

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

**EXPRESSION DER GLIAL CELL LINE-DERIVED NEUROTROPHIC
FACTOR-REZEPTORFAMILIE AUF MIKROGLIA UND DEREN
BEEINFLUSSUNG DER MIKROGLIALEN AKTIVIERUNG VOR DEM
HINTERGRUND DES PARKINSON-SYNDROMS**

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

vorgelegt von
Steffen Grampp

Kiel, 2012

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Held-Feindt, Klinik für Neurochirurgie

Tag der mündlichen Prüfung: 16.07.2012

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 16.07.2012

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Neurodegenerative Erkrankungen.....	1
1.1.1 Parkinson-Syndrom.....	1
1.1.2 Pathogenese des Parkinson-Syndroms.....	1
1.1.3 Proteinaggregation.....	2
1.1.4 Ubiquitin-Proteasomen-System.....	3
1.1.5 Mitochondriale Dysfunktion.....	4
1.2 Mikroglia.....	6
1.2.1 Mikroglia: Funktion und Aktivierung im ZNS.....	6
1.2.2 Neuronale Kontrolle und Mikrogliaaktivierung	7
1.2.3 Mikroglia und Neuroinflammation beim Parkinson-Syndrom	7
1.2.4 Der Glial Cell Line Derived Neurotrophic Factor (GDNF).....	9
1.2.5 Signaltransduktion.....	10
1.2.6 Funktion der GFL-Familie.....	11
1.3 Fragestellung.....	13
2. Material und Methoden.....	14
2.1 Material.....	14
2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Medien.....	14
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	15
2.1.3 Geräte und Hilfsmittel.....	16
2.1.4 Peptide.....	16
2.1.5 Primärantikörper.....	16
2.1.6 Sekundärantikörper.....	17
2.1.7 Enzyme.....	17
2.1.8 Gebrauchsfertige Kits.....	17
2.2. Medien, Lösungen und Puffer.....	17
2.2.1 Zellkulturmedien.....	17
2.2.2 Lösungen.....	17
2.2.3 Puffer.....	18
2.2.4 RNA-Agarose-Gel.....	19

2.3 Methoden.....	20
2.3.1 Isolierung und Kultur primärer Mikroglia.....	20
2.3.2 Beschichtung von Deckgläsern.....	21
2.3.3 Stimulation von Mikroglia.....	21
2.3.4 NO-Messung im Zellkulturüberstand.....	21
2.3.5 Coomassie Blue Färbung.....	22
2.3.6 Rezeptornachweis.....	22
2.3.6.1 Immunzytochemische Färbung.....	22
2.3.6.2 Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR).....	23
2.3.6.3 RNA-Isolierung	23
2.3.6.4 Quantifizierung der isolierten RNA.....	24
2.3.6.5 Herstellung von cDNA.....	24
2.3.6.6 Semiquantitative RT-PCR.....	25
2.3.6.7 Agarosegelelektrophorese.....	26
2.3.6.8 Qualitative Auswertung der Gelelektrophorese.....	26
2.3.7 <i>Realtime</i> RT-PCR.....	27
2.3.8 TNF- α - und IL-6 Sandwich-ELISA	28
2.3.9 Western-Blot.....	29
2.3.9.1 Kernproteinisolierung.....	29
2.3.9.2 Gesamtproteinisolierung.....	30
2.3.9.3 Quantifizierung der isolierten Proteine nach Bradford.....	30
2.3.9.4 Polyacrylamidgelelektrophorese.....	30
2.3.10 Statistische Analyse.....	32
2.3.11 Ausarbeitung, Layout.....	32
3. Ergebnisse.....	33
3.1 Zellkulturstudien.....	33
3.1.2 Mikroglia (Ruheform).....	33
3.1.3 Mikrogliaaktivierung durch LPS.....	34
3.2 Rezeptornachweis	35
3.2.1 Nachweis des GFR- α 1- und RET-Rezeptors auf Mikroglia mittels immunzytochemischer Färbung.....	35
3.2.2 Nachweis des GFR- α 1- und RET-Rezeptors auf mRNA-Ebene durch RT-PCR.	37
3.3 Die vier Faktoren der GFL-Familie reduzierten die NO- Synthese LPS stimulierter Mikroglia.....	39

3.3.1	GDNF, NTN, ATN und PSP reduzierten die Expression der iNOS-mRNA in LPS stimulierten Mikroglia	41
3.4	Einfluss der Faktoren der GFL-Familie auf die mRNA-Synthese von proinflammatorischen Enzymen und Mediatoren.....	42
3.4.1	GDNF, NTN, ATN und PSP reduzierten die Expression der COX-2-mRNA.....	43
3.4.2	Einfluss der Faktoren der GFL-Familie auf die mRNA-Synthese proinflammatorischer Zytokine	44
3.4.2.1	GDNF, NTN, ATN und PSP reduzierten die IL-6-mRNA-Synthese.....	44
3.4.2.2	GDNF, NTN, ATN und PSP reduzierten die TNF- α -mRNA-Synthese.....	45
3.4.2.3	GDNF, NTN, ATN und PSP reduzierten die IL-1 β mRNA-Synthese.....	46
3.5	Nachweis der reduzierten Proteinsekretion von IL-6 und TNF- α mittels Sandwich-ELISA.....	48
3.6	Nachweis der Beeinflussung intrazellulärer Signalwege mittels Western Blot.....	53
4.	Diskussion.....	56
4.1	Zellkultur.....	56
4.2	Nachweis einer veränderten NO-Sekretion durch die GFL-Familie.....	57
4.3	Nachweis von Rezeptoren der GFL-Familie.....	58
4.4	Beeinflussung der mRNA- und Proteinsynthese proinflammatorischer Enzyme und Zytokine.....	59
4.5	Die Beeinflussung intrazellulärer Signalwege durch die GFL-Faktoren.....	61
4.6	Klinische Anwendung der GFL-Faktoren-Familie.....	61
5.	Zusammenfassung.....	63
6.	Literatur.....	65
	Danksagung.....	73
	Lebenslauf	74
	Erklärung.....	75

Abkürzungsverzeichnis:

ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ATN	Artemin
α -MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
BSA	Bovines Serumalbumin
CDNF	Conserved dopamine neurotrophic factor
COX-2	Cyclooxygenase 2
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle Medium
ERK 1/2	extrazellulär regulierte Kinase 1/2
FasL	Fas-Ligand
FKS	fötales Kälberserum
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
GFL	<i>GDNF family ligand</i> -Familie neurotropher Faktoren
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
IBR	In between ring
IL-1	Interleukin-1
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-10	Interleukin-10
LK	Lewy Körperchen
iNOS	induzierbare NO-Synthetase
IFN- γ	Interferon- γ
LPS	Lipopolysaccharid
LRRK-2	Leucin rich repeat kinase 2
MANF	Mesencephalic-astrocyte-derived-neurotrophic-factor
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MMP3	Matrix-Metallo-Protease 3
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
NTN	Neurturin
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PI3K	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PLC γ	Phospholipase C γ
PSP	Persephin
PVDF	Polyvinylidenfluorid-Membran
TNF- α	Tumornekrosefaktor α

TGF- β	Transforming growth factor β
tPA	tissue Plasminogen-Aktivator
UBS	Ubiquitin-Proteasom-System
UCH-L1	Ubiquitin-C-terminale Hydrolase L1
VIP	vasoaktives intestinales Peptid

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Ätiologie des Parkinson-Syndroms.....	5
Abb. 1.2	<i>Circulus vitiosus</i> aus mikroglialer Aktivierung und neuronalem Zelltod.....	9
Abb. 1.3	Signaltransduktion der GFL-Familie.....	12
Abb. 3.1	Primäre Mikroglia in Ruheform.....	33
Abb. 3.2	Primäre Mikrogliazellkultur (Aktivierte Form).....	34
Abb. 3.3	Immunzytochemische Darstellung des GFR- α 1-Rezeptors auf unstimulierter und LPS stimulierter Mikroglia.....	36
Abb. 3.4	Immunzytochemische Darstellung des RET-Rezeptors auf unstimulierter und LPS stimulierter Mikroglia.....	37
Abb. 3.5	Qualitativer Nachweis von mRNA-Transkripten des GFR- α 1-Rezeptors mittels RT-PCT auf primärer Mikroglia.....	38
Abb. 3.6	Qualitativer Nachweis von mRNA-Transkripten des RET-Rezeptors mittels RT-PCT auf primärer Mikroglia.....	38
Abb. 3.7	Modulation der NO-Synthese durch GDNF, NTN, ATN und PSP bei LPS stimulierter Mikroglia.....	40
Abb. 3.8	Stimulation der Mikroglia hatte keinen Einfluss auf deren Vitalität.....	41
Abb. 3.9	Einfluss von GDNF, NTN, ATN und PSP auf die iNOS-mRNA-Synthese in LPS stimulierter Mikroglia.....	42
Abb. 3.10	Einfluss von GDNF, NTN, ATN und PSP auf die COX-2-mRNA-Synthese in LPS stimulierter Mikroglia	43
Abb. 3.11	Einfluss von GDNF, NTN, ATN und PSP auf die IL-6-mRNA-Synthese in LPS stimulierter Mikroglia.....	45

Abb. 3.12	Einfluss von GDNF, NTN, ATN und PSP auf die TNF α -mRNA-Synthese in LPS stimulierter Mikroglia	46
Abb. 3.13	Einfluss von GDNF, NTN, ATN und PSP auf die IL-1 β -mRNA-Synthese in LPS stimulierter Mikroglia.....	47
Abb. 3.14	Einfluss von GDNF, NTN, ATN und PSP auf die IL-6-Proteinsynthese nach 6 Stunden Stimulation.....	49
Abb. 3.15	Einfluss von GDNF, NTN, ATN und PSP auf die IL-6-Proteinsynthese nach 24 Stunden Stimulation	50
Abb. 3.16	Einfluss von GDNF, NTN, ATN und PSP auf die TNF- α Proteinsynthese nach 6 Stunden Stimulation	51
Abb. 3.17	Einfluss von GDNF, NTN, ATN und PSP auf die TNF- α Proteinsynthese nach 24 Stunden Stimulation	52
Abb. 3.18	Einfluss von GDNF auf den p38/pp38 Signalweg.....	53
Abb. 3.19	Einfluss von NTN auf den p38/pp38 Signalweg.....	54
Abb. 3.20	Einfluss von ATN auf den p38/pp38 Signalweg.....	54
Abb. 3.21	Einfluss von PSP auf den p38/pp38 Signalweg.....	55

1. Einleitung

1.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Mit der steigenden Lebenserwartung in den Industrieländern erlangen die neurodegenerativen Erkrankungen immer mehr an Bedeutung. Zentrales Merkmal aller neurodegenerativen Erkrankungen ist der langsame, progrediente und meist selbständig verlaufende Verlust von Neuronen. Die Neurone sind nicht zu einer endogenen Regeneration befähigt, was zu einem irreversiblen Verlust der Neurone mit nachfolgenden Auswirkungen auf funktionelle zerebrale Systeme führt. Die Pathogenese der Erkrankungen ist bis heute nicht vollständig geklärt, es wird jedoch angenommen, dass sowohl genetische als auch umweltbedingte Einflüsse zum Ausbruch dieser Erkrankungen führen. Zur Gruppe der neurodegenerativen Erkrankungen zählt man unter anderem das Parkinson-Syndrom, den Morbus Alzheimer, die Chorea Huntington und die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS). Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit soll auf dem Parkinson-Syndrom liegen.

1.1.1 Parkinson-Syndrom

Das Parkinson-Syndrom wurde 1817 erstmals von James Parkinson, einem britischen Arzt, beschrieben (Parkinson, 1817). Heute unterscheidet man verschiedene Formen des Parkinson-Syndroms. Es sind eine idiopathische, eine familiäre Form und ein sekundäres Parkinson-Syndrom bekannt (Übersicht bei Lees et al., 2009).

Die klinischen Leitsymptome des idiopathischen Parkinson-Syndroms sind Akinese, Tremor, Rigor und Störung der posturalen Reflexe. Die Inzidenz der Erkrankung steigt mit zunehmendem Alter bei einem Lebenszeitrisiko von 1,5 % (Bower et al., 1990). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 60 Jahren und das mediane Überleben bei 15 Jahren (Katzenschlager et al., 2008). Außer den o.g. Kardinalssymptomen manifestiert sich die Erkrankung aber auch in Bereichen der Kognition, des vegetativen Nervensystems und der Sensorik (Übersicht bei Lees et al., 2009).

1.1.2 Pathogenese des Parkinson-Syndroms

Leitmerkmale des Parkinson-Syndroms sind der Verlust dopaminergener Neurone in der Substantia nigra (Pars compacta) und die Entstehung intraneuronaler Zelleinschlüsse, der so genannten Lewy-Körperchen (LK) (Braak et al., 2003). Erst ab einem Verlust von ca. 50-70 % der dopaminergen Neurone kommt es zur Entstehung der Parkinson-Syndrom-spezifischen Symptomatik. Dabei gilt die erniedrigte neuronale Dopaminkonzentration, die vor allem in späten Stadien sehr niedrige Werte erreicht, als Hauptursache für die Symptomatik (Fahn et al., 2000).

Ein Großteil der Parkinson-Syndrom-Erkrankungen entsteht sporadisch. Es wurde darüber hinaus eine Vielzahl an Genen identifiziert, die eine wesentliche Rolle bei der Entstehung des Parkinson-Syndroms spielen. Man geht heute davon aus, dass die genetisch bedingten Formen einen Anteil von 5-10 % an den Gesamtfällen des Parkinson-Syndroms ausmachen (Ghandi et al., 2005).

Bei den identifizierten Gendefekten handelt es sich um autosomal dominante Punktmutationen oder Genduplikationen im α -Synuclein-Gen (Polymeropoulos et al., 1997), Punktmutationen in der Ubiquitin-C-terminalen Hydrolase L1 (UCH-L1) (Leroy et al., 1998) oder Mutationen im LRRK-2 (Leucin rich repeat kinase 2)-Gen (Zimprich et al., 2004; Übersicht bei Cook et al., 2009). Als Folge dieser Mutationen entstehen genetisch dominante Formen des Parkinson-Syndroms. Genetisch rezessive Formen des Parkinson-Syndroms werden durch Mutationen im Parkin-Gen (Kitada et al., 1998), Pink 1 Gen und DJ1 Gen (Bonifati et al., 2003) verursacht. Trotz der Vielzahl an beteiligten Genen und Mutationen sind in den meisten Fällen eine gestörte Proteinfaltung, eine mitochondriale Dysfunktion oder eine gestörte Kinasenaktivität zu beobachten. Der genaue Ablauf dieser drei Veränderungen und deren Gewichtung in der Entstehung des Parkinson-Syndroms ist bis heute nicht abschließend geklärt. Bislang erklärt man sich durch sie den dopaminergen Zellverlust.

1.1.3 Proteinaggregation

Ein bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen auftretender Pathomechanismus ist die Aggregation und intrazelluläre Ablagerung von zuvor löslichen Proteinen. Eine verstärkte Autooxidation und enzymatische Umsetzung von Neurotransmittern im Gehirn, wie zum Beispiel Dopamin, führt leichter zur Entstehung von proteinschädigenden, reaktiven Sauerstoffspezies und freien Radikalen (Keller et al., 2004). Neurone, die eine lange Lebensspanne und nur eine begrenzte Regenerationsfähigkeit besitzen, sind anfällig für solche Störungen. In diesem Zusammenhang war die Entdeckung des α -Synucleins als Hauptbestandteil der LK (Spillantini et al., 1998) ein Durchbruch im Verständnis des Parkinson-Syndroms. LK findet man beim Parkinson-Syndrom im Hirnstamm und im Cortex. Sie bestehen hauptsächlich aus aggregiertem Synphilin-1, Ubiquitin und α -Synuclein (Cole et al., 2002; Uversky et al., 2002). α -Synuclein ist ein primär ungefaltetes und gut lösliches Protein, welches normalerweise nur in Neuronen in begrenzten Arealen des Gehirns exprimiert wird. Die genaue Funktion des α -Synucleins ist nicht bekannt (Übersicht bei Breydo et al., 2011). Es kommt in der Zelle präsynaptisch sowohl in einer löslichen als auch einer membrangebundenen Form in hohen Konzentrationen vor. Man vermutet, dass α -Synuclein eine wichtige Rolle bei der Membranvesikelfusion und dem Vesikeltransport spielt (Übersicht bei Fink, 2006).

Sowohl beim sporadischen als auch familiären Parkinson-Syndrom kommt es zu einer Oligomerisierung des α -Synucleins, wobei die Oligomere zu einem nicht mehr löslichen Polymer (Fibrillen) aggregieren (Giasson et al., 2001). Diese Fibrillen bilden zusammen mit Neurofilamenten im Verlauf die äußere Schicht der LK, deren Kern aus ubiquitinierten Proteinen besteht (Spillantini et al., 1998). Eine Aggregation des α -Synucleins wird durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und Glykolysierung begünstigt (Giasson et al., 2000). Für die Entstehung der Oligomere, nicht aber der Fibrillen, sind Mutationen verantwortlich (Conway et al., 2000).

Man geht heute davon aus, dass die Oligomere die zytotoxische Form des α -Synucleins darstellen und nicht etwa die Fibrillen, die den Hauptanteil der LK ausmachen (Goldberg et al., 2000). In diesem Zusammenhang muss geklärt werden, ob die Bildung der LK ein Schutzmechanismus der Zelle ist, um die toxischen α -Synuclein-Oligomere zu entgiften. Dopamin selbst führt dabei zu einer Stabilisierung von α -Synuclein-Oligomeren, was die selektive Zerstörung der dopaminergen Neurone erklären kann (Conway et al., 2001).

1.1.4 Ubiquitin-Proteasomen-System

Mit der Identifizierung des Parkin-Gens wurde die Bedeutung des Ubiquitin-Proteasomen-Systems (UPS) für die Entstehung des Parkinson-Syndroms deutlich. Das UPS ermöglicht es der Zelle, defekte oder auch fehlgefaltete Proteine zu degradieren. Dieser Prozess findet im Zytoplasma, im Kern und im endoplasmatischen Retikulum statt (Ciechanover et al., 2005; Goldberg 2003). Die Funktion des UPS ist dabei, unerwünschte oder defekte Proteine mit einem Ubiquitinrest zu markieren und den Transport zu den abbauenden Enzymen, so genannte 26/20s-Proteasomen, zu gewährleisten (Ciechanover et al., 2005; Goldberg 2003). Mutationen im Parkin-Gen verursachen eine früh manifeste Form des autosomal-rezessiven Parkinson-Syndroms (Kitada et al., 1998). Es codiert für eine E3-Ubiquitin-Ligase mit einer charakteristischen „Zwei-Ring-Domäne“, die durch einen „*in between ring*“ (IBR) getrennt wird (Mata et al., 2004). Dieses Enzym ist verantwortlich für das Anfügen von Ubiquitinresten an für den Abbau bestimmte Proteine. Substrate von Parkin sind unter anderem Synphilin-1, O-glycosyliertes α -Synuclein und Cyclin E (Cooksen et al., 2005). Es wird vermutet, dass der Verlust bzw. die Mutation des Parkin-Gens zu einer Anhäufung seiner Substrate führt, da eine Markierung für das Proteasom-System ausbleibt. Die Folge sind eine zelltoxische Wirkung durch die angehäuften Substrate und ein genetisch verursachtes Parkinson-Syndrom.

Ein weiteres Gen, das identifiziert wurde und die Rolle des UPS an der Entstehung des Parkinson-Syndroms unterstützt, ist das UCHL-1 Gen. Es wird für dominante Formen des Parkinson-Syndroms verantwortlich gemacht (Leroy et al., 1998). UCHL-1 ist eine Ubiquitin-

Hydrolase, die Polyubiquitinketten in Monomere spaltet. Ist die Aktivität dieses Enzyms vermindert, können die Proteine nicht durch das Proteasom verdaut werden, und es kommt zu einer intrazellulären Ablagerung der Proteine und in der Folge zum Zelltod. Diese Mutationen sind jedoch nur in einer kleinen Fallzahl des Parkinson-Syndroms nachzuweisen. Die Beteiligung des UPS-Systems konnte nicht nur bei den genetisch bedingten Parkinson-Syndrom Fällen gezeigt werden. Auch bei den sporadischen Fällen ließ sich die Beteiligung nachweisen (Übersicht bei Cook et al., 2009). So wurde *post mortem* bei Patienten, die an der sporadischen Form des Parkinson-Syndroms erkrankt waren, eine verminderte Funktion der 20s-Proteasomaktivität festgestellt, was ebenfalls auf eine defiziente Proteindegradierung durch das UPS schließen lässt (Chung et al., 2001; Übersicht bei Cook et al., 2009).

1.1.5 Mitochondriale Dysfunktion

Eine weitere Hypothese beschreibt die mitochondriale Dysfunktion als zentralen Bestandteil der Pathogenese des Parkinson-Syndroms. So weisen neben Autopsiebefunden und Tiermodellen auch Mutationen im Pink1- und DJ-1 Gen auf eine mitochondriale Beteiligung in der Entstehung des Parkinson-Syndroms hin (Übersicht bei Cook et al., 2009). Hinweise auf eine mitochondriale Dysfunktion als Ursache zur Entstehung des Parkinson-Syndroms gehen auf die Entdeckung dreier Komplex-1-Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette zurück. 1-Methyl-4-Phenyl-1-2-3-6-Tetrahydropyridin (MPTP), Rotenon und Paraquat sind in der Lage, das Parkinson-Syndrom durch einen selektiven Verlust dopaminerger Neurone zu verursachen. Dies konnte *in vitro* und *in vivo* bei Mäusen (Seniuk et al., 1990) und Primaten (Forno et al., 1986) gezeigt werden. Bei den künstlich erzeugten Modellen fehlte jedoch ein zentrales Merkmal des sporadischen Parkinson-Syndroms, nämlich die neuronalen Ablagerungen in Form der LK. Erst bei einer langfristigen Infusion von Rotenon und MPTP konnten LK im Tiermodell erzeugt werden (Betarbet et al., 2000).

Die Wirkung der drei experimentell verwendeten Substanzen beruht auf einer Hemmung des Komplex 1 der mitochondrialen Atmungskette. Der Komplex 1 der Atmungskette transportiert Protonen und Elektronen über die innere Mitochondrienmembran und ist der erste Schritt der oxidativen Energiegewinnung in den Mitochondrien. Die Hemmung des Komplex 1 hat zwei grundlegende Konsequenzen:

Zum einen entsteht eine verminderte ATP-Produktion, wodurch ATP abhängige Prozesse der Zelle, zum Beispiel der Abbau ubiquitinionierter Proteine durch Proteasomen, abgeschwächt werden. Zum anderen kommt es zur Entstehung freier Radikale, welche zelltoxisch wirken. Ein klarer Beleg für den oxidativen Stress *in vivo* sind erhöhte Spiegel oxidierter Lipide und nitrierter Proteine, was sich *post mortem* in der Substantia nigra und den LK zeigen ließ (Anderson et al., 2004). Ein reduzierter Glutathionspiegel und ein

verminderter Spiegel an oxidiertem Glutathion, welche der Zelle als Antioxidantien dienen, sind das früheste Zeichen eines Zellverlustes in der Substantia nigra durch oxidativen Stress (Sian et al., 1994).

Folge der beschriebenen Pathomechanismen ist der Untergang dopaminerger Neurone in der Substantia nigra. Außer den sichtbaren Folgen der Bewegungsstörung kommt es intrazerebral durch die Zelltrümmer der untergegangenen Neurone zu einer Entzündungsreaktion, der sogenannten Neuroinflammation (Sugama et al., 2003; Cho et al., 2006), bei der Mikroglia eine zentrale Rolle spielen. In der nachfolgenden Abbildung sind die multifaktoriellen Ursachen des Parkinson-Syndroms zusammengefasst (Abb 1.1).

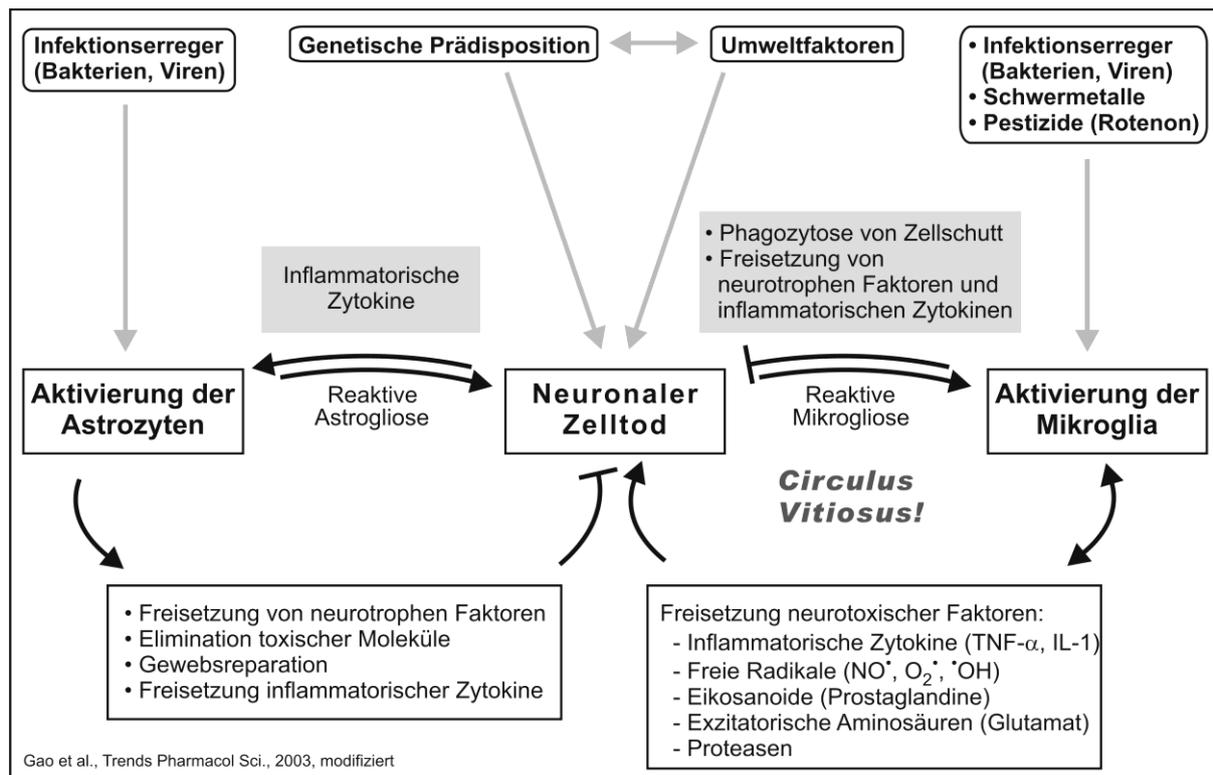


Abb. 1.1: Ätiologie des Parkinson-Syndroms (Gao et al., 2003, modifiziert durch Claasen (Diss., Med. Fak. Universität Kiel 2010)). Dargestellt sind die multifaktoriellen Ursachen, die nach heutigem Kenntnisstand zum Parkinson-Syndrom führen können. Außer einer genetischen Disposition und Umweltfaktoren sind Infektionserreger für den direkten oder indirekten, durch Mikroglia verursachten, dopaminerger Zellverlust verantwortlich. Gemeinsamer Endpunkt der Pathomechanismen ist der neuronale Zelltod in der Substantia nigra und die darauf folgende Aktivierung von Zellsubpopulationen im ZNS. Die Aktivierung der Mikroglia führt zu einer reaktiven Mikroglieose. Durch die mikrogliale Produktion neurotoxischer Substanzen kommt es zum neuronalen Zelltod. Dieses Wechselspiel mündet in einem *Circulus vitiosus* mit einem fortschreitenden dopaminerger Zellverlust. Die Beseitigung von Zelltrümmern, infektiösen Erregern und von toxischen Radikalen gilt als positiver Effekt der Neuroinflammation (Gao et al., 2003).

1.2 Mikroglia

1.2.1 Mikroglia: Funktion und Aktivierung im ZNS

Zum ersten Mal beschrieben wurden Mikroglia 1919 durch del Rio-Hortega. Er charakterisierte sie als eigenständigen Zelltyp des ZNS, mit verschiedenster Morphologie und engem Kontakt zu Neuronen und Astrozyten (del Rio-Hortega, 1919).

Heute weiß man, dass Mikroglia ca. 10 % der Glia-Population im ZNS ausmachen (Perry, 1998). Aus Zellen mesodermalen Ursprungs hervorgehend, wandern die Mikroglia in der frühen Embryonalphase in das ZNS (Übersicht bei Kettenmann et al., 2011). Sie leiten sich aus Monozyten ab und werden zu den hämatopoetischen Zellen gerechnet. Die Mikroglia sind über das gesamte Parenchym verteilt, wobei es zu keinem Kontakt der Mikrogliafortsätze untereinander kommt. Jede Mikroglia hat so ihr eigenes exklusives Kontrollgebiet (McGeer et al., 2008).

