

**AUS DEM LEHRSTUHL FÜR HUMANGENETIK
PROF. DR. BERNHARD H. F. WEBER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**Luteolin verursacht globale Veränderungen im Transkriptom von Mikroglia und
führt zu einem anti-inflammatorischen, neuroprotektiven Phänotyp**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg**

**VORGELEGT VON
Konstantin Richard Franz Dirscherl**

2013

**AUS DEM LEHRSTUHL FÜR HUMANGENETIK
PROF. DR. BERNHARD H. F. WEBER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**Luteolin verursacht globale Veränderungen im Transkriptom von Mikroglia und
führt zu einem anti-inflammatorischen, neuroprotektiven Phänotyp**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg**

**VORGELEGT VON
Konstantin Richard Franz Dirscherl**

2013

Dekan: **Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert**
1. Berichterstatter: **Prof. Dr. Thomas Langmann**
2. Berichterstatter: **Prof. Dr. Claus Hellerbrand**
Tag der mündlichen Prüfung: **12. Juli 2013**

gewidmet

Herrn Franz Brem

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1	Weltweite Bedeutung von neurodegenerativen Erkrankungen.....	8
1.2	Die Rolle von Mikroglia bei neurodegenerativen Erkrankungen.....	8
1.3	Bekannte Effekte von Luteolin auf Mikroglia und Makrophagen.....	9
1.4	Studienziele.....	10

2 Material und Methoden

2.1	Reagenzien.....	11
2.2	Tiere.....	11
2.3	Zellkultur	
2.3.1	BV-2-Zelllinie.....	11
2.3.2	Mikroglia aus Mäusegehirn.....	12
2.3.3	661W-Photorezeptorzelllinie.....	12
2.4	Phalloidin-Färbung.....	12
2.5	Stickstoffmonoxid-Messung.....	13
2.6	Apoptose-Untersuchung.....	14
2.7	RNA-Isolierung und reverse Transkription.....	14
2.8	DNA-Microarray-Analyse.....	14
2.9	Analyse der Microarray-Daten.....	15
2.10	Quantitative real-time RT-PCR.....	15
2.11	Gelelektrophorese und Western Blots.....	19
2.12	Software.....	20

3 Ergebnisse

3.1	Effekt von Luteolin auf vier ausgewählte pro-inflammatorische Marker.....	21
3.2	Globale Veränderungen der Transkription in Mikroglia durch Luteolin.....	22
3.3	Regulation wichtiger immunregulatorischer Signalwege und Veränderung des transkriptorischen Phänotyps von Mikroglia durch Luteolin.....	23
3.4	Validierung der Microarray-Daten mittels qRT-PCR	
3.4.1	Auswahl der zu validierenden Gene.....	26
3.4.2	Induktion anti-oxidativer Signalwege durch Luteolin.....	27
3.4.3	Induktion anti-inflammatorischer Signalwege und Phagozytose durch Luteolin...	28
3.4.4	Verminderung der pro-inflammatorischen Aktivierung und der Akute- Phase-Reaktion durch Luteolin.....	30
3.4.5	Inhibition pro-apoptotischer Signalwege und Verminderung von Genen der Deramifizierung durch Luteolin.....	34

3.5	Reduktion der Menge an enzymatisch aktiven Spaltprodukten des Komplementfaktors B durch Luteolin.....	36
3.6	Änderung der Morphologie in Mikroglia und Inhibition der NO-Sekretion durch Luteolin.....	38
3.7	Verminderung der Neurotoxizität auf Photorezeptoren durch Luteolin.....	40

4 Diskussion

4.1	Globale Veränderung des Transkriptoms von Mikroglia durch Luteolin.....	42
4.2	Verstärkte anti-oxidative Wirkung von Luteolin in der BV-2-Zelllinie	42
4.3	Erhöhung der Phagozytose-Aktivität von Mikroglia durch Luteolin.....	43
4.4	Entfachung anti-inflammatorischer Wirkung von Luteolin auch über NFkB-unabhängige Signalwege.....	43
4.5	Sensibilisierung primärer Mikroglia gegenüber Apoptose durch Luteolin.....	44
4.6	Induktion morphologischer Veränderungen in Mikroglia durch Luteolin.....	44
4.7	Protektion von Photorezeptorzellen vor LPS-induzierter Mikroglia-Toxizität durch Luteolin.....	45

