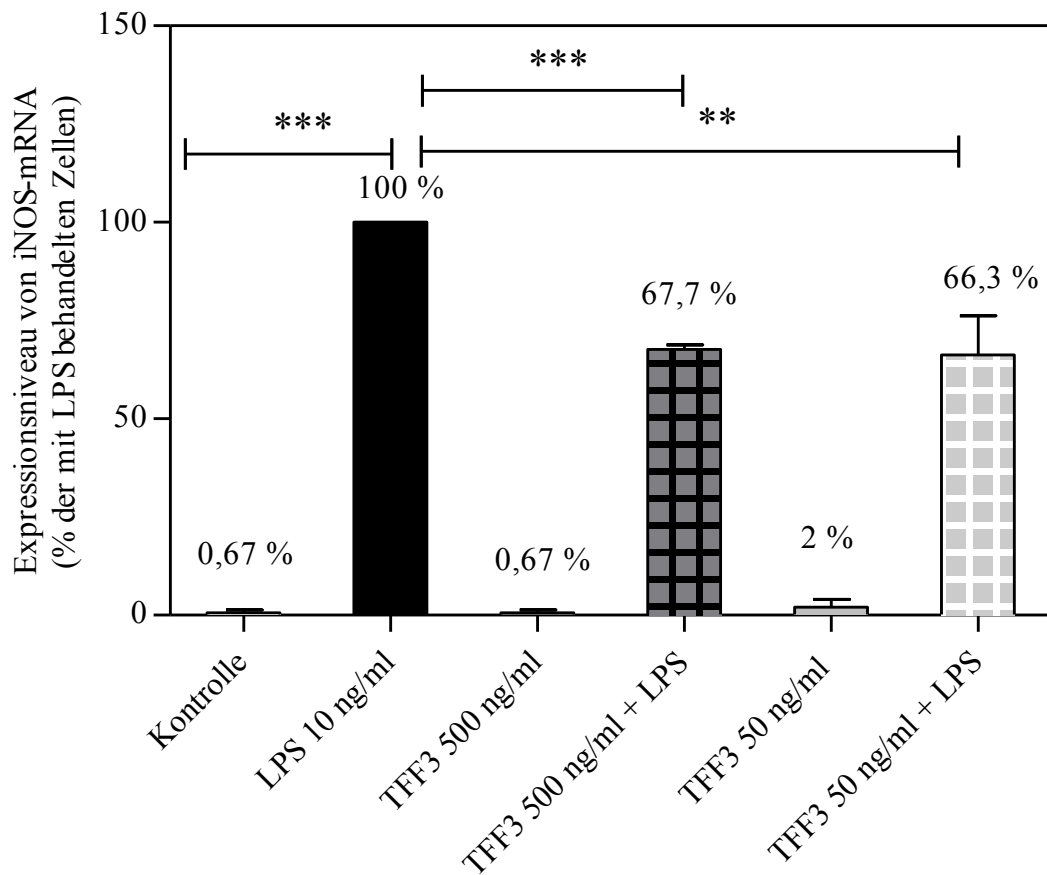


Abb. 3.5: qPCR zur Bestimmung der iNOS-mRNA in Mikroglia nach 6 Stunden Stimulation. Es erfolgte die Amplifikation der durch reverse Transkription entstandenen cDNA mit dem TaqMan[®]-System. Nach einer 6-stündigen Stimulation der Mikroglia mit einem Gemisch von TFF3 in den Konzentrationen 500 ng/ml und 50 ng/ml jeweils mit LPS 10 ng/ml ließ sich im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit LPS [10 ng/ml] eine Reduktion der iNOS-mRNA-Quantität von 100 % auf 67,7 % (500 ng/ml) und von 100 % auf 66,3 % (50 ng/ml) verzeichnen. TFF3 zeigte keinen Einfluss auf die iNOS-Expression in unstimulierten Zellen. (Mittelwert \pm SEM, n = 3; p*** < 0,001, p** < 0,01)

Bei einer Stimulationsdauer von 24 Stunden konnten ebenfalls signifikante Reduktionen der mRNA-Quantität bewiesen werden, es zeigten sich Verminderungen jeweils von 100 % auf 65,5 % (TFF3 500 ng/ml) und 71,2 % (TFF3 50 ng/ml) (Abb. 3.7).

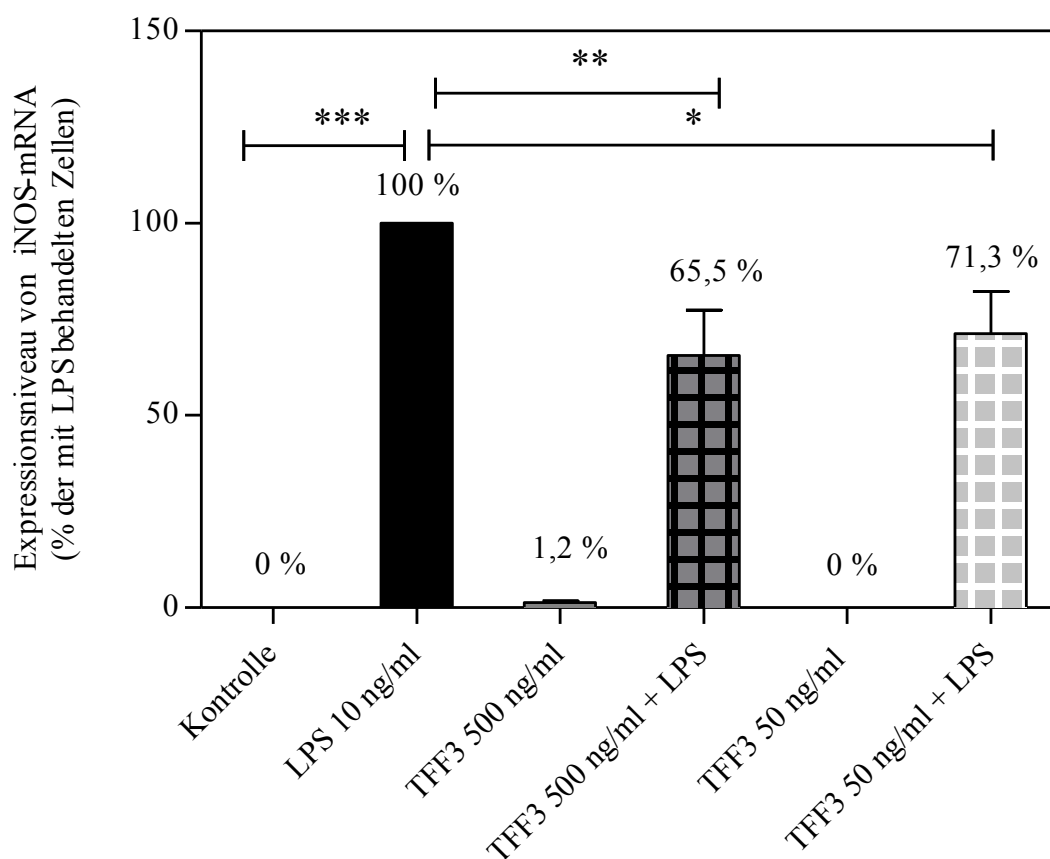


Abb. 3.6: qPCR zur Bestimmung der iNOS-mRNA in Mikroglia nach 24 Stunden Stimulation. Die revers transkribierte mRNA wurde mit der qPCR amplifiziert und das Fluoreszenzsignal des TaqMan®-Farbstoffs in Relation zum Housekeeping Gen 18srRNA gemessen. Es zeigte sich nach einer Stimulationszeit von 24 Stunden mit TFF3 [500 ng/ml] mit LPS [10 ng/ml] (A) und TFF3 [50 ng/ml] mit LPS [10 ng/ml] (B) eine signifikante Reduktion der iNOS auf Genebene von jeweils 100 % auf 65,5 % und 71,2 %. Die alleinige Zugabe von TFF3 führte zu keiner verstärkten oder verminderten Expression der iNOS. (Mittelwert \pm SEM, $n = 4$, $p^{**} < 0,01$, $p^{***} < 0,001$)

3.2.2 Nachweis von NO im Zellkulturüberstand von Mikroglia

Um den Einfluss von TFF3 auf die iNOS-Aktivität in Mikroglia weiter zu klären, erfolgte eine Quantifizierung des Produktes der iNOS durch indirekte Bestimmung von NO im Zellkulturüberstand mittels Griess-Reagenz. Dabei wurde Nitrit als stabiles Produkt von NO, welches mit den Komponenten des Griess-Reagenz einen Azofarbstoff bildet, photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm bestimmt. In dieser Untersuchung konnte keine signifikante Reduktion des NO-Gehaltes bei Zugabe von TFF3 zu den stimulierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.7).

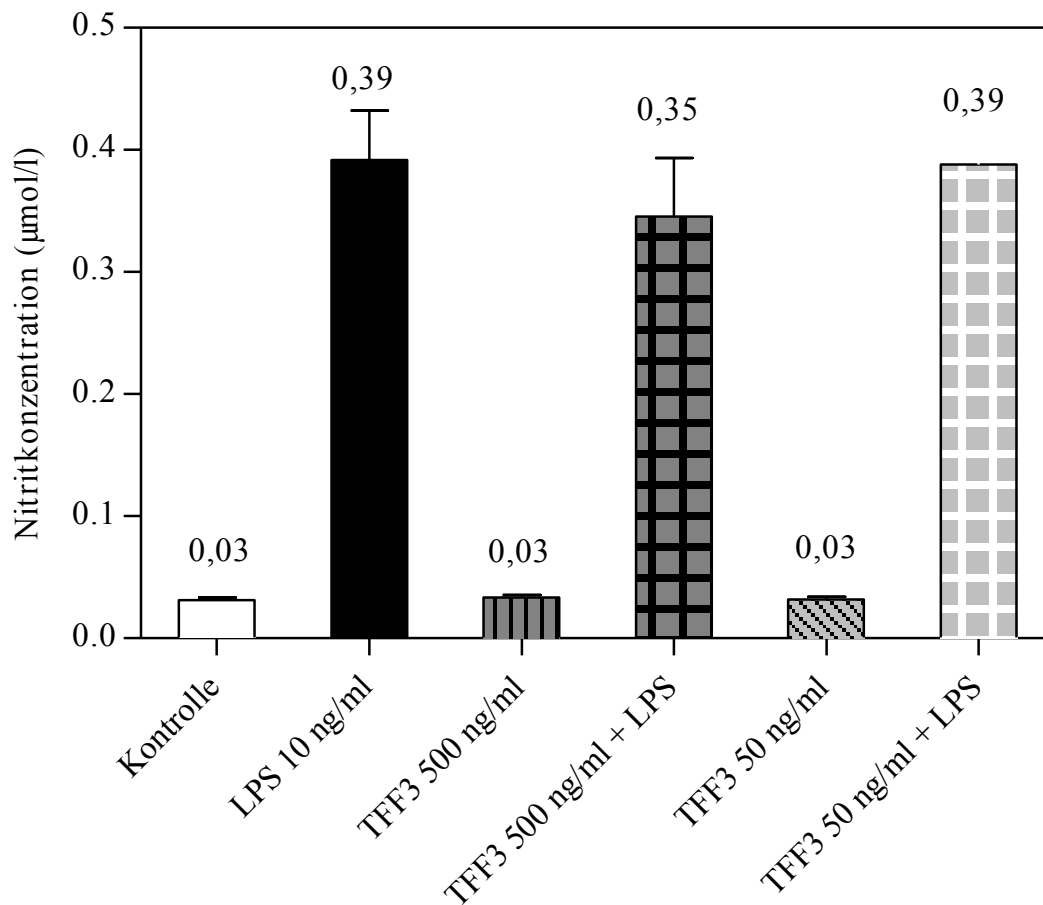


Abb.3.7: NO-Messung im Zellkulturüberstand von Mikroglia. Es zeigte sich nach einer Stimulationsdauer von 24 Stunden kein signifikanter Einfluss von TFF3 auf die NO-Produktion in stimulierten Mikroglia. Es konnte ebenfalls kein Einfluss von TFF3 ohne Zugabe von LPS auf die Konzentration von NO nachgewiesen werden. (Mittelwert \pm SEM, n = 10)

3.3 Einfluss von TFF3 auf die mRNA-Synthese proinflammatorischer Zytokine

Nachdem die Bestimmung der iNOS-mRNA-Menge eine Reduktion der Aktivität der Mikroglia erbracht hatte, wurde der Einfluss von TFF3 auf die Quantität der mRNA der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α untersucht. Diese Zytokine werden vermehrt bei Entzündungen im ZNS produziert und unterhalten das entzündliche Geschehen. Für die Bestimmung der mRNA-Menge wurde einem Teil der stimulierten Zellen TFF3 in den Konzentrationen 500 ng/ml oder 50 ng/ml hinzugefügt. Nach 6 oder 24 Stunden Stimulation erfolgte die qPCR-Analyse.

3.3.1 TFF3 führt zu einer Reduktion der IL-1 β -mRNA in stimulierten

Mikroglia

Die Messung der IL-1 β -mRNA ergab nach 6 Stunden und nach 24 Stunden Stimulation bei Inkubation der Mikroglia mit TFF3 und LPS im Vergleich zur isolierten LPS-Stimulation einen Abfall des Transkriptionsprodukts. Nach 6 Stunden Stimulation ließ sich eine Reduktion von 100 % auf 68 % (TFF3 500 ng/ml) und von 100 % auf 73,3 % (TFF3 50 ng/ml) nachweisen (Abb. 3.8).

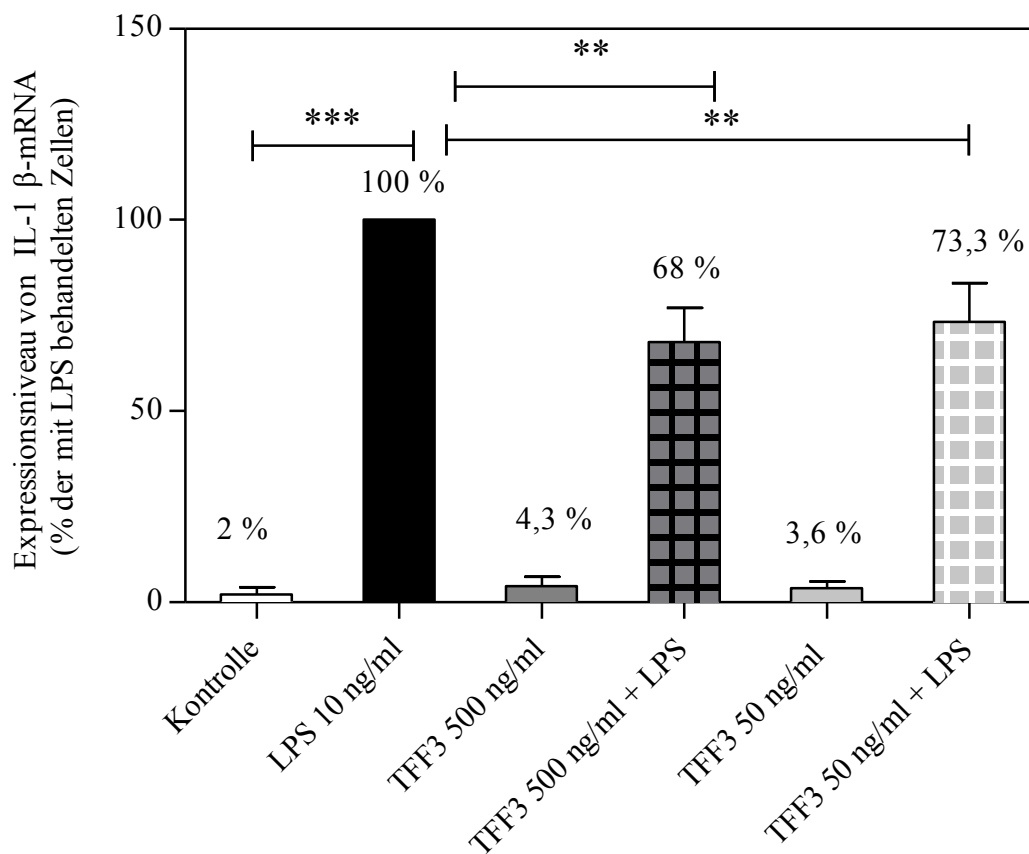


Abb. 3.8: qPCR zur Bestimmung IL-1 β -mRNA in Mikroglia nach 6 Stunden Stimulation. Der mit Hilfe des TaqMan[®]-Systems bestimmte mRNA-Gehalt der mit LPS [10 ng/ml] und TFF3 in den Konzentrationen 500 ng/ml und 50 ng/ml stimulierten Zellen war mit 68 bzw. 73,3 % signifikant niedriger verglichen mit den ausschließlich mit LPS [10 ng/ml] inkubierten Zellen (100 %). Ein Einfluss von TFF3 auf unstimulierte Zellen konnte nicht nachgewiesen werden. (Mittelwert \pm SEM, n = 3, p* < 0,05, p** < 0,01, p*** < 0,001)

Nach 24 Stunden zeigte sich eine Reduktion von jeweils 100 % auf 72,7 % bei einer Konzentration von 500 ng/ml und auf 66,5 % bei Zugabe von TFF3 50 ng/ml (Abb. 3.9).