In der Literatur wird die Mikroglia als die erste Immunabwehr des ZNS beschrieben (Übersicht bei Napoli et al., 2008). Die Aufgaben der Mikroglia im ZNS sind jedoch vielfältig. So geht man davon aus, dass im Laufe der Entwicklung überproduzierte Neurone durch Apoptose zu Grunde gehen und durch Mikroglia beseitigt werden. Sie verfügen für diese Aufgabe über eine Vielzahl hydrolytischer Enzyme, die ihnen die Phagozytose und Beseitigung der Zelltrümmer ermöglichen (Ling, 1977). Ist die neuronale Entwicklung abgeschlossen, begeben sich die Mikroglia in eine sogenannte ramifizierte Form. Diese Form gilt als das Ruhestadium der Mikroglia (Übersicht bei Kettenman et al., 2011). Die genaue Funktion der ruhenden Mikroglia konnte noch nicht geklärt werden, aber es ließ sich *in vivo* zeigen, dass die Mikroglia aktiv das Parenchym des gesunden ZNS durch fortlaufende Bewegung ihrer feinen Fortsätze beobachten (Nimmerjahn et al., 2005). Zudem stehen die Mikroglia durch ihre Fortsätze in einem engen Kontakt zu Astrozyten, Neuronen und Blutgefäßen (Nimmerjahn et al., 2005).

Durch eine Vielzahl pathologischer Ereignisse (HIV, Infektion, Ischämie u.a.) bildet sich die ramifizierte Form in eine amöbioide (aktive) Form um. Experimentell konnte diese Aktivierung der Mikroglia schon durch eine iatrogen verursachte Schädigung einer Kapillare ausgelöst werden (Nimmerjahn et al., 2005). Die Umwandlung in die aktive Form mit proteolytischer und auch phagozytotischer Aktivität ist durch eine verstärkte Sekretion von Zytokinen, wie zum Beispiel Tumornekrosefaktor α (TNF- α) oder Interleukin-1 (IL-1) (Griffin et al., 1989), gekennzeichnet. Außerdem geht sie einher mit der Synthese proteolytischer Enzyme, der Produktion von Prostaglandinen (Banati et al., 1993) und mit einer verstärkten Expression von MHC-II-Antigenen auf der Zelloberfläche (Mattiace et al., 1990).

1.2.2 Neuronale Kontrolle und Mikrogliaaktivierung

Das ZNS unterliegt einem kontrollierten Gleichgewicht aus Hemmung und Aktivierung. Die Aktivität der Mikroglia wird durch ein komplexes Zusammenspiel von Neuronen, Astrozyten und den Mikroglia selbst gesteuert. Als Oberflächenmolekül konnte auf Neuronen das Glycoprotein CD 200 nachgewiesen werden, welches zu einer Ruhigstellung der Mikroglia führt (Hoek et al., 2000). Einen weiteren Regulationsmechanismus zur Kontrolle der Mikroglia stellt die elektrische Aktivität der Neurone und die Produktion löslicher Faktoren dar. Astrozyten verfügen über die Fähigkeit, durch die Produktion von *transforming growth factor - β* (TGF- β) und Interleukin 10 (IL-10) die Aktivierung von Mikroglia zu unterdrücken (Vincent et al., 1997).

So werden die Mikroglia unter normalen Umständen durch eine Koordination von Neuronen und Astrozyten in ihrer Funktion gehemmt. Erst im Falle einer Integritätsstörung des ZNS kommt es zu einer schnellen Aktivierung.

Für die Aktivierung der Mikroglia konnte eine Vielzahl von Molekülen ausgemacht werden, unter anderem Lipopolysaccharid (LPS), Interferon- γ (IFN- γ), CD40L und Chemokine, aber auch zahlreiche Proteasen wie Thrombin, Gewebe-Plasminogen-Aktivator (tPA) und die Matrix-Metallo-Protease 3 (MMP3). Diese Faktoren stammen dabei von Pathogenen, Immunzellen oder Mikroglia selbst (Tan et al., 1999). Aber auch ubiquitär anzutreffende Stoffe wie zum Beispiel ATP, freigesetzt aus geschädigten Neuronen und Astrozyten, stehen unter Verdacht, Mikroglia zu aktivieren und zum Läsionsort führen zu können (Davalos et al., 2005).

1.2.3 Mikroglia und Neuroinflammation beim Parkinson-Syndrom

Die Rolle der Mikroglia im gesunden Gehirn besteht in der fortlaufenden Überwachung ihrer Umgebung in ihrem ramifizierten Ruhestadium. In diesem Stadium sind die Mikroglia jedoch nicht inaktiv. So zeigte sich bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen, dass die Mikroglia andauernd durch Formation pseudopodienartiger Zellfortsätzen ihre nächste Umgebung überwachen und Zelltrümmer und Pathogene durch Phagozytose beseitigen (Übersicht bei Napoli et al., 2008). Lösliche Moleküle wie TGF- β , α -MSH, VIP, FasL und die Blut-Hirn-Schranke dienen dazu, die Mikroglia in ihrem Ruhestadium zu halten und eine überschießende Reaktion gegen gesunde neuronale Strukturen zu verhindern (Perry, 1998; Flugel et al., 2000).

Im Falle einer Verletzung, Infektion oder chronischen Entzündungsreaktion, wie sie beim Parkinson-Syndrom vorkommt, kommt es zur Freisetzung immunregulatorischer und proinflammatorischer Mediatoren. Mikroglia sind eine der Quellen dieser Mediatoren (Yoon et al., 2006; Qian et al., 2011). Verschiedene Studien legen zudem den Verdacht nahe, dass

es durch Neurone, die im neurodegenerativen Prozess zu Grunde gehen, zur Freisetzung Mikroglia-aktivierender Faktoren kommt (Sugama et al., 2003; Cho et al., 2006). Folge dieser Freisetzung und der Entwicklung einer chronischen Inflammation sind aktivierte Mikroglia mit einer verstärkten MHC-Expression und phagozytotischer Aktivität (Hayes et al., 1988). Beim Parkinson-Syndrom ließ sich nachweisen, dass es zu einer fokalen Akkumulation aktivierter Mikroglia in der Substantia nigra kommt (Mirza et al., 2000).

In der Substantia nigra untergehende dopaminerge Neurone setzen α -Synuclein frei. Für α -Synuclein konnte die Aktivierung von Mikroglia und dadurch eine quasi selbst induzierte Toxizität für dopaminerge Neurone gezeigt werden (Zhang et al., 2005). Ein weiterer Stoff, der im Verdacht steht, einen aktivierenden Einfluss auf die Mikroglia zu haben, ist Neuromelanin. Eigentlich spielt es eine protektive Rolle, indem es toxische Metabolite intrazellulär bindet (Enochs et al., 1994). Wilms et al. konnten hingegen zeigen, dass es durch Neuromelanin *in vitro* zu einer Induktion von Zytokinen wie zum Beispiel TNF- α , Interleukin-6 (IL-6) und Stickstoffmonoxid (NO) kommt, welche an der Pathogenese des Parkinson-Syndroms beteiligt sind (Wilms et al., 2003).

Auch wenn eine Erhöhung dieser Zytokine *in vivo* teilweise mit dem chronischen Gebrauch von L-Dopa zwecks Therapie erklärt werden kann (Bessler et al., 1999), ist der Anstieg eher mit einer Aktivierung der Mikroglia in Zusammenhang zu bringen (Hunot et al., 1999). Die Konsequenz der erhöhten Zytokinspiegel ist die erhöhte Produktion von NO durch iNOS, wobei die Induktion wahrscheinlich nicht über die Zytokine direkt, sondern über CD23, ein Oberflächenmolekül, erfolgt (Hunot et al., 1999). Der erhöhte NO-Spiegel wiederum führt zu einer vermehrten Zytokinproduktion. Die Zytokine haben dabei die Möglichkeit, direkt an Rezeptoren auf den dopaminergen Neuronen zu binden und so den neuronalen Zelltod durch die Aktivierung von Caspasen zu initiieren (Hartmann et al., 2002).

Auch für das experimentell erzeugte Modell des Parkinson-Syndroms mit MPTP konnte, außer dem dopaminergen Zelluntergang, eine Aktivierung von Mikroglia nachgewiesen werden (O'Callaghan et al., 1990).

Die genaue Rolle der Mikroglia in diesem Ablauf ist nicht abschließend geklärt. Durch das Zusammenspiel der aktivierenden Faktoren aus degenerierten Neuronen und der Produktion neurotoxischer Faktoren durch Mikroglia spielen sie jedoch eine aktive Rolle im neurodegenerativen Prozess (Qian et al., 2011). Dieser *Circulus vitiosus* im Krankheitsverlauf des Parkinson-Syndroms macht die Mikroglia zu einem potentiellen therapeutischen Ziel (Abb. 1.2).

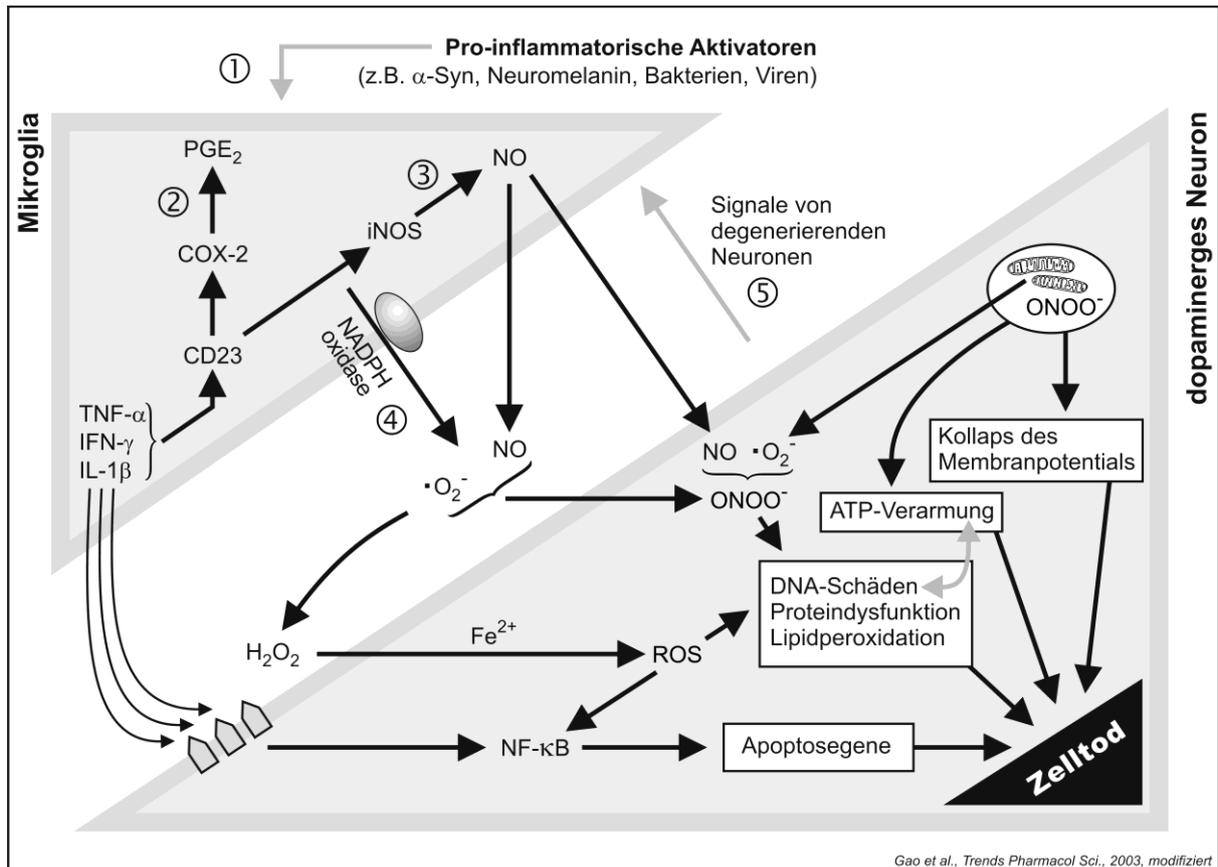


Abb. 1.2: Circulus vitiosus aus mikroglialer Aktivierung und neuronalem Zelltod (Gao et al., 2003, modifiziert durch Claasen 2010). Dargestellt ist das Zusammenspiel aus mikroglialer Aktivierung und neuronalem Zelltod im Rahmen der Neuroinflammation. Durch proinflammatorische Signale durch Bakterien, Viren und aus degenerierenden Neuronen kommt es in den Mikroglia zur Produktion von Sauerstoffradikalen, NO und einer Vielzahl an proinflammatorischen Zytokinen. Diese Vielfalt an Faktoren führt ihrerseits in vitalen Neuronen zu letalen Zellschäden bzw. einer Induktion von Apoptosegenen. Die Abbildung zeigt mögliche Ziele einer neuroprotektiven Therapie in Mikroglia, um die Produktion neurotoxischer Substanzen zu verhindern.

1.2.4 Der Glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF)

Auf der Suche nach neuen therapeutischen Möglichkeiten, den dopaminergen Zelltod zu stoppen, wurde durch Lin et al. (1993) der neurotrophe Faktor GDNF entdeckt. GDNF wurde das erste Mal aus der Gliazellreihe B49 isoliert (Lin et al., 1993) und ermöglicht das Überleben verschiedener Neuronensubtypen. Dazu zählen zentrale Motoneurone, dopaminerge und noradrenerge Neurone und periphere Neurone (Übersicht bei Aron et al., 2011) Außer GDNF konnten drei weitere, zu dieser Familie neurotropher Faktoren gehörende Faktoren identifiziert werden: zum einem Neurturin (NTN), als protektiver Faktor sympathischer Neurone, zum anderen Artemin (ATN) und Persephin (PSP) (Übersicht bei Aron et al. 2011). GDNF und die anderen drei ihm verwandten Faktoren sind entfernte Mitglieder der TGF- β -Superfamilie und werden heute zusammengefasst als die *GDNF family ligand*-Familie neurotropher Faktoren (GFL).

Alle vier Faktoren besitzen die für die TGF- β -Superfamilie typischen sieben Cysteinreste. Sie gehören damit zur Familie der Cystein-Knoten-Proteine und funktionieren nur als Dimere (Airaksinen et al., 2002). Die vier Faktoren besitzen eine Aminosäuresequenz-Homologie von ca. 40 % (Takahashi, 2001).

Produziert werden die Faktoren als preproGFL. Die Signalsequenz wird bei der Sekretion abgespalten, und die Aktivierung des proGFL erfolgt wahrscheinlich durch proteolytische Spaltung (Airaksinen et al., 2002). Extrazellulär scheinen die Faktoren Heparansulfatseitenketten von Extrazellulärmatrix zu binden, wodurch deren Diffusion verhindert und die lokale Konzentration erhöht wird (Hamilton et al., 2001).

Als Hauptproduzenten der GFL im entwickelten Gehirn gelten die Neurone, auch wenn eine Expression in Astrozyten und Mikroglia nachgewiesen werden konnte (Barroso-Chinea et al., 2005).

1.2.5 Signaltransduktion der Faktoren der GFL-Familie

Der erste Schritt des Signalweges der Faktoren der GFL-Familie liegt in der Dimerisierung zweier gleicher Liganden im Extrazellulärraum. Um an einen membranständigen Rezeptor binden zu können, muss ein Faktoren-Dimer aus zwei Molekülen GDNF, NTN, ATN oder PSP zuerst eine Bindung mit seinem Rezeptor GFR- α , einem Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anker assoziierten Membranprotein, eingehen (Jing et al., 1996; Treanor et al., 1996). Für die vier einzelnen Faktoren wurde jeweils ein spezifischer Rezeptor entdeckt, der dann die Bindung an einen membrangebundenen Rezeptor ermöglicht. So bindet GDNF an GFR- α 1, NTN an GFR- α 2, ATN an GFR- α 3 und PSP an GFR- α 4 (Übersicht bei Airaksinen & Saarma, 2002; Bessalov et al., 2007). Die Selektivität der Liganden für ihren Rezeptor beträgt nicht einhundert Prozent, und so kann auch eine Stimulation über einen der anderen Rezeptoren erfolgen. Bei diesem sogenannten „*crosstalk*“ ist GDNF in der Lage, an GFR- α 2 und GFR- α 3 zu binden. NTN und ATN können außer an ihren Rezeptoren auch an GFR- α 1 binden (Übersicht bei Airaksinen & Saarma 1999, Bessalov et al., 2007).

Der weitere Hauptsignalweg der Mitglieder der GFL-Familie, nach Dimerisierung und Bindung eines GFR- α -Rezeptors, läuft über die Aktivierung des RET-Rezeptors (Übersicht bei Airaksinen & Saarma 1999).

Der RET-Rezeptor ist das Produkt des c-RET-Protoonkogens und ist eine Tyrosinrezeptorkinase (Tsui-Pierchala et al., 2002). Die Bindung an den RET-Rezeptor kann mit einem einzelnen GFR- α -Molekül plus einem dimerisierten Faktormolekül erfolgen. Eine zweite Möglichkeit besteht in der Bindung mit einem Tetramer aus einem Faktorendimer und einem GFR- α -Dimer (Übersicht bei Airaksinen & Saarma 1999). Der Komplex aus GDNF/GFR- α bindet zuerst an einen RET-Rezeptor, welcher dann mit einem

zweiten RET-Rezeptor dimerisiert Die Bindung zwischen GFR- α und RET kann erfolgen, wenn beide auf der gleichen Zellmembran exprimiert werden (cis-Signalweg) oder wenn GFR- α in löslicher Form vorliegt (trans-Signalweg) (Übersicht bei Airaksinen & Saarma 1999). Die Rezeptoren befinden sich dabei in den so genannten „lipid rafts“, welche aus Cholesterin und Sphingolipiden aufgebaute Bereiche in der Plasmamembran der Zelle sind (Ledda et al., 2008). Nach der Komplexbildung kommt es zur Autophosphorylierung des RET-Rezeptors und in der Folge zu einer Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), der extrazellulär regulierten Kinase 1 und 2 (ERK 1/2), der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und der Phospholipase C γ (PLC γ) (Übersicht bei Airaksinen & Saarma, 2002). Die Hauptwirkung, die durch die Bindung des Faktoren/Rezeptor-Komplexes ausgelöst wird, ist eine Veränderung der Gentranskription (Jongen et al., 2005, Abb. 1.3).

1.2.6 Funktion der Faktoren der GFL-Familie

Die GFL bewirkt das Überleben von mesencephalen dopaminergen Neuronen *in vitro* (Lin et al., 1993) und spielt eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung und dem Überleben von Motoneuronen, sympathischen und sensorischen Neuronen, der Entwicklung der Nieren (Moore et al., 1996) und der Synapsenentwicklung im Hippocampus (Ledda et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass GDNF, NTN und ATN das Überleben sowohl von zentralen als auch peripheren Neuronen unterstützen, während für PSP ein solcher Effekt nur für zentrale Neurone gezeigt werden konnte (Takahashi et al., 2001).

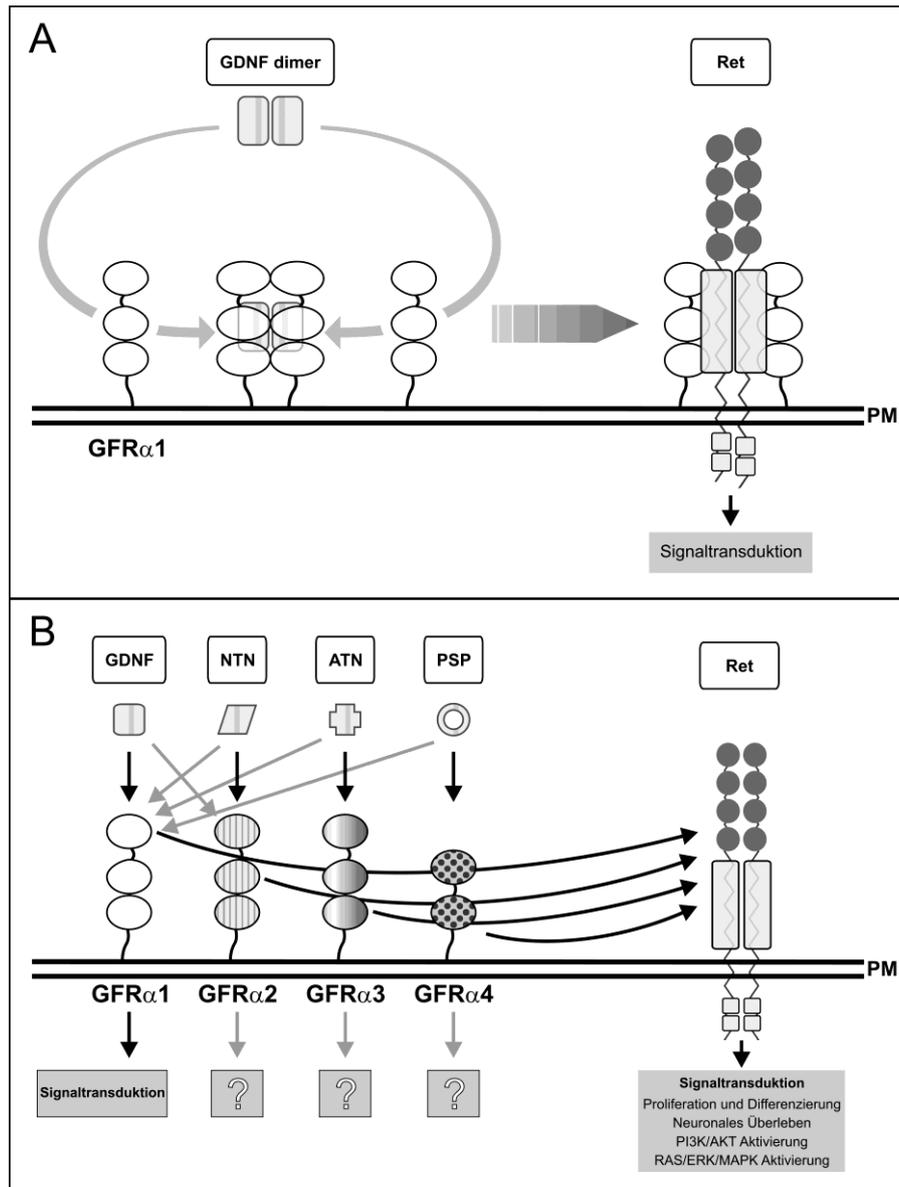


Abb. 1.3: Signaltransduktion der vier Faktoren der GFL-Familie (Sariola et al., 2003, modifiziert). Dargestellt ist die Signaltransduktion der Faktoren der GFL-Familie. **A** zeigt die Signalkette eines GDNF-Moleküls. Zuerst erfolgt die Dimerisierung zweier GDNF-Moleküle im Extrazellulärraum. Das GDNF-Dimer bindet beim hier dargestellten CIS Signalweg zwei Membran gebundene GFR- α 1-Corezeptor-Moleküle, die ebenfalls dimerisieren. Der Komplex aus zwei GDNF und zwei GFR- α 1-Molekülen bindet in der Folge zwei RET-Rezeptoren. Diese erlangen als Folge der Komplexbildung die Fähigkeit zur Autophosphorylierung und Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege. **B** zeigt die vier verschiedenen Faktoren der GFL-Familie mit den dazugehörigen Cofaktoren. Ebenfalls dargestellt ist der sogenannte Crosstalk der einzelnen Faktoren mit den verschiedenen Untereinheiten des GFR- α -Rezeptors.

1.3 Fragestellung

Aus den in Kapitel 1.2.3 bis 1.2.6. geschilderten Befunden ergibt sich die Frage, ob die vier Faktoren der GFL-Familie außer neurotrophen Eigenschaften auch die Fähigkeit haben, die für die neuroinflammatorischen Effekte verantwortlichen Mikroglia so zu beeinflussen, dass deren neurotoxische Wirkung reduziert werden kann.

Folgende Aspekte sollen dabei untersucht werden:

1. Nachweis der Rezeptoren und Korezeptoren der Faktoren der GFL-Familie auf Mikrogliazellen.
2. Einfluss auf die Produktion von Enzymen, proinflammatorischen Zytokinen und neurotoxischen Substanzen durch Stimulation mit Faktoren der GFL-Familie.
3. Effekte auf nachgeschaltete Signalwege.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Reagenzien, Geräte und Medien

Aceton	Merck
Acrylamid/ Bisacrylamid	Serva
Agarose	Roth
Ammoniumperoxdisulfat	Merck
Amphotericin	Sigma
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Promega
Bisbenzimid	Sigma
Casein	Reformhaus
Chloroform	Merck
Coomassie Blue	Biorad
dNTP Mix, 10mM	Bioline
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
DMSO	Sigma
DMEM	Invitrogen
Dulbecco's Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung	Invitrogen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Fluka
Fötales Kälberserum (FKS)	Invitrogen
Glutamin	Roth
Glycin	Roth
Glycerin	Merck
Griess-Reagenz	Sigma
Guanidinisothiocyanat	Fluka
HEPES	Biochrom AG
Immo-Mount	Thermo Electron Corporation
Isopropanol	Merck
Isopropylalkohol (2-Propanol)	Merck

Kaisers Glyceringelatine	Merck
L-Glutamin	Biochrom
Magermilchpulver	BioRad
2-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Roth
Natriumacetat	Merck
Na ₃ -Citrat (Tri-Natriumcitrat-2-Hydrat)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natronlauge (NaOH)	Roth
Penicillin G	Biochrom
Pageruler [®] TMP restained Protein Ladder	Fermentas
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma
SDS	Biomol
Streptomycin	Biochrom
Salzsäure (HCl)	Roth
TEMED	Roth
Trichloressigsäure	Merck
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma
Triton X-100	Sigma
Trypsin	In Vitrogen
Trizol Reagenz	Quiagen
Tween 20	Roth
100 bp DNA Ladder	Promega
5 x reaction Buffer	Fermentas

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

6-Loch-Zellkulturplatte	Sarstedt
24-Loch-Zellkulturplatte	Sarstedt
96-Loch-Zellkulturplatte	Sarstedt
25 cm ² Zellkulturflasche	Sarstedt
75 cm ² Zellkulturflasche	Sarstedt
Chemilumineszenzfilm: „Hyperfilm ECL“	Amersham
PVDF-Membran	Roth
Whatmann Papier	Whatmann
Deckgläser (26 x26 mm)	Menzel-Gläser
Glasplatten	Amersham Pharmacia
Objektträger	Marienfeld

Pipettenspitzen
Zentrifugenröhrchen

Sarstedt
Sarstedt

2.1.3 Geräte und Hilfsmittel

Axiovert 200 M Mikroskop
Ultrospec 3100pro
Gene Amp. PCR System 9700
Plattenausleser EAR 340 ATTC
Vortex Genie 2
Centrifuge 5804 R
Elektrodenkammer
Elektrophoresekammer
Gefrierschrank (-70 °C)
Gelgießstand
Kühl/Gefrierschrank
Neubauer Zählkammer
O₂/CO₂ Brutschrank
Waage
Gel-Dokumentationssystem
Digitalkamera Modell 429 k,
Spectrophotometer U-2000 Hitachi
Stromquelle Power Pac 200
Trans-Blot[®] SD Electrophoretic Transfer Cell
Filmkassette Hypercassette

Zeiss
Amersham Bioscience.
Applied Biosystems
Tecan
Scientific Industries
Eppendorf
BioRad
Biometra
Heraeus
BioRad
Privileg
Assistent
Heraeus
Sartorius
E.A.S.Y RH
Herolab
Colora Messtechnik
Bio-Rad
Bio-Rad
Amersham Pharmacia
Biotech

2.1.4 Peptide

GDNF recombinant human
Neurturin recombinant human
Artemin recombinant human
Persephin recombinant human

PeproTech
PeproTech
PeproTech
PeproTech

2.1.5 Primärantikörper

GFR- α 1 (C-20): sc6157 (200 μ g/ml) (Ziege)
RET (C-19): sc-167 (200 μ g/ml) (Kaninchen)
p-p38 (Tyr 182) r: sc-7975-R (200 μ g/ml) (Kaninchen)
p-38 (#9215) (200 μ g/ml) (Kaninchen)

Santa Cruz
Santa Cruz
Santa Cruz
Cell Signaling

2.1.6 Sekundärantikörper

Rabbit anti-Goat IgG Cy3 Conjugate	(1 mg/ml)	Sigma
Sheep anti-Rabbit IgG Cy3 Conjugate	(1 mg/ml)	Sigma
Goat anti-Mouse IgG Peroxidase Conjugate	(1 mg/ml)	Sigma

2.1.7 Enzyme

RNase freie DNase I (10 U/μl)	Promega
Revert Aid H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase	Fermentas
Thermus Aquaticus DNA (TaqMan) Polymerase (5 U/μl)	Fermentas

2.1.8 Gebrauchsfertige Kits

ECL Kit	Amersham
Rat TNF ELISA Set	BD Biosciences
Rat IL-6 ELISA Set	BD Biosciences

2.2 Medien, Lösungen und Puffer

2.2.1 Zellkulturmedien

DMEM	(4,5g Glucose/l) mit L-Glutamin supplementiert mit 10 % FKS (bei 44-53°C inaktiviert) 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin/Streptomycin
-------------	---

2.2.2 Lösungen

Dissoziationslösung	0,024 g Hapes 0,020 g Trypsin 0,002 g EDTA 35 μl DNase (1mg/ml) ad 10 ml DMEM
Zellablöselösung	0,030 g EDTA 0,003 g Trypsin 25 ml PBS (Ca ²⁺ und Mg ²⁺ frei)

Zamboni-Fixierlösung

Paraformaldehyd 80g
 350 ml Pikrinsäure (gesättigt)
 NaOH-Lösung (Tropfenweise)
 Phosphatpuffer(6,62 g)
 44,8 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O
 ad 2l Aqua BiDest

12,5 % Trenngel

2,5 ml Gelpuffer I
 4,17 ml Acrylamid
 3,29 ml BiDest
 60 µl Ammoniumpersulfat 10%
 30 µl TEMED

4,5 % Sammelgel

2,6 ml Sammelgel
 1,67 ml Acrylamid
 5,79 BiDest
 60 µl Ammoniumpersulfat 10 %
 30 µl TEMED

2.2.3 Puffer**Lysispuffer (pH 7,4)**

5mM Hepes
 2mM Na-metavanadat

Kernextraktionspuffer A (pH 7,9)

10 mM Hepes,
 10 mM KCL
 0,2 mM EDTA
 1 mM Dithiotreitol
 0,5 mM PMSF
 10 µg/ml Aprotinin

Kernextraktionspuffer B (pH 7,9)

10 mM Hepes,
 0,4 M NaCL
 0,2 mM EDTA
 1 mM Dithiotreitol
 0,5 mM PMSF
 10 µg/ml Aprotinin

Elektrodenpuffer (Laufpuffer) (pH 8,2)	12,2 g Tris 57,6 g Glycin 4 g SDS (Sodiumdodecylsulfat) ad 4 l dest. Wasser
Gelpuffer I (pH 8,8)	1,5M Tris HCl 0,4 % SDS,
Gelpuffer II (pH 6,8)	0,5M Tris HCl 0,4 % SDS,
Probenpuffer:	0,23g SDS 1,25 ml Gelpuffer II 1 ml Glycerin 0,5 ml 2-Mercapto-Ethanol 7,25 ml Aqua dest.
Transferpuffer (pH 9)	5 mM Tris 192 mM Glycin 10 % Methanol,
TBS (Tris-buffered Saline Tween) (pH 7,5)	50mM Tris 150mM NaCl 1mM EDTA 0,1 % Tween
TAE-Puffer (50x) (pH 8,0)	242 g Tris-Base 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA-Lösung ad 1l mit Aqua dest.
2.2.4 RNA-Agarose-Gel, 1 %:	1g Agarose 100 ml TAE Puffer

2.3 Methoden

2.3.1 Isolierung und Kultur primärer Mikroglia

Die Mikroglia wurden aus den Gehirnen von Ratten des Stammes Wistar am postnatalen Tag 2 (P2) isoliert, wobei der Tag der Geburt als Tag 0 galt. Die Tiere stammten aus dem Tierhaus der vorklinischen Institute der Universität Kiel und wurden unter Standardbedingungen gehalten.