5	Zusammenfassung	46
----------	------------------------------	----

6	Literaturverzeichnis	47
----------	-----------------------------------	----

7 Anhang

7.1	Publikation.....	55
7.2	Danksagung.....	56
7.3	Lebenslauf.....	57

1 Einleitung

1.1 Weltweite Bedeutung von neurodegenerativen Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen stellen einen Formenkreis multipelster Krankheiten dar, die sowohl alte als auch junge Menschen betreffen und nicht nur eine ökonomische, sondern auch eine tiefgreifende soziale Relevanz besitzen. Im Jahr 2000 litten weltweit etwa 15,3 Millionen Menschen allein an Morbus Alzheimer und etwa 4,6 Millionen Menschen erkrankten im selben Jahr neu an dieser Krankheit [1]. Morbus Parkinson, ebenso eine neurodegenerative Erkrankung, weist eine Prävalenz von circa 150 pro 100000 Einwohner weltweit auf und verursacht damit Kosten von etwa 1,1 Milliarden US-Dollar jährlich [2]. Auch die Altersbedingte Makuladegeneration (AMD), eine der häufigsten Ursachen für irreversible Blindheit auf der Welt [3], gehört diesem Formenkreis an.

Den Erkrankten entsteht ein enormer Leidensdruck, dem momentan nur mit eingeschränkten Therapieoptionen entgegengetreten werden kann. Grundlagenforschung im Bereich der Neurodegeneration stellt damit eine große und wichtige Herausforderung an die Naturwissenschaften dar, um durch weitere Erkenntnisse in diesem Bereich mögliche neue Therapiestrategien aufzudecken.

1.2 Die Rolle von Mikroglia bei neurodegenerativen Prozessen

In Gegenwart von mehreren neurodegenerativen und chronisch-inflammatorischen Prozessen, insbesondere bei Morbus Alzheimer [4], Morbus Parkinson [5], Amyotropher Lateralsklerose [6], Multipler Sklerose [7], erblichen Photorezeptor-Dystrophien [8,9], Retinitis pigmentosa und AMD [10], wurde aktivierte Mikroglia identifiziert.

Mikroglia entspricht den ansässigen Makrophagen des zentralnervösen Systems. Sie spielt eine zentrale Rolle bei der Immunregulation [11,12] und der neuronalen Homöostase [13,14] in Rückenmark, Gehirn und Auge. Obwohl die Mikroglia mesenchymalen Ursprungs ist [15] und dem mononukleären phagozytischen System zugeordnet wird, unterscheidet sie sich durch ihre spezielle Lokalisation im fragilen neuronalen Umfeld und durch ihre morphologischen Eigenheiten deutlich von peripheren Makrophagen [16]. Mit ihren langen, hochmobilen Zellfortsätzen übernimmt sie eine aktive Überwachung des zentralnervösen Gewebes und reagiert auf pathogene Einflüsse [17,18]. Solche ramifizierten Mikroglia-Zellen stehen in ständigem Kontakt mit Neuronen und erhalten permanent inhibitorische Signale, die Neurotoxizität von Mikroglia vermeiden [19,20]. Der Verlust dieses sogenannten Cross-talks [21], aber auch lokale Faktoren wie extrazelluläres ATP [22] oder Neurotransmitter-Gradienten [23], das in Bakterienmembranen vorkommende Lipopolysaccharid (LPS), und proinflammatorische Zytokine wie Interferon- γ ,

und Tumor-Nekrosefaktor α [24] führen zu einer zügigen funktionellen Änderung. Diese Aktivierung von Mikroglia ist einerseits ein wichtiger protektiver Mechanismus, im Zuge dessen die Erregerabwehr und Geweberegenerierung in der Frühphase von Neurodegeneration gesteuert wird [14]. Andererseits kann eine übermäßige oder anhaltende Aktivierung zu chronisch-neuroinflammatorischen Prozessen im Gehirn und in der Retina führen [12].