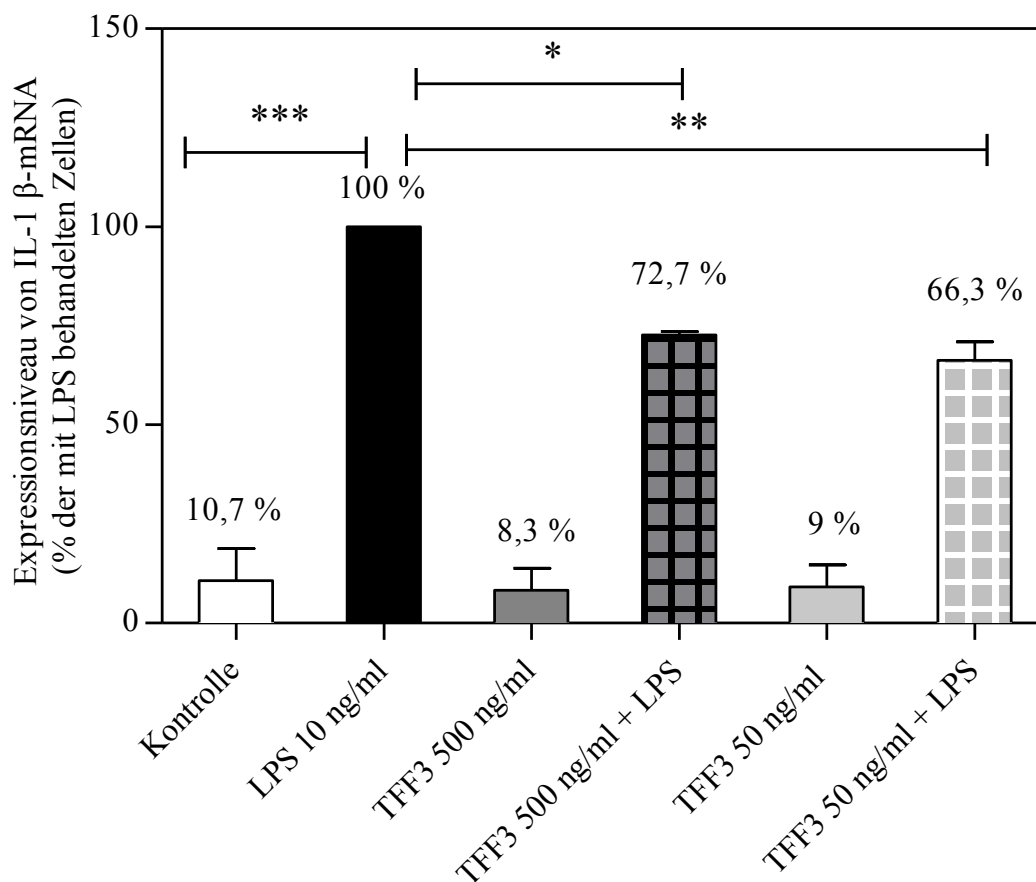


Abb. 3.9: qPCR zur Bestimmung IL-1 β -mRNA in Mikroglia nach 24 Stunden Stimulation. Die mittels qPCR gemessene Quantität der mRNA von IL-1 β war unter LPS-Zugabe im Vergleich zur Kontrolle und zur isolierten TFF3-Zugabe deutlich erhöht. Bei gleichzeitiger Inkubation der Mikroglia mit LPS [10 ng/ml] und TFF3 in den Konzentrationen 500 ng/ml und 50 ng/ml zeigt sich eine Reduktion des mRNA-Gehalts von jeweils 100 % auf 72,7 % und 66,5 %. In unstimulierten Zellen konnte bei Zugabe von TFF3 keine Veränderung des Expressionsniveaus von IL-1 β detektiert werden. (Mittelwert \pm SEM, n = 3 (500 ng/ml) bzw. 4 (50 ng/ml), p* < 0,05, p** < 0,01, p*** < 0,001)

3.3.2 TFF3 führt zu einer Reduktion der IL-6-mRNA in stimulierten Mikroglia

Die mittels qPCR relativ zu den mit LPS-stimulierten Zellen gemessene mRNA-Menge ergab nach 6 und nach 24 Stunden Stimulation bei Inkubation der Mikroglia mit TFF3 und LPS einen Abfall des Transkriptionsprodukts. Es zeigt sich nach 6 Stunden Stimulation eine Senkung des mRNA-Gehaltes von 100 % auf 75,7 % bei Inkubation der mit LPS [10 ng/ml] stimulierten Mikroglia mit TFF3 in der Konzentration 500 ng/ml und von 100 % auf 71,7 %, wenn den stimulierten Zellen TFF3 [50 ng/ml] verabreicht wurde (Abb. 3.10).

Fand die Messung nach 24 Stunden Stimulation statt, zeigten sich für die Konzentration 500 ng/ml und 50 ng/ml Reduktion von jeweils 100 % auf 72 % und auf 76,7 % (Abb. 3.11).

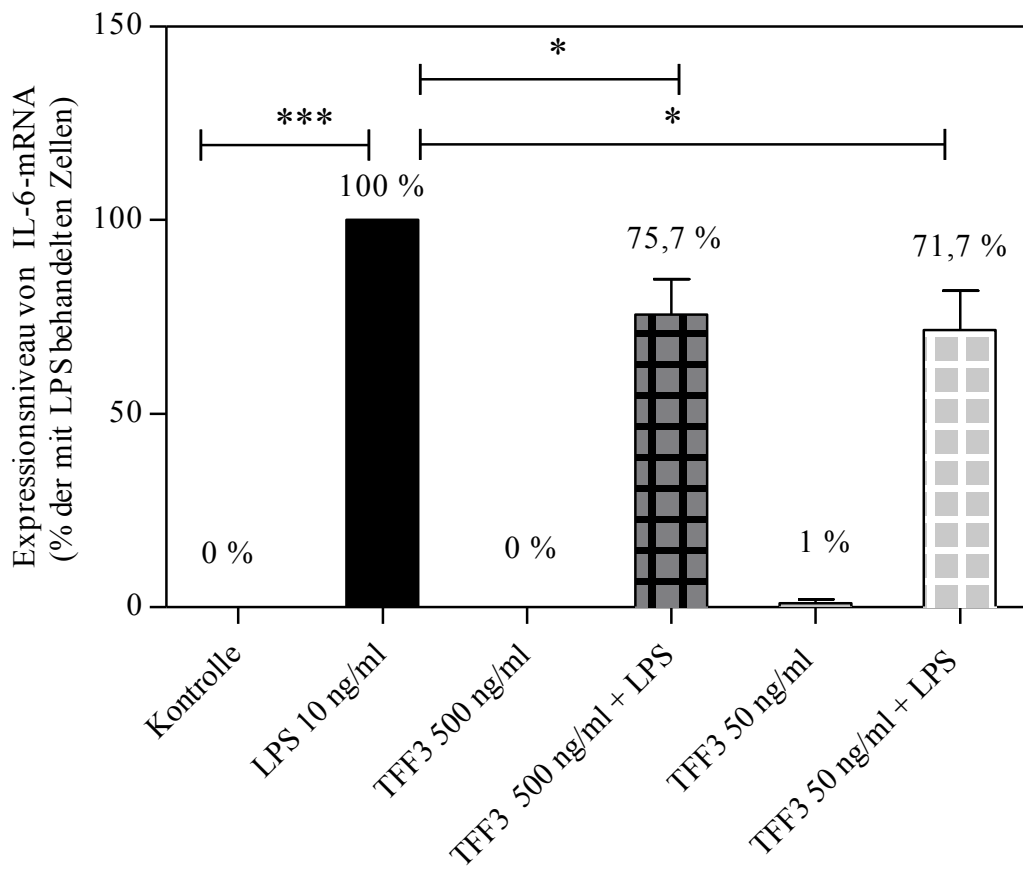


Abb. 3.10: qPCR zur Bestimmung IL-6-mRNA in Mikroglia nach 6 Stunden Stimulation. Es erfolgte die quantitative Bestimmung der mRNA-Menge mittels qPCR nach vorausgegangener reverser Transkription der mRNA in eine cDNA. Die Inkubation der für 6 Stunden stimulierten Mikroglia mit TFF3 in den Konzentrationen 500 ng/ml und 50 ng/ml führte in der Untersuchung mit Hilfe der qPCR verglichen mit der alleinigen LPS-Stimulation zu einer von jeweils 100 % auf 75,7 % bzw. 71,7 % reduzierten mRNA-Menge an IL-6. Wurde TFF3 zu unstimulierten Zellen gegeben, konnte kein Einfluss auf die Expression von IL-6 gezeigt werden. (Mittelwert \pm SEM, n = 3, $p^* < 0,05$, $p^{***} < 0,001$)

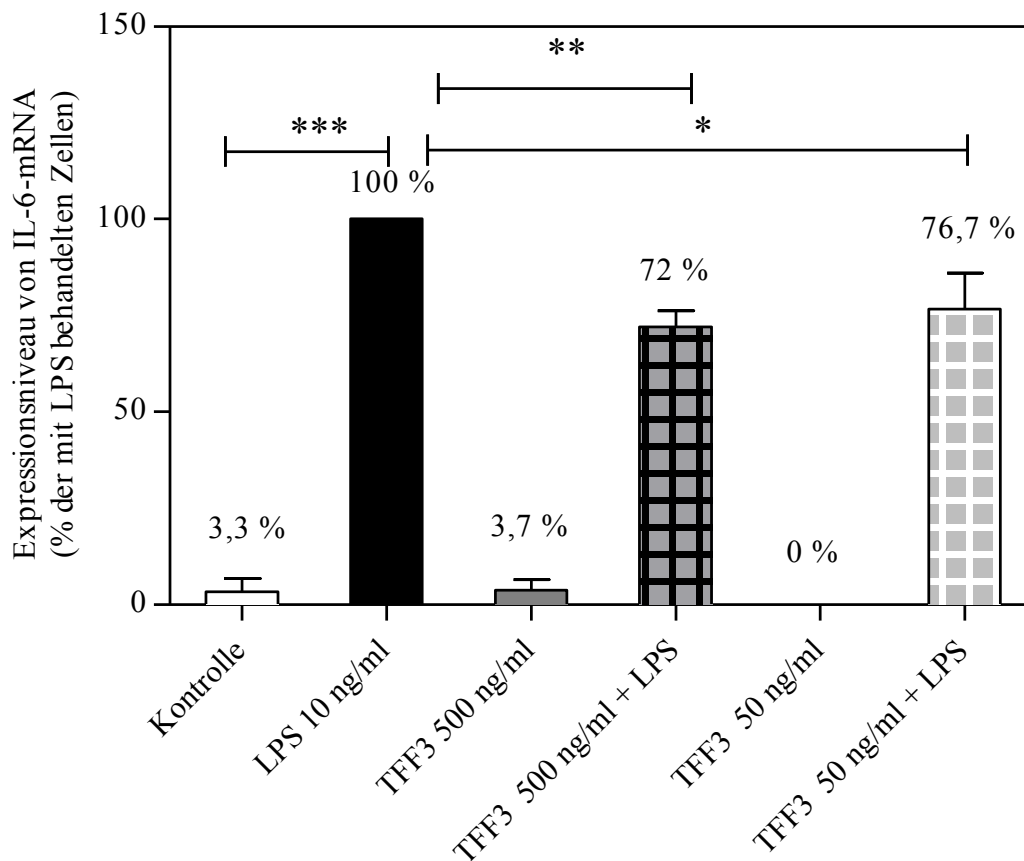


Abb. 3.11: qPCR zur Bestimmung IL-6-mRNA in Mikroglia nach 24 Stunden Stimulation. Unter Verwendung des Taqman[®]-Systems wurde mittels qPCR nach 24 stündiger Stimulation der Gehalt an IL-6-mRNA bestimmt. Nach Inkubation der stimulierten Mikroglia mit TFF3 war der Gehalt an IL-6-mRNA im Vergleich zur ausschließlich mit LPS [10 ng/ml] stimulierten Probe von 100 % auf 72 % (500 ng/ml) bzw. 76,7 % (50 ng/ml) reduziert. TFF3 zeigte in unstimulierten Zellen keinen Einfluss auf die Expression von IL-6. (Mittelwert \pm SEM, n = 3, $p^* < 0,05$, $p^{**} < 0,01$, $p^{***} < 0,001$)

3.3.3 TFF3 führt zu einer Reduktion der TNF- α -mRNA in stimulierten Mikroglia

Die Messung der mRNA ergab nach 6 und nach 24 Stunden bei Inkubation der Mikroglia mit TFF3 und LPS im Vergleich zur isolierten LPS-Stimulation einen Abfall des Transkriptionsprodukts. Die Quantität der TNF- α -mRNA war nach 6 stündiger Stimulation von jeweils 100 % auf 53 % bei Zugabe von TFF3 [500 ng/ml] und auf 56,3 % bei Zugabe von TFF3 in einer Konzentration von 50 ng/ml reduziert (Abb. 3.12).

Auch nach 24 Stunden Stimulation war der mRNA-Gehalt vermindert. So betrug er statt 100 % in der LPS-stimulierten Probe nach Inkubation mit TFF3 in der Konzentration 500 ng/ml 54,3 % und in der Konzentration 50 ng/ml 96 % (Abb. 3.13).

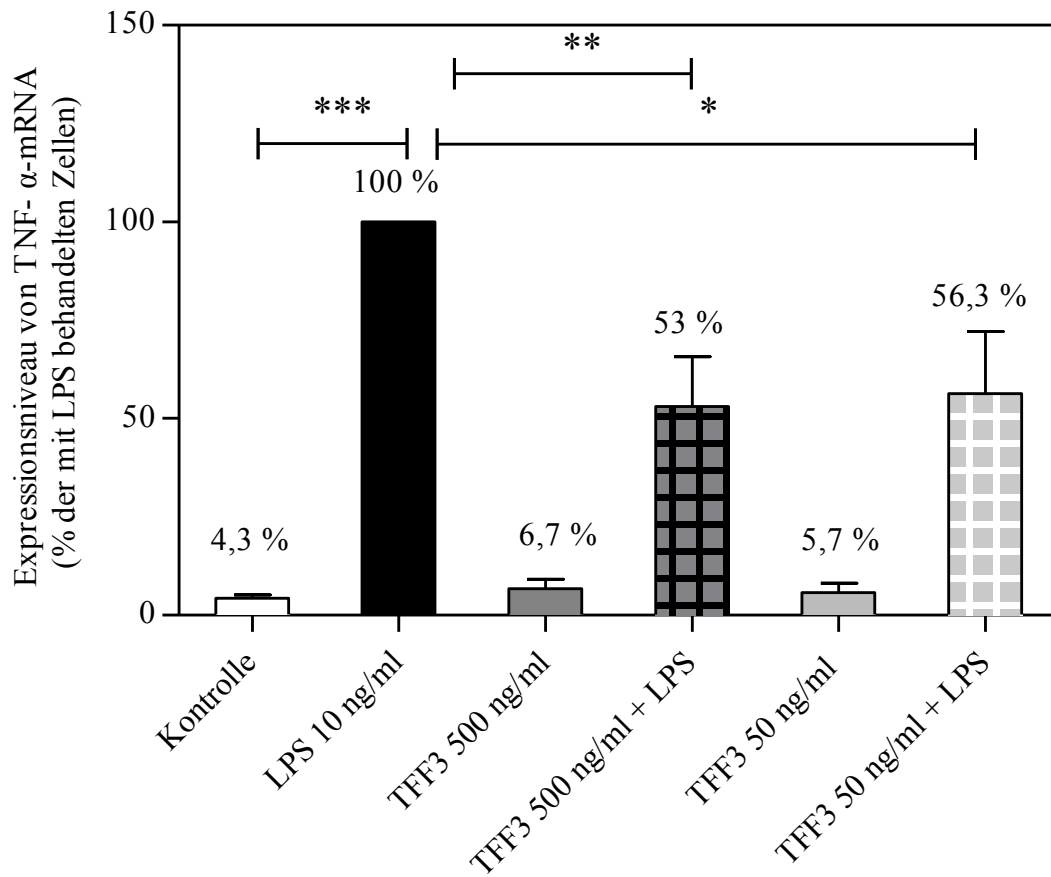


Abb. 3.12: qPCR zur Bestimmung TNF- α -mRNA in Mikroglia nach 6 Stunden Stimulation. Zur Quantifizierung der mRNA-Menge wurde die Zunahme des Fluoreszenzsignals des Taqman[®]-Systems während der Vervielfältigung der durch reverse Transkription entstandenen cDNA gemessen. Es konnten signifikante Verminderungen der mRNA-Menge bei Zugabe von TFF3 zu den stimulierten Mikroglia von jeweils 100 % auf 53 % (TFF3 500 ng/ml) bzw. 56,3 % (TFF3 50 ng/ml) gemessen werden. Ein Einfluss von TFF3 bei alleiniger Gabe ohne Stimulation mit LPS konnte nicht nachgewiesen werden. (Mittelwert \pm SEM, n = 3, p* < 0,05, p** < 0,01, p*** < 0,001)