Zur Gewinnung der Zellen nach McCarthy und de Vellis (1980) wurden die Tiere dekapitiert, die Gehirne herauspräpariert und jeweils drei Gehirne in ein 60 × 15 mm Gewebekulturschälchen, welches 1 % Penicillin/Streptomycin in PBS enthielt, überführt. Anschließend wurden unter Zuhilfenahme eines Binokulars von jedem Gehirn zuerst der Hippocampus und die Meningen entfernt, um dann die Cortexhälften und das vordere Mesencephalon für die Zellisolierung zu präparieren. Jeweils vier bis fünf der präparierten Cortexhälften und bis zu sechs Mesencephali wurden in separaten 60 × 15 mm Gewebekulturschälchen in 3 ml PBS gesammelt und unter einer Sterilwerkbank mit einem Einmalskalpell zerkleinert. Danach erfolgte die Zellisolierung durch enzymatische und mechanische Dissoziation. Dafür wurden die zerkleinerten Organteilchen aus je einem Gewebekulturschälchen in ein 12 ml Zentrifugenröhrchen überführt und nach dem Absaugen des überschüssigen PBS in jeweils 10 ml Dissoziationslösung unter Zugabe von 35 µl DNase (1mg/ml) für 30 Minuten bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde die Dissoziationslösung abgesaugt und die Trypsinaktivität durch Zugabe von 2 ml serumhaltigen Zellkulturmedium gestoppt. Die letzten Gewebesteilchen wurden durch mehrfaches Auf- und Absaugen mit einer Pasteurpipette dissoziiert und die Zellen durch wiederholtes Resuspendieren mittels Pasteurpipetten vereinzelt, deren Öffnungen durch Einschmelzen verengt wurden. Danach wurden jeweils die Cortex-Zellen und die Mesencephali-Zellen in einem 50 ml Röhrchen vereinigt und die Zellzahl bestimmt, indem 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau in einem Eppendorfreaktionsgefäß gemischt und die vitalen Zellen in einer Neubauer Zählkammer unter einem Mikroskop ausgezählt wurden. Pro 75 cm² Zellkulturflasche wurden ca. 5 Millionen Zellen in 10 ml Zellkulturmedium ausgesät, wobei aufgrund des schnelleren Wachstums der Zellen aus dem Cortex diese während der Kultivierung nicht mit Zellen aus dem Mesencephalon vermischt werden durften. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ Begasung kultiviert. Bis zur Ernte der Mikroglia wurde das Medium jeden zweiten Tag gewechselt.

Um Mikroglia zu gewinnen, macht man sich zu Nutze, dass primäre Astrozytenkulturen immer auch eine Anzahl von Mikroglia-Progenitor Zellen enthalten (Richardson et al., 1993). Nach acht bis zehn Kulturtagen wurden die locker auf dem Astrozytenrasen sitzenden Mikroglia durch manuelles Schütteln abgelöst und zusammen mit dem Medium in 50 ml

Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei $500 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert, bevor die Zellen entsprechend der Versuchsplanung in definierter Zellzahl in die entsprechenden Zellkulturgefäße oder auf beschichtete Deckgläser ausgesät wurden.

2.3.2 Beschichtung von Deckgläsern

Um den Mikroglia auf den Deckgläsern (26 x 26 mm) eine bessere Adhärenz zu ermöglichen, wurden die Deckgläser mit Poly-D-Lysin (PDL) beschichtet. Dafür wurden die fettfreien Deckgläser in 6-Loch-Zellkulturplatten gelegt und mit einer 0,002 %igen PDL-Lösung beschichtet. Die Deckgläser wurden für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgte ein viermaliges Spülen mit zweifach destilliertem Wasser. Anschließend wurden die Gläser unter der Sterilwerkbank luftgetrocknet.

2.3.3 Stimulation von Mikroglia

Für die Stimulation der Mikroglia wurden diese nach der Ernte und der Aussaat zunächst für 24 Stunden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 Begasung inkubiert. Die anschließende Stimulation erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, in frischem Zellkulturmedium versetzt mit 5 ng/ml LPS in An- oder Abwesenheit von Faktoren der GFL-Familie (50 ng/ml GDNF, 100 ng/ml NTN, 10 ng/ml ATN und 5 ng/ml PSP) für 24 Stunden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 im Inkubator. Außerdem wurden Einzelstimulationen mit den einzelnen Faktoren sowie unstimulierte Kontrollen durchgeführt.

2.3.4 NO-Messung im Zellkulturüberstand

Stickoxid ist ein Sekretionsprodukt der aktivierten Mikroglia und damit ein Parameter für deren Aktivierung. Es hat eine Halbwertszeit von wenigen Sekunden, reagiert aber mit H_2O und OH^- zu stabilem NO_2 und NO_3 . Man geht davon aus, dass die Menge an gebildetem NO_2 proportional zum produzierten NO ist. Um die Konzentration des produzierten NO zu messen, macht man sich die Reaktion des NO mit dem Griess-Reagenz zu Nutze. In einem ersten Schritt reagiert dabei NO_2 mit Sulfanilamid zu einem Komplex, der wiederum in einem zweiten Reaktionschritt mit N-(1-Naphtyl)-ethylendiamin zu einem violetten Komplex reagiert. Die Auswertung der Farbreaktion erfolgt photometrisch.

Für diesen Versuch wurden 100 000 Mikroglia pro Ansatz in einer 96-Zellkulturplatte ausgesät und nach der Stimulationszeit 100 μl der Zellkulturüberstände mit 100 μl des Griess-Reagenz gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde die NO_2 Konzentration bei einer Wellenlänge von 550 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) im Mikrotiterplatten-Photometer bestimmt. Als Standard wurden NaNO_2 -Kurven aufgestellt.

2.3.5 Coomassie Blue Färbung

Um nach der Stimulation der Mikroglia eine mögliche Reduktion der NO-Produktion durch den Tod der Zellen auszuschließen, wurde eine Färbung mit Coomassie Blue durchgeführt. Dafür wurden 100 000 Mikroglia in 96-Loch-Zellkulturplatten stimuliert. Nach der Stimulationszeit wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 30 Minuten mit je 30 µl 2 % Glutaraldehyd fixiert. Dann wurden die Zellen dreimal mit je 100 µl PBS gewaschen und im Anschluss daran mit je 50 µl Coomassie Blue für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die gefärbten Mikroglia zweimal mit 75 µl Coomassie Blue-Entfärber und dreimal mit destilliertem Wasser gespült, bevor sie mit Kaisers Glyceringelantine eingedeckt wurden. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch.

2.3.6 Rezeptornachweis

Zum Nachweis des GFR- α -Rezeptors und seines RET-Corezeptors wurden zwei verschiedene Methoden eingesetzt: Zum einen auf Proteinebene durch eine immunzytochemische Färbung und andererseits auf mRNA-Ebene durch eine semiquantitative RT-PCR.

2.3.6.1 Immunzytochemie

Für die immunzytochemische Färbung wurden pro Deckglas 50 000 Mikroglia wie beschrieben ausgesät und mit LPS stimuliert. Im Anschluss wurden die Mikroglia dreimal mit PBS gewaschen, um Zellkulturrückstände vollständig zu entfernen. Die Fixierung der Mikroglia erfolgte mit je 1 ml Zambonifixierlösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach dem Fixiervorgang wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurde auf jedes Deckglas 150 µl eines 1 %igen BSA-PBS-Gemisches pipettiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die überschüssige Blockierlösung abpipettiert. Für den Rezeptornachweis wurden die Zellen mit dem Primärantikörper gegen den GFR- α 1- oder RET-Rezeptor in einer Verdünnung von je 1:50 für eine Stunde inkubiert. Die Zellen wurden nach der Inkubation dreimal mit PBS gewaschen. Um den Primärantikörper zu detektieren, wurde ein Sekundärantikörper eingesetzt, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Carbocyanin 3 (Cy 3) gekoppelt war. Nach Herstellerangaben verdünnt (1:200), wurde der Sekundärantikörper mit den Zellen für 1 Stunde inkubiert und die Zellen im Anschluss dreimal mit PBS gespült.

Für die Darstellung der Zellkerne wurden diese mit einer Bisbenzimidlösung gefärbt. Bisbenzimid ist ein blau fluoreszierender interkallierender Farbstoff, der sich selektiv an DNA

anlagert. Zur Färbung wurden die Zellen für 3 Minuten mit Bisbenzimid in einer 1:1 Konzentration in Dulbecco's PBS gefärbt.

Eindecken:

Die Deckgläser wurden mit der Zellsseite mit Hilfe einer Pinzette luftblasenfrei auf zuvor mit Eindeckmedium beträufelte Objektträger gelegt. Als Eindeckmedium wurde Immo-Mount (Thermo Electron Corporation, Pittsburgh, Pennsylvania) verwendet.

Mikroskopie:

Die Aufnahmen wurden mit einem Axiovert 200 M Mikroskop der Firma Zeiss (Jena) angefertigt. Dabei wurde der Cy 3-Farbstoff mit einer Wellenlänge von 549 nm angeregt. Die Aufnahmen wurden mit der integrierten AxioCam angefertigt und mit dem Computerprogramm Axiovision bearbeitet und archiviert.

2.3.6.2 Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR ist eine Methode, bei der die aus den Zellen isolierte mRNA zuerst in einzelsträngige *complementary* oder *copy* DNA (cDNA) transkribiert (=reverse Transkription) wird. Anschließend wird eine spezifische Sequenz dieser cDNA in mehreren Zyklen amplifiziert (PCR).

Für die Untersuchungen auf mRNA-Ebene wurden in dieser Arbeit pro Ansatz 1 000 000 Mikroglia in 12-Loch-Zellkulturplatten ausgesät, wie beschrieben stimuliert und als erstes die RNA aus den Zellen isoliert.

2.3.6.3 RNA-Isolierung

Für die Isolierung der RNA wurden in einem ersten Schritt die Zellmembranen der zuvor dreimal mit PBS gewaschenen Mikroglia durch Zugabe von 1ml Trizol-Reagenz je Ansatz lysiert. Die lysierten Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturplatte abgeschabt und die Lysate in Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Zu den Lysaten wurden dann pro 1 ml Trizol-Reagenz 200 µl Chloroform pipettiert, der Ansatz von Hand für ca. 15 Sekunden aufgeschüttelt und dann für ca. 2-3 Minuten bei 15 - 30 ° C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde jeder Ansatz für 15 Minuten bei 12 000 x g und einer Temperatur von 2-8 °C zentrifugiert. Jede Probe war nach diesem Schritt in drei Phasen aufgeteilt: Eine untere rote Phenolphase, die DNA und Protein enthielt, eine mittlere Interphase und eine obere wässrige Phase mit der RNA. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert und nach Zugabe von je 1 µl Glycogen (70mg/ml) die Proben kurz gemischt. Im nächsten Schritt wurde jeder Probe 500 µl Isopropylalkohol zugesetzt und erneut gemischt.

Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 15-30 °C wurden die Proben für 10 Minuten bei 12 000 x g und 2-8 °C zentrifugiert. Die RNA konnte danach als gelartiges Pellet am Boden der Reaktionsgefäße ausgemacht werden. Der Überstand jeder Probe wurde entfernt und die RNA-Pellets in jeweils 1 ml Ethanol (75 %) pro ml Trizol-Reagenz gewaschen und für 5 Minuten bei 7500 x g und 2-8 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die RNA-Pellets unter der Sterilwerkbank luftgetrocknet. In einem letzten Schritt wurden die RNA-Pellets je nach Größe in 20 - 50 µl RNase-freiem zweifach destilliertes Wasser bei einer Temperatur von 55-60 °C durch eine 10 minütige Inkubation im Heizblock gelöst und die isolierte RNA quantifiziert.

2.3.6.4 Quantifizierung der extrahierten RNA

Zur Bestimmung des RNA-Anteils in jeder Probe wurde jeweils 5 µl einer Probe mit 995 µl RNA-Probenpuffer in einer Küvette vermischt und die Extinktion gegen einen Leerwert (1 ml RNA Puffer) bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch in einem Spektrophotometer bestimmt. Gleichzeitig wurde der Proteingehalt der Probe bei 280 nm ermittelt. Der Quotient aus den beiden Messungen zeigte die Reinheit der Probe, wobei der angestrebte Reinheitsgrad bei 1,7-2,0 lag. Erfüllte die extrahierte RNA diese Anforderungen, wurde sie in cDNA umgeschrieben.

2.3.6.5 Herstellung von cDNA

Das Prinzip bei der Herstellung von cDNA beruht darauf, dass sich unspezifische Primer, sogenannte p(dT) Oligomere, mit den Poly-A-Enden der mRNA hybridisieren. An diesen Komplex aus Primer und RNA lagert sich eine reverse Transkriptase an und synthetisiert unspezifisch mit der RNA als Vorlage die cDNA.

Zur Synthese von cDNA wurde je 1 µg der extrahierten mRNA auf ein Gesamtvolumen von 7 µl mit RNase-freiem, zweifach destilliertem Wasser aufgefüllt. Mögliche genomische DNA Reste in den Proben wurden durch Zugabe von 1 µl DNase-Puffer und 1 µl DNase (10000 units) und einer anschließenden Inkubation im Thermocycler für 15 Minuten bei 37 °C verdaut. Um die Aktivität der DNase zu unterbrechen, wurde 1 µl Stopplösung (EDTA 25 mM) zu jedem Ansatz pipettiert und bei 65 °C für 10 Minuten im Thermocycler inkubiert. Dann wurde jeweils 1 µl eines Random Hexamer Primer-Gemisches (200 ng) zu den Ansätzen pipettiert und alles für 5 min bei 70 °C im Thermocycler inkubiert. Im letzten Schritt wurde zu jedem Ansatz 8 µl eines Transkriptionsmixes, bestehend aus 4 µl 5 x Reaktionspuffer, 2 µl dNTP-Mix (10nM) und 1 µl zweifach destilliertes Wasser, pipettiert und die Probe für 5 Minuten bei 25 °C inkubiert, bevor jeweils 1 µl Reverse Transkriptase hinzupipettiert wurde. Die Probenansätze mit einem Gesamtvolumen von 20 µl durchliefen anschließend folgendes Programm im Thermocycler: 10 Minuten bei 25 °C, 60 Minuten bei

42 °C und 10 Minuten bei 70 °C. Währenddessen wurde die cDNA synthetisiert und am Ende das Enzym hitzeinaktiviert. Von dieser cDNA wurden nachfolgend bestimmte Abschnitte mit der RT-PCR bzw. *realtime* RT-PCR amplifiziert.

2.3.6.6 Semiquantitative RT-PCR

Für die Vermehrung spezifischer Sequenzen auf der cDNA werden sequenzspezifische Oligoprimer eingesetzt, die an die cDNA binden (Annealing) und somit einer DNA-Polymerase die Synthese von komplementären DNA-Strängen (Elongation) ermöglichen. Der spezifische DNA-Abschnitt wird exponentiell in bis zu 40 Zyklen vermehrt.

Zum qualitativen Nachweis der Expression des RET-Rezeptors und des GFR- α -Corezeptors auf mRNA-Ebene in Mikroglia wurde eine RT-PCR unter Verwendung von Primern mit folgenden Sequenzen verwendet:

RET-Rezeptor (Ratte) (Li et al. 2006):

5'-GAT CAC CAG GAA CTT CTC CAC- 3' (sense)
5'- AGA CCT GGT TCT CCA TGG AGT- 3' (antisense)

GFR- α 1-Rezeptor (Ratte) (Kalous et al., 2007):

5'- GCA CAG CTA CGG GAT GCT CTT CTG-3' (sense)
5'- GTA GTT GGG AGT CAT GGAC TGT GCC AAT C-3' (antisense)

GFR- α 2-Rezeptor (Ratte) (Nazanin et al., 2002)

5'-GCC TTC TGC CTC TTC TTC TTT TTA-3' (sense)
5'- ACG GTT GCA GAT GGA GAT ATA AGA-3' (antisense)

GFR- α 3-Rezeptor (Ratte) (Stöver et al., 2000)

5'-CAC AGT GAC CAG CAA ACC-3' (sense)
5'-CCA GTC CTG GGA GAA GAG-3' (antisense)

β -Actin (Ratte)

5'-AGA GGG AAA TCG TGC GTG ACA-3' (sense)
5'-CAC TGT GTT GGC ATA GAG GTC-3' (antisense).

Alle Primer wurden von der MWG Biotech AG synthetisiert und nach Firmenangaben mit RNase-freiem, zweifach destilliertem Wasser in einer Konzentration von 100 pmol/ μ l gelöst. Diese Lösung wurde vor Gebrauch 1:10 mit RNase-freiem zweifach destilliertem Wasser verdünnt, so dass die Arbeitskonzentration 10 pmol/ μ l betrug. Jeder Reaktionsansatz für die

RT-PCR bestand aus 5 µl 10 × Reaktionspuffer, 4 µl dNTP-Mix (10mmol), jeweils 2,5 µl des jeweiligen Sense- und Antisenseprimers, 31,7 µl zweifach destilliertem Wasser und 0,3 µl Taq-Polymerase. Zu jedem Ansatz wurden 4 µl (0,2 µg cDNA) pipettiert und dann im Thermocycler mit folgendem PCR-Programm amplifiziert:

94 °C	30 Sekunden	(Denaturierung)
Variabel	30 Sekunden	(Annealing)
72 °C	45 Sekunden	(Elongation)

Dieses Programm wurde in 35 Zyklen wiederholt. Die Annealingtemperatur für die RET-Rezeptor-Primer betrug 56 °C und für die GFR-α1-Rezeptor-Primer 62 °C. Nach Beendigung der Zyklen wurde noch eine finale Extension bei 72 °C für 7 Minuten durchlaufen.

2.3.6.7 Agarosegelelektrophorese

Um die amplifizierten PCR-Fragmente nachzuweisen, wurde eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. Dazu wurde ein 1 %iges Agarosegel (7 cm x 8 cm) hergestellt. Die Agarose wurde mit TEA-Puffer versetzt und in der Mikrowelle aufgekocht. Die Lösung wurde in einen Gelgießstand gegossen, und sofort wurde ein Gelgießkamm mit 10 Geltaschen eingesetzt. Nach Abkühlen des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine mit TEA-Puffer befüllte Elektrophoresekammer gelegt. Es wurden 10 µl der Probe mit 3 µl DNA-Ladungspuffer (30 % v/v Glycerin) versetzt. 10 µl der Lösung wurden je in eine Tasche pipettiert. Eine Geltasche wurde mit 5 µl einer DNA-Leiter versetzt und mit Bromphenolblau befüllt. Die Laufzeit der Elektrophorese betrug ca. 25 Minuten bei 120 Volt und 160 mA.

2.3.6.8 Qualitative Auswertung der Gelelektrophorese

Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel in einer 0.001 % Ethidiumbromid-Lösung für 30 Minuten gefärbt. Die Auswertung des Gels erfolgte unter UV-Licht mit dem Gel-Dokumentationssystem und dem dazugehörigen Computerprogramm EasyWin 32 (Herolab, Wiesloch). Mit einer angeschlossenen Digitalkamera wurden die Gele fotografiert.

2.3.7 *Realtime* RT-PCR

Die *realtime* RT-PCR beruht auf dem Prinzip der oben beschriebenen PCR. Zusätzlich ist hier aber noch eine Quantifizierung der amplifizierten DANN zu jedem Zeitpunkt möglich. Die Quantifizierung wird mittels Fluoreszenzmessung durchgeführt. Dazu wird eine Exonuklease-Floureszenzsonde verwendet, die aus einem Reporterfarbstoff (6-Carboxy-Fluorescein (FAM)) und einem Quencher-Farbstoff (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin (TAMRA)) besteht. Dabei hemmt der Quencher-Farbstoff einer intakten Sonde die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes. Die Sonde fungiert nicht als spezifischer Primer, lagert sich aber trotzdem den spezifischen cDNA-Molekülen an. Nach der Hybridisierung der Primer mit der cDNA und Beginn der Polymerisation durch die DNA-TaqMan Polymerase verdrängt diese durch ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität die Fluoreszenzsonde von der cDNA. Dabei löst sich der Quencher-Frabstoff vom Reporterfarbstoff. Die dabei entstehende Fluoreszenz nimmt proportional zur DNA-Menge zu und wird in der exponentiellen Vermehrungsphase bestimmt, da nur hier optimale Reaktionsbedingungen herrschen. Es wird dabei der Zyklus ermittelt, in dem ein definierter Anstieg der Floureszenz vorliegt (C1-Wert).

Analog zur RT-PCR werden spezifische Oligoprimer verwendet, um spezifische cDNA Moleküle exponentiell zu vermehren. Zum Nachweis der proinflammatorischen Mediatoren wurden vorgefertigte Lösungen gekauft. In diesen Taq Man Assay on Demand Lösungen sind der Sense- und der Antisenseprimer und Fluoreszenzsonden bereits enthalten. Es wurden TNF- α , IL-6, IL1beta, COX-2 und iNOS untersucht. Als endogene Kontrolle diente 18s RNA, ein so genanntes „Housekeeping“-Gen.

Für einen Versuchsansatz wurden 1 Million Mikroglia in Zellkulturmedium in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Die anschließende Stimulation erfolgte mit frischem Zellkulturmedium, versetzt mit 5 ng/ml LPS in An- oder Abwesenheit von Faktoren der GFL-Familie (50 ng/ml GDNF, 100 ng/ml NTN, 10 ng/ml ATN und 5 ng/ml PSP), für 6 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator. Außerdem wurden Einzelstimulationen mit den einzelnen Faktoren sowie unstimulierte Kontrollen mitgeführt.

Ein Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus:

- 10 μ l Taq-Man-Puffer,
- 1 μ l Assay on Demand,
- 5 μ l zweifach destilliertes Wasser
- 4 μ l cDNA (2,5 ng/ml)

Ein Ansatz bestand aus 20 µl. Es wurden immer Doppelansätze eines Zielgens quantifiziert. Die Amplifikation erfolgte mit dem ABI Prism 7000 Sequence Detection System 700' (Applied Biosystems) mit folgendem Programm:

Vorinkubation	2 Minuten	50 °C
DNA TaqMan Polymerase Aktivierung	10 Minuten	90 °C
Denaturierung	15 Sekunden	95 °C
Annealing/Extension	1 Minuten	66 °C

Die Auswertung der *realtime*-Reaktion erfolgte mit dem Computerprogramm ABI-Prism-7000.

Als Primer wurden folgende Sequenzen verwendet:

TNF- α	5'-CTC ACA CTC AGA TCA TCT TCT CAA A -3'
IL-6	5'-GAG AAA AGA GTT GTG CAA TGG CAA T-3'
iNOS	5'-TGC TAT TCC CAG CCC AAC AAC ACA G-3'
IL-1beta	5'-ATA AGC CAA CAA GTG GTA TTC TCC A-3'
18s RNA	5'-TCC ATT GGA GGG CAA GTC TGG TGC C-3'
COX-2	5'-CTCAGCCATGCAGCAAATCCTTGCT-3'

2.3.8 TNF- α - und IL-6-Sandwich-ELISA

Ein weiteres Verfahren, um den Einfluss der vier Faktoren der GFL-Familie auf die Zytokinexpression zu untersuchen, stellt der ELISA dar. Es handelt sich hierbei um den spezifischen Nachweis eines Moleküls auf Proteinebene in den Zellkulturüberständen. Mit Hilfe eines spezifischen Primärantikörpers gegen das zu bestimmende Protein und mit Hilfe eines katalysierenden Sekundärantikörpers ist es möglich, auf Proteinebene den Einfluss der vier Faktoren, in Form der sich ändernden Proteinsekretion zu zeigen. Es wurden dazu nach Herstellerangaben zwei ELISAs für TNF- α und IL-6 durchgeführt. Es wurden eine Million Mikroglia in 6-Loch-Zellkulturplatten in Zellkulturmedium ausgesät und mit Faktoren und LPS stimuliert. Nach der Aussaat für 24 Stunden in Zellkulturmedium erfolgte die Stimulation. Die Konzentrationen der Faktoren betragen für GDNF 50 ng/ml, für NTN 100 ng/ml, für ATN 10 ng/ml und für PSP 5 ng/ml. Es erfolgte eine Stimulation für 6 Stunden und in einem zweiten Ansatz für 24 Stunden. Nach Abschluss der Stimulation wurde der Zellkulturüberstand mittels Pipette gewonnen, in ein 1 ml Eppendorfgefäß überführt und kurz zentrifugiert. Die Proben wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

Für den ELISA wurde über Nacht bei 4 °C in einer 96-Loch high adsorbense ELISA-Platte der Capture-Antikörper in einer Verdünnung nach Herstellerangaben von 1:250 ausgesät. Der Antikörper wurde mittels 5 %igem FCS für 1 Stunde geblockt und im Anschluss daran mit PBS für 1 Stunde gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Proben in die

vorbereiteten 96-Loch high adsorbense ELISA-Platten gegeben und für 2 Stunden bei 37° C mit dem Capture-Antikörper inkubiert. Zur Berechnung der freigesetzten Menge wurden TNF- α - oder IL-6-Proteinstandards mitgeführt. Nach einem Waschschrift mit PBS wurde der konjugierte Detektor-Antikörper für 1 Stunde bei 37°C nach Herstellerangaben in einer Verdünnung von 1:250 hinzugegeben. Nach dem erneuten Waschen mit PBS und Zugabe von HRP-konjugiertem Steptavidin als Substrat in einer Verdünnung von 1:250, für 30 Minuten bei Raumtemperatur konnten die Platten nach einem letzten Waschschrift mit PBS mit Hilfe des Tertamethylbenzidin-Peroxidase-Substrat Systems bei einer Absorbtiionswellenlänge von 450 nm in einem automatischen Plattenausleser ausgewertet werden. Die Referenzwellenlänge betrug 570 nm.

2.3.9 Western-Blot

Der Western-Blot dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen mit Hilfe von Antikörpern. Vor dem Western-Blot werden die Proteine in einer Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe und Ladung aufgetrennt.

Beim Western-Blot wird ein senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt. Dadurch wandern die Proteine aus dem Gel auf einer Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF), auf der sie aufgrund hydrostatischer Eigenschaften haften bleiben. Das Muster der Proteine bleibt dabei erhalten. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, werden die Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper gefärbt.

Für einen Versuchsansatz wurden 1 Million Mikroglia in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät und mit den Faktoren stimuliert. Für GDNF wurden 50 ng/ml, für NTN 100 ng/ml, für ATN 10 ng/ml und für PSP 5 ng/ml gewählt. Die LPS-Stimulation erfolgte mit 10 ng/ml LPS. Die Zellen wurden für 24 Stunden stimuliert.

2.3.9.1 Kernproteinisolierung

Nach dem Absaugen des Kulturmediums wurden die Zellen zuerst zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Mit Hilfe von 500 μ l Kernpuffer A und einem Zellschaber wurden die Zellen vom Boden des Zellkulturgefäßes abgelöst. Die Zellen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und durch mehrfaches Aufschütteln homogenisiert und für 1 Stunde auf Eis stehen gelassen. Nach 5 Minuten Mischen bei 4°C wurde das Homogenat für 5 Minuten bei 1300 x g zentrifugiert. Im Überstand befanden sich nun die cytosolischen Proteine. Dieser Überstand wurde verworfen. Das „Kernpellet“ wurde nach Entfernen des Überstandes je nach Größe in Kernpuffer B (30 μ l) resuspendiert, für 15 Minuten gemischt und dann bei 4 °C für 10 Minuten bei 14000 x g zentrifugiert. Die Kernproteine befanden sich dann im Überstand. Vor Verwendung wurde noch eine Quantifizierung der isolierten Proteine durchgeführt. Bis zur Verwendung wurden die Proteine bei -70 °C gelagert.