Da die Heterogenität und Plastizität von Makrophagen weitläufig ist und charakterisierende zelluläre Markerkombinationen sowie Subpopulationen zum Teil noch nicht eindeutig identifiziert sind [25], wurde ein vereinfachtes Konzept nach polarisierten funktionellen Kategorien etabliert. Darin werden „klassische aktivierte“ Makrophagen, die eine hohe Produktion an oxidativen Metaboliten und proinflammatorischen Zytokinen aufweisen, als M1-Makrophagen bezeichnet. Durch diesen Typ wird aber als Nebeneffekt auch gesundes Gewebe geschädigt. Demgegenüber steht der als M2 bezeichnete Typ an „alternativ aktivierten“ Makrophagen. M2-Makrophagen fördern den Gewebeumbau und hemmen gleichzeitig destruktive Immunreaktionen [26-28].

Neuere Erkenntnisse legen nahe, dass Mikroglia die Fähigkeit besitzt, sich in einen M1- und M2- polarisierten Phänotyp zu differenzieren [29, 30]. Es wird sogar ein altersabhängiger Wechsel von alternativer zu klassischer Aktivierung im PS1xAPP Alzheimer-Mausmodell beschrieben [29], was den Schluss zulässt, dass es sich dabei um ein allgemeines Phänomen bei neurodegenerativen Erkrankungen handelt.

Somit würden Substanzen, die eine Verschiebung von inflammatorischer M1-Mikroglia hin zur anti-inflammatorischen M2-Mikroglia hervorrufen, eine neue therapeutische Option darstellen, mit der neuronale Inflammation abgeschwächt und neuronale Regeneration unterstützt werden könnte [31].

1.3 Bekannte Effekte von Luteolin auf Mikroglia und Makrophagen

Viele verschiedene Substanzen zeigen anti-inflammatorische Wirkungen und mehrere vermindern neuronale Entzündungsprozesse. Dennoch konnte bisher nur für wenige solcher Stoffe eine direkte funktionelle Wirkung auf Mikroglia nachgewiesen werden [32]. Bezuglich des Flavonoids Luteolin bestehen hierfür aber deutliche Hinweise.

Luteolin (3',4',5,7-Tetrahydroxyflavon) ist natürlicher Bestandteil von Petersilie, grünem Pfeffer, Sellerie, Sesamblättern und Kamillentee. Es entfacht starke anti-inflammatorische und anti-oxidative Wirkungen [33], die nur teilweise durch die strukturelle Funktion als Radikalfänger erklärbar sind [34]. Es wurde gezeigt, dass Luteolin proinflammatorische Zytokinproduktion in Makrophagen über eine Hemmung des Nukleären Faktor kappa B (NFkB)- und des Aktivatorprotein 1 (AP1)-Signalwegs vermindert [35]. Daneben verringert das Flavonoid die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) [36] und proinflammatorischen Eikosanoiden [37]. Des Weiteren ist bekannt, dass Luteolin die

Freisetzung von Tumornekrosefaktor und Superoxid-Anionen in LPS- oder Interferon γ -behandelter Mikroglia reduziert [38,39] und die LPS-induzierte Interleukin-6-Produktion in Gehirn-Mikroglia verkleinert [40].

1.4 Studienziele

Obwohl die inhibitorische Funktion von Luteolin auf den NFkB-Signalweg und einige ausgewählte Zytokine bereits für Makrophagen genau dokumentiert ist, existiert bisher keine Genom-weite Untersuchung weiterer molekularer Ziele von Luteolin in der Mikroglia. Ebenso wurden keine immun-modulatorischen Effekte von Luteolin in Bezug auf eine Stimulation der unterschiedlichen funktionellen Mikroglia-Phänotypen veröffentlicht.

Aus diesem Grund war es das Ziel dieser Studie, Transkriptom-weite Effekte von Luteolin in aktivierter und nicht-aktivierter Mikroglia bei annähernd physiologischen Konzentrationen [36] zu identifizieren und diese anschließend zu validieren. Zusätzlich sollte die Zellmorphologie beobachtet werden und die Konsequenzen von Mikroglia-konditioniertem Medium auf das Überleben von Photorezeptoren analysiert werden.

Erkenntnisse auf diesem Gebiet könnten zum besseren Verständnis der Rolle von Mikroglia bei neurodegenerativen Erkrankungen beitragen und so die Kenntnis der Pathogenese dieser Krankheiten verbessern.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien

Luteolin (3',4',5,7-Tetrahydroxyflavon) und *E.coli* 0111:B4 Lipopolysaccharid wurde von Sigma-Aldrich Co. (Steinheim) erworben. Luteolin wurde gemäß den Herstelleranweisungen in Dimethylsulfoxid (SeccoSolv®, Merck KGaA, Darmstadt) gelöst und in Konzentrationen verwendet, die in keinem Zellkulturexperiment 0,05% des Gesamtvolumens überschritten.