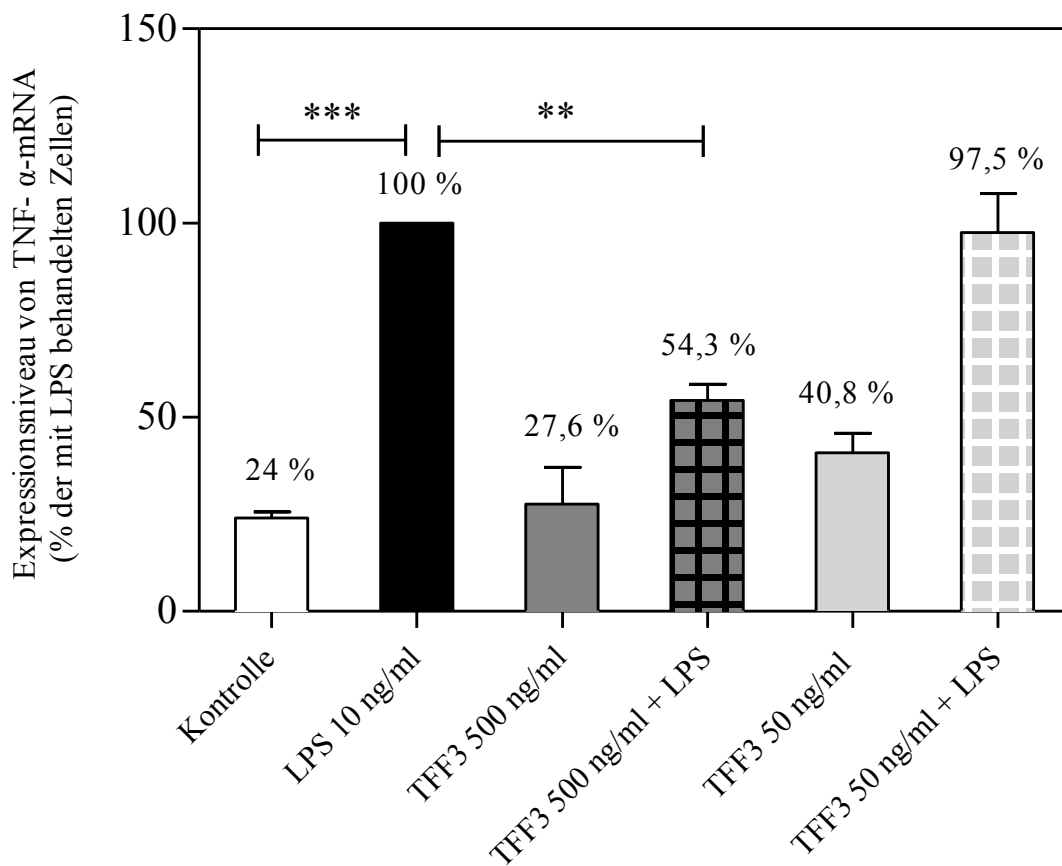


Abb. 3.13: qPCR zur Bestimmung TNF- α -mRNA in Mikroglia nach 24 Stunden Stimulation. Unter Verwendung des Taqman[®]-Systems wurde die mRNA-Quantität mittels qPCR bestimmt. Nach 24 stündiger Inkubation der Mikroglia mit LPS 10 ng/ml und TFF3 in den Konzentrationen 500 ng/ml und 50 ng/ml zeigte sich eine Reduktion der mRNA-Quantität von TNF- α von jeweils 100 % auf 54,3 % (500 ng/ml) bzw. 96 % (50 ng/ml). Wurde TFF3 zu unstimulierten Zellen gegeben konnte eine geringfügige nicht signifikante Erhöhung des Gehaltes der TNF- α -mRNA detektiert werden. (Mittelwert \pm SEM, n = 3 (500 ng/ml) bzw. 6 (50 ng/ml), p* < 0,05, p** < 0,01, p*** < 0,001)

3.4 Einfluss von TFF3 auf die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine

Um nicht nur die Auswirkung der TFF3-Applikation auf die Synthese der proinflammatorischen Zytokine, sondern auch auf die Freisetzung von TNF- α und IL-6 zu klären, wurden die Proteinmengen nach 6 und nach 24 Stunden Stimulation mittels ELISA bestimmt. Die Mikroglia wurden für diese Untersuchungen mit TFF3 [500 ng/ml] und [50 ng/ml] jeweils mit LPS [10 ng/ml] für 6 oder 24 Stunden stimuliert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand mittels Sandwich-ELISA untersucht. Die Ergebnisse wurden jeweils in Prozent der mit LPS [10 ng/ml] stimulierten Zellen angegeben.

3.4.1 TFF3 führt zu einer Reduktion der IL-6-Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand stimulierter Mikroglia

Es zeigte sich nach 6 Stunden eine signifikante Reduktion der Proteinmenge bei einer TFF3-Konzentration von 500 ng/ml von 100 % auf 85,2 % und bei einer Konzentration von 50 ng/ml von 100 % auf 71,2 % (Abb. 3.14). Nach einer Stimulationszeit von 24 Stunden fand bei Zugabe von TFF3 [500 ng/ml] eine nicht signifikante Reduktion von 100 % auf 95,4 % statt. Bei Inkubation mit TFF3 in der Konzentration 50 ng/ml kam es zu einer Reduktion von 100 % auf 84,2 % (Abb.3.15).

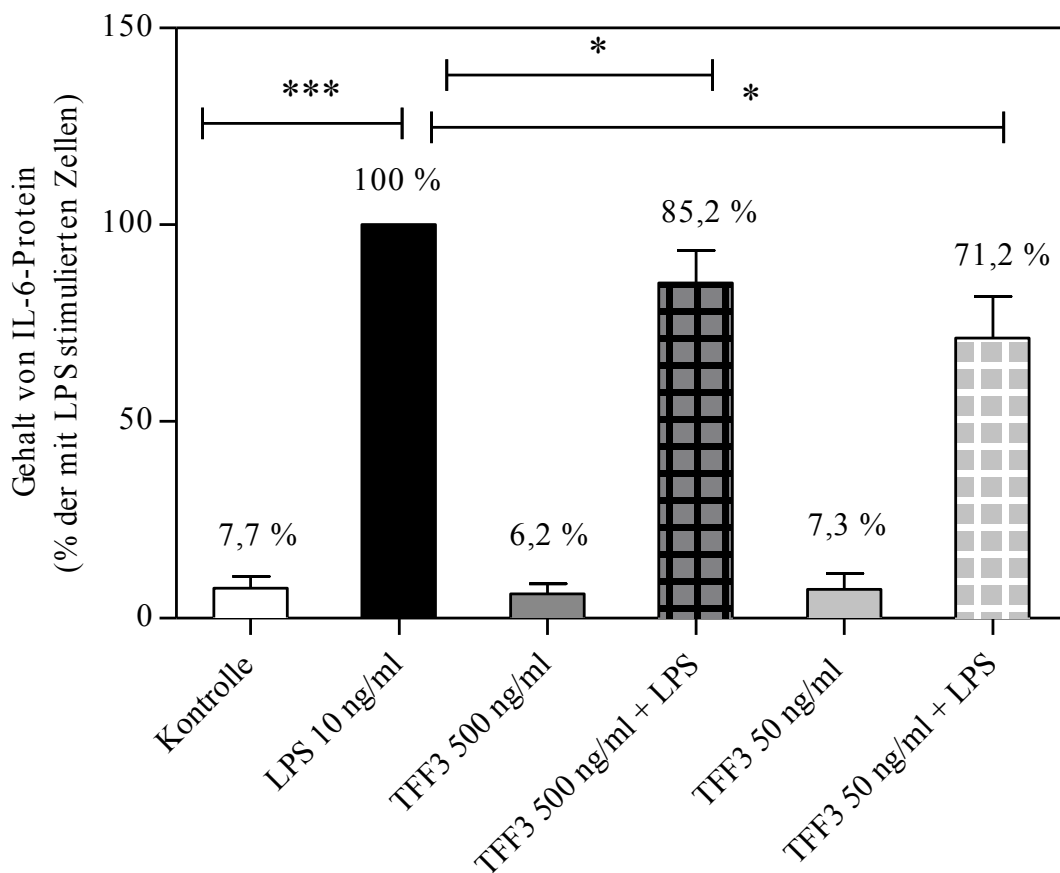


Abb. 3.14: IL-6-ELISA nach 6 stündiger Stimulation. Die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels ELISA ergab nach einer Stimulationszeit von 6 Stunden eine Verminderung der Proteinmenge von IL-6 bei Inkubation der stimulierten Mikroglia mit TFF3. Es zeigt sich eine Reduktion der Proteinmenge von IL-6 von 100 % auf 85,2 % bei einer TFF3-Konzentration von 500 ng/ml und von 100 % auf 71,2 % bei einer TFF3-Konzentration von 50 ng/ml. Bei Zugabe von TFF3 zu unstimulierten Zellen zeigte sich kein Einfluss auf die Proteinkonzentration von IL-6. (Mittelwert \pm SEM, n = 4 (50 ng/ml) bzw. 6 (500 ng/ml), p* < 0,05, p*** < 0,001)

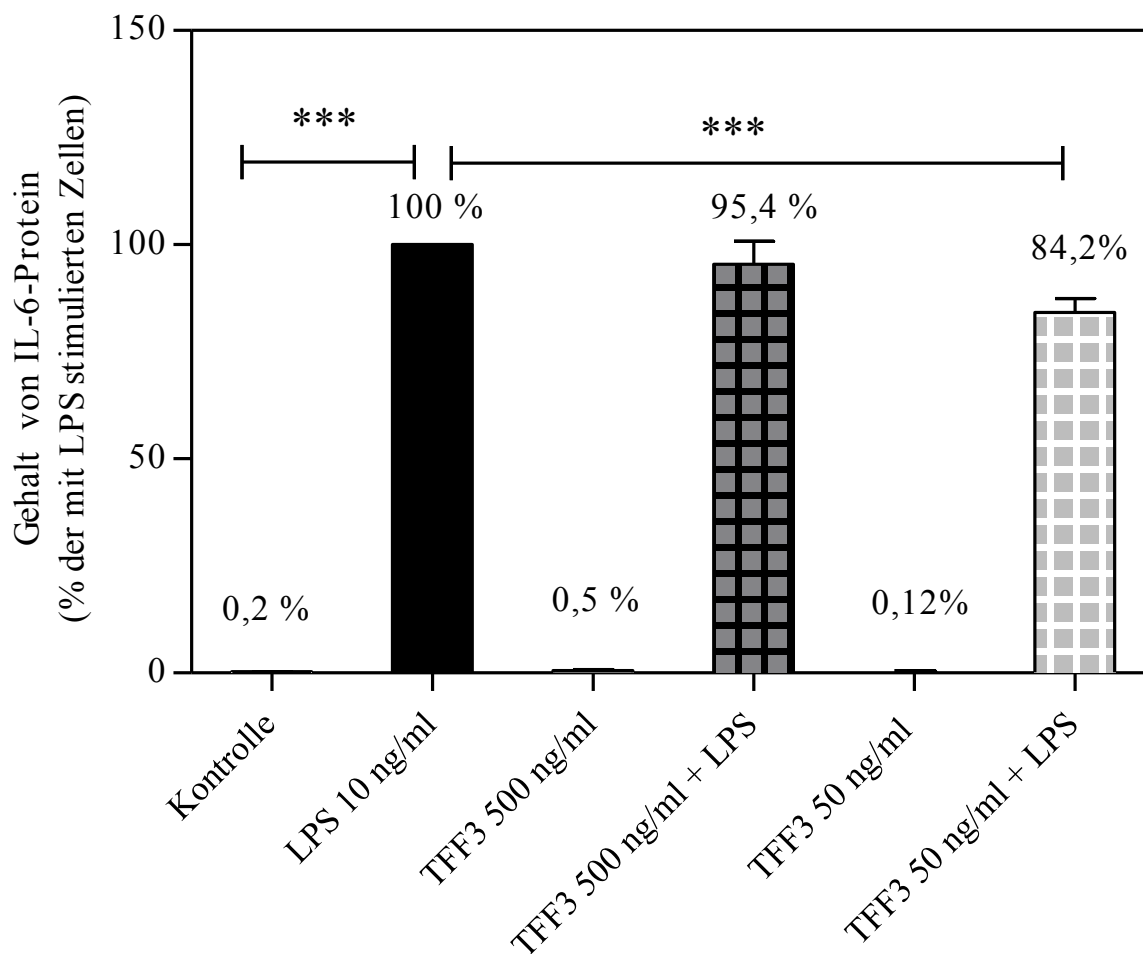


Abb. 3.15: IL-6-ELISA nach 24 Stunden Stimulation. Unter Verwendung des Sandwich-ELISAs wurde der Proteingehalt im Zellkulturüberstand quantitativ bestimmt. Wurden die stimulierten Mikroglia mit TFF3 in einer Konzentration von 500 ng/ml inkubiert, konnte in der ELISA-Untersuchung eine Reduktion des Proteingehalts von 100 % auf 95,4% verzeichnet werden. Dieses Ergebnis war nicht signifikant. Bei Applikation von TFF3 [50 ng/ml] zeigte sich eine Abnahme der Proteinquantität von 100 % auf 84,2 %. Es konnte kein signifikanter Einfluss von TFF3 auf den Gehalt von IL-6-Proteinen ohne Zugabe von LPS nachgewiesen werden. (Mittelwert \pm SEM, n = 4, p*** < 0,001)

3.4.2 TFF3 führt zu einer Reduktion der TNF- α -Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand stimulierter Mikroglia

Nach 6 Stunden zeigte sich bei Inkubation mit TFF3 in der Konzentration 500 ng/ml eine Abnahme der Proteinmenge von 100 % auf 68,1 % und von 100 % auf 51,2 % bei Inkubation mit TFF3 [50 ng/ml] (Abb. 3.16). Die Proteinmenge von TNF- α war nach 24 stündiger Inkubation mit TFF3 [500 ng/ml] nicht signifikant von 100 % auf 94,1 % und bei Inkubation mit TFF3 [50 ng/ml] signifikant auf 85,8 % reduziert (Abb. 3.17).

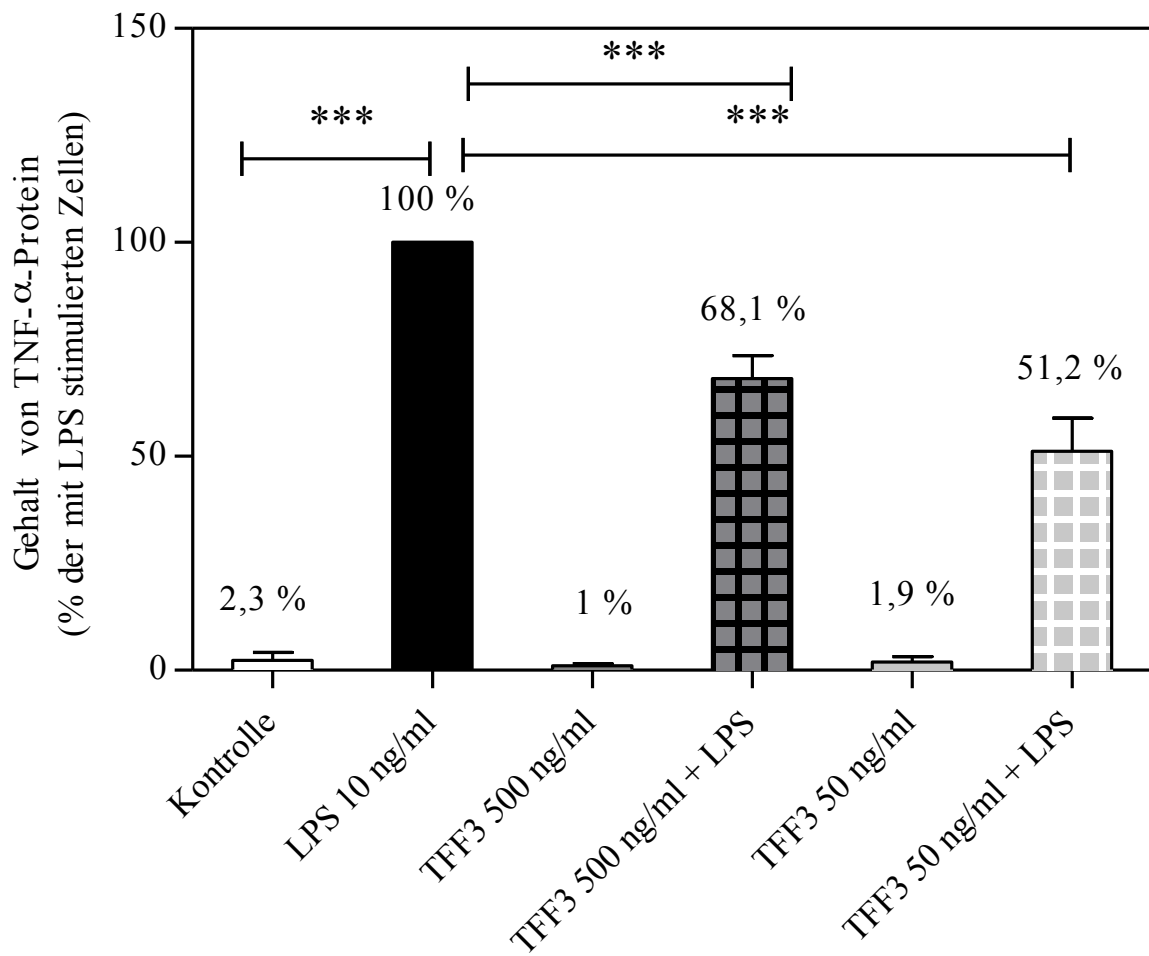


Abb. 3.16: TNF- α -ELISA nach 6 Stunden Stimulation. Es wurde der Proteingehalt im Zellkulturüberstand mittels ELISA nach Inkubation der stimulierten Mikroglia mit TFF3 bestimmt. Nach Hinzufügen von TFF3 [500 ng/ml] und [50 ng/ml] zu den stimulierten Mikroglia zeigte sich ein Abfall der Proteinmenge von je 100 % auf 68,1 % und auf 51,2 %. Die alleinige Zugabe von TFF3 führte in unstimulierten Mikroglia zu keiner signifikanten Veränderung des TNF- α -Proteingehaltes. (Mittelwert \pm SEM, n = 3, p*** < 0,001)