2.3.9.2 Gesamtproteinisolierung

Zur Isolierung des Gesamtproteins wurden die Zellen nach Entfernen des Zellkulturmediums ebenfalls zweimal mit PBS gespült. Mit 100 µl Lysispuffer pro Zellkulturgefäß und einem Zellschaber wurden die Zellen abegläst und in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Durch mehrfaches Aufschütteln erfolgte eine Homogenisierung des Lysats. Nach der Proteinbestimmung wurden 10 µg Protein mit SDS-Probenpuffer auf ein Volumen von 40 µl in neuen Reaktionsgefäßen aufgefüllt. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 99 °C auf einem Thermoblock (Thermomixer compact, Eppendorf) denaturiert und wahlweise bei -18 °C eingefroren oder in einer SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese aufgetrennt.

2.3.9.3 Quantifizierung der der isolierten Proteine nach Bradford

Zur Quantifizierung der isolierten Proteine wurden 5 µl einer Probe eingesetzt. Diese wurden mit 795 µl destilliertem Wasser und mit 200 µl Bradford-Reagenz vermischt. Als Leerwert diente eine Mischung aus 10 µl Lyse-Puffer und 790 µl destilliertem Wasser, versetzt mit 200 µl Bradford-Reagenz. Als Standard dienten 10 µl einer 1 mg/ml BSA Stammlösung, 10 µl Lyse-Puffer, 780 µl destilliertes Wasser und 200 µl Bradford-Reagenz. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wurde die Extinktion bei 595 nm mit einem Spektrophotometer gemessen. Der Proteingehalt der Probe wurde automatisch berechnet.

2.3.9.4 Polyacrylamidgelelektrophorese

Mit der Gelelektrophorese ist es möglich, Proteine anhand ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld aufzutrennen. Um bei unterschiedlichen geladenen Proteinen einen Effekt des Stromfeldes zu verhindern, werden die Proteine im Vorfeld mit dem Detergens SDS behandelt und sind so alle negativ geladen.

Für die Gelelektrophorese zur Auftrennung der Proteine wurde 12,5 % Acrylamid-Trenngel angesetzt. Das Gel wurde zwischen zwei Glasplatten nach Herstellerangaben gegossen und mit Propanol beschichtet. Auf das Trenngel wurde in einem zweiten Schritt ein 4,5 %iges Sammelgel gegossen und ein Kamm für die Geltaschen eingesetzt. Das Sammelgel wurde ebenfalls mit Propanol beschichtet. Nach fertiger Polymerisation, Entfernen des Kamms und Absaugen des Propanols wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gesetzt.

Probenvorbereitung

Die aufzutrennenden Proben wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und nochmals für 3 Minuten bei 99 °C denaturiert. Im Anschluss wurden je 20 µl einer Probe in eine Geltasche gefüllt. Als Standard wurden 5 µl eines Proteinstandards in eine Tasche gefüllt. Die Laufkammer wurden dann vorsichtig mit Elektrodenpuffer befüllt.

Um die Lauflinie sichtbar zu machen, wurden 10 µl Bromphenolblau in die innere Kammer gegeben. Das Laufprogramm für 2 Gele betrug ca. 35 Minuten bei 200 Volt und 125 mA.

Proteintransfer

Für den Transfer der Proteine wurde das Semidry-Verfahren mit Graphitplatten verwendet. Ziel ist es, die Proteine aus dem Gel auf PDVF-Membranen zu übertragen. Dafür wurde die PDVF-Membran für 60 Sekunden in Methanol eingeweicht und dann für mindestens 15 Minuten in Transferpuffer gelegt, um den Transfer der Proteine zu erleichtern. Gleichzeitig wurde noch Whatman-Papier in Transferpuffer eingeweicht.

Vor dem Einlegen des Gels und der PDVF-Membran wurden die Graphitplatten der Transferkammer mit Laufpuffer befeuchtet. Dann wurden zwei feuchte Blätter Whatman-Papier aufgelegt. Auf dieses Whatman-Papier wurde die PDVF-Membran gelegt. Auf die Membran wurde jetzt das Gel aufgelegt und noch einmal mit zwei feuchten Whatman-Papier bedeckt. Die Übertragung erfolgte in einer Elektrodenkammer (Trans-Blot® SD Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad). Das Laufprogramm für den Probentransfer dauerte ca. 75 Minuten bei 25 V und 340 mA.

Immunfärbung

Nach dem Transfer wurde die Membran dann in 5 % igen Kasein in Tris-gepufferter Salz Tween-Lösung (TBS-T) unter Schütteln für 1 Stunde inkubiert, um unspezifische Bindungstellen der Membran zu blockieren. Nach dreimaligem Spülen in TBS-T Puffer wurde der erste Primärantikörper zugesetzt. Um pp38 darzustellen, wurde ein pp38-Antikörper verwendet. Der pp38-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:2000 für 24 Stunden bei 4 °C in TBS-T Puffer mit der Membran inkubiert. Die Membran war dabei in Folie eingeschweißt.

Die Membran wurde nach der Inkubation dreimal für 15 Minuten in TBST-Puffer gespült. Beim zweiten Antikörper handelt es sich um einen Meerrettich-Peroxidase (horse-radish-peroxidase, HRP)-gekoppelten Antikörper. Dieser wurde entweder als Anti-mouse (1:20 000) oder als Anti-rabbit (1:30 000) eingesetzt und mit der Membran für 1 Stunde in Blockierungspuffer inkubiert und im Anschluss erneut für 15 Minuten unter Bewegung in TBST-Puffer gespült.

Für die Darstellung der Banden auf Hyperfilm wurde das ECL-Kit verwendet.

Dazu wurde eine Lösung nach Herstellerangaben 40:1 gemischt und 2,5 ml davon auf die Membran aufgetragen. Diese wurden nach dem Auftragen sofort faltenfrei in Folie verpackt und in eine lichtdichte Filmkassette verpackt legt (Hypercassette, Amersham Pharmacia Biotech). Der Hyperfilm wurde dann auf die Membran gelegt und belichtet. Die Auswertung der Filme erfolgte digital mittels densitometrischer Messung.

Zur Bestimmung des Anteils an phosphoryliertem p38 wurden die vorher angefertigten Western Blots gestrippt. Dazu wurden die gewaschenen Membranen getrocknet. Danach wurden sie für 1 Minute in Methanol eingelegt und im Anschluss daran 15 Minuten in Transferpuffer inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Membranen dreimal unter Schütteln für 5 Minuten in 0,1 M Glycin (pH 2,5) gewaschen. Nach je 5 Minuten wurde die Glycinlösung verworfen und durch neue ersetzt. Der nächste Schritt bestand aus dreimaligem Waschen mit einer 0,1 M Tris-Lösung (pH 8) für je 15 Minuten. Anschließend wurde die Membran in 5 %igem Kasein geblockt. Zur Darstellung von p38 wurde die Membran mit dem Primärantikörper in einer Verdünnung in TBS-T Puffer von 1:1000 für 24 Stunden bei 4 °C inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein anti-rabbit-Antikörper (1:30000) eingesetzt und wie oben beschrieben weiter verfahren.

2.3.10 Statistische Analyse

Alle graphischen Darstellungen wurden mit Graphpad Prism 5 (Graphpad Software, San Francisco Diego, USA) angefertigt.

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes) angegeben. Zur statistischen Analyse wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (One-Way ANOVA) durchgeführt, gefolgt von einem post-hoc Test der einzelnen Gruppen zueinander, nach Bonferroni. Zur Analyse wurde das Programm Graphpad Prism 5 verwendet. Eine statistische Signifikanz wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 0,05$ angenommen.

2.3.11 Ausarbeitung, Layout

Die schriftliche Ausarbeitung erfolgte mit dem Programm Word für WindowsTM der Firma Microsoft. Die Bildbearbeitung wurde mit Hilfe des Programms Adope Photoshop CS 4TM (Adope Systems Incorporated) und AxioVision LETM (Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, Jena) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Zellkulturstudien

Bevor die primären Mikroglia kulturen für die Versuche mit den Faktoren der GFL-Familie eingesetzt wurden, wurden zunächst Zellkulturstudien durchgeführt. Diese hatten das Ziel zu überprüfen, in welchem Zeitraum die für Versuche ausgesäten Mikroglia ihre Ruheform annehmen und ob LPS geeignet ist, Mikroglia *in vitro* zu aktivieren. Dafür wurden die Mikroglia in verschiedene Zellkulturplatten ausgesät. In mehreren unabhängigen Versuchsansätzen wurde der oben genannten Fragestellung nachgegangen.

3.1.2 Mikroglia (Ruheform)

In Zellkulturmedium ausgesäte Mikroglia liegen als ramifizierte Ruheform vor. Diese Form zeichnet sich durch einen kleinen flachen Zellkörper mit zahlreichen pseudopodienartigen Zellfortsätzen aus (Wilms et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit zeigten die mikroskopisch ausgewerteten Vorversuche, dass die Mikroglia 24 Stunden nach der Aussaat ihre Ruheform annehmen (Abb. 3.1). Für die nachfolgenden Versuche wurden nur primäre Mikroglia kulturen eingesetzt, die in der ramifizierten Ruheform vorlagen - also vor Versuchsbeginn nicht vorstimuliert waren.

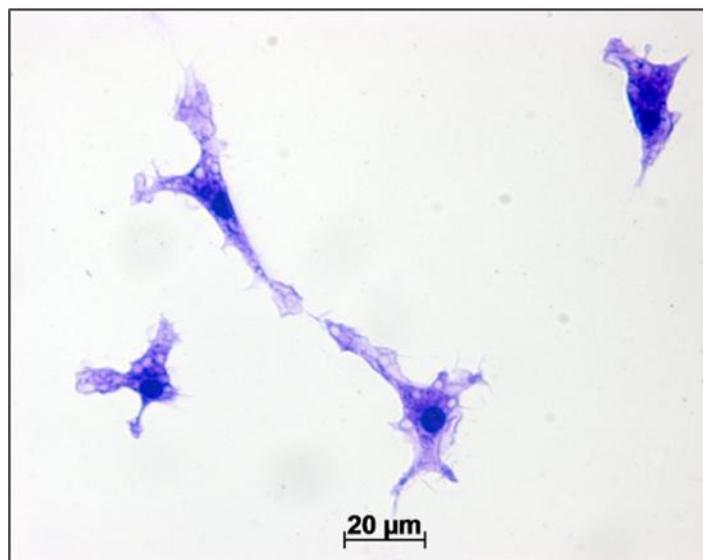


Abb. 3.1: Primäre Mikroglia in Ruheform. Abgebildet sind in einer 6-Loch-Zellkulturplatte ausgesäte Mikroglia, die 24 Stunden nach der Aussaat mit Coomassie-Blue gefärbt wurden. Die Abbildung zeigt exemplarisch Mikroglia in ihrer typischen ramifizierten Ruheform mit einem flachen Zellkörper und zahlreichen pseudopodienartigen Zellfortsätzen.

3.1.3 Mikrogliaaktivierung durch LPS

Der erste Hinweis auf eine Aktivierung der Mikroglia ist der Übergang aus der ramifizierten Form in die aktive amöboide Form. Diese zeichnet sich durch einen fast runden, spindelzellartigen Zellkörper und die weitestgehende Rückbildung der Zellfortsätze und Pseudopodien aus (Wollmer et al. 2001).

Nachdem die ausgesäten Mikroglia nach 24 Stunden ihre Ruheform angenommen hatten, wurde überprüft, ob LPS eine geeignete Substanz ist, um Mikroglia innerhalb eines bestimmten Zeitraumes zu stimulieren und welche LPS-Konzentration gegebenenfalls dafür in Frage kommt.

Die primären Mikrogliazellkulturen zeigten nach einer Stimulation mit 5 ng/ml LPS sowohl nach 6 Stunden als auch nach 24 Stunden (Abb. 3.2) eine aktivierte Morphologie. Daher wurde LPS in einer Konzentration von 5 ng/ml für die weiteren Versuche eingesetzt.

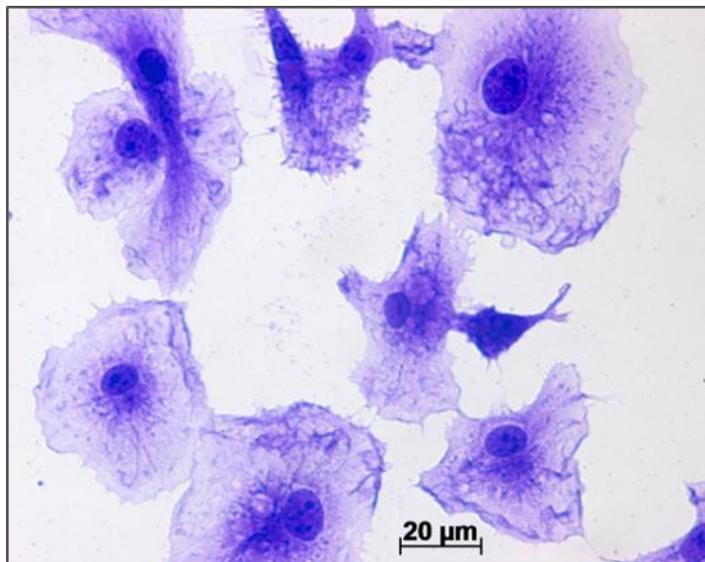


Abb. 3.2: Primäre Mikrogliazellkultur (Aktivierte Form). Abgebildet sind in einer 6-Loch-Zellkulturplatte ausgesäte Mikroglia, die nach Annahme ihrer Ruheform für 24 Stunden mit 5 ng/ml LPS wurden. Es zeigt sich der fast runde Zellkörper mit einer fast vollständigen Rückbildung der Zellfortsätze.

3.2 Rezeptornachweis

Um einen Effekt der Faktoren der GFL-Familie auf die neuroinflammatorische Aktivität der Mikroglia zu untersuchen, war es zunächst notwendig, das Vorhandensein der GFR- α - und RET-Rezeptoren auf Mikroglia zu untersuchen. Der Nachweis sollte einmal auf Proteinebene durch die Immunzytochemie sowie durch eine qualitative RT-PCR auf mRNA-Ebene erbracht werden. Die Stimulation der Mikroglia mit den Faktoren der GFL-Familie wurde wie in Kap. 2.3.6 beschrieben durchgeführt.

3.2.1 Nachweis des GFR- α 1- und RET-Rezeptors auf Mikroglia mittels immunzytochemischer Färbung

Durch eine immunzytochemische Färbung ist es möglich, Proteine indirekt mittels einer gekoppelten Antikörperreaktion auf der Plasmamembran von Zellen darzustellen. Dafür wurden auf Deckgläsern gewachsene Mikroglia nach einer Stimulationsdauer von 24 Stunden mit einem primären Antikörper gegen den GFR- α 1- bzw. RET-Rezeptor inkubiert, dessen Bindung anschließend mit einem sekundären, rot fluoreszierenden Cy-3-gekoppelten Antikörper detektiert wurde. Eine Kerngegenfärbung wurde mit Bisbenzimid durchgeführt, die Kerne fluoreszierten dadurch blau.

Sowohl auf den nicht stimulierten als auch auf den mit LPS stimulierten Mikroglia ließen sich GFR- α 1 (Abb. 3.6) und RET-Rezeptoren (Abb. 3.7) eindeutig rot fluoreszierend darstellen. Die Stimulation mit LPS führte dabei zu keiner sichtbaren Veränderung der Expression des GFR- α 1- und RET-Rezeptors auf den Mikroglia. Anhand der Kontrollfärbung, bei der die Zellkerne blau fluoreszierten, konnte eine unspezifische Bindung des Cy-3-gekoppelten Sekundärantikörpers ausgeschlossen werden.

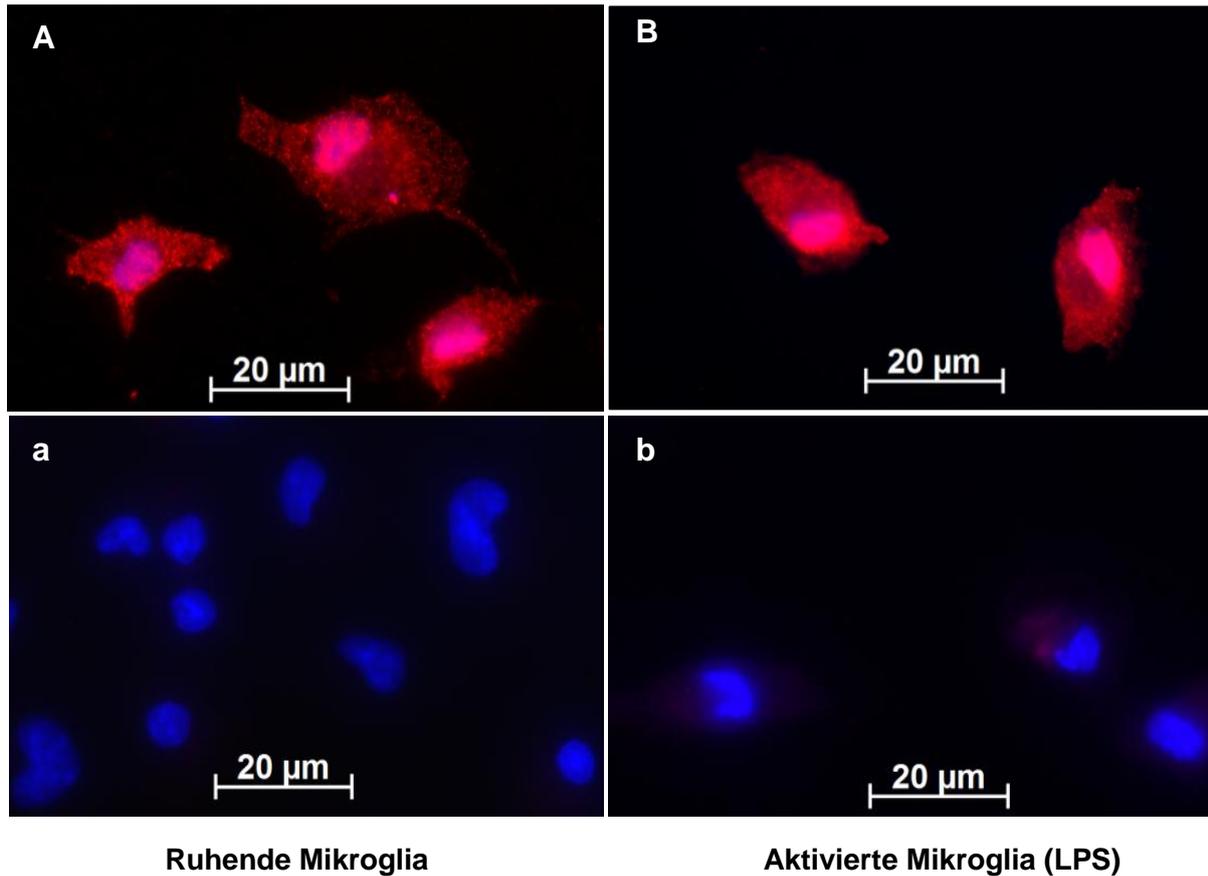


Abb. 3.3: Immunzytochemische Darstellung des GFR- α 1-Rezeptors auf unstimulierter und LPS stimulierter Mikroglia. Mikroglia wurden auf PDL-beschichteten Deckgläsern für 24 Stunden kultiviert und dann mittels Zamboni-Fixierlösung fixiert. Der Rezeptornachweis erfolgte mit dem Primärantikörper gegen GFR- α 1. Die Detektion des gebundenen Primärantikörpers erfolgte durch einen rot fluoreszierenden Cy-3 gekoppelten Sekundärantikörper. Die Zellkerne wurden mit Bisbenzimid gegengefärbt. **Abb. A** zeigt den GFR- α 1 Rezeptor auf unstimulierten Mikroglia; **Abb. a** zeigt die dazugehörige Kontrolle; **Abb. B** zeigt den GFR- α 1 Rezeptor auf, mit 5 ng /ml LPS, stimulierten Mikroglia; **Abb. b** zeigt die dazugehörige Kontrolle.

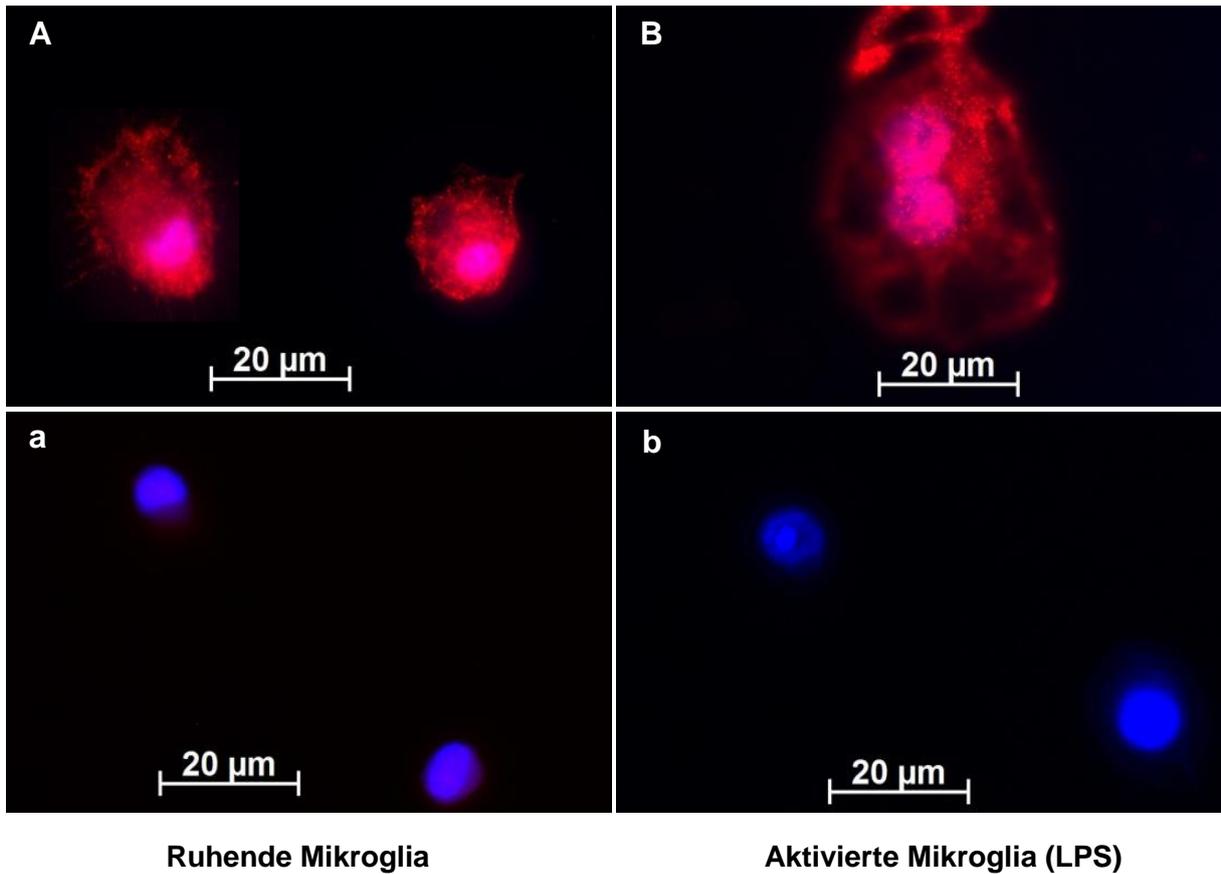


Abb. 3.4: Immunzytochemische Darstellung des RET-Rezeptors auf unstimulierter und LPS stimulierter Mikroglia. Mikroglia wurden auf PDL-beschichteten Deckgläsern für 24 Stunden kultiviert und dann mittels Zamboni-Fixierlösung und Methanol fixiert. Der Rezeptornachweis erfolgte mit dem Primärantikörper gegen RET. Die Detektion des gebundenen Primärantikörpers erfolgte durch einen rot fluoreszierenden Sekundärantikörper. Die Zellkerne wurden mit Bisbenzimid gegengefärbt und fluoreszierten blau. **Abb. A** zeigt den RET-Rezeptor auf unstimulierten Mikroglia; **Abb. a** zeigt die dazugehörige Kontrolle; **Abb. B** zeigt den rot fluoreszierenden RET-Rezeptor auf LPS stimulierten Mikroglia; **Abb. b** zeigt die dazugehörige Kontrolle.

3.2.2 Nachweis des GFR- α 1- und RET-Rezeptors auf mRNA-Ebene durch RT-PCR

Im Anschluss an den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis sollten der GFR- α 1- und RET-Rezeptor mittels RT-PCR auf RNA-Ebene nachgewiesen werden. Dazu wurde aus zuvor 24 Stunden mit LPS stimulierten Mikroglia die RNA isoliert und nach Transkription in cDNA die Genexpression mit spezifischen Primern der GFR- α - und RET-Rezeptoren in einer RT-PCR überprüft.

Sowohl auf nicht stimulierten als auch stimulierten Mikroglia konnten der GFR- α 1- und der RET-Rezeptor auf mRNA-Ebene qualitativ dargestellt werden. Es zeigte sich eine spezifische Bande für den GFR- α 1-Rezeptor bei 286 bp (Abb. 3.8). LPS stimulierte Mikroglia zeigten ein stärkeres Signal der Bande für den GFR- α 1-Rezeptor als unstimulierte Mikroglia.

Bei der Detektion des RET-Rezeptors zeigte sich eine spezifische Bande bei 465 bp (Abb. 3.9). Für RET zeigte sich eine spezifische, stärkere Bande für unstimulierte Mikroglia und eine schwache Bande bei durch LPS stimulierten Mikroglia. β -Actin als interne Kontrolle zeigte sowohl auf unstimulierten, als auch mit LPS stimulierten Mikroglia eine spezifische Bande bei 281 bp.

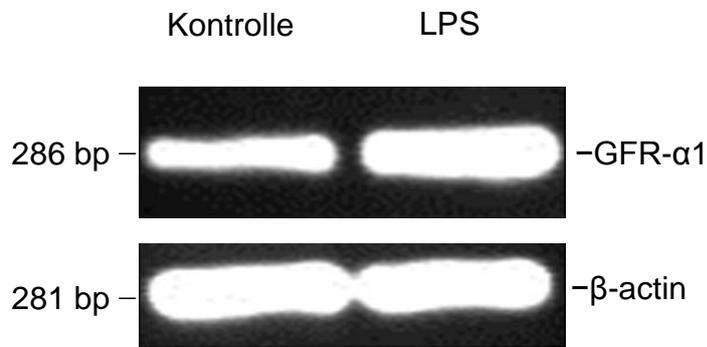


Abb. 3.5: Qualitativer Nachweis von mRNA-Transkripten des GFR- α 1-Rezeptors mittels RT-PCR auf primärer Mikroglia. Die RNA nicht stimulierter und stimulierter Mikroglia wurde isoliert, in cDNA transkribiert und mit spezifischen Primern für den GFR- α 1-Rezeptor (286 bp) als RT-PCR angesetzt. Als interne Kontrolle diente β -Actin (281 bp). Die RT-PCR wurde in einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Hilfe einer 0,001 %igen Ethidiumbromidlösung gefärbt und unter UV-Licht ausgewertet.

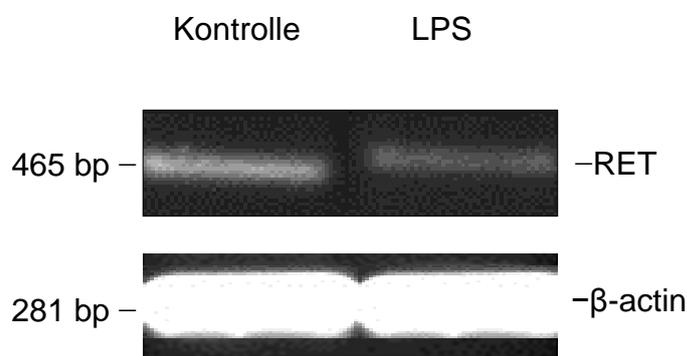


Abb. 3.6: Qualitativer Nachweis von mRNA-Transkripten des RET-Rezeptors mittels RT-PCR auf primärer Mikroglia. Die RNA nicht stimulierter und stimulierter Mikroglia wurde isoliert, in cDNA transkribiert und mit spezifischen Primern für den RET-Rezeptors (465 bp) als RT-PCR angesetzt. Als interne Kontrolle diente β -Actin (281 bp). Die RT-PCR wurde in einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Hilfe einer 0,001 %igen Ethidiumbromidlösung gefärbt und unter UV-Licht ausgewertet.

3.3 Die vier Faktoren der GFL-Familie reduzierten die NO-Synthese LPS stimulierter Mikroglia

Vor dem Hintergrund der Neuroinflammation, in deren Pathogenese NO eine zentrale Rolle spielt (Wilms et al., 2003), sollte gezeigt werden, ob die Faktoren der GFL-Familie einen modulatorischen Einfluss auf die NO-Synthese LPS-stimulierter Mikroglia haben.

In einem Versuchsansatz befanden sich 100 000 Mikroglia, die in einer 96-Loch-Zellkulturplatten ausgesät und nach Annahme der Ruheform für 24 Stunden, wie in Kap. 2.3.4 beschrieben, stimuliert wurden. Die Messung im Zellkulturüberstand erfolgte nach 15 Minuten Reaktionszeit des Überstandes mit Griess-Reagenz bei einer Wellenlänge von 550 nm.