2.2 Tiere

C57BL/6 Mäuse wurden von Charles River Laboratories erworben. Die Mausaufzucht erfolgte in klimatisierter Käfighaltung bei konstanten 20-22°C unter Einhaltung eines 12 Stunden Hell-Dunkel-Schemas. Es bestand freier Zugang zu Nahrung und Wasser, der Gesundheitszustand der Tiere wurde regelmäßig überprüft. Die Tiere wurden durch CO₂-Asphyxiation mit anschließendem Genickbruch getötet. Alle Vorgänge waren im Einklang mit den Vorgaben des Tierschutzkomitees der Universität Regensburg, dem deutschen Tierschutzgesetz und dem Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 1999 des Institute of Laboratory Animal Research (ILAR, Washington D.C., USA).

2.3 Zellkultur

2.3.1 BV-2-Zelllinie

Als Zelllinie wird eine Zellkultur aus immortalisierten Zellen bezeichnet. Zelllinien bieten den Vorteil, dass sie sich weitgehend unbegrenzt teilen und zu hoher Dichte proliferieren. Da sie aber meist aus Tumorzellen generiert sind, kann deren Verhalten vom physiologischen Verhalten normaler Zellen in einem Organismus in manchen Bereichen abweichen [41].

BV-2-Zellen entstammen einer murinen Zelllinie. Sie wurden von Professor Ralph Lucius (Klinik für Neurologie, Christian Albrechts Universität, Kiel) zur Verfügung gestellt und nach etabliertem Schema in RPMI 1640 Nährmedium (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) mit 10% Fetalem Kälberserum (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich), 1% L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich), 1% Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) und 55,77 nM β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich Co., Steinheim) im Feuchtinkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert [42]. Es erfolgte dreimal wöchentlich ein Nährmediumswechsel und bei

konfluentem Wachstum eine Neuaussaat. Die Zellkultur erfolgte unter sterilen Bedingungen.

2.3.2 Mikroglia aus Mäusegehirn

Zellkulturen, die direkt aus dem Gewebe eines Organismus gewonnen werden, werden als primäre Kulturen bezeichnet. Direkt aus Mäusehirn gewonnene primäre Mikroglia besitzt nur ein begrenztes Lebens- und Zellteilungsvermögen, verhält sich aber gegenüber den immortalisierten Zelllinien physiologischer und wird deshalb häufig bevorzugt [41].

Die Mikroglia wurde nach bekanntem Schema aus Mäusehirn gewonnen [43]. Circa 300mg Mäusehirn wurden in PBS gegeben, mittels Schere zerkleinert und wiederholt mittels Pipette resuspendiert. Der Verdau erfolgte unter Zugabe von 1mg/ml Collagenase Typ 1 (Sigma-Aldrich Co., Steinheim), 2mg/ml Hyaluronidase (Sigma-Aldrich Co., Steinheim), und 0,3mg/ml DNase I (Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim) für 40 Minuten bei 37°C unter stetigem Schütteln. Die erhaltene Zellsuspension wurde durch einen 70µm Zellfilter (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) filtriert, zweimal mit je 10ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM high Glucose (4,5g/L) with L-Glutamine, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) mit 10% Fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin gewaschen, und anschließend für 5 Minuten bei 1600 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet resuspendiert in 10ml DMEM mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 50ng/ml rekombinantern humanem M-CSF (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) resuspendiert und in 75cm² Flasks für 11 Tage im Feuchtinkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Ein Nährmediumswechsel wurde nach 4 Tagen getätigt. Die Zellkultur erfolgte unter sterilen Bedingungen.

2.3.3 661W-Photorezeptorzelllinie

Die 661W-Photorezeptorzelllinie wurde von Professor Muayyad Al Ubaidi (University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City, Oklahoma, USA) zur Verfügung gestellt und nach etabliertem Schema in DMEM-Nährmedium mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin im Feuchtinkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert [44]. Die Zellkultur erfolgte unter sterilen Bedingungen.