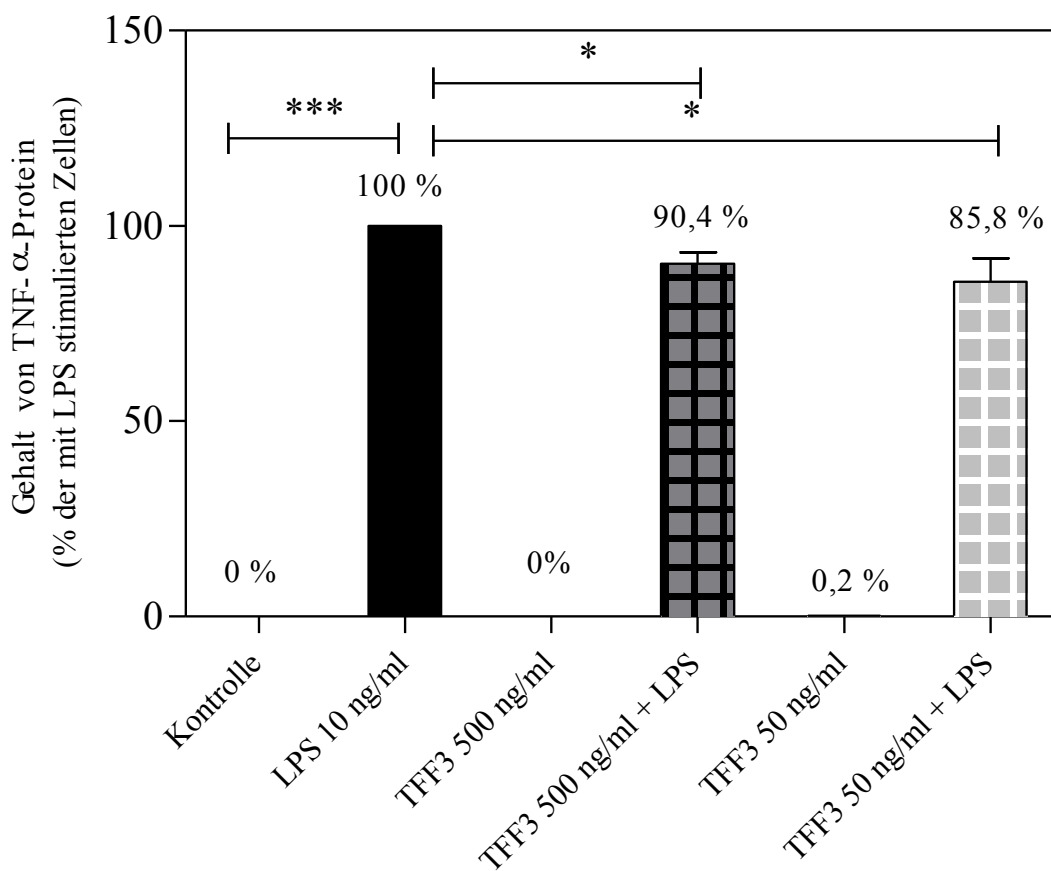


Abb. 3.17: TNF- α -ELISA nach 24 Stunden Stimulation. Die Messung der Proteinmenge nach Stimulation der Mikroglia mit LPS 10 ng/ml und TFF3 ergab eine verminderte TNF- α -Expression im Vergleich zur LPS-Stimulation. Es konnte eine Reduktion von TNF- α auf Proteinebene nach Applikation von TFF3 [500 ng/ml] und [50 ng/ml] von 100 % auf 94,1 % und auf 85,8 % nachgewiesen werden. TFF3 zeigte keinen Einfluss auf die Proteinkonzentration von TNF- α in unstimulierten Mikroglia. (Mittelwert \pm SEM, n = 4, p* < 0,05, p*** < 0,001)

3.5 Einfluss von TFF3 auf die Phosphorylierung von MAP-Kinasen

Zum Nachweis eines möglichen Einflusses auf die Phosphorylierung und somit auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors ERK 1/2 bzw. p38 wurden Western-Blots angefertigt. Nachdem hierfür zunächst die Mikroglia in An- und Abwesenheit von TFF3 [50 ng/ml] mit LPS [10 ng/ml] für 15 Minuten stimuliert worden waren, wurden die Gesamtproteine aus den Zellen extrahiert. Anschließend wurde eine Gelelektrophorese mit nachfolgendem Transfer des Gels auf eine Membran durchgeführt. Die Proteine wurden folgend unter Verwendung

spezifischer Antikörper detektiert. In den stimulierten Zellen konnte mit pp38 und pERK verstärkt phosphoryliertes Protein nachgewiesen werden.

Wurde den Zellen zusätzlich TFF3 [50 ng/ml] verabreicht, wurde eine geringere Menge phosphorylierten Proteins detektiert (Abb. 3.18).

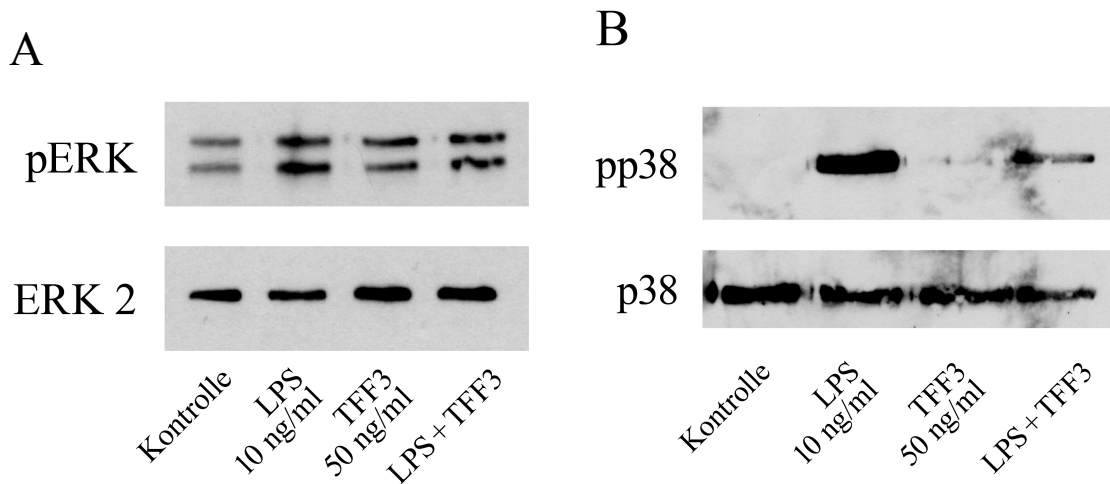


Abb. 3.18: Repräsentativer Western-Blot zum Nachweis des Einflusses von TFF3 auf MAP-Kinasen nach 15 minütiger Stimulation. Die extrahierten Proteine wurden mit SDS-Gelelektrophorese ihrer Größe entsprechend aufgetrennt und die gesuchten MAP-Kinasen mittels Immundetektion nachgewiesen. Die Stimulation mit LPS führte zu einer vermehrten Phosphorylierung sowohl von ERK (A) als auch von p38 (B). Bei zusätzlicher Inkubation mit TFF3 [50 ng/ml] wurde weniger Protein phosphoryliert als bei isolierter LPS-Stimulation. TFF3 zeigte in unstimulierten Zellen keinen Einfluss auf die Phosphorylierung und damit einhergehende Aktivierung der Transkriptionsfaktoren. In allen Versuchsansätzen konnten die unphosphorylierten Proteine als Laddungskontrolle nachgewiesen werden.

3.6 Immunzytochemie zur Lokalisation von NF- κ B

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B befindet sich im Ruhezustand im Zytosol und transloziert bei Aktivierung in den Zellkern. Um eine Aussage über den Einfluss von TFF3 auf die Aktivierung von NF- κ B treffen zu können, wurden auf Deckgläsern ausgesäte Mikroglia für eine Stunde mit LPS 10 ng/ml stimuliert und mittels Immunzytochemie untersucht. Hierbei wurde der Einfluss von TFF3 auf die Lokalisation von NF- κ B in der Zelle untersucht.

Die Stimulation mit LPS [10 ng/ml] führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer deutlicheren Fluoreszenz im Zellkern, dies entspricht einer verstärkten Aktivierung dieses Signalweges. Es kommt hier zu einer vermehrten Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern durch Abbau des Inhibitor-Komplexes nach vorangegangener Ubiquitinierung. Dieses Fluoreszenzsignal im Zellkern konnte sowohl bei alleiniger Zugabe von TFF3 [500 ng/ml], als auch bei Stimulation mit TFF3 [500 ng/ml] und LPS [10 ng/ml] nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.19).

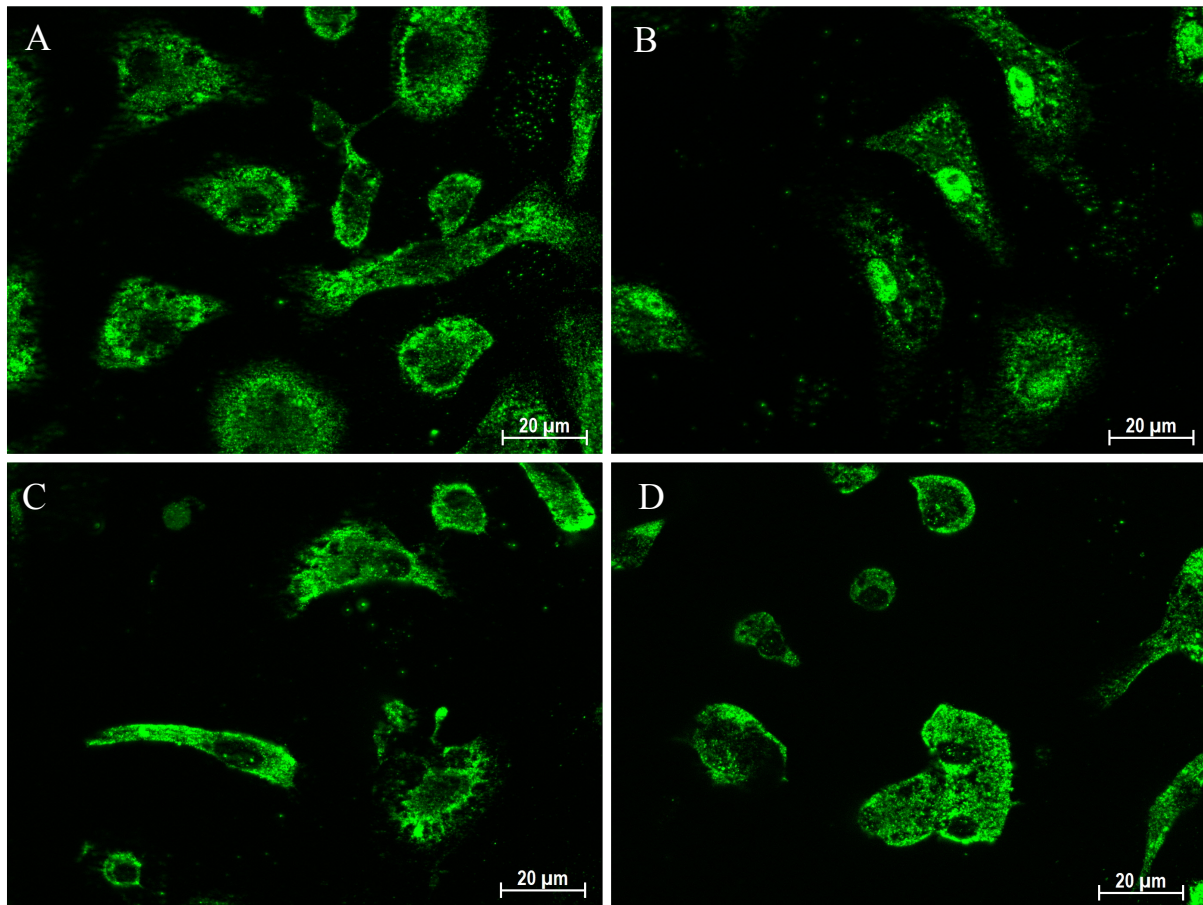


Abb. 3.19: NF- κ B-Immunfluoreszenzfärbung in Mikroglia nach 60 minütiger Stimulation. A = Kontrolle, B = LPS [10 ng/ml], C = TFF3 [500 ng/ml] und D = TFF3 [500 ng/ml] + LPS [10 ng/ml]. NF- κ B wurde für diese Untersuchung mit einem Fluoreszenz-Antikörper gefärbt, der bei Anregung grünes Licht emittiert. In der Kontrolle (A) sowie in der isolierten TFF3-Stimulation (C) zeigte sich ein deutliches Fluoreszenzsignal im Zytosol. Dahingegen führte die Inkubation mit LPS (B) zu einer verstärkten Anfärbung des Zellkerns. Bei gleichzeitiger Inkubation mit TFF3 und LPS (D) zeigte sich wiederum ein Fluoreszenzsignal im Zytosol, wobei sich in den Zellkernen kein Signal detektieren ließ.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass Astrozyten eine mögliche Hauptquelle von TFF3 im ZNS sind.

In Analogie zu bisher überwiegend im Gastrointestinaltrakt erhobenen Befunden ist die Hauptwirkung von TFF3, eine antiinflammatorische und somit potenziell neuroprotektive Wirkung.

4.1 Nachweis von TFF3 im ZNS

TFF3 wurde in den vergangenen Jahren in verschiedenen Oberflächenepithelien nachgewiesen, insbesondere im Gastrointestinaltrakt (Suemori *et al.*, 1991), aber auch im Flimmerepithel der Trachea (Kjellerv, 2009), im Urothel (Rinnert *et al.*, 2010) und der Kornea (Paulsen *et al.*, 2008) konnte TFF3 detektiert werden. Der erste Nachweis von TFF3 mittels Immunhistochemie und qPCR im ZNS gelang bereits 1996 im Hypothalamus der Ratte (Probst *et al.*, 1996). Weitere Untersuchungen an Gehirnen von Menschen und von Schweinen zeigten einen engen Zusammenhang von Oxytocin-produzierenden Neuronen und TFF3, der im *Nucleus paraventricularis* deutlicher ausgeprägt war als im *Nucleus supraopticus*, obwohl beide Kerngebiete an der Oxytocin-Synthese beteiligt sind (Griepentrog *et al.*, 2000). Das ebenfalls im Hypothalamus produzierte Hormon Vasopressin, auch als antidiuretisches Hormon (ADH) bezeichnet, stand in keinem Zusammenhang zur TFF3-Expression (Probst *et al.*, 1996; Jagla *et al.*, 2000). Da die im Hypothalamus produzierten Hormone über den Blutstrom zur Hypophyse gelangen, stellte sich die Frage nach der TFF3-Expression in der Hypophyse. Hierzu führten Schwarz *et al.* (2001) elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Hypophyse des Schweins durch. Diese ergaben eine Lokalisation von TFF3 in mit Oxytocin gefüllten Vesikeln (Schwarz *et al.*, 2001). Des Weiteren konnte TFF3-Protein in humanem postmortal gewonnenem *Liquor cerebrospinalis* detektiert werden (Jagla *et al.*, 2000). Im ZNS der Maus konnte TFF3 außerdem immunhistochemisch im temporalen Kortex, im Hippocampus und im Cerebellum nachgewiesen werden. Da ein immunhistochemischer Nachweis von TFF3 in der weißen

Substanz nicht möglich war, schlossen die Autoren auf eine Produktion von TFF3 ausschließlich durch Neurone (Hinz *et al.*, 2004). Im Fokus unserer Überlegungen stand daher die Frage, ob TFF3 auch von Gliazellen des ZNS gebildet werden kann.

In dieser Arbeit wurden mittels Immunhistochemie zunächst Hirnschnitte von Ratten auf eine mögliche TFF3-Lokalisation untersucht, wobei deutlich TFF3-positive Zellen detektiert wurden. Mit einer Größe von ca. 18 μm waren diese TFF3-positiven Zellen kleiner als die in der Literatur angegebene Größe von Astrozyten (Oberheim *et al.*, 2009). Allerdings beziehen sich die Größenangaben in der Literatur auf den Zellkörper inklusive der Fortsätze. Eine genaue Größenbestimmung insbesondere inklusive der Fortsätze ist in der Immunhistochemie jedoch schwierig. Da es sich bei den Zellen um die größten im Schnitt zu detektierenden Zellen handelte, wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei diesen Zellen um Astrozyten handelt. Um diese Hypothese zu bestärken, wurden primäre Mikroglia- und Astrozytenkulturen immunzytochemisch untersucht. Dabei konnte das TFF3-Protein im Zytoplasma von Astrozyten detektiert werden. Um sicherzustellen, dass die im Zytoplasma der Astrozyten vorgefundenen TFF3-Proteine auch von den Astrozyten selbst produziert werden und nicht durch Aufnahme aus dem Extrazellulärraum stammen, sollte der Nachweis von TFF3 auch auf Genebene erbracht werden. Hierzu wurde eine qPCR durchgeführt. Durch Auftragung des PCR-Produktes auf ein Agarosegel und anschließende Färbung mit Ethiumbromid konnte hier eine spezifische Bande bei 80 bp in Astrozyten nachgewiesen werden. Diese spezifische Bande konnte in Mikroglia nicht detektiert werden. Somit wurde in dieser Arbeit erstmals gezeigt, dass Gliazellen im ZNS TFF3 produzieren können. Gliazellen lassen sich im ZNS in Astrozyten, Mikroglia, Oligodendrozyten, sowie Ependymzellen unterteilen. Die quantitativ überwiegenden Astrozyten sorgen für die Aufrechterhaltung der Homöostase und können durch ihre komplexen Interaktionen mit Mikroglia und Neuronen in die Regulation von Entzündungsprozessen eingreifen (Sidoryk-Wegrzynowicz *et al.*, 2011). Im Rahmen dieser Interaktion ist sowohl die Produktion von anti- als auch von proinflammatorischen Substanzen nicht ungewöhnlich für Astrozyten. So hemmt der von Astrozyten freigesetzte *transforming growth factor- β* (TGF- β) z.B. die Produktion der iNOS, während die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine durch Astrozyten zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion führt (Vincent *et al.*, 1997; Deng *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010).