Die Einzelstimulationen mit den Faktoren hatten keinen Effekt auf die NO-Synthese. Die gemessenen Werte lagen im Bereich der Kontrollen. Für die simultane Stimulation der Faktoren mit LPS ergab sich hingegen eine signifikante Reduktion der NO-Synthese der Mikroglia für alle vier Faktoren. Für GDNF ergab sich eine durchschnittliche Reduktion auf 85,04 % mit $p < 0,01$, für NTN auf 83,48 % mit $p < 0,05$, für ATN auf 82,78 % mit $p < 0,05$ und für PSP auf 82,06 % mit $p < 0,001$, bezogen auf die NO-Freisetzung bei reiner LPS-Stimulation mit 100 %. In Abbildung 3.3 sind die Ergebnisse für die einzelnen Faktoren graphisch dargestellt.

Um eine Reduktion der NO-Produktion durch den Tod der Mikroglia auszuschließen, wurden anschließend dieselben Zellen mit Coomassie-Blue gefärbt und unter einem Mikroskop betrachtet.

Die Zellen waren vital und zeigten sich entweder in ihrer Ruheform, wenn sie einzeln mit dem jeweiligen Faktor stimuliert (Abb. 3.4 A) oder unstimuliert waren, oder in ihrer aktivierten amöboiden Form, wenn sie mit LPS oder mit LPS gemeinsam mit einem Faktor der GFL-Familie (Abb. 3.4 B) stimuliert waren.

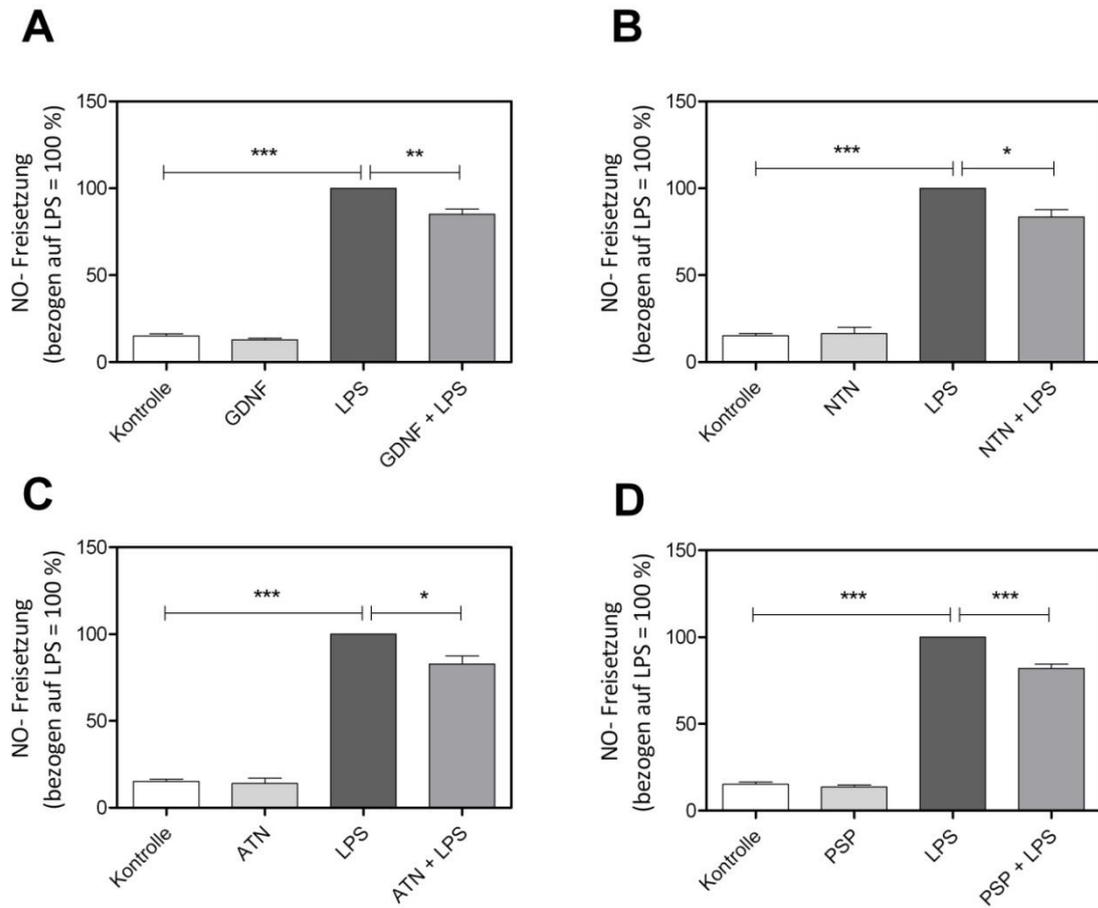


Abb. 3.7: Modulation der NO-Synthese durch GDNF, NTN, ATN und PSP bei LPS stimulierter Mikroglia. Es zeigt sich die signifikante Reduktion der NO-Synthese im Überstand des Kulturmediums für alle vier Faktoren. GDNF auf 85,04%, mit $p < 0,01$ (**Abb. A**); NTN eine Reduktion auf 83,48 % mit $p < 0,05$ (**Abb. B**); ATN zeigt eine Reduktion auf 82,78 % mit $p < 0,05$ (**Abb. C**) und für PSP zeigt sich eine Reduktion auf 82,06 % mit $p < 0,001$ (**Abb. D**). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte + SEM ($n=15$ aus drei unabhängigen Versuchen, ANOVA) ($p^* \leq 0,05$; $p^{**} \leq 0,01$; $p^{***} \leq 0,001$).

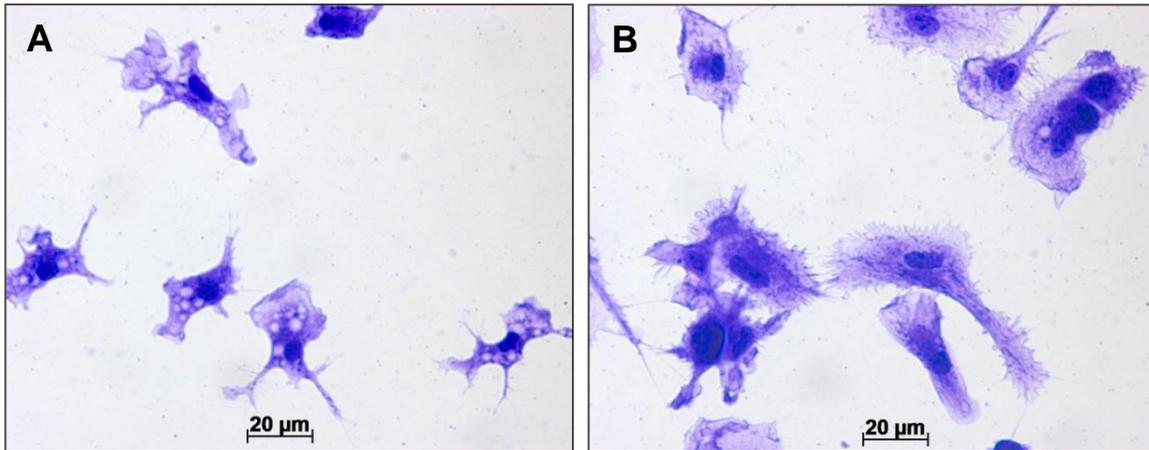


Abb. 3.8: Stimulation der Mikroglia hatte keinen Einfluss auf deren Vitalität. Abgebildet sind in einer 96-Loch-Zellkulturplatte ausgesäte Mikroglia, die nach Annahme ihrer Ruheform für 24 Stunden stimuliert und anschließend mit Coomassie-Blue gefärbt wurden. **Abb. A** zeigt exemplarisch Mikroglia, die mit 50 ng/ml GDNF für 24 Stunden in Zellkulturmedium inkubiert wurden. Es zeigt sich ein flacher Zellkörper mit zahlreichen Fortsätzen. **Abb. B** zeigt exemplarisch Mikroglia, die simultan mit 50 ng/ml GDNF und 5 ng/ml LPS stimuliert wurden. Hier zeigt sich nur eine moderate Rückbildung der Zellfortsätze und Umwandlung des Zellkörpers hin zur amöboiden aktivierten Form.

3.3.1 GDNF, NTN, ATN und PSP reduzierten die Expression der iNOS-mRNA in LPS-stimulierten Mikroglia

Nach dem Nachweis der veränderten NO-Produktion im Zellkulturüberstand wurde die Beeinflussung der iNOS-mRNA-Synthese durch eine *realtime* RT-PCR untersucht.

Für einen Versuchsansatz wurden 1 Million Mikroglia in Zellkulturmedium in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät und wie in Kap. 2.3.7 beschrieben stimuliert. Es zeigte sich, dass die alleinige Aussaat der Mikroglia in Zellkulturmedium und in Zellkulturmedium mit einem Faktor der GFL-Familie versetzt, keinen Einfluss auf deren iNOS-mRNA-Synthese hatte. Die alleinige Stimulation mit LPS führte dagegen zu einer signifikanten Steigerung der iNOS-mRNA-Synthese in Mikroglia, was auf deren Aktivierung hindeutet.

Die gleichzeitige Stimulation der Mikroglia mit jeweils einem der vier GFL-Faktoren und LPS führte zu einem signifikanten Rückgang der mikroglialen Aktivierung.

GDNF zeigte eine Reduktion auf 76,5 % mit $p < 0,01$ der iNOS-mRNA-Expression im Vergleich zu 100 % bei reiner LPS-Stimulation. Für NTN ergab sich eine signifikante Reduktion auf 58,2 % mit $p < 0,01$ %. Bei ATN ließ sich eine Reduktion auf 52 % mit $p < 0,01$ zeigen. Für PSP ließ sich eine Reduktion auf 66,3 % mit $p < 0,001$ nachweisen. Die Ergebnisse der *realtime* RT-PCR der iNOS-mRNA-Synthese sind in Abbildung 3.5 dargestellt.

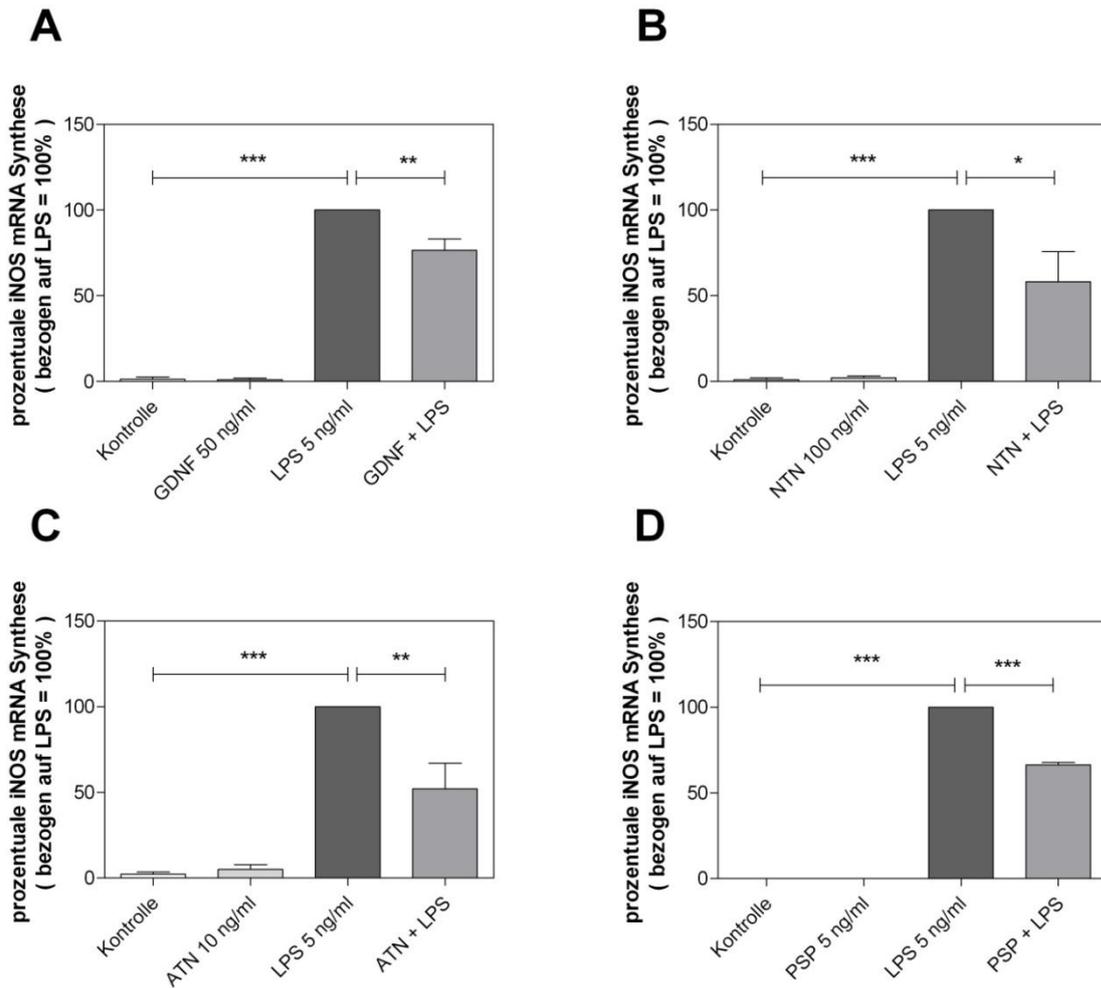


Abb. 3.9: Einfluss von GDNF, NTN, ATN und PSP auf die iNOS-mRNA-Synthese in LPS stimulierter Mikroglia. Die iNOS-mRNA-Synthese wurde quantitativ mittels *realtime* RT-PCR ermittelt. Alle 4 Faktoren regulierten die iNOS-mRNA in LPS stimulierten Mikroglia signifikant herab: GDNF auf durchschnittlich 76,5 % mit $p < 0,01$ (**Abb. A**); NTN auf 58,2 % mit $p < 0,01$ (**Abb. B**); ATN auf 52 % mit $p < 0,01$ (**Abb. C**) und für PSP 66,3 % mit $p < 0,001$ (**Abb. D**). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte + SEM ($n=6$, aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen, ANOVA) ($p^* \leq 0,05$; $p^{**} \leq 0,01$; $p^{***} \leq 0,001$).

3.4 Einfluss der Faktoren der GFL-Familie auf die mRNA-Synthese von proinflammatorischen Enzymen und Mediatoren

Zum Nachweis einer Veränderung der mRNA-Expression von proinflammatorischen Enzymen und Zytokinen wurde eine *realtime* RT-PCR durchgeführt. Hierzu wurden 1 Million Mikroglia in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät und mit LPS und den Faktoren wie in Kap. 2.3.7 beschrieben stimuliert. Es wurden die Modulation der mRNA-Synthese des proinflammatorischen Enzyms Cyclooxygenase 2 (COX-2), sowie die Modulation der mRNA-Synthese der proinflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- α und IL-1 β bestimmt. Die Ergebnisse der einzelnen Faktoren gegenüber der reinen LPS-Stimulation (100 %) sind im Folgenden dargestellt.

3.4.1 GDNF, NTN, ATN und PSP reduzierten die Expression der COX-2-mRNA

Es zeigte sich, dass eine alleinige Aussaat der Mikroglia in Zellkulturmedium und in Zellkulturmedium versetzt mit jeweils einem Faktor der GFL-Familie keinen Einfluss auf die COX-2-mRNA-Synthese hatte. Die alleinige Stimulation mit LPS führte dagegen zu einer Steigerung der mRNA-Synthese. Für die Stimulation mit LPS und einem der vier GFL-Faktoren zeigte sich für alle vier Faktoren eine signifikante Reduktion der COX-2-mRNA-Synthese.

Für GDNF zeigte sich eine Reduktion auf durchschnittlich 80,33 % mit $p < 0,05$, für NTN auf 83,7 % mit $p < 0,001$, für ATN eine Reduktion auf 76,33 % mit $p < 0,001$ und für PSP 80,2 % mit $p < 0,01$. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.10 graphisch dargestellt.

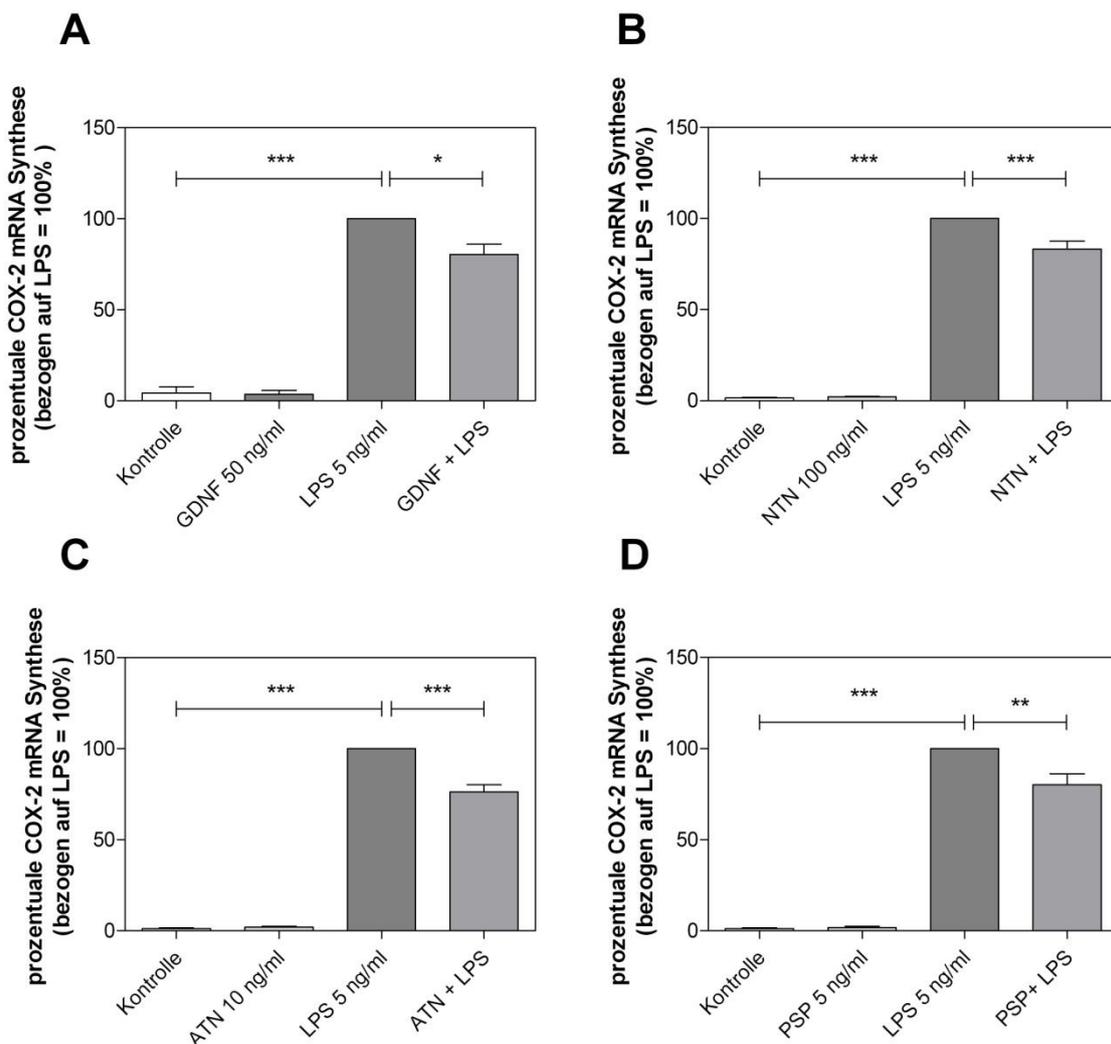


Abb. 3.10: Einfluss von GDNF, NTN, ATN und PSP auf die COX-2-mRNA-Synthese in LPS stimulierter Mikroglia. Die COX-2-mRNA-Synthese wurde quantitativ mittels *realtime* RT-PCR ermittelt. Alle Faktoren regulierten die COX-2-mRNA in LPS stimulierten Mikroglia signifikant herab: GDNF auf durchschnittlich 80,33 % mit $p < 0,05$ (**Abb. A**); NTN auf 83,7 % mit $p < 0,01$ (**Abb. B**); für ATN 76,33 % mit $p < 0,001$ (**Abb. C**); und für PSP 80,2 % mit $p < 0,01$ (**Abb. D**). Dargestellt sind

jeweils die Mittelwerte + SEM (n=6, aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen, ANOVA). ($p^* \leq 0,05$; $p^{**} \leq 0,01$; $p^{***} \leq 0,001$)

3.4.2 Einfluss der Faktoren der GFL-Familie auf die mRNA-Synthese proinflammatorischer Zytokine

Es gibt eine Vielzahl proinflammatorischer Zytokine, die in der Pathogenese neurodegenerativer Krankheiten eine Rolle spielen (Wilms et al., 2003). Um einen modulatorischen Einfluss der Faktoren der GFL-Familie auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine zu untersuchen, wurden in der *realtime* RT-PCR TNF- α , Interleukin 1 β (IL-1 β) und IL-6 untersucht. Hierzu wurden ebenfalls 1 Million Mikroglia pro Probengefäß ausgesät und mit LPS und den Faktoren, wie in Kap. 2.3.7 beschrieben, stimuliert. Die Ergebnisse der einzelnen GFL-Faktoren gegenüber der reinen LPS-Stimulation (100 %) sind im Folgenden dargestellt.

3.4.2.1 GDNF, NTN, ATN und PSP reduzierten die IL-6-mRNA-Synthese

Für die Stimulation nur mit Zellkulturmedium und dem alleinigen Faktor der GFL-Familie zeigte sich kein Einfluss auf die Expression der IL-6-mRNA-Synthese. Die alleinige Stimulation mit LPS führte zu einer Steigerung der mRNA-Synthese. Bei der simultanen Stimulation mit LPS und einem Faktor der GFL-Familie konnte für alle vier Faktoren eine signifikante Reduktion der IL-6-mRNA-Synthese gezeigt werden.

Für GDNF ergab sich eine signifikante Reduktion mit $p < 0,05$ auf durchschnittlich 89,25 %, im Vergleich zu 100 % bei reiner LPS-Stimulation. Für NTN ergab sich eine Reduktion auf 57,4 % mit einem $p < 0,01$. Die Stimulation mit ATN zeigte eine Reduktion auf 51,75 %, mit $p < 0,01$. Für PSP ließ sich eine durchschnittliche Reduktion auf 57,66 % nachweisen bei $p < 0,001$. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.11 graphisch dargestellt.

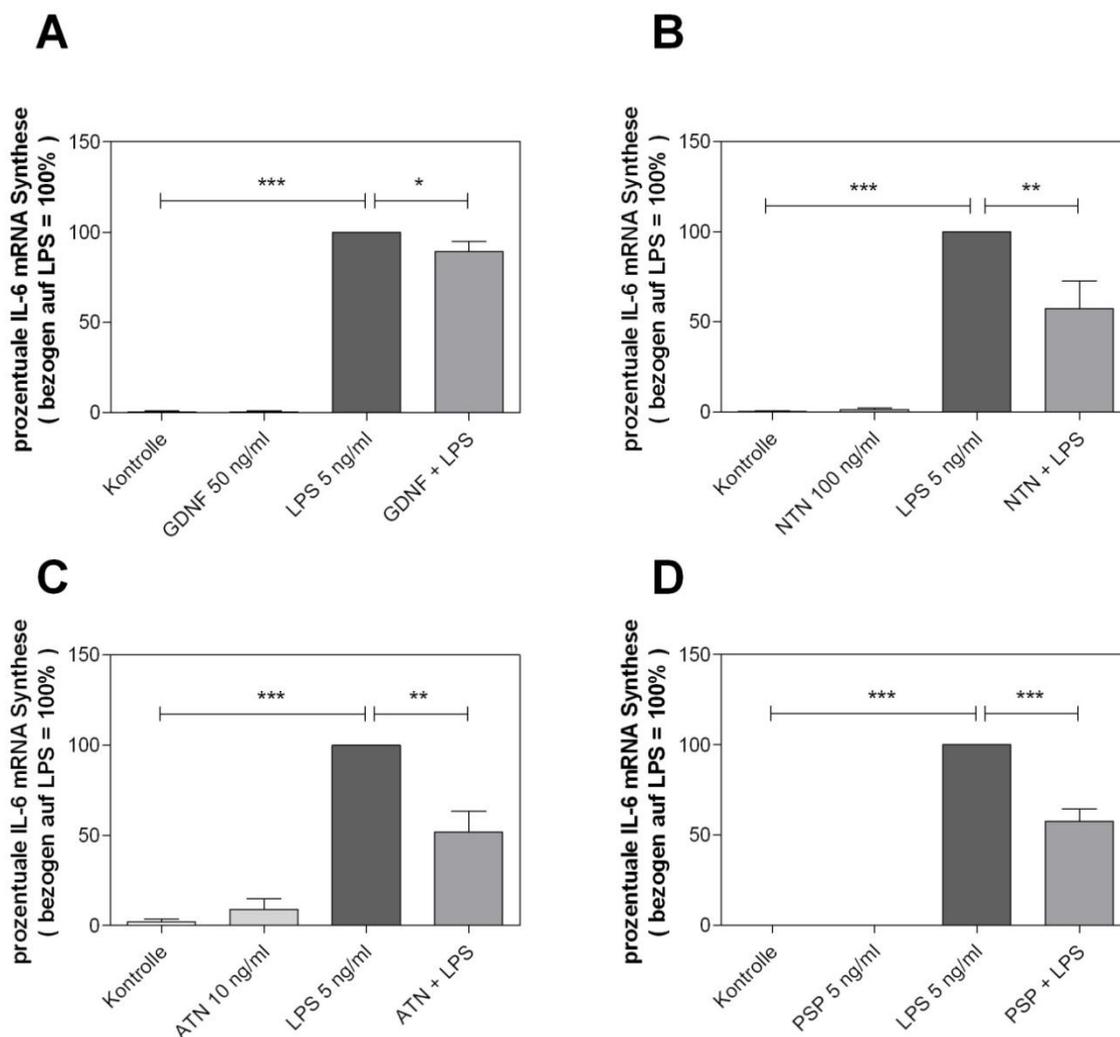


Abb. 3.11: Einfluss von GDNF, NTN, ATN und PSP auf die IL-6-mRNA-Synthese in LPS stimulierter Mikroglia. Die IL-6-mRNA-Synthese wurde quantitativ mittels *realtime* RT-PCR ermittelt. Alle Faktoren regulierten die IL-6-mRNA in LPS stimulierten Mikroglia signifikant herab: GDNF auf durchschnittlich 89,25 %, mit $p < 0,05$ (**Abb. A**); für NTN 57,4 % mit $p < 0,01$ (**Abb. B**); für ATN 51,75%, mit $p < 0,01$ (**Abb. C**) und für PSP 57,66, % mit $p < 0,001$ (**Abb. D**). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte + SEM ($n=6$, aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen, ANOVA). ($p^* \leq 0,05$; $p^{**} \leq 0,01$; $p^{***} \leq 0,001$)

3.4.2.2 GDNF, NTN, ATN und PSP reduzierten die TNF- α -mRNA-Synthese

Auch für TNF- α zeigte die alleinige Stimulation mit Zellkulturmedium und dem alleinigen Faktor der GFL-Familie keinen Einfluss auf die mRNA-Synthese von TNF- α . Durch LPS kam es auch hier zu einer Steigerung der TNF- α -mRNA-Synthese. Bei der simultanen Stimulation mit LPS und einem der vier Faktoren kam es bei allen zu einer signifikanten Reduktion der mRNA-Synthese, im Vergleich zur Steigerung unter LPS-Stimulation.

Die Ergebnisse der Beeinflussung der TNF- α -mRNA-Synthese durch die vier Faktoren stellten sich wie folgt dar: Für GDNF ergab sich eine durchschnittliche Reduktion auf 77,3 %

mit $p < 0,001$, für NTN 69,0 % mit $p < 0,05$, für ATN eine Reduktion auf 91,0 % mit $p < 0,05$ und für PSP durchschnittlich 53,32 % mit $p < 0,001$. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.12 graphisch dargestellt.