2.4 Phalloidin-Färbung

Bei morphologischen Veränderungen von Zellen spielt das Zytoskelett eine entscheidende Rolle. Das Zytoskelett ist ein inneres Gerüst aus Proteinfilamenten, das für Stabilität sorgt und Kräfte zur Formveränderung bereitstellt. Es besteht aus Mikrotubuli, Intermediärfilamenten und Aktinfilamenten. Letztere werden auch als Mikrofilamente bezeichnet

und verlaufen parallel als Bündel oder netzartige Gitterstrukturen. Sie bestehen aus doppelsträngig angeordneten helikalen Aktinpolymeren, die mit verschiedenen anderen Strukturen in Wechselwirkung treten [45]. Phalloidin vom Pilz Amanita phalloides bindet an Aktin und stabilisiert Aktinfilamente [46]. Ist an Phalloidin ein fluoreszierendes Molekül wie Tetramethylrhodamin-B-Isothiocyanat (TRITC) gekoppelt, können die Aktinfilamente mit einem Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden. Um den Zellkern als eine weitere wichtige Zellstruktur darzustellen, kann 4',6-Diamino-2-Phenylindol (DAPI) verwendet werden. DAPI bindet an DNA, fluoresziert Licht der Wellenlänge 460 nm, was blauem Licht entspricht, und ist als Kernfärbung weit verbreitet [47].

BV-2-Zellen wurden über Nacht auf Deckgläsern platziert, mit 4% Paraformaldehyd für 20 Minuten bei 37°C fixiert, und mit 0,2% Triton X-100 für 5 Minuten permeabilisiert. Anschließend wurde mit 5% fettfreier Milch in 0,2% Triton X-100 geblockt und mit 0,1µg/ml DAPI (4',6-Diamino-2-Phenylindol, Molecular Probes®, Invitrogen GmbH, Darmstadt) in PBS für 10 Minuten gefärbt. Aktinfilamente wurden durch Zugabe von 1,5µM Phalloidin-Tetramethylrhodamin-B-Isothiocyanat (Sigma-Aldrich Co., Steinheim) für 1 Stunde gefärbt. Die Deckgläser wurden auf Objektträger aufgebracht und mit Hilfe des mit einem Eclipse Digital Analyzer ausgestatteten Axioskop 2 Floureszenzmikroskops (Carl Zeiss AG, Oberkochen) betrachtet.

2.5 Stickstoffmonoxid-Messung

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein Signalmolekül, das unter anderem als lokaler Mediator von aktivierten Makrophagen und Neutrophilen produziert wird und in die Verletzungs- und Infektantwort involviert ist. Es entsteht vorwiegend bei der Deaminierung der Aminosäure Arginin, welche durch das Enzym NO-Synthase (NOS) katalysiert wird. NO kann aufgrund seiner geringen Größe und seiner Hydrophilie Zellmembranen passieren und bewirkt intrazellulär eine Stimulation des Enzyms Guanylylzyklase, welches den Mediator zirkuläres GMP produziert. Der Ablauf erfolgt innerhalb von Sekunden [48].

Stickstoffmonoxid-Konzentrationen wurden durch Messung der von BV-2-Zellen ins Nährmedium sezernierten NO-Menge ermittelt. Dazu wurde ein Griess Reagent System (Promega GmbH, Mannheim) verwendet, mit dem sich Nitrit als stabiles Abbauprodukt im NO-Metabolismus nachweisen lässt. Dabei wurden 50 µl Nährmediumsüberstand zusammen mit 50 µl Griess Reagenz für 15 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 535 nm mittels FLUOstar Optima (BMG Labtech GmbH, Offenburg) bestimmt. Die NO-Konzentration jeder Probe wurde durch eine Natrium-Nitrit-Standardkurve errechnet.

2.6 Apoptose- Untersuchung

Apoptose von 661W-Photorezeptorzellen wurde mittels des Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega GmbH, Mannheim) ermittelt. Dabei wurden 661W-Photorezeptorzellen mit Nährmediumsüberständen von BV-2-Zellen (Microglia-conditioned media) für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Danach wurden 100µl der Überstände mit 100µl Caspase-Glo®-Reagenz, das das Tetrapeptid DEVD enthält, für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von UltraGlo™ Luciferase Mg²⁺ wurde Lumineszenz durch Spaltung des Substrats generiert, die proportional zur vorhandenen Caspase-Aktivität war. Das Lumineszenz-Signal wurde mit Hilfe des FLUOstar Optima (BMG Labtech GmbH, Offenburg) bestimmt. Eine Leerprobe wurde zur Messung der Grundlumineszenz, die durch Nährmedium und die verwendeten Reagenzien entsteht, erstellt und von allen erhaltenen Werten subtrahiert. Um die Basalcaspaseaktivität der Photorezeptorzellen zu erfassen, wurden Negativkontrollen durchgeführt.