Nach dem positiven Nachweis von TFF3 sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene in unseren Experimenten stellten sich nun die Fragen nach der Funktion von TFF3 und einer

möglichen Regulation der TFF3-Expression unter neuroinflammatorischen Bedingungen. Neuroinflammation ist nach dem heutigen Wissenstand an einem Großteil der neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. den Morbus Parkinson oder den Morbus Alzheimer beteiligt. Hierbei kommt es durch zumeist ungeklärte Ursachen zu einer verstärkten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-1 β , IL-6 und TNF- α , was eine verstärkte Aktivierung der Mikroglia zur Folge hat (Wood *et al.*, 1993; Mogi *et al.*, 1994; Muller *et al.*, 1998; Long-Smith *et al.*, 2009). Diese setzen neben toxischen Metaboliten wie NO auch weitere proinflammatorische Zytokine frei und können so zu einer Schädigung des ZNS beitragen (Liu *et al.*, 2002).

4.2 Einfluss von Entzündungsmediatoren auf die Transkription von TFF3-mRNA in Astrozyten

Zur Klärung der Beeinflussung der TFF3-Transkription durch Entzündungsreaktionen wurden primäre Astrozyten mit LPS [10 ng/ml] stimuliert. Anschließend wurde die TFF3-mRNA mittels relativer qPCR gemessen. Es zeigte sich in dieser Untersuchung eine Herabregulation der Expression der TFF3-mRNA in LPS-stimulierten Astrozyten im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, wobei dieser Effekt nach 24 Stunden Stimulationsdauer deutlicher ausgeprägt war als nach 6 Stunden.

Diese Ergebnisse korrespondieren mit Erkenntnissen aus dem Gastrointestinaltrakt. So konnte in Zellkulturen der Zelllinien HT-29 (Humane Kolon-Adenokarzinom-Zellen) und KATO-III (Humane Magenkarzinom-Zellen) eine Verminderung von TFF3 im Rahmen von simulierten Entzündungen durch Zugabe von IL-6 und IL-1 β nach 48 Stunden nachgewiesen werden (Dossinger *et al.*, 2002). Derselbe Effekt zeigte sich auch bei Stimulation mit TNF- α , wobei NF- κ B eine entscheidende Rolle zu spielen scheint (Loncar *et al.*, 2003).

Gegensätzlich zu diesen Ergebnissen ergaben Untersuchungen an Astrozyten eine Erhöhung der TFF1-mRNA durch Stimulation mit IL-6 (Hirota *et al.*, 1994). Weiterhin ergaben Untersuchungen an arthritisch veränderten Knorpelgeweben eine Erhöhung der TFF3-mRNA und der TFF3-Proteine im Vergleich zu gesundem Knorpelgewebe (Rosler *et al.*, 2010).

Außer der vermehrten TFF3-Transkription durch ein entzündliches Geschehen sind weitere Faktoren bekannt, die zu einer Erhöhung der TFF3-mRNA-Menge führen: So führt Östrogen zu einer Augmentation der mRNA-Menge an TFF3 im Endometrium (Borthwick *et al.*, 2003). Außerdem konnten Studien mit der Darmzelllinie HT-29 eine Erhöhung der TFF3-mRNA-Quantität durch Stimulation mit Somatostatin oder vasoaktivem intestinalen Peptid (VIP) nachweisen (Ogata und Podolsky, 1997).

Die Ergebnisse in dieser Arbeit belegen, dass TFF3 bereits im physiologischen Ruhezustand von Astrozyten transkribiert und exprimiert wird. Die Transkription wird durch die LPS-Stimulation deutlich vermindert, wobei eine längere Stimulationszeit zu einem stärkeren Abfall des Transkriptionsprodukts führt. Denkbar ist daher eine verminderte Aktivierung der Mikroglia durch TFF3 unter physiologischen Bedingungen. Kommt es zu einem Entzündungsreiz, auf den die Mikroglia mit einer verstärkten Phagozytoseaktivität reagieren sollte, wird die TFF3-Transkription in Astrozyten vermindert und eine Aktivierung der Mikroglia wahrscheinlicher. Es stellt sich hier die Frage, welche Rolle die Dauer des Entzündungsreizes hierbei spielt. So kann eine deutlich längere Stimulation, z.B. über mehrere Tage, zu einem weniger stark ausgeprägten Abfall des Transkriptionsprodukts führen und so eine Verselbständigung im Sinne eines *circulus vitiosus* durch eine verstärkte Hemmung der Mikroglia verhindern. Allerdings kann die TFF3-mRNA-Menge auch weiter reduziert werden, sodass eine stärkere Immunantwort durch Reduktion der hemmenden Einflüsse gefördert wird. So kann der Entzündungsprozess neurodegenerativer Erkrankungen gefördert werden. Nicht zu vergessen ist die Frage nach der physiologischen TFF3-Konzentration im ZNS. Hierzu gibt es bis jetzt keinerlei Daten. Einzelne Untersuchungen konnten TFF3 im Blut nachweisen, wobei die Konzentration im Blut gesunder Probanden je nach Untersuchung um 230 pg/ml bzw. 150 pg/ml lag (Vestergaard *et al.*, 2002; Qu *et al.*, 2012). Im Blut von Patienten mit verschiedenen Lungen-Karzinomen war die Konzentration mindestens doppelt so hoch (Qu *et al.*, 2012). Ebenfalls deutlich erhöhte Werte zeigten sich bei Patienten, die unter chronisch entzündlicher Darmerkrankung litten (Vestergaard *et al.*, 2002). Auf Grund der Blut-Hirn-Schranke können die TFF3-Konzentrationen im ZNS allerdings sowohl deutlich höher als auch niedriger als die Blut-Konzentration sein. Zu bedenken ist auch, dass sich die antiinflammatorische Wirkung von TFF3 ab einer bestimmten Konzentration auch umkehren kann. Die in dieser Arbeit verwendeten TFF3-Konzentrationen von 50 ng/ml und 500 ng/ml führten alle zu den gleichen Ergebnissen, aber die Wirkung von TFF3 in geringeren oder höheren Konzentrationen bleibt unklar. Vorstellbar

ist, dass eine starke Verminderung von TFF3 durch eine Entzündung zu einer proinflammatorischen Wirkung führen und so zur Bekämpfung der möglicherweise eingetretenen Krankheitserreger beitragen kann. Außerdem belegen neue Studien, dass die TFF3-Konzentration im Blut bei chronischer Niereninsuffizienz deutlich ansteigt, was zu einer Verfälschung von Ergebnissen bei in-vivo-Untersuchungen führen kann (Du *et al.*, 2013). So können höhere Konzentrationen bei Patienten, die an Krebserkrankungen leiden, zum Teil auch durch Einschränkungen der Nierenfunktion verursacht sein.

4.3 Einfluss von TFF3 auf die Aktivität von Mikroglia

Die Aktivität von Mikroglia wird durch verschiedenste Faktoren wie eingedrungene Krankheitserreger, Veränderungen des extrazellulären Milieus und Interaktion mit Astrozyten und Neuronen beeinflusst. Besonders die Interaktionen zwischen Gliazellen und Neuronen ist komplex und teilweise noch wenig erforscht. Sowohl Neurone als Mikroglia können Substanzen produzieren, die die Mikrogliaaktivität hemmen oder auch fördern. So hemmt das durch Neurone sezernierte Fraktalkin die Phagozytoseaktivität, während die Matrixmetalloprotease 3 aus apoptotischen Neuronen die Aktivität fördert (Kim *et al.*, 2005; Cardona *et al.*, 2006). Außer der Interaktion von Neuronen mit Mikroglia findet auch eine Kommunikation zwischen Astrozyten und Mikroglia statt. Neben ihrer Aufgabe, Glutamat und Kalium aus dem extrazellulären Raum zu eliminieren, produzieren Astrozyten verschiedene pro- und antiinflammatorische Zytokine, die auf die Mikroglia Einfluss nehmen.

Nachdem in dieser Arbeit TFF3 in Astrozyten nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob astrozytäres TFF3 einen Einfluss auf mikrogliale Zellfunktionen besitzt.

4.3.1 Einfluss von TFF3 auf die Expression der iNOS und auf die Freisetzung von NO

Um den Wirkung von TFF3 auf Expression der iNOS zu klären, wurde die mRNA von iNOS mittels qPCR in stimulierten Mikroglia nach Zugabe von TFF3 in den Konzentrationen 500 ng/ml und 50 ng/ml quantifiziert. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der mRNA-Menge nach 6 und 24 Stunden Stimulationsdauer (Abb. 3.5 und 3.6).

Zur weiteren Untersuchung der Mikrogliaaktivierung wurde der Einfluss von TFF3 auf die NO-Freisetzung in dem Zellkulturüberstand mittels Griess-Reagenz photometrisch bestimmt.

Da sich die mRNA für das NO produzierende Enzyme, die iNOS, durch TFF3-Gabe deutlich reduzieren ließ, war hier ebenfalls eine Reduktion zu erwarten. Es konnte in den Untersuchungen jedoch kein Einfluss von TFF3 auf die NO-Produktion nachgewiesen werden.

Übereinstimmungen mit dem Ergebnis einer reduzierten Transkription der iNOS in den untersuchten Mikroglia zeigten sich auch mit Arbeiten anderer Arbeitsgruppen am Gastrointestinaltrakt. Hier konnte eine Reduktion der iNOS-mRNA-Menge durch TFF3 bei Ratten mit Hypoxie-induzierter Kolitis nachgewiesen werden (Zhang *et al.*, 2003). Der zur gleichen Familie gehörende TFF2 führte ebenfalls zu einer verminderten Transkription der iNOS sowohl in *in-vivo* im heilenden Kolon der Ratte nach Kolitis, als auch *in-vitro* in Monozyten (Giraud *et al.*, 2004). Wie zu erwarten, ergaben diese Untersuchungen neben der Reduktion der iNOS-mRNA auch eine verminderte NO-Freisetzung, was in der vorliegenden Arbeit für Mikroglia nicht bewiesen werden konnte.

4.3.2 Einfluss von TFF3 auf die Synthese und die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen

Aus der Literatur war die antiinflammatorische und antiapoptotische Wirkung von TFF3 im Gastrointestinaltrakt bekannt, zur Wirkung von TFF3 auf Mikroglia lagen jedoch keine Untersuchungen vor. Um weitere Aussagen zum Einfluss von TFF3 auf Mikroglia treffen zu können, wurden die mRNA-Mengen verschiedener proinflammatorischer Zytokine bestimmt. Bei diesen Zytokinen handelte es sich um IL-1 β , IL-6 und TNF- α , die sowohl von Astrozyten und Mikroglia als auch von Neuronen produziert werden können. Durch Inkubation der Mikroglia mit TFF3 kam es bei den untersuchten Zytokinen sowohl nach 6 als auch nach 24 Stunden zu einem in den meisten Fällen signifikanten Abfall des mRNA-Gehalts im Vergleich zu den ausschließlich mit LPS stimulierten Zellen (Abb. 3.8 bis 3.17).

Zur Klärung, ob TFF3 nicht nur auf Genebene einen Einfluss auf diese Zytokine hat, wurde die Freisetzung der Zytokine mittels Sandwich-ELISA untersucht. Diese Untersuchungen ergaben für TNF- α signifikante Reduktionen der Proteinmengen, so wurde die Proteinmenge nach 6 Stunden Stimulation bei Zugabe von TFF3 [500 ng/ml] bzw. [50 ng/ml] von je 100 % auf 85,2 % bzw. 71,2 % und nach 24 Stunden von 100 % auf 54,3 % bzw. 96 % reduziert. Für

IL-6 zeigten sich ebenfalls Reduktionen, die allerdings nur bei Zugabe von TFF3 [50 ng/ml] signifikant waren, hier zeigte sich eine Reduktion von 100 % auf 71,2 % nach 6 stündiger Stimulation und auf 84,2 % nach 24 stündiger Stimulation.

Diese Ergebnisse sind konkordant mit Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen am Gastrointestinaltrakt: Hier wurde eine verminderte Expression von TNF- α nach intraperitonealer Applikation von 0,5 mg TFF3 im entzündlich veränderten Darm der Ratte nachgewiesen (Teng *et al.*, 2009). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Experimente bei neugeborenen Ratten mit nekrotisierender Enterokolitis. Auch hier kam es bei den durchgeführten ELISA-Untersuchungen zur Reduktion der TNF- α -Proteinmenge nach intraperitonealer Applikation von 0,5 mg TFF3 (Zhang *et al.*, 2003).

Die untersuchten proinflammatorischen Zytokine spielen eine wesentliche Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen. So konnte IL-6 in senilen Plaques bei der Alzheimer Erkrankung nachgewiesen werden (Hull *et al.*, 1996). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass LPS zu verstärkter Phosphorylierung von Tau-Proteinen *in-vitro* führt (Lee *et al.*, 2010). Dies führt am ehesten zu einer Instabilität der Mikrotubuli in Neuronen und so zu einer vermehrten Neurodegeneration. Zusätzlich fällt der DNA-protective Effekt, den intaktes nicht phosphoryliertes Tau aufweist, weg, was ebenfalls zur Neurodegeneration beiträgt (Violet *et al.*, 2014). Außerdem wurden erhöhte Zytokin-Niveaus in Mikroglia, die aus der weißen Substanz von Alzheimer-Patienten isoliert worden waren, gefunden (Lue *et al.*, 2001). Auch bei der Parkinson-Erkrankung konnten erhöhte Werte der Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α im *Liquor cerebrospinalis* nachgewiesen werden (Mogi *et al.*, 1994; Mogi *et al.*, 1996). Die amyotrophe Lateralsklerose ist eine Erkrankung, die das erste Motoneuron betrifft. Bei dieser Erkrankung wurden erhöhte Konzentrationen von IL-6 in der Haut, im Serum und im *Liquor cerebrospinalis* gemessen (Sekizawa *et al.*, 1998; Ono *et al.*, 2001).

Trotz der Beteiligung der Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α an neurodegenerativen Prozessen gibt es auch Untersuchungen, die neuroprotektive Wirkungen, insbesondere bei kurzzeitiger Freisetzung, nachweisen konnten (Carlson *et al.*, 1999). Hier scheint vor allem die Interaktion zwischen Neuronen, Astrozyten und Mikroglia eine Rolle zu spielen.

Zusammengefasst deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass TFF3 auch im ZNS die Entzündungsreaktion durch Verminderung der Freisetzung an proinflammatorischen Zytokinen reduziert.

4.3.3 Einfluss von TFF3 auf die Phosphorylierung von MAP-Kinasen

MAP-Kinasen sind essentiell an der Zellproliferation und -differenzierung beteiligt. Diese Gruppe lässt sich weiter unterteilen in p38-MAP-Kinasen, JNK und ERK (Arthur und Ley, 2013). Da auch Mikrogliazellen im Rahmen der Aktivierung eine Beteiligung dieser Signalkaskade zeigen, wurde der Einfluss von TFF3 auf die Phosphorylierung von p38-MAP-Kinasen und ERK 1/2 untersucht (Wilms *et al.*, 2003; Wilms *et al.*, 2009).

p38 wird insbesondere durch Zellstress aktiviert, wobei proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 oder Entzündungsinduktoren wie LPS eine große Rolle zukommt (Kyriakis und Avruch, 2012). Diese Aktivierung führt zu mehreren Phosphorylierungen durch Kinasen, was wiederum zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine führt. Dieser pathophysiologische Vorgang spielt z.B. bei der Alzheimer-Erkrankung, der multiplen Sklerose und dem Morbus Parkinson eine Rolle (Yasuda *et al.*, 2011). Ebenso fördert die Aktivierung von p38 die Langzeitdepression im Rahmen der synaptischen Plastizität (Yasuda *et al.*, 2011). Außerdem konnte eine Beteiligung des Signalweges an der Produktion von NO und TNF- α durch Gliazellen nachgewiesen werden (Bhat *et al.*, 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Western-Blot eine geringere Phosphorylierung von p38 bei Stimulation der Zellen mit TFF3 [50 ng/ml] und LPS [10 ng/ml] in Relation zu den mit LPS [10 ng/ml] inkubierten Zellen gezeigt werden. Damit zeigte sich eine mögliche Ursache für die verminderte mRNA-Synthese und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen in unseren Versuchsansätzen.