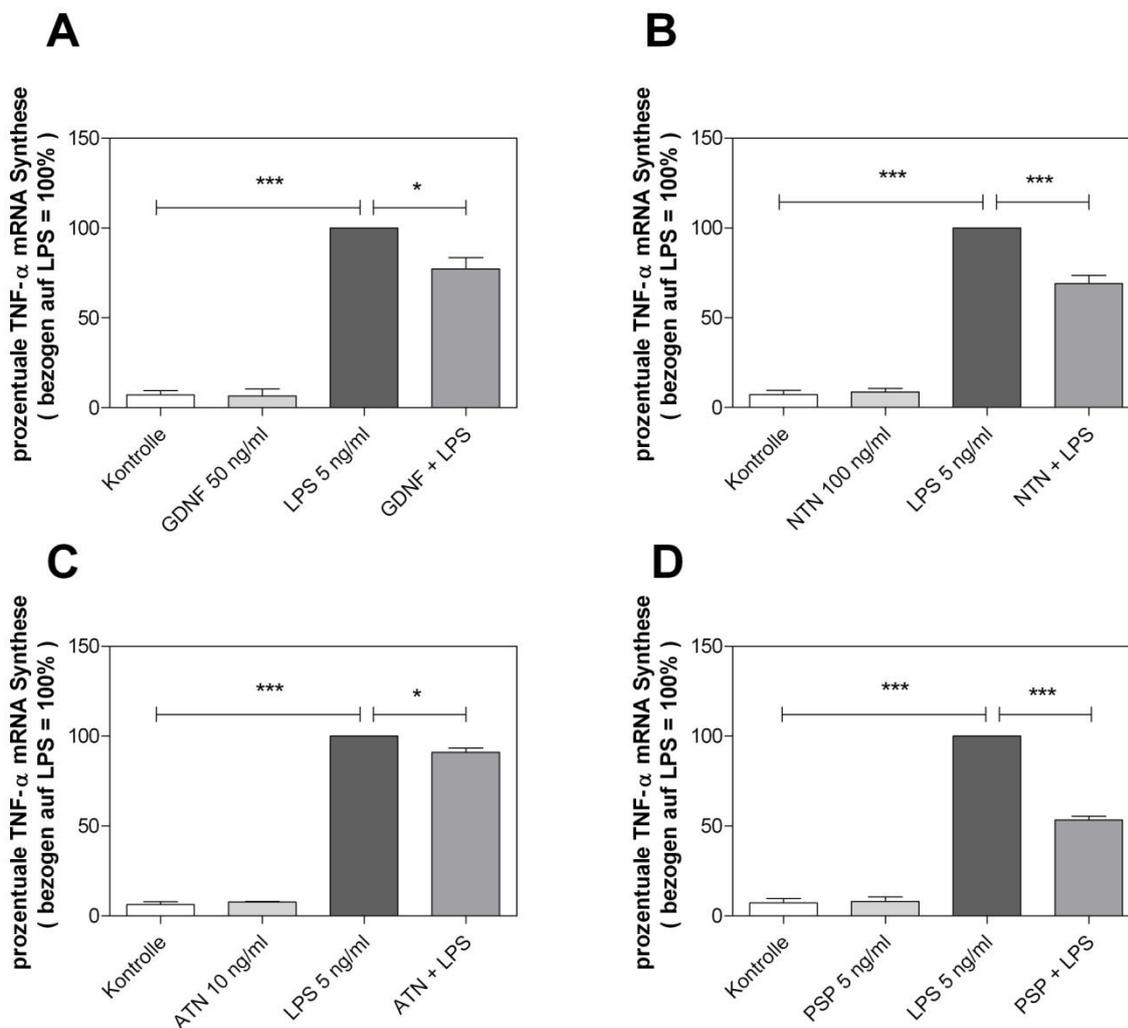


Abb. 3.12: Einfluss von GDNF, NTN, ATN und PSP auf die TNF- α -mRNA-Synthese in LPS stimulierter Mikroglia. Die TNF- α -mRNA-Synthese wurde quantitativ mittels *realtime* RT-PCR ermittelt. Alle Faktoren regulierten die TNF- α -mRNA in LPS stimulierten Mikroglia signifikant herab: GDNF auf durchschnittlich 77,3 %, mit $p < 0,001$ (**Abb. A**); für NTN 69,0 % mit $p < 0,05$ (**Abb. B**); für ATN 91,0 %, mit $p < 0,05$ (**Abb. C**) und für PSP 53,32 % mit $p < 0,001$ (**Abb. D**). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte + SEM ($n=6$, aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen, ANOVA). ($p^* \leq 0,05$; $p^{***} \leq 0,001$)

3.4.2.3 GDNF, NTN, ATN und PSP reduzierten die IL-1 β -mRNA-Synthese

Für die Messungen der Reduktion der IL-1 β -mRNA-Synthese ergaben sich signifikante Ergebnisse für die Stimulation mit GDNF, NTN und PSP in Anwesenheit von LPS gegenüber der alleinigen LPS-Stimulation.

GDNF zeigte eine Reduktion auf 80 % mit $p < 0,01$. Für NTN ergab sich eine durchschnittliche Reduktion auf 87,0 % mit $p < 0,05$. Bei ATN zeigte sich eine nicht signifikante Reduktion auf durchschnittlich 93,2 %. Für PSP ergab sich eine Reduktion auf 62,0 % mit $p < 0,001$. Eine Stimulation mit Zellkulturmedium und dem alleinigen Faktoren der GFL-Familie ergab keine Veränderung der IL-1 β -mRNA-Synthese. Eine Stimulation mit LPS erhöhte die mRNA-Expression. Abbildung 3.13 zeigt die Ergebnisse.

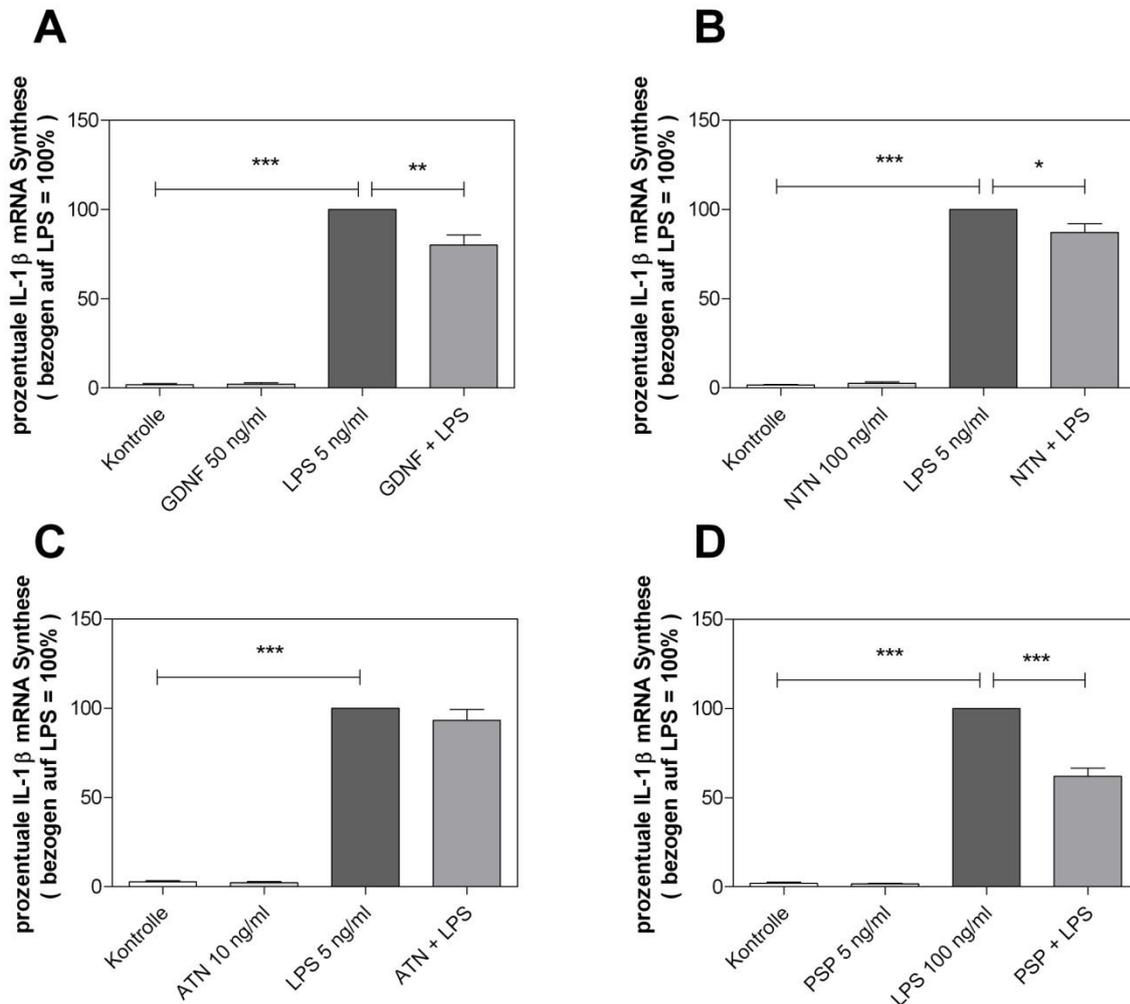


Abb. 3.13: Einfluss von GDNF, NTN, ATN und PSP auf die IL-1 β -mRNA-Synthese in LPS stimulierter Mikroglia. Die IL-1 β -mRNA-Synthese wurde quantitativ mittels *realtime* RT-PCR ermittelt. Alle Faktoren bis auf ATN regulierten die IL-1 β -mRNA in LPS stimulierten Mikroglia signifikant herab: GDNF auf 80,0 %, mit $p < 0,01$ (**Abb. A**); für NTN 87,0 % mit $p < 0,05$ (**Abb. B**); für ATN 93,17 %, mit $p > 0,05$ (**Abb. C**) und für PSP 62,0 % mit $p < 0,001$ (**Abb. D**). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte + SEM ($n=6$, aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen, ANOVA). ($p^* \leq 0,05$; $p^{**} \leq 0,01$; $p^{***} \leq 0,001$)

3.5 Nachweis der reduzierten Proteinsekretion von IL-6 und TNF- α mittels Sandwich-ELISA

Um die nachgewiesene veränderte mRNA-Synthese auch auf Proteinebene zu zeigen, wurden zusätzlich ELISAs für TNF- α und IL-6 durchgeführt. Nach Aussaat von 1 Million Mikroglia in 12-Loch-Zellkulturplatten und Stimulation für 6 bzw. 24 Stunden, wie in Kap. 2.3.8 beschrieben, wurden die Zellkulturüberstände gewonnen und in einem Sandwich-ELISA getestet. Bei der Auswertung der Daten wurde eine „point zu point“ Analyse durchgeführt, um auch die niedrigen Werte der Kontrollen und Standards sicher mit einzuschließen.

Auch hier zeigte sich, dass eine alleinige Stimulation mit Zellkulturmedium oder einem Faktor der GFL-Familie zu keiner Steigerung der Proteinsekretion führte, bei LPS-Stimulation hingegen schon. Die simultane Stimulation aus einem Faktor und LPS führte in zeitlichem Zusammenhang zu einer signifikanten Reduktion durch alle vier Faktoren.

Die Ergebnisse der sechsstündigen Stimulation für IL-6 (Abb. 3.16) ergaben für GDNF eine nicht signifikante Steigerung auf 101 %, für NTN eine Reduktion auf 90,9 % mit $p < 0,01$ %, für ATN eine nichtsignifikante Steigerung auf 106,7 % und für PSP eine Reduktion auf durchschnittlich 91,1 % mit $p < 0,001$. Die Ergebnisse der 24 stündigen Stimulation für IL-6 ergaben für alle vier Faktoren eine signifikant reduzierte Proteinsekretion. Für GDNF ergab sich eine Reduktion auf 82,7 % mit $p < 0,01$ für NTN 76,8 % mit $p < 0,001$, für ATN 86,8 % mit $p < 0,01$ und für PSP eine durchschnittliche Reduktion auf 82,5 % mit $p < 0,001$.

Für TNF- α zeigten sich nach einer sechsstündigen Stimulation für GDNF 86,3 % mit $p < 0,01$, für NTN eine nicht signifikante Reduktion auf 94,8 %, für ATN eine Steigerung auf 100,7 % und für PSP eine Reduktion auf 88,3 % mit $p < 0,001$. Die Ergebnisse für TNF- α mit 24-Stunden-Stimulation (Abb. 3.15) stellten sich wie folgt da: Für GDNF 81,7 % mit $p < 0,001$ %, für NTN 79,8 % mit $p < 0,001$, für ATN 85,1 % mit $p < 0,001$ und für PSP 81,7 % mit $p < 0,01$.

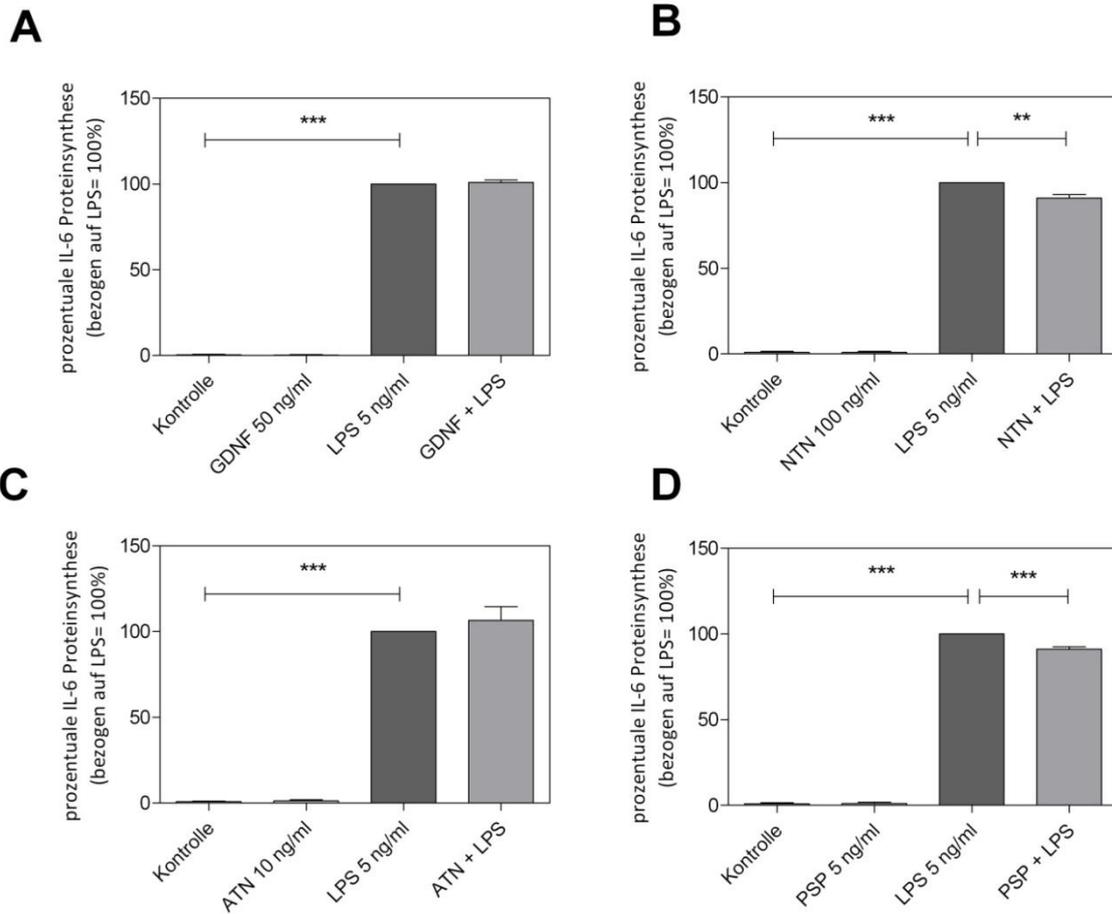


Abb. 3.14: Einfluss von GDNF, NTN, ATN und PSP auf die IL-6-Proteinsynthese nach 6 Stunden Stimulation. 1 Million Mikroglia wurden für 6 Stunden mit den GFL-Faktoren und LPS inkubiert. Anschließend wurde die IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels eines ELISAs bestimmt. **Abb. A** zeigt für GDNF eine nicht signifikante Steigerung auf 101 %; **Abb. B** für NTN eine Reduktion auf durchschnittlich 90,9 % mit $p < 0,01$; **Abb. C** für ATN eine nicht signifikante Steigerung auf 106,7 % und **Abb. D** für PSP eine Reduktion auf 91,1 % mit $p < 0,001$. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte + SEM ($n=6$, aus mindestens drei unabhängigen Versuchen, ANOVA). ($p^{**} \leq 0,01$; $p^{***} \leq 0,001$)

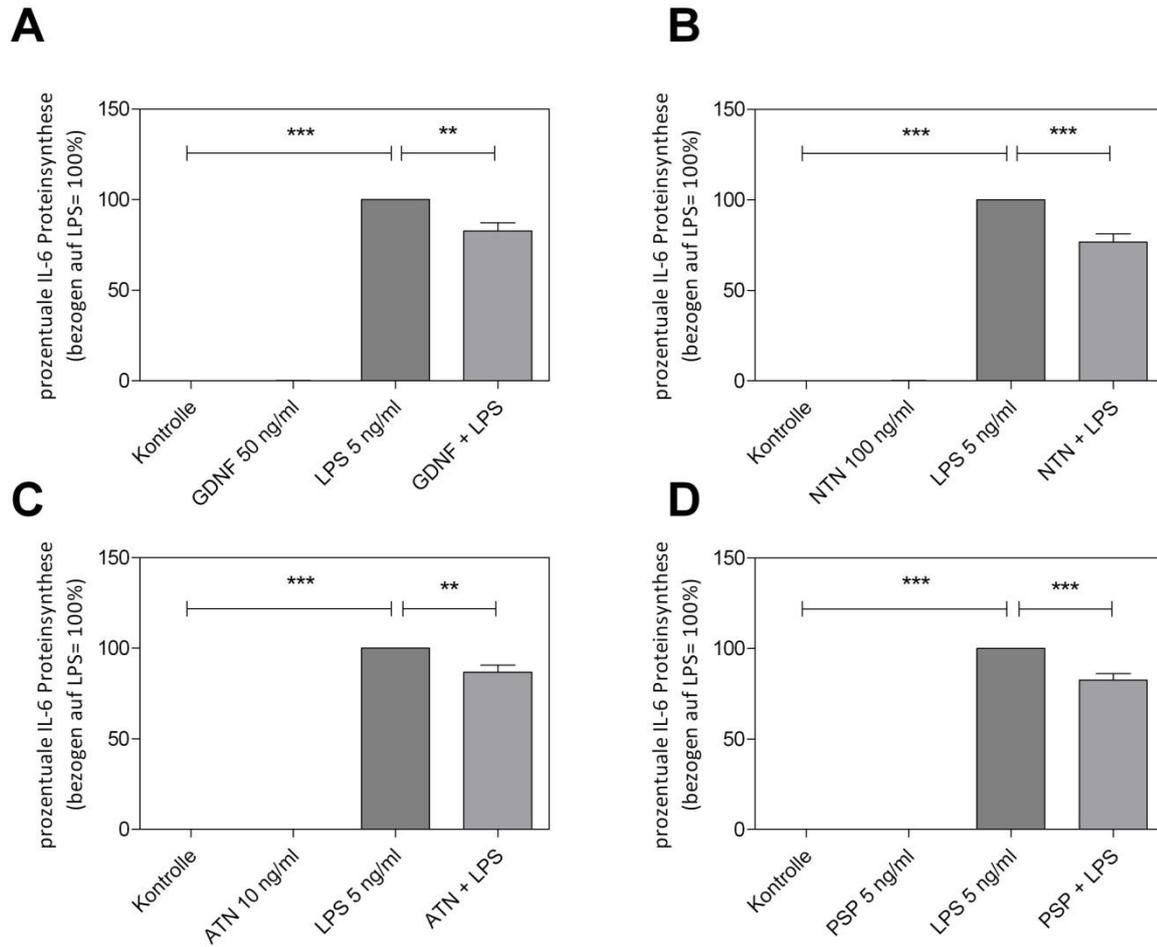


Abb. 3.15: Einfluss von GDNF, NTN, ATN und PSP auf die IL-6-Proteinsynthese nach 24 Stunden Stimulation. 1 Million Mikroglia wurden für 24 Stunden mit den GFL-Faktoren und LPS inkubiert. Anschließend wurde die IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Alle vier Faktoren regulierten die IL-6 Proteinexpression signifikant herab. GDNF auf 82,7 % mit $p < 0,01$ **Abb. A**; für NTN 76,8 % mit $p < 0,001$ **Abb.B**; für ATN 86,8 % mit $p < 0,01$ **Abb. C** und für PSP 82,5 % mit $p < 0,001$ **Abb. D**. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte + SEM ($n=6$, aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen, ANOVA). ($p^{**} \leq 0,01$; $p^{***} \leq 0,001$)

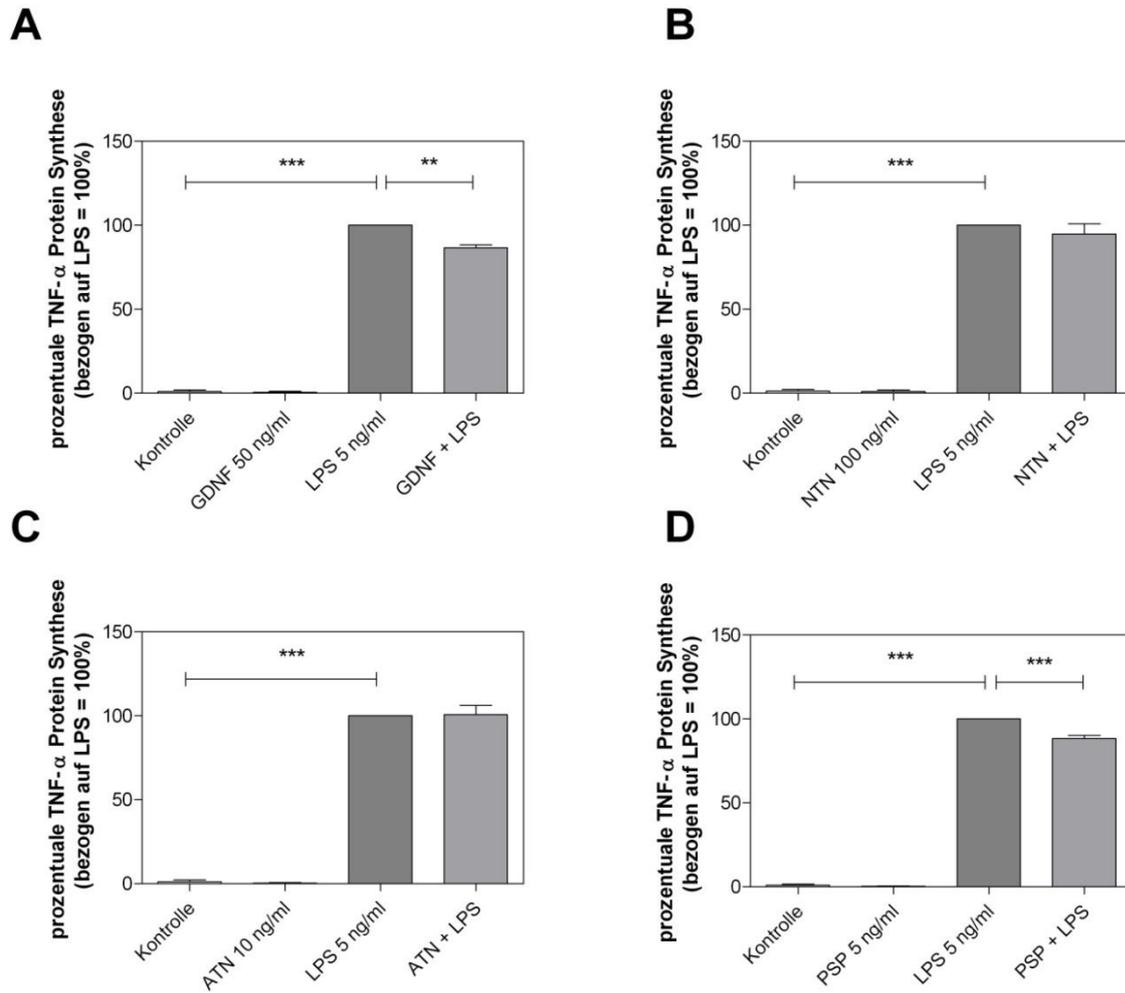


Abb. 3.16: Einfluss von GDNF, NTN, ATN und PSP auf die TNF- α -Proteinsynthese nach 6 Stunden Stimulation. 1 Million Mikroglia wurden für 6 Stunden mit den GFL-Faktoren und LPS inkubiert. Anschließend wurde die TNF- α -Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion für GDNF auf 86,3 %, mit $p < 0,01$ **Abb. A**; für NTN eine nicht signifikante Reduktion auf 94,8% **Abb. B**; für ATN eine Steigerung auf 100,7 % **Abb. C** und für PSP eine Reduktion auf 88,3 % mit $p < 0,001$ **Abb. D**. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte + SEM ($n=6$, aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen, ANOVA). ($p^{**} \leq 0,01$; $p^{***} \leq 0,001$)

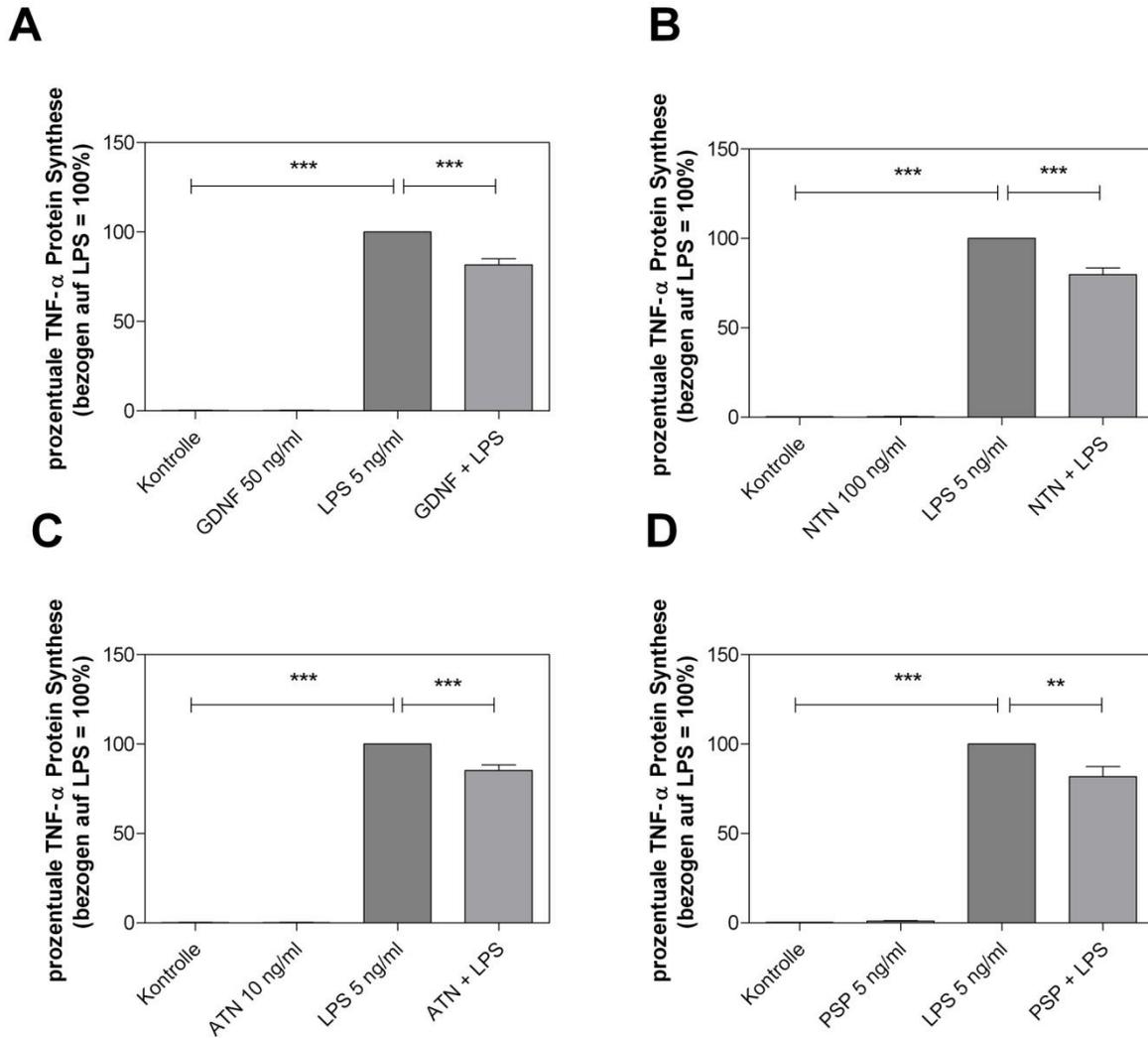


Abb. 3.17: Einfluss von GDNF, NTN, ATN und PSP auf die TNF- α -Proteinsynthese nach 24 Stunden Stimulation. 1 Million Mikroglia wurden für 24 Stunden mit den GFL-Faktoren und LPS inkubiert. Anschließend wurde die TNF- α -Konzentrationen im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Alle vier Faktoren regulierten die TNF- α -Proteinexpression signifikant herab: GDNF auf 81,7 % mit $p < 0,001$ (**Abb. A**); NTN auf 79,8 % mit $p < 0,001$ (**Abb. B**); ATN auf 85,1 % mit $p < 0,001$ (**Abb. C**) und PSP auf 81,7 % mit $p < 0,01$ (**Abb. D**). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte + SEM ($n=6$, aus mindestens drei unabhängigen Versuchen, ANOVA). ($p^{**} \leq 0,01$; $p^{***} \leq 0,001$)

3.6 Nachweis der Beeinflussung intrazellulärer Signalwege mittels

Western Blot

Um zu klären, ob die Faktoren der GFL-Familie ihre Wirkung durch Beeinflussung intrazellulärer Signalwege vermitteln, wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Für einen Versuchsansatz wurden 1 Million Mikroglia ausgesät und wie in Kapitel 2.3.9 beschrieben stimuliert. Nach dem Ablösen erfolgten die Isolierung der Proteine und die molekulare Auftrennung mittels Polyacrylamidgelelektrophorese. Durch eine gekoppelte Antikörperreaktion wurden die pp38- (Abb 3.18A-3.21A) sowie die p38-Proteinbanden (Abb 3.18B-3.21B) detektiert und durch Chemilumineszenz dargestellt. Zum Vergleich wurden eine unstimulierte und eine jeweils nur mit einem Faktor der GFL-Familie stimulierte Probe mitgeführt.

Es zeigte sich anhand der reduzierten Bandenintensitäten für alle vier Faktoren eine verminderte Expression von pp38 der Mikroglia, die mit jeweils einem GFL-Faktor und LPS kostimuliert wurden, im Vergleich zu nur mit LPS stimulierten Mikroglia. Die Ergebnisse sind im Folgenden exemplarisch dargestellt.