2.7 RNA-Isolierung und reverse Transkription

RNA wurde aus kultivierter Mikroglia oder BV-2-Zellen mithilfe des RNeasy Protect Mini Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend den Herstelleranweisungen extrahiert. Es wurde immer mit Eis gekühlt und unter Nuklease-freien Bedingungen gearbeitet. Die Quantifizierung erfolgte spektrophotometrisch mittels NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Products, Wilmington, Delaware, USA) und der ND-1000 V3.5.2-Software, die Aufbewahrung fand bei -80°C statt.

Da für eine später beabsichtigte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA, nicht RNA, benötigt wird, muss eine reverse Transkription erfolgen, bei der RNA in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) umgeschrieben wird [49]. Einzelstrang-cDNA-Synthese wurde mittels RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St. Leon-Rot) gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

2.8 DNA Microarray-Analyse

Mikroarray-Triplikatmessungen wurden mit 3 unabhängigen RNAs von unstimulierten, mit 50µM Luteolin stimulierten, mit 50ng/ml LPS stimulierten, und mit 50µM Luteolin und 50ng/ml LPS für 24 Stunden stimulierten BV-2-Zellen durchgeführt. Kontrolle der Reinheit und Intaktheit der RNA mittels Agilent 2100 Bioanalyzer mit RNA 6000 Nano Lab-Chip® reagent set (Agilent Technologies, Büblingen), Generierung von Doppelstrang-cDNA, Präparation und Markierung der cRNA, Hybridisierung zu Affymetrix 430 2.0 mouse genome arrays, Waschen und Scannen wurde vom Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik (Regensburg) nach dem Affymetrix Standardprotokoll ausgeführt. Dabei wurden die Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-

Kriterien erfüllt [50]. Die Microarray-Daten dieser Studie sind der Öffentlichkeit zugänglich und können im National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus im Internet unter <http://ncbi.nlm.nih.gov/geo/> als Serie GSE18740 eingesehen werden.

2.9 Analyse der Microarraydaten

Für die Erstellung zusammengefasster Expressionswerte in Form von CHP-Dateien aus den Intensitätswerten in Form von CEL-Dateien, die unter Verwendung des Robust Multichip Analysis (RMA) -Algorithmus angefertigt worden waren, wurde die Affymetrix Expression Console Software Version 1.0 (Affymetrix, Santa Clara, California, USA) verwendet.

Zur integrativen visuellen Analyse der genomweiten Expressionsaktivitäten der BV-2-Zellen wurde der Gene Expression Dynamics Inspector (GEDI) angewandt, ein vom Children's Hospital in Boston (Department of Pathology, Children's Hospital/Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA) entwickeltes Matlab R13-Programm (Mathworks, Natick, Massachusetts, USA), das im Internet als Freeware auf der Seite <http://www.chip.org/~ge/gedihome.html> erhältlich ist und auf Basis selbst-organisierender Karten (self-organizing maps SOMs) hochkomplexe Expressionsdatensätze als zweidimensionales Mosaik abbildet [51]. Dabei entspricht jedes Mosaikteilchen einem individuellen, farbkodierten Cluster, wobei Rot einer hohen und Blau einer niedrigen Expression des Clustergenes entspricht.

Zur Identifikation von Genen, deren Expression von Luteolin reguliert wird, wurden die Transkripte von 24 Stunden stimulierten gegenüber unstimulierten und von 24 Stunden LPS stimulierten gegenüber 24 Stunden LPS mit Luteolin stimulierten BV-2-Zellen verglichen. Dazu wurde das Genomatix Chip Inspector Program (Genomatix Software GmbH, München) mit einem Significance Analysis of Microarray (SAM)-Algorithmus angewendet und eine Falsch-Positivrate von 0,1% bei einer Mindestanzahl von 3 unabhängigen Einzelproben akzeptiert.