Des Weiteren wurde der Einfluss von TFF3 auf die Phosphorylierung von ERK 1 und 2 untersucht. ERK 1 (42 kDa) und 2 (44 kDa) werden beide im ZNS insbesondere von Neuronen exprimiert, wobei ERK 2 quantitativ überwiegt (Samuels *et al.*, 2009). Die Aktivierung von ERK 1/2 findet insbesondere durch Wachstumsfaktoren statt. Hierdurch wird die Signalkaskade über Guanosintriphosphat (GTP) gekoppelte Proteine wie Ras oder Raf initiiert. Es kommt zur Phosphorylierung einer Reihe von Kinasen, die dann ERK 1/2 aktivieren (Seger und Krebs, 1995). Die Funktion von ERK 1/2 ist umstritten. So wurde, nachdem Studien einen Einfluss auf das Überleben von Neuronen gezeigt hatten, lange angenommen, dass ERK 1/2 für das Überleben von Neuronen essentiell sind (Jin *et al.*, 2002). Allerdings konnte dies in Studien, in denen ERK 2 in Mäusen inaktiviert worden war, nicht nachgewiesen werden. So konnte keine erhöhte Apoptoserate nachgewiesen werden (Samuels *et al.*, 2009). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Untersuchungen an ERK 2 defizienten

Mäusen: Die Inaktivierung von ERK 2 während der Entwicklung führte zu einem Kortex, der aus wenigen Neuronen, aber vielen Astrozyten bestand (Samuels *et al.*, 2009). Eine weitere Rolle spielt ERK 2 bei der synaptischen Plastizität, indem ERK 2 zur Langzeitpotenzierung beiträgt (Davis und Laroche, 2006). Außerdem scheint es einen Zusammenhang zwischen ERK 1/2 und der Entstehung von Gliomen zu geben (Cheng *et al.*, 2013). Allerdings muss auch die Beteiligung von ERK 1/2 an der iNOS-Synthese berücksichtigt werden (Blanchette *et al.*, 2003). Gleiches gilt für die Hemmung der Mikrogliaaktivierung und der IL-1 β -Expression durch Inhibition des ERK 1/2-Signalweges (Lu *et al.*, 2007). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ERK 1/2 bei der Proliferation und Differenzierung insbesondere von Astrozyten eine große Rolle spielen und zu einer verstärkten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine sowie zu einer verstärkten Aktivierung von Mikroglia führt.

Die vorliegende Arbeit konnte eine geringfügig reduzierte Phosphorylierung von ERK 1/2 in den Mikroglia-Zellen, die mit TFF3 [50 ng/ml] und LPS [10 ng/ml] behandelt worden waren, im Vergleich zu den ausschließlich mit LPS stimulierten Zellen, nachweisen. Auch wenn die genaue Funktion von ERK 1/2 noch weiter untersucht werden muss, ist dies ein weiterer Hinweis auf die antiinflammatorische Wirkung von TFF3 im ZNS.

4.3.4 Einfluss von TFF3 auf NF- κ B

Bei NF- κ B handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der im Ruhezustand im Zytosol gebunden an einen Inhibitor Komplex vorliegt (Napetschnig und Wu, 2013). Die Translokation findet durch Aktivierung von extrazellulären Rezeptoren, z.B. durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1, statt, die die Signalkaskade in Gang setzen. Durch Phosphorylierung des Inhibitor Komplexes durch die zugehörige Kinase kommt es zur Ubiquitinierung des Komplexes mit anschließendem Abbau im Proteasom. Hierdurch wird NF- κ B vom Inhibitor-Komplex freigesetzt und kann in den Zellkern translozieren (Napetschnig und Wu, 2013). Unter physiologischen Bedingungen ist NF- κ B an der neuronalen Entwicklung, sowie an Lernprozessen beteiligt. Insbesondere beeinflusst NF- κ B das axonale Wachstum und fördert die synaptische Plastizität über die Aktivierung verschiedener Untereinheiten an der Prä- und der Postsynapse (Gutierrez und Davies, 2011).

NF- κ B ist jedoch auch besonders an Entzündungsreaktionen beteiligt, indem es die weitere Produktion von proinflammatorischen Substanzen wie z.B. Prostaglandin E2 über die vermehrte Expression der COX-2 fördert (Munhoz *et al.*, 2008). Die Blockade der Signaltransduktion über NF- κ B führt bei neuronalen Vorläuferzellen *in-vitro* zu einer verminderten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (Pugazhenti *et al.*, 2013). Allerdings fördert NF- κ B auch über die Aktivierung von MAP-Kinasen die Proliferation und hemmt z.B. über die Verminderung von reaktiven Sauerstoffspezies den Zelltod (Sakon *et al.*, 2003). Mit diesen antiapoptotischen Effekten fördert NF- κ B allerdings auch die Entstehung von Karzinomen. So konnte z.B. in Glioblastomen eine konstitutive Expression dieses Transkriptionsfaktors nachgewiesen werden (Garner *et al.*, 2013). Um den Einfluss von TFF3 auf die Lokalisation von NF- κ B in Mikroglia nach Stimulation mit LPS [10 ng/ml] unter Zugabe von TFF3 [500 ng/ml] zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbung mit einem gegen NF- κ B gerichteten Primärantikörper durchgeführt (Abb. 3.19). Im Vergleich zu den ausschließlich mit LPS stimulierten Zellen konnte in den Zellen, die mit LPS und TFF3 inkubiert worden waren, ein schwächeres Fluoreszenzsignal detektiert werden. Dieses zeigte sich insbesondere im Zytoplasma, aber auch die Zellkerne fluoreszierten im Vergleich mit den ausschließlich mit LPS stimulierten Zellen nur schwach. Eine Erklärung hierfür kann eine reduzierte Expression von proinflammatorischen Zytokinen, die für eine Aktivierung von NF- κ B sorgen, sein. Diese Reduktion konnte in dieser Arbeit bereits sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene gezeigt werden. Allerdings wurden bei diesen Untersuchungen mit 6 und 24 Stunden deutlich längere Stimulationszeiten verwendet. Bei einer Stimulationszeit von 1 Stunde, wie sie für die Untersuchung zur Lokalisation von NF- κ B mittels Immunfluoreszenz verwendet wurde, ist nicht davon auszugehen, dass der Effekt der proinflammatorischen Zytokinen eine große Rolle spielte. Eher in Frage kommt hier eine direkte Blockade der Signaltransduktion via NF- κ B durch TFF3. Ähnliche Effekte auf NF- κ B sind durch das Isoflavon Diadzein oder das aus Ingwer gewonnene Zerumbone beschrieben (Surh und Na, 2008; Chinta *et al.*, 2013).

4.4 Ausblick und Perspektiven

Entsprechend den Befunden zur Wirkung von TFF3 im Gastrointestinaltrakt (Kinoshita *et al.*, 2000) und auf anderen Schleimhäuten konnten auch im ZNS antiinflammatorische Eigenschaften durch unsere Experimente nachgewiesen werden. So konnte neben einer Reduktion der Mikroglia-Aktivität und der Synthese proinflammatorischer Zytokine auch eine Hemmung der Signaltransduktion über NF- κ B und p38 demonstriert werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit anderen Arbeiten, die protektive Effekte z.B. an der Kornea nachwiesen und dieses als Therapeutikum bei entzündlichen Erkrankungen der Kornea diskutierten (Paulsen *et al.*, 2008; Schulze *et al.*, 2010). So könnte TFF3 intrathekal verabreicht werden und die Neurodegeneration z.B. bei Multipler Sklerose hemmen. Eine weitere Möglichkeit wäre die gezielte Applikation z.B. über eine stereotaktische Operation in die am stärksten von der Neurodegeneration betroffenen Areale. Hierfür käme z.B. bei an Morbus Parkinson erkrankten Patienten die Substantia nigra in Frage. Untersuchungen, bei denen TFF3 Ratten intraperitoneal verabreicht worden war, zeigten eine Verbesserung der Gedächtnisfunktion (Shi *et al.*, 2011). Die Frage ist hier, wie sich die Bioverfügbarkeit bei intraperitonealer und intrathekaler Gabe unterscheiden. Außerdem wäre zu klären, wie stark sich TFF3 im Liquorraum verteilt. Eventuell wäre hier die Anwendung beschichteter Plättchen (ähnlich den bei Glioblastomen lokal applizierten Gliadel® -Plättchen) sinnvoll. Allerdings konnten in-vivo Untersuchungen bei Patienten mit Colitis ulcerosa keinen Vorteil von lokaler TFF3-Applikation gegenüber der Erhöhung der immunsuppressiven Medikation mit Mesalazin zeigen (Mahmood *et al.*, 2005). Außerdem wären mögliche unerwünschte Nebenwirkungen die Entstehung von Tumoren durch die antiapoptotische Wirkung von TFF3. Insgesamt stellt sich vor dem Hintergrund der Neuroinflammation zwangsläufig die Frage, ob TFF3 als Therapeutikum bei neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt werden kann und somit Gegenstand weiterer Forschungen sein soll.

Eine weitere sich aufdrängende Überlegung ist die Frage nach der Beteiligung von TFF3 am Wachstum hirneigener Tumore. In mehreren Tumoren, z.B. Magenkarzinomen, Mammakarzinomen und Prostatakarzinomen, wurde TFF3 in den besonders aggressiven Formen gefunden oder korrelierte meist mit einer schlechten Prognose der Erkrankung. Auf Grund der antiinflammatorischen Wirkung liegt es nahe, dass z.B. Glioblastome TFF3 produzieren können, um einer Immunantwort zu entgehen. Außerdem sind die proliferative

und die angiogensefördernde Wirkung von TFF3 aus anderen Geweben bekannt und können zur Aggressivität dieser Tumoren beitragen (Dhar *et al.*, 2005; Kannan *et al.*, 2010).

Es bleibt die Frage, ob der Einsatz von neutralisierenden Antikörpern oder, nach Identifikation des TFF3-Rezeptors, die Applikation von Rezeptorantagonisten zu einem längeren Überleben bei Patienten mit Glioblastoma multiforme führen kann. Auch hier bestünde die Möglichkeit TFF3 lokal zu applizieren. Dies wäre während einer Operation problemlos möglich. Negative Einflüsse auf die Wundheilung sind allerdings nicht auszuschließen, sollte sich die Substanz weiter verteilen. Alles in Allem sind hier weiterführende Forschungen erforderlich, bevor die Relevanz unserer Untersuchungen für die klinische Versorgung geklärt werden kann.

5. Zusammenfassung

Bei neurodegenerativen Erkrankungen spielt die Aktivierung von Mikroglia eine große Rolle. So kommt es häufig zu einer verstärkten NO-Produktion durch die iNOS, was zum neuroinflammatorischen Geschehen beiträgt (Liu *et al.*, 2002). Außerdem nimmt die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine eine Schlüsselposition in dem Teufelskreis der Neuroinflammation ein (Mogi *et al.*, 1994; Muller *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 1999; Long-Smith *et al.*, 2009).

Das besonders gut im Gastrointestinaltrakt untersuchte Protein TFF3 scheint für Regenerationsprozesse von großer Bedeutung zu sein (Zhang *et al.*, 2003; Vandenbroucke *et al.*, 2004). Es kommt vor allem in Schleimhäuten vor und hat je nach Gewebe pro- oder antiinflammatorische Eigenschaften (Teng *et al.*, 2009; Rosler *et al.*, 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde TFF3-mRNA und -Protein in Astrozyten nachgewiesen. Die Quantität der TFF3-mRNA wurde durch Stimulation der Astrozyten mit LPS [10 ng/ml] deutlich vermindert. Um den Einfluss von TFF3 auf Mikroglia zu klären, wurde die Aktivierung der Mikroglia mittels Bestimmung der iNOS-mRNA und der NO-Messung gemessen. Hier zeigte sich eine Verminderung der iNOS auf Genebene, wobei ein Einfluss auf die NO-Produktion nicht festgestellt werden konnte. Des Weiteren wurde der Einfluss von TFF3 auf die Synthese von proinflammatorischer Zytokine untersucht. Hier zeigte sich neben einer Reduktion des mRNA-Gehaltes auch eine verminderte Expression der Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α .

Schlussendlich scheint TFF3 unter physiologischen Bedingungen von Astrozyten produziert zu werden und Entzündungen im ZNS zu hemmen. Unter entzündlichen Prozessen wird die Produktion von TFF3 vermindert, was zur Entstehung oder Verstärkung neuroinflammatorischer Vorgänge beitragen kann.

Es bleibt zu klären, ob TFF3 eine therapeutische Option TFF3 z.B. bei Morbus Parkinson, Multipler Sklerose oder den verschiedenen Demenzformen sein kann. Unsere Befunde liefern Hinweise dafür.

6. Thesen

1. TFF3-mRNA wird von Astrozyten produziert.
2. TFF3-Proteine können im Astrozyten nachgewiesen werden.
3. Die Expression von TFF3 durch Astrozyten wird durch Stimulation mit LPS [10 ng/ml] reduziert.
4. TFF3 reduziert die Aktivität von Mikroglia.
5. TFF3 reduziert die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene.
6. Unter TFF3-Einfluss kommt es zu einer verminderten Phosphorylierung von ERK 1/2 und p38.
7. NF- κ B ist im Zellkern von TFF3 und LPS-stimulierten Zellen in geringerer Quantität nachzuweisen, als in ausschließlich mit LPS stimulierten Zellen.
8. TFF3 wird unter entzündlichen Bedingungen vermindert produziert.
9. TFF3 hat im ZNS antiinflammatorische Eigenschaften.
10. TFF3-Antagonisten wie Anti-TFF3-Antikörper könnten potentiell als Therapeutikum bei neurodegenerativen Erkrankungen in Frage kommen.

7. Literaturverzeichnis

Abbott, N. J., A. A. Patabendige, D. E. Dolman, S. R. Yusof und D. J. Begley (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. Neurobiol Dis. **37**: 13-25.

Allan, S. M., P. J. Tyrrell und N. J. Rothwell (2005). Interleukin-1 and neuronal injury. Nat Rev Immunol. **5**: 629-640.

Anderson, C. M. und R. A. Swanson (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. Glia. **32**: 1-14.

Andriezen, W. L. (1893). "The Neuroglia Elements in the Human Brain." Br Med J **2**(1700): 227-230.

Arthur, J. S. und S. C. Ley (2013). "Mitogen-activated protein kinases in innate immunity." Nat Rev Immunol **13**(9): 679-692.

Beattie, E. C., D. Stellwagen, W. Morishita, J. C. Bresnahan, B. K. Ha, M. Von Zastrow, M. S. Beattie und R. C. Malenka (2002). Control of synaptic strength by glial TNFalpha. Science. **295**: 2282-2285.

Beck, J., P. Rondot, L. Catinot, E. Falcoff, H. Kirchner und J. Wietzerbin (1988). "Increased production of interferon gamma and tumor necrosis factor precedes clinical manifestation in multiple sclerosis: do cytokines trigger off exacerbations?" Acta Neurol Scand **78**(4): 318-323.

Bhat, N. R., P. Zhang, J. C. Lee und E. L. Hogan (1998). "Extracellular signal-regulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha gene expression in endotoxin-stimulated primary glial cultures." J Neurosci **18**(5): 1633-1641.

Bickel (2012). "Die Epidemiologie der Demenz." Deutsche Gesellschaft für Alzheimer
http://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/factsheets/FactSheet01_2012_01.pdf.

Blackburn, D., S. Sargsyan, P. N. Monk und P. J. Shaw (2009). "Astrocyte function and role in motor neuron disease: a future therapeutic target?" Glia **57**(12): 1251-1264.

Blanchette, J., M. Jaramillo und M. Olivier (2003). "Signalling events involved in interferon-gamma-inducible macrophage nitric oxide generation." Immunology **108**(4): 513-522.

Borthwick, J. M., D. S. Charnock-Jones, B. D. Tom, M. L. Hull, R. Teirney, S. C. Phillips und S. K. Smith (2003). "Determination of the transcript profile of human endometrium." Mol Hum Reprod **9**(1): 19-33.

- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Brown, D. R. (2009). "Role of microglia in age-related changes to the nervous system." ScientificWorldJournal **9**: 1061-1071.
- Cardona, A. E., E. P. Pioro, M. E. Sasse, V. Kostenko, S. M. Cardona, I. M. Dijkstra, D. Huang, G. Kidd, S. Dombrowski, R. Dutta, J. C. Lee, D. N. Cook, S. Jung, S. A. Lira, D. R. Littman and R. M. Ransohoff (2006). "Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor." Nat Neurosci **9**(7): 917-924.
- Carlson, N. G., W. A. Wieggl, J. Chen, A. Bacchi, S. W. Rogers und L. C. Gahring (1999). "Inflammatory cytokines IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways." J Immunol **163**(7): 3963-3968.
- Casado, E., V. M. Garcia, J. J. Sanchez, M. T. Del Pulgar, J. Feliu, J. Maurel, B. Castelo, J. M. Rubio, R. A. Lopez, M. A. Garcia-Cabezas, E. Burgos, J. de Castro, C. Belda-Iniesta, M. Lopez-Gomez, C. Gomez-Raposo, F. Zambrana, M. Sereno, C. Fernandez-Martos, P. Vazquez, J. C. Lacal, M. Gonzalez-Baron und P. Cejas (2012). Upregulation of Trefoil Factor 3 (TFF3) After Rectal Cancer Chemoradiotherapy Is an Adverse Prognostic Factor and a Potential Therapeutic Target. Int J Radiat Oncol Biol Phys.
- Chaiyarit, P., A. Chayasodom, N. Wara-Aswapati, D. Hormdee, S. Sittisomwong, S. Nakaresisoon, M. H. Samson, W. Pitiphat und A. S. Giraud (2011). "Trefoil Factors in Saliva and Gingival Tissues of Patients With Chronic Periodontitis." J Periodontol.
- Chan, W. Y., S. Kohsaka und P. Rezaie (2007). The origin and cell lineage of microglia: new concepts. Brain Res Rev. **53**: 344-354.
- Cheng, P., I. Alberts und X. Li (2013). "The role of ERK1/2 in the regulation of proliferation and differentiation of astrocytes in developing brain." Int J Dev Neurosci **31**(8): 783-789.
- Chinta, S. J., A. Ganesan, P. Reis-Rodrigues, G. J. Lithgow und J. K. Andersen (2013). "Anti-inflammatory role of the isoflavone diadzein in lipopolysaccharide-stimulated microglia: implications for Parkinson's disease." Neurotox Res **23**(2): 145-153.
- Chomeczynski, P. und N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-159.
- Cook, G. A., M. Familiar, L. Thim und A. S. Giraud (1999). The trefoil peptides TFF2 and TFF3 are expressed in rat lymphoid tissues and participate in the immune response. FEBS Lett. **456**: 155-159.
- Davis, S. und S. Laroche (2006). "Mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase signalling and memory stabilization: a review." Genes Brain Behav **5 Suppl 2**: 61-72.