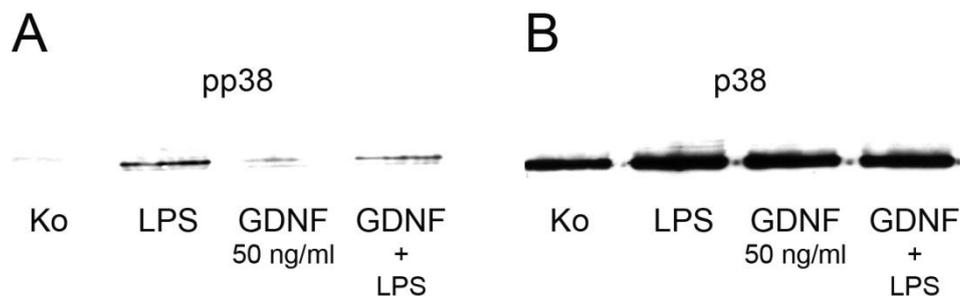


Abb. 3.18: Einfluss von GDNF auf den p38/pp38 Signalweg. 1 Million Mikroglia wurden für 1 Stunde mit den Faktoren der GFL-Familie stimuliert und die pp38 Expression mittels eines Western Blots ermittelt. GDNF regulierte die Expression von pp38 in LPS stimulierten Mikroglia deutlich herab. **Abb. A** zeigt die Beeinflussung der pp38 Expression durch die gleichzeitige Stimulation mit LPS und GDNF im Vergleich zu einer reinen LPS-Stimulation. **Abb. B** zeigt die Expression des unphosphorylierten p38 als Kontrolle.

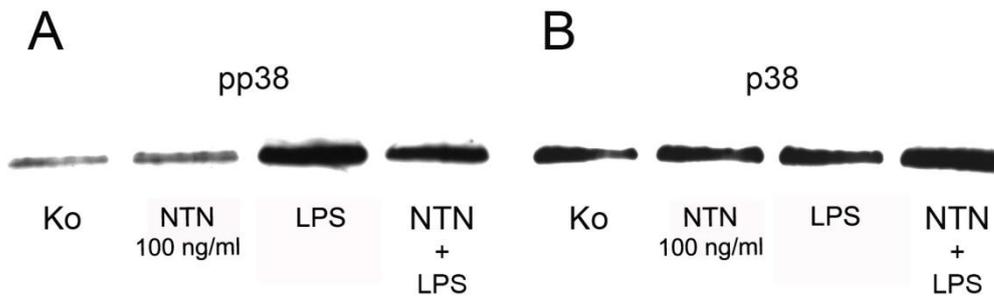


Abb. 3.19: Einfluss von NTN auf den p38/pp38 Signalweg. 1 Million Mikroglia wurden für 1 Stunde mit den Faktoren der GFL-Familie stimuliert und die pp38 Expression mittels eines Western Blots ermittelt. NTN regulierte die Expression von pp38 in LPS stimulierten Mikroglia deutlich herab. . **Abb. A** zeigt die Beeinflussung der pp38 Expression durch die gleichzeitige Stimulation mit LPS und GDNF im Vergleich zu einer reinen LPS-Stimulation. **Abb. B** zeigt die Expression des unphosphorylierten p38 als Kontrolle.

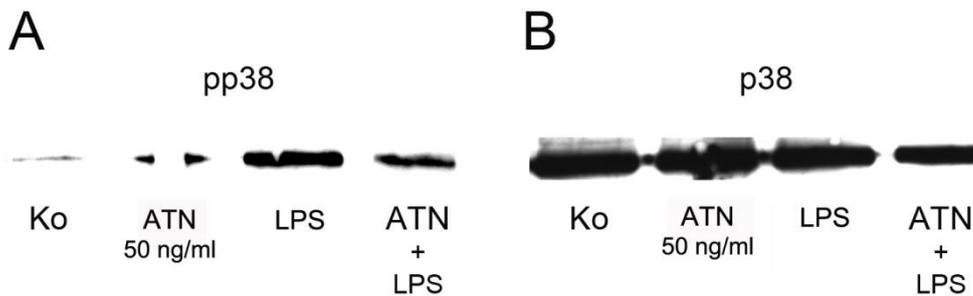


Abb. 3.20: Einfluss von ATN auf den p38/pp38 Signalweg. 1 Million Mikroglia wurden für 1 Stunde mit den Faktoren der GFL-Familie stimuliert und die pp38 Expression mittels eines Western Blots ermittelt. ATN regulierte die Expression von pp38 in LPS stimulierten Mikroglia deutlich herab. **Abb. A** zeigt die Beeinflussung der pp38 Expression durch die gleichzeitige Stimulation mit LPS und ATN im Vergleich zu einer reinen LPS-Stimulation. **Abb. B** zeigt die Expression des unphosphorylierten p38 als Kontrolle.

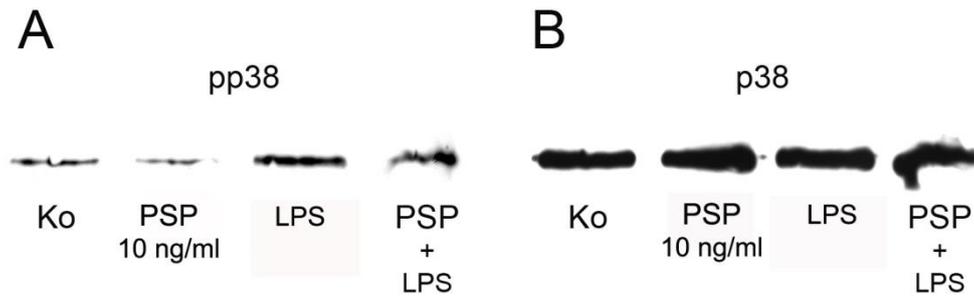


Abb. 3.21: Einfluss von PSP auf den p38/pp38 Signalweg. 1 Million Mikroglia wurden für 1 Stunde mit den Faktoren der GFL-Familie stimuliert und die pp38 Expression mittels eines Western Blots ermittelt. PSP regulierte die Expression von pp38 in LPS stimulierten Mikroglia deutlich herab. **Abb. A** zeigt die Beeinflussung der pp38 Expression durch die gleichzeitige Stimulation mit LPS und PSP im Vergleich zu einer reinen LPS Stimulation. **Abb. B** zeigt die Expression des unphosphorylierten p38 als Kontrolle.

4. Diskussion

Das Feld der neurodegenerativen Erkrankungen und deren Behandlung erlangt mit der zunehmenden Alterserwartung der Menschen immer mehr an Bedeutung. Die Pathologie der Erkrankungen stellt sich bis heute oftmals nicht eindeutig dar. Es werden verschiedenste Theorien zur Erklärung herangezogen, und so ergibt sich das Bild eines multifaktoriellen Geschehens, in dem genetische, umweltbedingte und altersbedingte Faktoren eine Rolle spielen.

Die Rolle der Mikroglia ist in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus intensiver Forschung geraten. Bekannt ist die Mikroglia als die immunkompetente Zelle des ZNS, die bei einer Läsion ihre ortsständige, ramifizierte Form aufgibt und zur Läsionsstelle wandert, um dort ihre sekretorische Funktion aufzunehmen (Kettenmann et al., 2011). Bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen konnte eine aktive Rolle der Mikroglia in Form einer proinflammatorischen Aktivität mit Produktion neurotoxischer Substanzen nachgewiesen werden (Banati et al., 1998; McGeer et al., 1988). Die Produktion dieser neurotoxischen Substanzen, ausgelöst durch den neurodegenerativen Krankheitsprozess, wird dabei als ein sich selbst erhaltender Prozess beschrieben (Boka et al., 1994; Hartmann et al., 2002).

Mit der Entdeckung des GDNF durch Lin et al. (1993) als neuroprotektiver Faktor der dopaminergen Neurone der Substantia nigra kam neue Hoffnung auf, eine effiziente Therapie für neurodegenerative Erkrankungen gefunden zu haben. Für die GFL-Faktoren konnte der Nachweis einer neuroprotektiven Wirkung auf dopaminerge Neurone des Mittelhirns, auf Motorneurone, auf periphere Neurone und die Entwicklung von embryonalem Nierengewebe erbracht werden (Heuckeroth et al., 1998; Runeberg-Ross et al., 2007). Im Hinblick auf die neuroprotektive Wirkung der GFL-Familie auf Neurone, die durch eine Vielzahl wissenschaftlicher Arbeiten belegt ist (Übersicht bei Aron et al., 2011), kam die Frage nach der potentiellen Wirkung dieser Faktoren-Familie gegenüber den Mikroglia auf. Gegenstand dieser Arbeit war, die vier Faktoren der GFL-Familie auf eine zellselektive Wirkung gegenüber Mikroglia zu untersuchen. Die Untersuchungen sollten hierbei an primären Mikrogliazellkulturen erfolgen.

4.1 Zellkultur

Mikroglia werden *in vivo* durch ein komplexes Netzwerk mit Astrozyten und Neuronen in ihrer Aktivität gesteuert. *In vitro* ist dieses System aufgrund seiner Komplexität nicht nachzubilden. Alternativ wurden Mikroglia in einer Primärkultur angelegt. Hierzu machte man es sich zu Nutze, dass primäre Astrozytenkulturen immer auch eine Anzahl von Mikroglia-Progenitor Zellen enthalten (Richardson et al., 1993). Nach acht bis zehn Kulturtagen wurden die locker auf dem Astrozytenrasen sitzenden Mikroglia durch Schütteln abgelöst und in

Zellkulturmedium in definierter Zellzahl ausgesät. Durch diese spezielle Kultivierung kommt es zu einer Reinheit von 98% der Zellkulturen. In der vorliegenden Arbeit zeigten die mikroskopisch ausgewerteten Vorversuche, dass die Mikroglia 24 Stunden nach der Aussaat ihre Ruheform annehmen. Für die nachfolgenden Versuche wurden nur primäre Mikrogliaulturen eingesetzt, die in der ramifizierten Ruheform vorlagen - also vor Versuchsbeginn nicht vorstimuliert waren.

Zur Stimulation der Mikroglia können *in vitro* zum Beispiel LPS oder IFN γ eingesetzt werden. Die Zellen reagieren zum einen mit einer Veränderung der Morphologie in eine aktivierte amöbioide Form, andererseits mit der Produktion potentiell neurotoxischer Substanzen wie NO, TNF- α oder reaktive Sauerstoffspezies (Wilms et al., 2003).

Eine Messung der Zytokine nach LPS-Stimulation im Kulturmedium ist somit ein Nachweis für die Aktivierung der Mikroglia und konnte von zahlreichen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden (Wilms et al., 2010; Kalehua et al., 2000). Auf Grundlage dieser Erkenntnisse bietet sich das Kultursystem an, um einen postulierten antiinflammatorischen Effekt der vier Faktoren der GFL-Familie auf die Mikroglia zu untersuchen.

4.2 Nachweis einer veränderten NO-Sekretion durch die GFL-Familie

Die Ursache der Neurodegeneration durch Neuroinflammation wird unter anderem in einem verstärkten Anfall oxidativer Substanzen gesehen (Broom et al., 2011). Eine Substanz, die hier im Zentrum steht, ist NO. NO führt in kleinen Mengen im ZNS zur Ausbildung von Synapsen und zur Freisetzung von Neurotransmittern. In größeren Mengen gilt NO jedoch als potentiell neurotoxisch (Broom et al., 2011). Wird NO durch Mikroglia freigesetzt, reagiert es mit Superoxid zu dem toxischen Molekül Peroxynitrit (Übersicht bei Kayva et al., 2006). Die Synthese des NOs erfolgt durch sogenannte nitrit oxide synthases (NOS) aus L-Arginin, Sauerstoff und NADPH. Die NOS finden sich unter anderem im Endothel, den Mitochondrien und Neuronen (Broom et al., 2011). Kommt es zu einer zerebralen Schädigung, wird in einer Vielzahl von Zellen eine induzierbare Form der NOS, die sogenannte iNOS, induziert. Diese induzierbare Form findet sich nur in geschädigten Bereichen des ZNS (Übersicht bei Conti et al., 2007). Unter Annahme einer Neuroinflammation und Schädigung des ZNS im Rahmen des Parkinson-Syndroms ging es in einem ersten Schritt um den Nachweis des Einflusses der GFL-Familie auf die NO-Sekretion. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten eine signifikante Reduktion sowohl der NO-Sekretion, als auch der iNOS-mRNA-Synthese durch alle vier Faktoren der GFL-Familie, wenn die Mikroglia mit LPS und einem der vier Faktoren stimuliert wurden. Die signifikante Reduktion der iNOS-mRNA-Synthese, die nur in geschädigten Gewebe exprimiert wird (Übersicht bei Conti et al., 2007), untermauert den postulierten antiinflammatorischen Effekt der GFL-Familie erstmals auch zellspezifisch für Mikroglia.

Dieser Effekt konnte hierbei erstmals für alle vier Faktoren der GFL-Familie an Mikroglia gezeigt werden. Chang et al. (2006) zeigten jedoch in Untersuchungen mit GDNF an Mikroglia eine leicht erhöhte NO-Sekretion und keinen Einfluss auf die Sekretion von TNF α und IL-1 β . Da Chang et al. die Mikroglia lediglich mit GDNF stimulierten, stehen diese Ergebnisse in Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Auch hier zeigte die alleinige Stimulation mit den GFL-Faktoren teilweise eine leicht erhöhte NO-Sekretion. Somit ist es möglich, dass die alleinige Stimulation mit einem der GFL-Faktoren zu einer veränderten NO-Sekretion führt. Broom et al. (2011) beschrieben kleine Mengen NO als förderlich für die Synapsenbildung und Neurotransmitterfreisetzung, was möglicherweise in nicht geschädigtem Gewebe einen protektiven Effekt darstellt.

4.3 Nachweis von Rezeptoren der Faktoren der GFL-Familie

Mit der Entdeckung des Faktors GDNF 1993 durch Ling et al. begann gleichzeitig die Suche nach dem Rezeptor und dem Signalweg. Eine neuronale Schutzfunktion durch GDNF wurde in vielen Arbeiten belegt, der Rezeptor und der Signalweg blieben aber viele Jahre ein Rätsel. 1996 konnten schließlich mehrere Arbeitsgruppen gleichzeitig den Beweis erbringen, dass das Produkt des c-RET-Onkogens den Rezeptor von GDNF darstellt (Trupp et al., 1996; Durbec et al., 1996). Das RET-Onkogen ist ein in vielen Geweben exprimiertes Gen. Eine Mutation des RET-Onkogens ist unter anderem für den Morbus Hirschsprung, eine Aganglionose des enterischen Nervensystems, (Carlomagno et al., 1996) verantwortlich.

Um seine Wirkung auf eine Zelle zu entfalten, muss ein Molekül der GFL-Familie neben der Bindung an den RET-Rezeptor einen Komplex mit seinen Korezeptoren bilden. Für die vier einzelnen Faktoren der GFL-Faktoren wurde jeweils ein spezifischer Korezeptor entdeckt, der dann die Bindung an den membrangebundenen RET-Rezeptor ermöglicht. So bindet GDNF an GFR- α 1, NTN an GFR- α 2, ATN an GFR- α 3 und PSP an GFR- α 4 (Übersicht bei Airaksinen & Saarma, 2002; Bessalov et al., 2007). Die Rezeptoren mussten auf den Mikroglia nachgewiesen werden, um die Eingangsthese zu bestätigen. Es wurden dazu zwei Verfahren verwendet: die RT-PCR und die immunzytochemische Färbung.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Hilfe der RT-PCR auf RNA-Ebene, mit spezifischen Primern für das Ratten-Genom, der Nachweis der Transkripte des GFR- α -1 und des RET-Rezeptors erbracht werden. Da dieses Verfahren aber nur einen Nachweis auf RNA-Ebene erlaubt, wurden die vollständigen Proteinmoleküle noch zusätzlich mit einer immunzytochemischen Färbung nachgewiesen. Auch hier gelang es, den GFR- α 1- und RET-Rezeptor immunhistochemisch darzustellen. Dazu wurden die Zellen mit einem rezeptorspezifischen Antikörper inkubiert und diese mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Der Nachweis der Rezeptoren gelang dabei sowohl auf nicht stimulierten als auch auf LPS stimulierten Mikroglia.

Die in der primären Mikrogliakultur erzielte Kulturreinheit von 98% spricht für einen spezifischen Nachweis der Rezeptoren. Der Nachweis des GFR- α -1 und RET-Rezeptors auf Mikroglia wurde erstmals durch Honda et al. (1999) erbracht und steht im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Ein Nachweis des GFR- α Korezeptors 2 und 3 konnte in der RT-PCR (Daten sind nicht dargestellt) nicht erbracht werden. Dieses Ergebnis lässt die Frage offen, über welchen Rezeptor NTN, ATN und PSP ihre Wirkung auf die Mikroglia vermitteln. Aus Studien an dopaminergen Neuronen ist jedoch bekannt, dass ein sogenannter „*cross talk*“ zwischen den einzelnen Faktoren und ihren Korezeptoren stattfindet. So sind NTN und ATN nachweislich in der Lage, den GFR- α 1-Korezeptor zu stimulieren (Übersicht bei Airaksinen & Saarna 1999). Eine weitere Möglichkeit der Signaltransduktion ohne einen membranständigen Rezeptor ist der sogenannte „*trans*“- Signalweg der Faktoren der GFL-Familie. Dabei kommt es zu einer Bindung frei löslicher GFR- α -Korezeptor-Moleküle mit einem membranständigen RET-Rezeptor-Molekül (Paratcha et al., 2001). Es ist für Mikroglia nicht abschließend geklärt, über welchen dieser zwei Mechanismen genau die Signaltransduktion erfolgt. Es hat sich aber in dieser Arbeit bestätigt, dass alle vier Faktoren Einfluss auf die sekretorische Funktion der Mikroglia haben und dieser Effekt konnte für NTN, ATN und PSP hier erstmals an Mikrogliazellen gezeigt werden.

4.4 Beeinflussung der mRNA- und Proteinsynthese proinflammatorischer Enzyme und Zytokine

Das Vorhandensein des GDNF-Rezeptorkomplexes auf den Mikroglia und die Reduktion der NO-Sekretion wirft die Frage nach dem Einfluss auf das Sekretionsmuster weiterer, als proinflammatorisch bekannter Mediatoren der Mikroglia auf. Der Befund erhöhter proinflammatorischer Zytokine im Parenchym und Liquor beim Parkinson-Syndrom konnte durch viele Arbeitsgruppen gezeigt werden (Tansey et al., 2007). Im Hinblick auf diese Arbeit konnten von Lui et al. Mikroglia in der Substantia nigra und eine erhöhte Produktion von TNF- α , IL-1 β , IL-6 und iNOS nachgewiesen werden (Liu et al., 2003). Eine aktive Rolle des Enzyms COX-2 in der inflammatorischen Genese des Parkinson-Syndroms konnte von Teismann et al. erbracht werden (Teismann et al., 2003).

Zu Beginn dieser Entdeckung war man davon ausgegangen, dass die Aktivierung der Mikroglia und damit die erhöhten Zytokinspiegel eine Folge des dopaminergen Zelltods sind und somit erst in einem fortgeschrittenen Stadium der Krankheit zu finden sind. Der Zytokinspiegel und die Enzymaktivierung wurden im Folgenden nicht nur bei sporadischen Parkinsonfällen, sondern auch bei künstlich erzeugten Modellen weiter untersucht. Sowohl für das MPTP- als auch das 6-OHDA-Modell konnte eine Erhöhung von IL-1 β , IL-6 (nur MPTP Modell), TNF- α , iNOS (Ciesielska et al., 2003), COX-2 (nur MPTP Modell) (Teismann

et al., 2003) und Teilen des NADPH Komplexes (Zhang et al., 2004) gezeigt werden. Diese Entdeckung, beobachtet in einer frühen Phase der Erkrankung und meist noch vor dem Auftreten neurodegenerativer Veränderungen, hat zu einem Umdenken geführt. Es wird heute davon ausgegangen, dass die durch Mikroglia produzierten Faktoren in der frühen Phase der dopaminergen Neurodegeneration eine aktive Rolle spielen und nicht Folge derer sind. Mit dem Wissen um diese inflammatorische Komponente der aktivierten Mikroglia in der Pathogenese des Parkinson-Syndroms kann eine Reduktion sowohl der Enzym- und Zytokinproduktion als auch der NO-Produktion einen indirekten neuroprotektiven Effekt durch eine verminderte inflammatorische Aktivität darstellen. Mittels PET-Analyse ließen sich selektiv aktivierte Mikroglia bei Parkinson-Patienten im Bereich der Substantia nigra nachweisen (Ouchi et al., 2005). Mit der Vermutung, dass gerade diese aktivierten Mikroglia in der Lage sind, außer den beschriebenen Enzymen und Zytokinen eine Großzahl an Sauerstoffradikalen zu produzieren, die dann wiederum für den oxidativen Stress und somit den Untergang der dopaminergen Neurone verantwortlich sind (Jenner et al., 2003), stellen die Mikroglia einen therapeutischen Angriffspunkt dar.

Nach der Stimulation mit LPS und der Zugabe der Faktoren konnte hier in *realtime* RT-PCRs eine quantitative Bestimmung von proinflammatorischer Enzym- und Zytokin-RNA vorgenommen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass alle vier Faktoren der GFL-Familie in der Lage sind, das Expressionmuster zu beeinflussen. Es ließ sich eine signifikante Reduktion der mRNA-Synthese für iNOS, COX-2, IL-6, TNF- α und IL-1 β zeigen. Bis auf die Expression der IL-1 β -mRNA durch ATN konnte eine signifikante Reduktion der mRNA der beiden untersuchten Enzyme iNOS und COX-2 und der drei Zytokine IL-6, TNF- α und IL-1 β durch alle vier Faktoren nachgewiesen werden. Auch die Expression auf Proteinebene von IL-6 und TNF- α im Zellkulturmediumüberstand, untersucht mittels Sandwich-ELISA, zeigte für eine 24-stündige Stimulation erstmals signifikante Ergebnisse für alle vier Faktoren. Die Beeinflussung der Proteinexpression bei nur 6 Stunden Stimulationszeit führte nicht bei allen Faktoren zu einer signifikanten Reduktion. Da nach 24 Stunden hingegen alle Faktoren eine signifikante Reduktion aufwiesen, scheint die Inkubationsdauer mit den Faktoren der GFL-Familie für eine Beeinflussung der Proteinexpression von entscheidender Bedeutung zu sein. Neue Untersuchungen haben *in vitro* gezeigt, dass TNF- α ein wichtiger neurotoxischer Mediator in künstlich erzeugten Parkinsonmodellen ist (McCoy et al., 2011). Dies unterstützt den hier postulierten antiinflammatorischen Effekt durch die GFL-Familie. Die Zusammenschau der oben aufgeführten Befunde führt zu folgenden zentralen Merkmalen: Sowohl beim sporadischen als auch experimentell erzeugten Parkinson-Syndrom gibt es erhöhte Spiegel von unter anderem als neurotoxisch bekannten Zytokinen. Es zeigte sich außer der erhöhten Produktion potentiell toxischer Substanzen eine erhöhte mikrogliale Aktivität in der Substantia nigra zu einem frühen Krankheitszeitpunkt. Durch die Inkubation

mit den Faktoren der GFL-Familie war es möglich, die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene signifikant zu reduzieren.

4.5 Die Beeinflussung intrazellulärer Signalwege durch die GFL-Faktoren

Die genaue Funktion des Faktor /GFR- α / RET-Signalweges wurde an Mikroglia zum jetzigen Zeitpunkt nur wenig untersucht (Chang et al., 2006). Nach der Komplexbildung der Rezeptoren kommt es zur Autophosphorylierung des RET-Rezeptors und in der Folge unter anderem zu einer Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), der ERK 1/2, der PI3K und der PLC γ (Übersicht bei Airaksinen & Saarma, 2002). Die Hauptwirkung, die durch die Bindung des Faktoren/Rezeptor-Komplexes ausgelöst wird, ist dabei eine Veränderung der Gentranskription (Jongen et al., 2005). Eine Vielzahl an zellulären Reaktionen der Mikroglia ist durch MAP-Kinasen reguliert. So sind sie unter anderem gerade an der Zytokinexpression (Hanisch et al., 2001) und NO-Produktion beteiligt (Übersicht bei Pocock, 2001).

In dieser Arbeit konnte für jeden der vier Faktoren exemplarisch die Beeinflussung des MAPK-Signalweges im Sinne einer verminderten Aktivität dargestellt werden. Eine reduzierte Aktivierung des MAPK Signalweges kann somit verantwortlich sein für die reduzierten Zytokinspiegel. Durch die vermehrte Zytokinproduktion und Enzyminduktion kommt es in der neuroinflammatorischen Situation zu einer gesteigerten NO-Produktion (Hunot et al., 1999). NO steigert wiederum die Zytokinproduktion der Mikroglia, was letztlich zum neuronalen Zelltod führen kann, da NO in hohen Dosen zelltoxisch wirkt (Übersicht bei Kettenmann et al., 2011).

4.6 Klinische Anwendung der GFL-Faktoren-Familie

Nach Entdeckung des protektiven Effekts der GFL-Faktoren auf dopaminerge Neurone kam die Hoffnung auf, eine neue Therapie des Parkinson-Syndroms gefunden zu haben. Nach Jahren der Forschung und ersten klinischen Studien zeigt sich ein nur mäßiger Erfolg. Die zum Teil schweren Nebenwirkungen und vor allem die Unzulänglichkeiten in der Applikation machen zum jetzigen Zeitpunkt eine Therapie mit GDNF oder anderen Faktoren aus der GFL-Familie unmöglich. Trotz dieser Hürden konnte in ersten klinischen Tests eine signifikante Verbesserung klinischer Symptome nach intraputaminaler Infusion gezeigt werden (Gill et al., 2003; Patel et al., 2005), auch wenn diese Daten durch das Auftreten schwerer Nebenwirkungen und eines verminderten klinischen Nutzens in neueren Studien in Frage gestellt werden (Lang et al., 2006). Nach insgesamt vier klinischen Studien ergeben sich vor allem Fragen nach einer besseren Verfügbarkeit von GDNF im Bereich der Substantia nigra. NTN wurde ähnlich wie GDNF aufgrund der bisher erhobenen Befunde für

klinische Studien an Patienten mit fortgeschrittenem Parkinson-Syndrom eingesetzt. Für NTN wurde eine doppelt-blinde randomisierte klinische Studie mit insgesamt 58 Patienten durchgeführt. Hierbei wurde in einer neurochirurgischen Operation den Patienten entweder NTN oder ein Placebo ins Putamen infundiert. Die Patienten wurden mittels eines Motorikscores für die folgenden zwölf Monate beobachtet. Es konnte dabei keine signifikante Verbesserung der klinischen Symptomatik festgestellt werden, was die Autoren ebenfalls auf eine nur mäßige Applikation von NTN im Bereich der Substantia nigra zurück führen (Marks et al., 2010). Da vor allem die schwierige Applikation der Faktoren im Bereich der Substantia nigra als Hauptproblem gesehen wird, bleibt abzuwarten, ob dieses mit Hilfe mikrobiologischer oder gentechnischer Verfahren überwunden werden kann und die neurotrophen Faktoren ihre protektive Wirkung voll entfalten können. So stellt sich die Frage, ob außer diesen vier bisher identifizierten Faktoren noch weitere Mitglieder der Faktorenfamilie existieren. Durch die Entdeckung eines weiteren neurotrophen Faktors für dopaminerge Neurone, des „*conserved dopamine neurotrophic factor*“ (CDNF), der dem humanen „*mesencephalic-astrocyte-derived-neurotrophic-factor*“ (MANF) entspricht (Lindholm et al., 2007), besteht weiter die Hoffnung, in den neurotrophen Faktoren dopaminergischer Neurone eine Therapiemöglichkeit des Parkinson-Syndroms gefunden zu haben.

5. Zusammenfassung

Die Mikroglia ist im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus gelangt. Bis heute ist nicht abschließend geklärt, ob die Aktivierung der Mikroglia und damit die proinflammatorische Aktivität die Ursache für den degenerativen Prozess ist oder eine Folge dessen. Unbestritten ist jedoch, dass die Mikroglia durch ihre inflammatorische Aktivität Anteil an der Pathogenese dieser Erkrankungen hat. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Rezeptoren der GDNF-Faktoren-Familie und eine antiinflammatorische Wirkung der GDNF-Faktoren-Familie auf Mikroglia nachzuweisen. Hierzu wurden Versuche an einer primären Mikroglia-Kultur durchgeführt.