- Deng, Y. Y., J. Lu, E. A. Ling und C. Kaur (2010). "Microglia-derived macrophage colony stimulating factor promotes generation of proinflammatory cytokines by astrocytes in the periventricular white matter in the hypoxic neonatal brain." Brain Pathol **20**(5): 909-925.
- Desforges, N. M., M. L. Hebron, N. K. Algarzae, I. Lonskaya und C. E. Moussa (2012). "Fractalkine Mediates Communication between Pathogenic Proteins and Microglia: Implications of Anti-Inflammatory Treatments in Different Stages of Neurodegenerative Diseases." Int J Alzheimers Dis **2012**: 345472.
- Devine, D. A., A. S. High, P. J. Owen, R. Poulsom und W. A. Bonass (2000). Trefoil factor expression in normal and diseased human salivary glands. Hum Pathol. **31**: 509-515.
- Dhar, D. K., T. C. Wang, H. Tabara, Y. Tonomoto, R. Maruyama, M. Tachibana, H. Kubota und N. Nagasue (2005). Expression of trefoil factor family members correlates with patient prognosis and neoangiogenesis. Clin Cancer Res. **11**: 6472-6478.
- Ding, A., W. Zhao, X. Shi, R. Yao, F. Zhou, L. Yue, S. Liu und W. Qiu (2013). "Impact of NPM, TFF3 and TACC1 on the prognosis of patients with primary gastric cancer." PLoS One **8**(12): e82136.
- dos Santos Silva, E., M. Ulrich, G. Doring, K. Botzenhart und P. Gott (2000). Trefoil factor family domain peptides in the human respiratory tract. J Pathol. **190**: 133-142.
- Dossinger, V., T. Kayademir, N. Blin und P. Gott (2002). "Down-regulation of TFF expression in gastrointestinal cell lines by cytokines and nuclear factors." Cell Physiol Biochem **12**(4): 197-206.
- Du, T. Y., H. M. Luo, H. C. Qin, F. Wang, Q. Wang, Y. Xiang und Y. Zhang (2013). "Circulating serum trefoil factor 3 (TFF3) is dramatically increased in chronic kidney disease." PLoS One **8**(11): e80271.
- Eggert, O. W., Reichmann H (2011). "S3-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der Parkinson-Synrome." Deutsche Gesellschaft für Neurologie AWMF online.
- Eng, L. F., J. J. Vanderhaeghen, A. Bignami und B. Gerstl (1971). An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. Brain Res. **28**: 351-354.
- Frei, K., C. Siepl, P. Groscurth, S. Bodmer, C. Schwerdel und A. Fontana (1987). "Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-gamma-treated microglial cells." Eur J Immunol **17**(9): 1271-1278.
- Frischknecht, R. und E. D. Gundelfinger (2012). "The brain's extracellular matrix and its role in synaptic plasticity." Adv Exp Med Biol **970**: 153-171.
- Fuchs, E. und K. Weber (1994). "Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease." Annu Rev Biochem **63**: 345-382.

- Furuta, G. T., J. R. Turner, C. T. Taylor, R. M. Hershberg, K. Comerford, S. Narravula, D. K. Podolsky und S. P. Colgan (2001). "Hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of intestinal trefoil factor protects barrier function during hypoxia." J Exp Med **193**(9): 1027-1034.
- Garner, J. M., M. Fan, C. H. Yang, Z. Du, M. Sims, A. M. Davidoff und L. M. Pfeffer (2013). "Constitutive activation of STAT3 and NF-kappaB signaling in glioblastoma cancer stem cells regulates the notch pathway." J Biol Chem.
- Giraud, A. S., P. M. Pereira, L. Thim, L. M. Parker und L. M. Judd (2004). "TFF-2 inhibits iNOS/NO in monocytes, and nitrated protein in healing colon after colitis." Peptides **25**(5): 803-809.
- Griepentrog, T., M. Bauer, C. Hornstein, H. Sauer und G. F. Jirikowski (2000). "Coexistence of intestinal trefoil factor (hITF) and oxytocin in magnocellular neurons in the human hypothalamus." Horm Metab Res **32**(4): 121-124.
- Guppy, N. J., M. E. El-Bahrawy, H. M. Kocher, K. Fritsch, Y. A. Qureshi, R. Poulsom, R. E. Jeffery, N. A. Wright, W. R. Otto und M. R. Alison (2012). "Trefoil Factor Family Peptides in Normal and Diseased Human Pancreas." Pancreas.
- Gutierrez, H. und A. M. Davies (2011). "Regulation of neural process growth, elaboration and structural plasticity by NF-kappaB." Trends Neurosci **34**(6): 316-325.
- Harrison, J. K., Y. Jiang, S. Chen, Y. Xia, D. Maciejewski, R. K. McNamara, W. J. Streit, M. N. Salafranca, S. Adhikari, D. A. Thompson, P. Botti, K. B. Bacon und L. Feng (1998). "Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(18): 10896-10901.
- Hein, Hopfenmüller und . (2000). "Hochrechnung der Zahl an Multipler Sklerose erkrankten Patienten in Deutschland." Nervenarzt: 288-294.
- Hinz, M., H. Schwegler, C. E. Chwieralski, G. Laube, R. Linke, W. Pohle und W. Hoffmann (2004). Trefoil factor family (TFF) expression in the mouse brain and pituitary: changes in the developing cerebellum. Peptides. **25**: 827-832.
- Hirota, M., H. Awatsuji, Y. Furukawa und K. Hayashi (1994). "Cytokine regulation of PS2 gene expression in mouse astrocytes." Biochem Mol Biol Int **33**(3): 515-520.
- Hoffmann, W., W. Jagla und A. Wiede (2001). "Molecular medicine of TFF-peptides: from gut to brain." Histol Histopathol **16**(1): 319-334.
- Hommes, D. W., M. P. Peppelenbosch und S. J. van Deventer (2003). "Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets." Gut **52**(1): 144-151.

- Hull, M., M. Berger, B. Volk und J. Bauer (1996). "Occurrence of interleukin-6 in cortical plaques of Alzheimer's disease patients may precede transformation of diffuse into neuritic plaques." Ann N Y Acad Sci **777**: 205-212.
- Itoh, H., M. Tomita, H. Uchino, T. Kobayashi, H. Kataoka, R. Sekiya und Y. Nawa (1996). "cDNA cloning of rat pS2 peptide and expression of trefoil peptides in acetic acid-induced colitis." Biochem J **318 (Pt 3)**: 939-944.
- Jagla, W., A. Wiede, K. Dietzmann, K. Rutkowski und W. Hoffmann (2000). "Co-localization of TFF3 peptide and oxytocin in the human hypothalamus." FASEB J **14(9)**: 1126-1131.
- Jagla, W., A. Wiede, M. Hinz, K. Dietzmann, D. Gulicher, K. L. Gerlach und W. Hoffmann (1999). "Secretion of TFF-peptides by human salivary glands." Cell Tissue Res **298(1)**: 161-166.
- Jin, K., X. O. Mao, Y. Zhu und D. A. Greenberg (2002). "MEK and ERK protect hypoxic cortical neurons via phosphorylation of Bad." J Neurochem **80(1)**: 119-125.
- Kamphuis, W., C. Mamber, M. Moeton, L. Kooijman, J. A. Sluijs, A. H. Jansen, M. Verveer, L. R. de Groot, V. D. Smith, S. Rangarajan, J. J. Rodriguez, M. Orre und E. M. Hol (2012). GFAP Isoforms in Adult Mouse Brain with a Focus on Neurogenic Astrocytes and Reactive Astroglia in Mouse Models of Alzheimer Disease. PLoS One. **7**: e42823.
- Kannan, N., J. Kang, X. Kong, J. Tang, J. K. Perry, K. M. Mohankumar, L. D. Miller, E. T. Liu, H. C. Mertani, T. Zhu, P. M. Grandison, D. X. Liu und P. E. Lobie (2010). "Trefoil factor 3 is oncogenic and mediates anti-estrogen resistance in human mammary carcinoma." Neoplasia **12(12)**: 1041-1053.
- Kaur, C., A. J. Hao, C. H. Wu und E. A. Ling (2001). Origin of microglia. Microsc Res Tech. **54**: 2-9.
- Kaur, C. und E. A. Ling (1992). "Activation and re-expression of surface antigen in microglia following an epidural application of kainic acid in the rat brain." J Anat **180 (Pt 2)**: 333-342.
- Kettenmann, H. und A. Verkhratsky (2011). "[Neuroglia--living nerve glue]." Fortschr Neurol Psychiatr **79(10)**: 588-597.
- Khoury, T., K. Chadha, M. Javle, K. Donohue, C. Levea, R. Iyer, H. Okada, H. Nagase und D. Tan (2005). Expression of intestinal trefoil factor (TFF-3) in hepatocellular carcinoma. Int J Gastrointest Cancer. **35**: 171-177.
- Kim, J. H., K. J. Min, W. Seol, I. Jou und E. H. Joe (2010). "Astrocytes in injury states rapidly produce anti-inflammatory factors and attenuate microglial inflammatory responses." J Neurochem **115(5)**: 1161-1171.

Kim, Y. S., S. S. Kim, J. J. Cho, D. H. Choi, O. Hwang, D. H. Shin, H. S. Chun, M. F. Beal und T. H. Joh (2005). "Matrix metalloproteinase-3: a novel signaling proteinase from apoptotic neuronal cells that activates microglia." J Neurosci **25**(14): 3701-3711.

Kimelberg, H. K. (2004). The problem of astrocyte identity. Neurochem Int. **45**: 191-202.

Kinoshita, K., D. R. Taupin, H. Itoh und D. K. Podolsky (2000). "Distinct pathways of cell migration and antiapoptotic response to epithelial injury: structure-function analysis of human intestinal trefoil factor." Mol Cell Biol **20**(13): 4680-4690.

Kjellev, S. (2009). "The trefoil factor family - small peptides with multiple functionalities." Cell Mol Life Sci **66**(8): 1350-1369.

Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci. **19**: 312-318.

Kucharczak, J., M. J. Simmons, Y. Fan und C. Gelinas (2003). To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. Oncogene. **22**: 8961-8982.

Kyriakis, J. M. und J. Avruch (2012). "Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update." Physiol Rev **92**(2): 689-737.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.

Lawson, L. J., V. H. Perry und S. Gordon (1993). Microglial responses to physiological change: osmotic stress elevates DNA synthesis of neurohypophyseal microglia. Neuroscience. **56**: 929-938.

Lee, D. C., J. Rizer, M. L. Selenica, P. Reid, C. Kraft, A. Johnson, L. Blair, M. N. Gordon, C. A. Dickey und D. Morgan (2010). "LPS- induced inflammation exacerbates phospho-tau pathology in rTg4510 mice." J Neuroinflammation **7**: 56.

Lenhossek, M. (1891). "Der feinere Bau des Nervensystems im Lichte."

Liao, H., W. Y. Bu, T. H. Wang, S. Ahmed und Z. C. Xiao (2005). Tenascin-R plays a role in neuroprotection via its distinct domains that coordinate to modulate the microglia function. J Biol Chem. **280**: 8316-8323.

Liebner, S., C. J. Czupalla und H. Wolburg (2011). Current concepts of blood-brain barrier development. Int J Dev Biol. **55**: 467-476.

Liu, B., H. M. Gao, J. Y. Wang, G. H. Jeohn, C. L. Cooper und J. S. Hong (2002). "Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration." Ann N Y Acad Sci **962**: 318-331.

- Liu, S. Q., B. J. Tefft, D. Zhang, D. Roberts, D. J. Schuster und A. Wu (2011). "Cardioprotective mechanisms activated in response to myocardial ischemia." Mol Cell Biomech **8**(4): 319-338.
- Livak, K. J. und T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Loncar, M. B., E. D. Al-azze, P. S. Sommer, M. Marinovic, K. Schmehl, M. Kruschewski, N. Blin, R. Stohwasser, P. Gott und T. Kayademir (2003). "Tumour necrosis factor alpha and nuclear factor kappaB inhibit transcription of human TFF3 encoding a gastrointestinal healing peptide." Gut **52**(9): 1297-1303.
- Long-Smith, C. M., A. M. Sullivan und Y. M. Nolan (2009). The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. Prog Neurobiol. **89**: 277-287.
- Lu, K., C. L. Cho, C. L. Liang, S. D. Chen, P. C. Liliang, S. Y. Wang und H. J. Chen (2007). "Inhibition of the MEK/ERK pathway reduces microglial activation and interleukin-1-beta expression in spinal cord ischemia/reperfusion injury in rats." J Thorac Cardiovasc Surg **133**(4): 934-941.
- Lue, L. F., R. Rydel, E. F. Brigham, L. B. Yang, H. Hampel, G. M. Murphy, Jr., L. Brachova, S. D. Yan, D. G. Walker, Y. Shen und J. Rogers (2001). "Inflammatory repertoire of Alzheimer's disease and nondemented elderly microglia in vitro." Glia **35**(1): 72-79.
- Lull, M. E. und M. L. Block (2010). Microglial activation and chronic neurodegeneration. Neurotherapeutics. **7**: 354-365.
- Mahmood, A., L. Melley, A. J. Fitzgerald, S. Ghosh und R. J. Playford (2005). "Trial of trefoil factor 3 enemas, in combination with oral 5-aminosalicylic acid, for the treatment of mild-to-moderate left-sided ulcerative colitis." Aliment Pharmacol Ther **21**(11): 1357-1364.
- Matsuoka, Y., J. C. Pascall und K. D. Brown (1999). Quantitative analysis reveals differential expression of mucin (MUC2) and intestinal trefoil factor mRNAs along the longitudinal axis of rat intestine. Biochim Biophys Acta. **1489**: 336-344.
- Meyer zum Buschenfelde, D., H. Hoschutzky, R. Tauber und O. Huber (2004). Molecular mechanisms involved in TFF3 peptide-mediated modulation of the E-cadherin/catenin cell adhesion complex. Peptides. **25**: 873-883.
- Meyer zum Buschenfelde, D., R. Tauber und O. Huber (2006). TFF3-peptide increases transepithelial resistance in epithelial cells by modulating claudin-1 and -2 expression. Peptides. **27**: 3383-3390.
- Mogi, M., M. Harada, H. Narabayashi, H. Inagaki, M. Minami und T. Nagatsu (1996). "Interleukin (IL)-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease." Neurosci Lett **211**(1): 13-16.

- Mogi, M., M. Harada, P. Riederer, H. Narabayashi, K. Fujita und T. Nagatsu (1994). "Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients." Neurosci Lett **165**(1-2): 208-210.
- Morgan, S. C., D. L. Taylor und J. M. Pocock (2004). Microglia release activators of neuronal proliferation mediated by activation of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and delta-Notch signalling cascades. J Neurochem. **90**: 89-101.
- Mueller, P. R., B. Wold und P. A. Garrity (2001). "Ligation-mediated PCR for genomic sequencing and footprinting." Curr Protoc Mol Biol **Chapter 15**: Unit 15 13.
- Muller, T., D. Blum-Degen, H. Przuntek und W. Kuhn (1998). "Interleukin-6 levels in cerebrospinal fluid inversely correlate to severity of Parkinson's disease." Acta Neurol Scand **98**(2): 142-144.
- Munhoz, C. D., B. Garcia-Bueno, J. L. Madrigal, L. B. Lepsch, C. Scavone und J. C. Leza (2008). "Stress-induced neuroinflammation: mechanisms and new pharmacological targets." Braz J Med Biol Res **41**(12): 1037-1046.
- Nagler, K., D. H. Mauch und F. W. Pfrieger (2001). Glia-derived signals induce synapse formation in neurones of the rat central nervous system. J Physiol. **533**: 665-679.
- Napetschnig, J. und H. Wu (2013). "Molecular basis of NF-kappaB signaling." Annu Rev Biophys **42**: 443-468.
- O'Neill, L. A. und C. Kaltschmidt (1997). NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. Trends Neurosci. **20**: 252-258.
- Oberheim, N. A., T. Takano, X. Han, W. He, J. H. Lin, F. Wang, Q. Xu, J. D. Wyatt, W. Pilcher, J. G. Ojemann, B. R. Ransom, S. A. Goldman und M. Nedergaard (2009). "Uniquely hominid features of adult human astrocytes." J Neurosci **29**(10): 3276-3287.
- Ogata, H. und D. K. Podolsky (1997). "Trefol peptide expression and secretion is regulated by neuropeptides and acetylcholine." Am J Physiol **273**(2 Pt 1): G348-354.
- Ono, S., J. Hu, N. Shimizu, T. Imai und H. Nakagawa (2001). "Increased interleukin-6 of skin and serum in amyotrophic lateral sclerosis." J Neurol Sci **187**(1-2): 27-34.
- Park, K. M. und W. J. Bowers (2010). "Tumor necrosis factor-alpha mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction." Cell Signal **22**(7): 977-983.
- Paulsen, F. P., M. Hinz, U. Schaudig, A. B. Thale und W. Hoffmann (2002). "TFF peptides in the human efferent tear ducts." Invest Ophthalmol Vis Sci **43**(11): 3359-3364.