Unter Annahme einer Neuroinflammation und Schädigung des ZNS im Rahmen des Parkinson-Syndroms ging es in einem ersten Schritt um den Nachweis des Einflusses der GFL-Familie auf die NO-Sekretion. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten eine signifikante Reduktion sowohl der NO-Sekretion, als auch der iNOS-mRNA-Synthese durch alle vier Faktoren der GFL-Familie, wenn die Mikroglia mit LPS und einem der vier Faktoren stimuliert wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Hilfe der RT-PCR auf RNA-Ebene der Nachweis der Transkripte des GFR- α -1 und des RET-Rezeptors erbracht werden. Darüber hinaus gelang es, den GFR- α 1- und RET-Rezeptor immunhistochemisch darzustellen. Nach dem Nachweis des GDNF/RET-Rezeptorkomplexes und dem Nachweis einer veränderten NO- und iNOS-mRNA-Produktion ging es im Folgenden darum, die Beeinflussung der proinflammatorischen Aktivität der Mikroglia durch die GFL-Faktoren nachzuweisen. Nach der Stimulation mit LPS und der Zugabe der Faktoren konnte hier in *realtime* RT-PCRs eine quantitative Bestimmung von proinflammatorischer Enzym- und Zytokin-RNA vorgenommen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass alle vier Faktoren der GFL-Familie in der Lage sind, das Expressionmuster zu beeinflussen. Es ließ sich eine signifikante Reduktion der mRNA-Synthese für iNOS, COX-2, IL-6, TNF- α und IL-1 β zeigen. Bis auf die Expression der IL-1 β -mRNA durch ATN konnte eine signifikante Reduktion der mRNA der beiden untersuchten Enzyme iNOS und COX-2 und der drei Zytokine IL-6, TNF- α und IL-1 β durch alle vier Faktoren nachgewiesen werden. Auch die Expression auf Proteinebene von IL-6 und TNF- α im Zellkulturmediumüberstand, untersucht mittels Sandwich-ELISA, zeigte für eine 24-stündige Stimulation erstmals signifikante Ergebnisse für alle vier Faktoren. In einem letzten Schritt dieser Arbeit konnte für jeden der vier Faktoren exemplarisch die Beeinflussung des MAPK-Signalweges im Sinne einer verminderten Aktivität dargestellt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise darauf, dass die Faktoren der GFL-Familie nicht nur einen Effekt auf Neurone haben, sondern auch die Mikroglia beeinflussen. Bisher liegen nur unzureichende Untersuchungen in Bezug auf Mikroglia und die Faktoren der

GDNF-Faktoren-Familie vor. Honda et al. (1999) konnten zwar den GFR- α 1 und RET-Rezeptor nachweisen, doch blieb der genaue Einfluss der GFL-Faktoren auf Mikroglia offen. Für alle aufgestellten Thesen dieser Arbeit ließen sich positive Ergebnisse aufstellen. Der GFR- α 1- und Ret-Rezeptor waren nachweisbar und das Enzym- und Zytokinexpressionsmuster wurde signifikant, im Sinne einer Neuroprotektion, verändert. Auch wurden nachgeschaltete Signalwege beeinflusst. Erstmals konnte der Einfluss aller vier Faktoren auf die Mikroglia gezeigt werden. Da vor allem GDNF im Fokus als mögliche Therapie des Parkinson-Syndroms steht, bleibt abzuwarten, ob nicht NTN, ATN oder PSP dem GDNF hinsichtlich der neurotrophen Wirkung und des Nebenwirkungsprofils überlegen sind. Neue Ansätze, die bereits im Tiermodell erforscht werden, nutzen virale Vektoren oder beschäftigen sich mit der Möglichkeit, über modifizierte Stammzellen und Mikrosphären eine gezielte Substitution mit Faktoren der GDNF-Faktoren-Familie zu ermöglichen (Übersicht bei Aron et al., 2011). Darüberhinaus müssen der Effekt dieser neurotrophen Faktoren auf andere Neuronensubpopulationen und die Folgen einer Langzeitanwendung untersucht werden (Übersicht bei Aron et al., 2011). Ob die vier Faktoren der GFL-Familie letztlich den *Circulus vitiosus* aus Zelltod und Aktivierung durchbrechen können und eine klinische Anwendung finden, bleibt offen. Außerdem bleibt abzuwarten, ob es möglich sein wird, sich diese zellselektive antiinflammatorische Wirkung der Faktoren auf Mikroglia zu Nutze zu machen. Die Forschung mit viralen Vektoren und Mikrosphären für eine gezielte Applikation lässt diesen Weg offen. Das Potential scheint aufgrund der zerstörerischen Potenz der Mikroglia zu einem frühen Zeitpunkt in der Pathogenese des Parkinson-Syndroms gegeben. Durch die verbesserte Diagnostik haben gerade Substanzen, die die Mikroglia durch einen frühen Therapiebeginn hemmen, möglicherweise einen positiven Einfluss auf den Verlauf und die Progredienz neurodegenerativer Erkrankungen.

6. Literatur

Airaksinen M.S., Titievsky A., Saarma M. GDNF family neurotrophic factor signalling: four masters, one servant? *Mol. Cell. Neurosci.* 1999; 13: 313-325.

Airaksinen M.S., Saarma M. The GDNF Family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat. Rev. Neurosci.* 2002; 3: 383-394.

Anderson J.K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat. Med.* 2004; 10: 18-25.

Aron L., Klein R. Repairing the parkinsonian brain with neurotrophic factors. *Trends Neurosci.* 2011; 34: 88-100.

Banati R.B., Gehrmann J., Schubert P., Kreutzberg G.W. Cytotoxicity of microglia. *Glia* 1993; 7: 111-118.

Banati R.B., Daniel S.E., Blunt S.B. Glial pathology in absence of apoptotic nigral neurons in long-standing Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 1998; 13: 221-227.

Barroso-Chinea P., Cruz-Muros I., Aymerich M.S., Rodriguez-Diaz M., Afonso-Oramas D., Lanciego J., Gonzales-Hernandez T. Striatal expression of GDNF and differential vulnerability of midbrain dopaminergic neurons. *Eur. J. Neurosci.* 2005; 21: 1815-1827.

Bespalov M.M., Saarma M. GDNF family receptor complexes are emerging drug targets. *Trends Pharmacol. Sci.* 2007; 2: 68-74.

Bessler H., Djaldetti R., Salman H., Bergmann M., Djaldetti M. IL-1beta, IL-2, IL-6 and TNF- α production by peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson's disease. *Biomed. Pharmacother.* 1999; 53: 141-145.

Betarbet R., Sherer T.B., MacKenzie G., Garcia-Osuna M., Panov A.V., Greenamyre J.T. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 2000; 3: 1301-1306.

Boka G., Anglade P., Wallach D., Javoy-Agid F., Agid Y., Hirsch E.C. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptor in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 1994; 172: 151-154.

Bonifati V., Rizzu P., van Baren M.J., Schaap O., Breedveld G.J., Krieger E., Dekker M.C., Squiteri F., Ibanez P., Joesse M., van Dongen J.W., Vanacore N., van Swieten J.C., Brice A., Meco G., van Duijn C.M., Oostra B.A., Heutink P. Mutations in DJ-1 Gen associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 2003; 299: 256-259.

Bower J.H., Maraganore D.M., McDonell S.K., Rocca W.A. Incidence and distribution of parkinsonism in Olmsted Country, Minnesota 1979-1990. *Neurology* 1999; 52: 1214-1220.

Braak H., Del Tredici K., Rub U., de Vos R.A., Jansen Steur E.N., Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson disease. *Neurobiol. Aging* 2003; 24: 197-211.

Breydo L., Wu J.W., Uversky V.N. α -Synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 2011.

- Broom L., Marinova-Mutafchieva L., Sadeghian M., Davis J.B., Medhurst A.D. Neuroprotection by the selective iNOS inhibitor GW274150 in a model of Parkinson disease. *Free Radic. Biol. Med.* 2011; 50: 633-640.
- Carlomagno F., De Vita G., Berlingieri M.T., de Franciscis V., Melillo R.M., Colantuoni V., Krauss M.H., Di Fiore P.P., Fusco A., Santoro M. Molecular heterogeneity of RET loss of function in Hirschsprung's disease. *EMBO J.* 1996; 15: 2177-2185.
- Cho B.P., Song D.Y., Sugama S., Shin D.H., Shimizu Y., Kim S.S., Kim Y.S., Joh T.H. Pathological dynamics of activated microglia following medial forebrain bundle transection. *Glia* 2006; 53: 92-102.
- Chung K.K., Dawson V.L., Dawson T.M. The role of the ubiquitin-proteasomal pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 2001; 24: 7-14.
- Ciechanover A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2005; 6: 79-87.
- Ciesielska A., Joniec I., Przybylkowski A., Gromadzka G., Kurkowska-Jastrzebska I., Członkowska A., Członkowski A. Dynamics of expression of the mRNA for cytokines and inducible nitric synthase in a murine model of the Parkinson's disease. *Acta Neurobiol. Exp.* 2003; 63: 117-126.
- Chang Y.P., Fang K.M., Lee T.I., Tzeng S.F. Regulation of microglial activities by glial cell line derived neurotrophic factor. *J. Cell. Biochem.* 2006; 97: 501-511.
- Cole N.B., Murphy D.D. The cell biology of alpha synuclein: a sticky problem? *Neuromolecular Med.* 2002; 1: 95-109.
- Conti A., Miscusi M., Cardali S., Germanò A., Suzuki H., Cuzzocrea S., Tomasello F. Nitric oxide in the injured spinal cord: Synthases cross-talk, oxidative stress and inflammation. *Brain Research Reviews* 2007; 54: 205-218.
- Conway K.A., Lee S.J., Rochet J.R., Ding T.T., Williamson R.E., Lansbury P.T. Jr. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: Implications for pathogenesis and therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000; 97: 571-576.
- Conway K.A., Rochet J.C., Bieganski R.M., Lansbury P.T. Jr. Kinetic stability of the alpha synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science* 2001; 294: 1346-1349.
- Cook C., Petrucelli L. A critical evaluation of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *J. Neural. Transm.* 2010; 117: 971-979.
- Cooksen M.R. The biochemistry of Parkinson's disease. *Annu. Rev. Biochem.* 2005; 74: 29-52.
- Davalos D., Grutzendler J., Yang G., Kim J.V., Zuo Y., Jung S., Littman D.R., Dustin M.L., Gan W.B. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury *in vivo*. *Nat. Neurosci.* 2005; 8: 752-758.
- Del Rio Hortega P. El 'tercer elemento' de los centros nerviosos Poder fagocitario y movilidad de la microglia. *Bol. Soc. Esp. Biol.* Año 1919; ix: 154-166.

Durbec P., Marco-Gutierrez C.V., Kilkenny J., Grigoriou M., Wartowaara K., Suvanto P., Smith D., Ponder B., Costantini F., Saarma M., Sariola H., Pachnis V. GDNF signalling through the RET receptor tyrosine kinase. *Nature* 1996; 381: 789-793.

Enochs W.S., Sarna T., Zecca L., Riley P.A., Swartz H.M. The roles of neuromelanin, binding of metal ions, and oxidative cytotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease: a hypothesis. *J. Neural. Transm. Park. Dis. Dement. Sect.* 1994; 7: 83-100.

Fahn S., Prezdborski S. *Parkinsonism Rowland LP Merrit's neurology*. Lippincott Williams & Wilkins, New York pp 679-693.

Fink A. The aggregation and fibrillation of α -Synuclein. *Acc. Chem. Res.* 2006; 39: 628-634.

Flugel A., Schwaiger F.W., Neumann H., Medana I., Willem M., Wekerle H., Kreutzberg G.W., Graeber M.B. Neuronal FasL induces cell death of encephalitogenic T-lymphocytes. *Brain Pathol.* 2000; 10: 353-364.

Forno L.S., Langston J.W., DeLanney L.E., Irwin I., Ricaurte G.A. Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys. *Ann. Neurol.* 1986; 20: 449-455.

Gao H.M., Liu B, Zhang W., Hong J.S. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 2003; 24: 395-401.

Ghandi S., Wood N. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 2005; 17: 2749-2755.

Giasson B.I., Duda J.E., Murray I.V., Chen Q., Souza J.M., Hurtig H.I., Ischiropoulos H., Trojanowski J.Q., Lee V.M. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* 2000; 290: 985-989.

Giasson B.I., Murray I.V., Trojanowski J.Q., Lee V.M. A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha synuclein is essential for filament assembly. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 2380-2386.

Gill S.S., Patel N.K., Hotton G.R., O'Sullivan K., McCarter R., Bunnage M., Brooks D.J., Svendsen C.N., Heywood P. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat. Med.* 2003; 9: 589-595.

Goldberg M.S., Lansbury P.T. Is there a cause-and-effect relationship between α -synuclein fibrillization and Parkinson's disease? *Nat. Cell. Biol.* 2000; 2: 115-119.

Goldberg A.L., Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins, *Nature* 2003; 426: 895-899.

Griffin G.E., Leung T.M., Folks S., Kunkel G.J. Activation of HIV gene expression during monocyte differentiation by induction of NF-kappa B. *Nature* 1989; 339: 70-73.

Hamilton J.F. Heparin coinjection during convection enhanced delivery (CED) increases the distribution of the glial cell line neurotrophic factor (GDNF) ligand family in rat striatum and enhances the pharmacological activity of neurturin. *Exp. Neurol.* 2001; 168: 155-161.

Hanisch U.K., Prinz M., Angstwurm K., Hausler K.G., Kann O., Kettenmann H., Weber J.R. The protein tyrosine kinase inhibitor AG126 prevents the massive microglial cytokine induction by pneumococcal cell walls. *Eur. J. Immunol.* 2001; 31: 2104-2115.

Hartmann A., Mouatt-Prigent A., Faucheux B.A., Agid Y., Hirsch E.C. FADD: a link between TNF family receptors and caspases in Parkinson's disease. *Neurology* 2002; 22: 308-310.

Hayes G.M., Woodroffe M.N., Cuzner M.L. Characterisation of microglia isolated from adult human and rat brain. *J. Neuroimmunol.* 1988; 19: 177-189.

Heuckeroth R.O., Lampe P., Johnson E.M., Milbrandt J. Neurturin and GDNF promote proliferation and survival of enteric neuron and glial progenitors *in vitro*. *Dev. Biol.* 1998; 200: 116-129.

Hoek R.M., Ruuls S.R., Murphy C.A., Wright G.J., Goddard R., Zurawski S.M., Blom B., Homola M.E., Streit W.J., Brown M.H., Barclay A.N., Sedgwick J.D. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science* 2000; 290: 1768-1771.

Honda S., Nakajima K., Nakamura Y., Imai Y., Kohsaka S.
Rat primary cultured microglia express glial cell line-derived neurotrophic factor receptors. *Neurosci. Lett.* 1999; 275 :203-206.

Hunot S., Dugas N., Faucheux B., Hartmann A., Tardieu M., Debre P., Agid Y., Dugas B., Hirsch E.C. FcEpsilon II/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, *in vitro*, production of nitric oxide and tumor necrosis factor alpha in glial cells. *J. Neurosci.* 1999; 19: 3440-3447.

Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 2003; 57: 26-36.

Jing S., Wen D., Yu Y., Holst P., Lou Y., Fang M., Tamir R., Antonio L., Hu Z., Cupples R., Louis J.C., Hu S., Altrock B.W., Fox G.M. GDNF induced activation of the RET protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR α , a novel receptor for GDNF. *Cell* 1996; 85: 1113-1124.

Jongen J., Haasdijk E.D., Sabel-Goedknecht H., van der Burg J., Vecht Ch J., Holstege J.C. Intrathecal injection of GDNF and BDNF induces immediate early gene expression in rat spinal dorsal horn. *Exp. Neurol.* 2005; 194, 255-266.

Kalehua A.N., Taub D.D., Baskar P.V., Hengemihle J., Munoz J., Trambadia M., Speer D.L., De Simoni M.G., Ingram D.K. Aged mice exhibit greater mortality concomitant to increased brain and plasma TNF- α levels following intracerebroventricular injection of lipopolysaccharide. *Gerontology* 2000; 46: 115-128.

Kalous A., Osborne P.B., Keast J.R. Acute and chronic changes in dorsal horn innervation by primary afferents and descending supraspinal pathways after spinal cord injury. *J. Comp. Neurol.* 2007; 503: 238-253.

Katzenschlager R., Head J., Schrag A., Ben-Sholmo Y., Evans A., Lees A. Fourteen year final report of the randomized PDRG-UK trial comparing three initial treatments in PD. *Neurology* 2008; 71: 474-480.

Kavya R., Saluja R., Singh S., Dikshit M. Nitric oxide synthase regulation and diversity: implications in Parkinson's disease Review. *Nitric Oxide* 2006; 15: 280-294.

Keller J.N., Dimayuga E., Chen Q., Thorpe J., Gee J., Ding Q. Autophagy, proteasoms, lipofuscin and oxidative stress in the Aging brain. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2004; 36: 2376-2391.

- Kettenmann H., Hanisch U.K., Noda M., Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol. Rev.* 2011; 91: 461–553.
- Kitada T., Asakawa S., Hattori N., Matsumine H., Yamamura Y., Minoshima S., Yokochi M., Mizuno Y., Shimizu N. Mutations in parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998; 392: 605-608.
- Lang A., Gill S., Patel N.K., Lozano A., Nutt J.G., Penn R., Brooks D.J., Hotton G., Moro E., Heywood P., Brodsky M.A., Burchiel K., Kelly P., Dalvi A., Scott B., Stacy M., Turner D., Wooten V.G., Elias W.J., Laws E.R., Dhawan V., Stoessl A.J., Matcham J., Coffey R.J., Traub M. Randomized controlled trial of intraputamin glial cell line derived neurotrophic factor in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 2006; 59: 459-466.
- Ledda F., Paratcha G., Sandoval-Guzman T., Ibanez C.F. GDNF and GFR- α 1 promote formation of neuronal synapses by ligand –induced cell adhesion. *Nat. Neurosci.* 2007; 10: 293-300.
- Ledda F., Bieraugl O., Fard S.S., Vilar M., Paratcha G. LRIG 1 is an endogenous inhibitor of RET receptor tyrosine kinase activation, downstream signaling, and biological responses to GDNF. *J. Neurosci.* 2008; 28: 39-49.
- Lees A., Hardy J., Revesz T. Parkinson's disease Review. *Lancet* 2009; 373: 2055-2066.
- Leroy E., Boyer R., Auburger G., Leube B., Ulm G., Mezey E., Harta G., Brownstein M.J., Jonnagada S., Chemova T., Dehejia A., Lavedan C., Gasser T., Steinbach P.J., Wilkinson K.D., Polymeropoulos M.H. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 1998; 395: 451-452.
- Li L., Su Y., Zhao C., Zhao H., Liu G., Wang J., Xu Q. The role of RET receptor tyrosine kinase in dopaminergic neuron development. *Neuroscience* 2006; 142: 391-400.
- Lin L.F., Doherty D.H., Lile D.H., Bektesh S., Collins F. GDNF: A glial line cell-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 1993; 260: 1130-1132.
- Lindholm P., Voutilainen M.H., Lauren J., Peränen J., Leppänen V.M., Andressoo J.O., Lindahl M., Janhunen S., Kalkkinen N., Timmusk T., Touminen R.K., Saarma M. Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain neurons *in vivo*. *Nature* 2007; 448: 73-77.
- Ling E.A. Light and electron microscopic demonstration of some lysosomal enzymes in the amoeboid microglia in neonatal rat brain. *J. Anat.* 1977; 123: 637-648.
- Liu B., Gao H.M., Honh J.S. Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries. *Environ. Health Perspect.* 2003; 111: 1064-1065.
- Mata I.F., Lockhart P.J., Farrer M.J. Parkin genetics: one model for Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 2004; 13: 127-133.
- Mattiace L.A., Davies P., Dickson D.W. Detection of HLA-DR on microglia in the human brain is a function of both clinical and technical factors. *Am. J. Pathol.* 1990; 136: 1101-1114.
- Marks W.J. Jr., Bartus R.T., Siffert J., Davis C.S., Lozano A., Boulis N., Vitek J., Stacy M., Turner D., Verhagen L., Bakay R., Watts R., Guthrie B., Jankovic J., Simpson R., Tagliati M., Alterman R., Stern M., Baltuch G., Starr P.A., Larson P.S., Ostrem J.L., Nutt J., Kiebertz K.,

- Kordower J.H., Olanow C.W. Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol.* 2010; 9: 1164-1172.
- McCoy M.K., Ruhn K.A., Blesch A., Tansey M.G. TNF: a key neuroinflammatory mediator of neurotoxicity and neurodegeneration in models of Parkinson's disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2011; 691: 539-540.
- McGeer P.L., Itagaki S., Tago H., McGeer E.G. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's diseases brains. *Neurology* 1988; 38: 1285-1291.
- McGeer P.L., McGeer E.G. Glial Reactions in Parkinson's disease, *Mov. Disord.* 2008; 23: 474-483.
- Mirza B., Hadberg H., Thomsen P., Moos T. The absence of reactive astrocytosis is a indicator of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. *Neuroscience* 2000; 95: 425-432.
- Moore M.W., Klein R. D., Farinas I., Sauer H., Armanini M., Phillips H. Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature* 1996; 382: 76-79.
- Napoli I., Neumann H., Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience* 2008; 158: 1030-1038.
- Nazanin F., Dolatshad A., Silva A., Saffrey M.J. Identification of GFR- α 2 isoforms in myenteric plexus of postnatal and adult rat intestine. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2002; 107: 32-38.
- Nimmerjahn A., Kirchhoff F., Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma *in vivo*. *Science* 2005; 308: 1314-1318.
- O'Callaghan J.P., Miller D.B., Reinhard J.F. Jr. Characterization of the origins of astrocyte response to injury using the dopaminergic neurotoxicant, MPTP. *Brain. Res.* 1990; 521: 73-80.
- Ouchi Y., Yoshikawa E., Sekine Y., Futatsubashi M., Kanno T., Ogosu T., Torizuka T. Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 2005; 57: 168-175.
- Paratcha G., Ledda F., Baars L., Couplier M., Besset V., Anders J. Released GFR- α 1 potentiates downstream signalling, neuronal survival, and differentiation via a novel mechanism of recruitment of c-RET to lipid rafts. *Neuron* 2001; 29: 171-184.
- Parkinson J. An Essay on the Shaking Palsy. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 2002; 14: 223-236.
- Patel N.K., Bunnage M., Plaha P., Svendsen C.N., Heywood P., Gill S.S. Intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in PD: a two-year outcome study. *Ann. Neurol.* 2005; 57: 298-302.
- Perry V.H. A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *J. Neuroimmunol.* 1998; 90: 113-121.

Pocock J.M., Liddle A.C. Microglial signalling cascades in neurodegenerative disease. *Prog. Brain Res.* 2001; 132: 555-565.

Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E., Ide S.E., Dehejia A., Dutra A., Pike B., Root H., Rubenstein J., Boyer R., Stenroos E.S., Chandrasekharappa S., Athanassiadou A., Papapetropoulos T., Johnson W.G., Lazzarini A.M., Duvoisin R.C., Di Lorio G., Golbe L.I., Nussbaum R.L. Mutations in the alpha synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276: 2045-2047.

Qian L., Flood P.M., Hong J.S. Neuroinflammation is a key player in Parkinson's disease and a prime target for therapy. *J. Neural. Transm.* 2010, 117: 971-979.

Richardson A., Hao C., Fedoroff S. Microglia progenitor cells: a subpopulation in cultures of mouse neopallial astroglia. *Glia* 1993; 7: 25-33.

Runeberg-Roos P., Saarma M. Neurotrophic factor receptor RET: structure, cell biology, and inherited diseases Review. *Ann. Med.* 2007; 39: 572-580.

Senuik N.A., Tatton W.G., Greenwood C.E. Dose dependent destruction of the coeruleus-cortical and nigral-striatal projections by MPTP. *Brain Res.* 1990; 527: 7-20.

Sian J., Dexter D.T., Lees A.J., Daniel S., Agid Y., Javoy-Agid F., Jenner P., Marsden C.D. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann. Neurol.* 1994; 36: 348-355.

Stöver T., Tzy-Wen L.G., Younsook C., Altschuler R., Lomax I., Expression of the GDNF family members and their receptors in the mature rat cochlea. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2000; 76; 25-35.

Spillantini M.G., Crowther R.A., Jakes R., Hasegawa M., Goedert M. Alpha synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998; 95: 6469-6473.

Sugama S., Cho B.P., Degiorgio I.A., Shimizu Y., Kim S.S., Kim Y.S., Shin D.H., Volpe B.T., Reis D.J., Cho S., Joh T.H. Temporal and sequential analysis of microglia in the substantia nigra following medial forebrain bundle axotomy in rat. *Neuroscience* 2003; 116: 925-933.

Takshashi M. The GDNF/RET signal pathway and human diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001; 12: 361-373.

Tan J., Town T., Paris D., Mori T., Suo Z., Crawford F., Mattson M.P., Flavell R.A., Mullan M. Microglial activation resulting from CD40-CD40L interaction after beta amyloid stimulation. *Science* 1999; 286: 2352-2355.

Tansey M.G., McCoy M.K., Frank-Cannon T.C. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease. Potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Exp. Neurol.* 2007; 208: 1-25.

Teismann P., Tieu K., Choi D.K., Wu D.C., Naini A., Hunot S., Vila M., Jackson-Lewis V., Przedborski S. Cyclooxygenase 2 is instrumental in Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003; 100: 5473-5478.

Treanor J., Goodman L., de Sauvage F., Stone D.M., Poulsen K.T., Beck C.D., Gray C., Armanini M.P., Pollock R.A., Hefti F., Phillips H.S., Goddard A., Moore M.W., Buj-Bello A.,

Davies A.M., Asai N., Takahashi M., Vandlen R., Henderson C.E., Rosenthal A. Characterization of multicomponent receptor for GDNF. *Nature* 1996; 382: 80-83.

Trupp M., Arenas E., Fainzilber M., Nilson A., Sieber B. A., Grigoriou M., Kilkenny C., Salazar-Gruesso E., Pachnis V., Arumäe U. Functional receptor for GDNF encoded by the c-RET proto-oncogen. *Nature* 1996; 381: 785-789.

Tsui-Pierchala B.A., Ahrens R.C., Crowder R.J., Milbrandt J., Johnson E.M. Jr. The long and short isoforms of RET function as independent signalling complexes. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 34618-34625.

Uversky V.N., Fink A.I. Amino acid determinants of alpha synuclein aggregation: putting together pieces of the puzzle. *FEBS Lett.* 2002; 522: 9-13.

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

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

Wilms H., Sievers J., Rickert U., Rostami-Yazdi M., Mrowietz U., Lucius R. Dimethylfumarate inhibits microglial and astrocytic inflammation by suppressing the synthesis of nitric oxide, IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 in an in-vitro model of brain inflammation. *J. Neuroinflammation.* 2010; 7: 30.

Wollmer M.A., Lucius R., Wilms H., Held-Feindt J., Sievers J., Mentlein R. ATP and adenosine induce ramification of microglia *in vitro*. *J. Neuroimmunol.* 2001; 115: 19-27.

Yoon S., Tong H.J. Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp. Mol. Med.* 2006; 38: 333-347.

Zhang W., Wang T., Qin L., Gao H.M., Wilson B., Ali S.F., Zhang W., Hong J.S., Liu B. Neuroprotective effect of dextromethorphan in the MPTP Parkinson's disease model: role of NADPH oxidase. *FASEB J.* 2004; 18: 589-591.

Zhang W., Wang T., Oei Z., Miller D.S., Wu X., Block M.L., Wilson B., Zhou Y., Hong J.S., Zhang J. Aggregated α -synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J.* 2005; 19: 533-542.

Zimperich A., Biskup S., Leitner P., Lichtner P., Farrer M., Lincoln S., Kachergus J., Hulihan M., Uitti R.J., Calne D.B., Stoessl A.J., Pfeiffer R.F., Patenge N., Carbajal I.C., Vieregge P., Asmus F., Müller-Mysok B., Dickson D.W., Meitinger T., Strom T.M., Wszolek Z.K., Gasser T. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 2004; 44: 601-607.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Lucius für die Überlassung des interessanten Themas und die stets nette und hervorragende wissenschaftliche Betreuung meiner thematischen Fragestellung. Bedanken möchte ich mich auch bei dem Direktorium des Anatomischen Institutes der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Prof. Dr. J. Sievers; Prof. Dr. R. Lucius und Prof. Dr. Dr. M. Schünke, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Möglichkeit, diese Arbeit am Kieler Institut für Anatomie durchführen zu dürfen. Ein großer Dank gilt Frau Uta Rickert für die vielen Korrekturen und wertvollen Anmerkungen und die Unterstützung beim Schreiben dieser Arbeit. Danken möchte ich an dieser Stelle auch Gerald Fortmann, einem gutem Freund, für die unzähligen Korrekturen dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau R. Sprang und Frau R. Worm für ihre wertvolle Unterstützung und Weitergabe ihrer Erfahrungen im Labor, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn C. Franke für seine kreativen Hilfestellungen bei den schematischen Abbildungen.

Danken möchte ich an dieser Stelle auch meinen Eltern, die mich immer vorbehaltlos unterstützt haben und es mir erst ermöglicht haben, dieses Studium und diese Arbeit erfolgreich abzuschließen. Mein Dank gilt auch meinen Geschwistern und meiner Freundin Lena, die mich ebenfalls immer unterstützten und mir mit Ratschlägen zur Seite standen.

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Steffen Grampp
 Geburtsdatum: 19.06.1985
 Familienstand: ledig

Schule und Zivildienst:

1991-1995 Grund- und Hauptschule Allensbach.
 1995-2001 Geschwister-Scholl-Realschule Konstanz.
 2001-2004 Zeppelin Gewerbeschule Konstanz, Fachgymnasium für Medien- und Gestaltungstechnik.
 2004 Fachabitur
 2004-2005 Zivildienst am Städtischen Krankenhaus der Spitalstiftung Konstanz.

Studium:

2005-2007 Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
 2007 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
 2007-2010 Klinisches Studium der Humanmedizin an Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
 2010-2011 Praktisches Jahr im Rahmen des Medizinstudiums
 1.Tertial: Chirurgie Diakonie Flensburg
 2.Tertial: Innere Medizin Segeberger Kliniken
 3.Tertial: Anästhesie UKSH Campus Kiel
 2011 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Promotion:

2007-2012 Anfertigen der Dissertation am Anatomischen Institut der CAU zu Kiel
 Thema: „Expression der glial cell line-derived neurothrophic factor-Rezeptorenfamilie auf Mikroglia und deren Beeinflussung der mikroglialen Aktivierung vor dem Hintergrund des Parkinson-Syndroms“

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbständig von mir verfasst wurde und keine weiteren als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel Verwendung fanden. Diese Arbeit wurde bisher weder ganz noch in Auszügen an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Kiel, den

.....
(Steffen Grampp)