- Paulsen, F. P., C. W. Woon, D. Varoga, A. Jansen, F. Garreis, K. Jager, M. Amm, D. K. Podolsky, P. Steven, N. P. Barker und S. Sel (2008). Intestinal trefoil factor/TFF3 promotes re-epithelialization of corneal wounds. J Biol Chem. **283**: 13418-13427.
- Perea, G. und A. Araque (2005). "Synaptic regulation of the astrocyte calcium signal." J Neural Transm **112**(1): 127-135.
- Perry, V. H. und S. Gordon (1988). Macrophages and microglia in the nervous system. Trends Neurosci. **11**: 273-277.
- Polazzi, E., T. Gianni und A. Contestabile (2001). Microglial cells protect cerebellar granule neurons from apoptosis: evidence for reciprocal signaling. Glia. **36**: 271-280.
- Poulsom, R., A. M. Hanby, E. N. Lalani, F. Hauser, W. Hoffmann und G. W. Stamp (1997). Intestinal trefoil factor (TFF 3) and pS2 (TFF 1), but not spasmolytic polypeptide (TFF 2) mRNAs are co-expressed in normal, hyperplastic, and neoplastic human breast epithelium. J Pathol. **183**: 30-38.
- Prat, A., K. Biernacki, K. Wosik und J. P. Antel (2001). Glial cell influence on the human blood-brain barrier. Glia. **36**: 145-155.
- Prinz, M. und A. Mildner (2012). "Microglia in the CNS: immigrants from another world." Glia **59**(2): 177-187.
- Probst, J. C., T. Zetzsche, M. Weber, P. Theilemann, T. Skutella, R. Landgraf und G. F. Jirikowski (1996). "Human intestinal trefoil factor is expressed in human hypothalamus and pituitary: evidence for a novel neuropeptide." FASEB J **10**(13): 1518-1523.
- Pugazhenthii, S., Y. Zhang, R. Bouchard und G. Mahaffey (2013). "Induction of an Inflammatory Loop by Interleukin-1beta and Tumor Necrosis Factor-alpha Involves NF-kB and STAT-1 in Differentiated Human Neuroprogenitor Cells." PLoS One **8**(7): e69585.
- Qu, Y., Y. Yang, D. Ma und W. Xiao (2012). "Increased trefoil factor 3 levels in the serum of patients with three major histological subtypes of lung cancer." Oncol Rep **27**(4): 1277-1283.
- Ridet, J. L., S. K. Malhotra, A. Privat und F. H. Gage (1997). Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. Trends Neurosci. **20**: 570-577.
- Rinnert, M., M. Hinz, P. Buhtz, F. Reiher, W. Lessel und W. Hoffmann (2010). "Synthesis and localization of trefoil factor family (TFF) peptides in the human urinary tract and TFF2 excretion into the urine." Cell Tissue Res **339**(3): 639-647.
- Rodrigues, S., E. Van Aken, S. Van Bocxlaer, S. Attoub, Q. D. Nguyen, E. Bruyneel, B. R. Westley, F. E. May, L. Thim, M. Mareel, C. Gespach und S. Emami (2003). Trefoil peptides as proangiogenic factors in vivo and in vitro: implication of cyclooxygenase-2 and EGF receptor signaling. FASEB J. **17**: 7-16.

Romero-Graillet, C., E. Aberdam, M. Clement, J. P. Ortonne und R. Ballotti (1997). "Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis." J Clin Invest **99**(4): 635-642.

Rosler, S., T. Haase, H. Claassen, U. Schulze, M. Schicht, D. Riemann, J. Brandt, D. Wohlrab, B. Muller-Hilke, M. B. Goldring, S. Sel, D. Varoga, F. Garreis und F. P. Paulsen (2010). "Trefoil factor 3 is induced during degenerative and inflammatory joint disease, activates matrix metalloproteinases, and enhances apoptosis of articular cartilage chondrocytes." Arthritis Rheum **62**(3): 815-825.

Rossi, D. und A. Volterra (2009). Astrocytic dysfunction: insights on the role in neurodegeneration. Brain Res Bull. **80**: 224-232.

Saijo, K. und C. K. Glass (2011). Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. Nat Rev Immunol. **11**: 775-787.

Sakon, S., X. Xue, M. Takekawa, T. Sasazuki, T. Okazaki, Y. Kojima, J. H. Piao, H. Yagita, K. Okumura, T. Doi und H. Nakano (2003). "NF-kappaB inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death." EMBO J **22**(15): 3898-3909.

Samuels, I. S., S. C. Saitta und G. E. Landreth (2009). MAP'ing CNS development and cognition: an ERKsome process. Neuron. **61**: 160-167.

Sawada, M., N. Kondo, A. Suzumura und T. Marunouchi (1989). Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. Brain Res. **491**: 394-397.

Schulze, U., S. Sel und F. P. Paulsen (2010). Trefoil factor family peptide 3 at the ocular surface. A promising therapeutic candidate for patients with dry eye syndrome? Dev Ophthalmol. **45**: 1-11.

Schwarz, H., W. Jagla, A. Wiede und W. Hoffmann (2001). "Ultrastructural co-localization of TFF3-peptide and oxytocin in the neural lobe of the porcine pituitary." Cell Tissue Res **305**(3): 411-416.

Seger, R. und E. G. Krebs (1995). "The MAPK signaling cascade." FASEB J **9**(9): 726-735.

Seib, T., N. Blin, K. Hilgert, M. Seifert, B. Theisinger, M. Engel, S. Dooley, K. D. Zang und C. Welter (1997). The three human trefoil genes TFF1, TFF2, and TFF3 are located within a region of 55 kb on chromosome 21q22.3. Genomics. **40**: 200-202.

Sekizawa, T., H. Openshaw, K. Ohbo, K. Sugamura, Y. Itoyama und J. C. Niland (1998). "Cerebrospinal fluid interleukin 6 in amyotrophic lateral sclerosis: immunological parameter and comparison with inflammatory and non-inflammatory central nervous system diseases." J Neurol Sci **154**(2): 194-199.

Shi, H. S., X. Yin, L. Song, Q. J. Guo und X. H. Luo (2011). Neuropeptide Trefoil factor 3 improves learning and retention of novel object recognition memory in mice. Behav Brain Res. **227**: 265-269.

Sidoryk-Wegrzynowicz, M., M. Wegrzynowicz, E. Lee, A. B. Bowman und M. Aschner (2011). Role of astrocytes in brain function and disease. Toxicol Pathol. **39**: 115-123.

Somjen, G. G. (1988). "Nervenkitt: notes on the history of the concept of neuroglia." Glia **1**(1): 2-9.

Song, H., C. F. Stevens und F. H. Gage (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. Nature. **417**: 39-44.

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

Stoll, G. und S. Jander (1999). The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. Prog Neurobiol. **58**: 233-247.

Streit, W. J. (2002). "Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS." Glia **40**(2): 133-139.

Streit, W. J., M. B. Graeber und G. W. Kreutzberg (1988). "Functional plasticity of microglia: a review." Glia **1**(5): 301-307.

Streit, W. J. und C. A. Kincaid-Colton (1995). "The brain's immune system." Sci Am **273**(5): 54-55, 58-61.

Suemori, S., K. Lynch-Devaney und D. K. Podolsky (1991). "Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(24): 11017-11021.

Surh, Y. J. und H. K. Na (2008). "NF-kappaB and Nrf2 as prime molecular targets for chemoprevention and cytoprotection with anti-inflammatory and antioxidant phytochemicals." Genes Nutr **2**(4): 313-317.

Swartz, K. R., F. Liu, D. Sewell, T. Schochet, I. Campbell, M. Sandor und Z. Fabry (2001). Interleukin-6 promotes post-traumatic healing in the central nervous system. Brain Res. **896**: 86-95.

Tan, X. D., Q. P. Liu, W. Hsueh, Y. H. Chen, H. Chang und F. Gonzalez-Crussi (1999). "Intestinal trefoil factor binds to intestinal epithelial cells and induces nitric oxide production: priming and enhancing effects of mucin." Biochem J **338** (Pt 3): 745-751.

Teng, X., L. F. Xu, P. Zhou, H. W. Sun und M. Sun (2009). "Effects of trefoil peptide 3 on expression of TNF-alpha, TLR4, and NF-kappaB in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis mice." Inflammation **32**(2): 120-129.

Thim, L. (1997). "Trefoil peptides: from structure to function." Cell Mol Life Sci **53**(11-12): 888-903.

Thim, L., H. F. Woldike, P. F. Nielsen, M. Christensen, K. Lynch-Devaney und D. K. Podolsky (1995). "Characterization of human and rat intestinal trefoil factor produced in yeast." Biochemistry **34**(14): 4757-4764.

Ulich, T. R., S. Yin, K. Guo, E. S. Yi, D. Remick und J. del Castillo (1991). "Intratracheal injection of endotoxin and cytokines. II. Interleukin-6 and transforming growth factor beta inhibit acute inflammation." Am J Pathol **138**(5): 1097-1101.

Vandenbroucke, K., W. Hans, J. Van Huysse, S. Neiryneck, P. Demetter, E. Remaut, P. Rottiers und L. Steidler (2004). Active delivery of trefoil factors by genetically modified *Lactococcus lactis* prevents and heals acute colitis in mice. Gastroenterology. **127**: 502-513.

Vestergaard, E. M., S. S. Poulsen, H. Gronbaek, R. Larsen, A. M. Nielsen, K. Ejksjaer, J. T. Clausen, L. Thim und E. Nexø (2002). "Development and evaluation of an ELISA for human trefoil factor 3." Clin Chem **48**(10): 1689-1695.

Vincent, V. A., F. J. Tilders und A. M. Van Dam (1997). "Inhibition of endotoxin-induced nitric oxide synthase production in microglial cells by the presence of astroglial cells: a role for transforming growth factor beta." Glia **19**(3): 190-198.

Violet, M., L. Delattre, M. Tardivel, A. Sultan, A. Chauderlier, R. Caillierez, S. Talahari, F. Nesslany, B. Lefebvre, E. Bonnefoy, L. Buee und M. C. Galas (2014). "A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions." Front Cell Neurosci **8**: 84.

Virchow, R. (1858). "Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre."

Wang, H., X. W. Wu, Q. X. Wan, X. Jin, Y. Sun, D. Wu, J. J. Cao und X. Peng (2011). "[Effects of intestinal trefoil factor combined with mucin on ability of proliferation and migration of intestinal epithelial cells after being treated by rat burn serum]." Zhonghua Shao Shang Za Zhi **27**(5): 347-352.

Wiede, A., M. Hinz, E. Canzler, K. Franke, C. Quednow und W. Hoffmann (2001). "Synthesis and localization of the mucin-associated TFF-peptides in the human uterus." Cell Tissue Res **303**(1): 109-115.

Wiede, A., W. Jagla, T. Welte, T. Kohnlein, H. Busk und W. Hoffmann (1999). "Localization of TFF3, a new mucus-associated peptide of the human respiratory tract." Am J Respir Crit Care Med **159**(4 Pt 1): 1330-1335.

Wilms, H., P. Rosenstiel, M. Romero-Ramos, A. Arlt, H. Schafer, D. Seegert, P. J. Kahle, S. Odoy, J. H. Claasen, C. Holzknecht, L. O. Brandenburg, G. Deuschl, S. Schreiber, D. Kirik und R. Lucius (2009). "Suppression of MAP kinases inhibits microglial activation and attenuates neuronal cell death induced by alpha-synuclein protofibrils." Int J Immunopathol Pharmacol **22**(4): 897-909.

Wilms, H., P. Rosenstiel, J. Sievers, G. Deuschl, L. Zecca und R. Lucius (2003). "Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease." FASEB J **17**(3): 500-502.

Wolburg, H. und W. Paulus (2010). "Choroid plexus: biology and pathology." Acta Neuropathol **119**(1): 75-88.

Wong, W. M., R. Poulson und N. A. Wright (1999). "Trefol peptides." Gut **44**(6): 890-895.

Wood, J. A., P. L. Wood, R. Ryan, N. R. Graff-Radford, C. Pilapil, Y. Robitaille und R. Quirion (1993). Cytokine indices in Alzheimer's temporal cortex: no changes in mature IL-1 beta or IL-1RA but increases in the associated acute phase proteins IL-6, alpha 2-macroglobulin and C-reactive protein. Brain Res. **629**: 245-252.

Woodroffe, M. N. (1995). "Cytokine production in the central nervous system." Neurology **45**(6 Suppl 6): S6-10.

Wu, J., J. Zhang, G. Xue und H. Zhang (2014). "Expression and localization of trefol factor family genes in rat submandibular glands." Biotech Histochem.

Yasuda, S., H. Sugiura, H. Tanaka, S. Takigami und K. Yamagata (2011). "p38 MAP kinase inhibitors as potential therapeutic drugs for neural diseases." Cent Nerv Syst Agents Med Chem **11**(1): 45-59.

Zhang, B. H., H. G. Yu, Z. X. Sheng, H. S. Luo und J. P. Yu (2003). The therapeutic effect of recombinant human trefol factor 3 on hypoxia-induced necrotizing enterocolitis in immature rat. Regul Pept. **116**: 53-60.

Zhao, B. und J. P. Schwartz (1998). Involvement of cytokines in normal CNS development and neurological diseases: recent progress and perspectives. J Neurosci Res. **52**: 7-16.

Zhao, X., B. Bausano, B. R. Pike, J. K. Newcomb-Fernandez, K. K. Wang, E. Shohami, N. C. Ringger, S. M. DeFord, D. K. Anderson und R. L. Hayes (2001). "TNF-alpha stimulates caspase-3 activation and apoptotic cell death in primary septo-hippocampal cultures." J Neurosci Res **64**(2): 121-131.

Zou, J., Y. X. Wang, F. F. Dou, H. Z. Lu, Z. W. Ma, P. H. Lu und X. M. Xu (2010). Glutamine synthetase down-regulation reduces astrocyte protection against glutamate excitotoxicity to neurons. Neurochem Int. **56**: 577-584.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Ann-Kristin Helmers

Anschrift: Feldstraße 30, 24105 Kiel

Geburtsdatum und -ort: 19.08.1987 in Neumünster

Eltern: Günter Helmers, Erzieher
Marion Helmers, Verbraucherberaterin

Geschwister: keine Geschwister

Schulbildung: 09/1994-07/1998 Grundschule Husberg
09/1998-07/2007 Klaus-Groth-Schule, Gymnasium der Stadt Neumünster

Schulabschluss: 07/2007 Abitur

Studium: seit 2007 Studium der Humanmedizin CAU Kiel
Herbst 2009 erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung,
Herbst 2013 zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Praktische Erfahrung: seit 1.1.2014 Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin (Assistenzärztin) an der Klinik für Neurochirurgie des UK-SH Campus Kiel; ehrenamtliche Tätigkeit beim DRK/Schnelle-Einsatzgruppe Rettung; Tätigkeit als Dozentin im Rettungsdienst; Mitarbeit am Lehrbuch „Mensch, Körper, Krankheit für den Rettungsdienst“

Zusatzqualifikationen: PHTLS-Instruktorin, AMLS-Provider, ERC-ALS-Provider, Rettungssanitäterin, Erste-Hilfe-Ausbilderin

Publikationen der Ergebnisse dieser Arbeit

Posterbeiträge:

1. Ann-Kristin Helmers, Jessica Spreu, Ralph Lucius, Uta Rickert. Trefoil peptide 3 (TFF3) reduces the expression of proinflammatory mediators in cultivated microglia. 30. Arbeitstagung des Instituts für Anatomie und Zellbiologie, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg, 2013.
2. Ann-Kristin Helmers, Jessica Spreu, Ralph Lucius, Uta Rickert. Trefoil peptide 3 (TFF3) reduces the expression of proinflammatory mediators in cultivated microglia. 3rd International Congress on Reconstructive Neurosurgery, Kiel, 2012.

Selbständigkeitserklärung

Die vorliegende Arbeit wurde von mir ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten in Anspruch genommen habe.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Erklärung über Promotionsversuche

Ich erkläre, dass ich keinerlei frühere Promotionsversuche unternommen habe und an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist.

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Ralph Lucius für die Vergabe dieses interessanten Dissertationsthemas. Außerdem möchte ich mich bei dem Direktor des anatomischen Instituts der CAU Kiel Herrn Prof. Dr. Jobst Sievers für die Bereitstellung des Doktorandenplatzes bedanken.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. Uta Rickert für Ihre zahlreichen Ratschläge beim Anfertigen dieser Arbeit.

Auch für die großartige Unterstützung im Labor durch Frau Rosemarie Sprang, Frau Regine Worm, Frau Monika Grell, Frau Gaby Steinkamp und Herrn Günther Schäfer möchte ich mich bedanken. Auch Herrn Clemens Franke danke ich für seine Unterstützung bei der Anfertigung der Abbildungen.

Außerdem gilt mein Dank meinen Eltern, die mich insbesondere während des Studiums immer unterstützt haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meiner Mitbewohnerin und meinem Freund bedanken, die nicht nur meine angespannte Stimmung ertragen und mich immer wieder motiviert haben, sondern mich durch zahlreiche Verbesserungsvorschläge tatkräftig unterstützt haben.