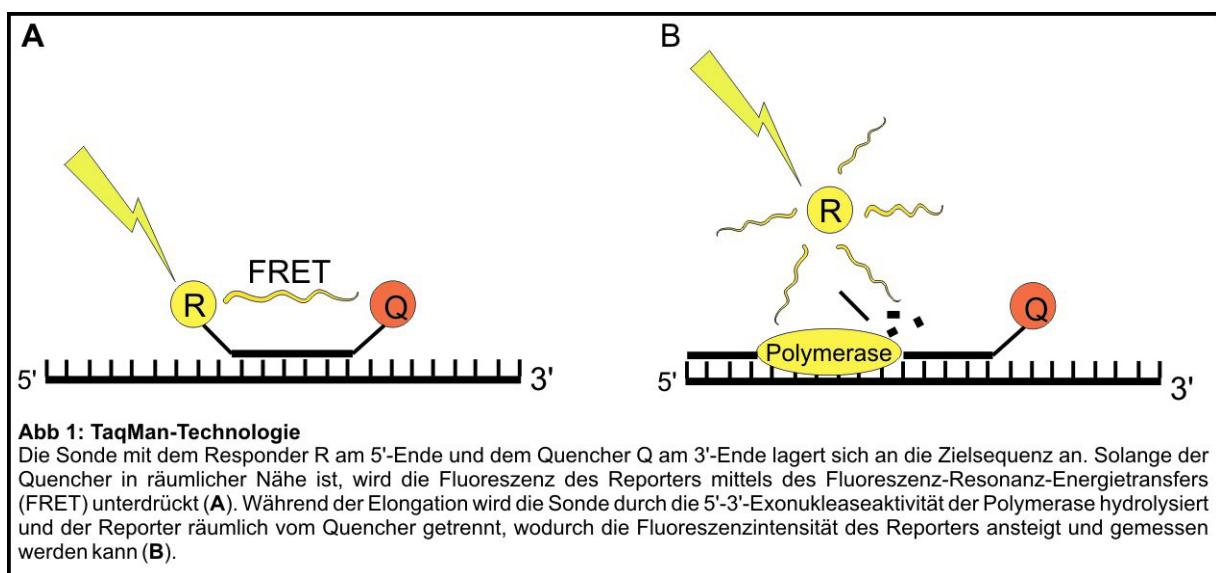
Die funktionelle Zuordnung der Transkripte erfolgte mittels der Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery DAVID (Laboratory of Immunopathogenesis and Bioinformatics LIB, National Cancer Institute at Frederick, Frederick, Maryland, USA) [52] und Bibliosphere Pathway Edition (Genomatix Software GmbH, München).

2.10 Quantitative real-time RT-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht eine schnelle Klonierung und Analyse von DNA. Sie dient der selektiven Amplifizierung einer bestimmten DNA-Frequenz und durchläuft dabei folgende Schritte [49]:

- Denaturierung: Die DNA wird bei Erhitzen auf 93-95°C denaturiert und somit den Primern zugänglich gemacht.
- Anlagerung der Primer (Annealing): Primer sind Oligonukleotide, die in ihrer Basensequenz den Bereichen entsprechen, die die gesuchte DNA-Frequenz flankieren. Deren Anlagerung an die durch Hitze aufgetrennten DNA-Stränge erfolgt abhängig von der Schmelztemperatur der DNA, die normalerweise bei 50-70°C liegt.
- DNA-Synthese (Elongation): Die Synthese findet in der Regel bei 70-75°C statt. Essentiell ist dabei das Vorhandensein einer hitzestabilen Polymerase, die eine effiziente Verlängerung der DNA gewährleistet.

Um Änderungen der Genexpression feststellen zu können, müssen relative RNA-Level gemessen werden. Dies ist mittels der quantitativen real-time RT-PCR möglich. Diese stellt eine Abwandlung der klassischen PCR dar und verwendet die TaqMan-Technologie (Abb 1). Dabei wird die Amplifikation bei der PCR mittels fluoreszenzmarkierter Gensonden in Echtzeit mitverfolgt. Die Sonden sind komplementär zur Zielsequenz und besitzen am 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff und am 3'-Ende einen Quencherfarbstoff. Solange eine räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher besteht, wird die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes mittels des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET) unterdrückt. Während der Elongationsphase wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert und somit der Reporterfarbstoff vom Quencher getrennt, wodurch die Fluoreszenzintensität des Reporters steigt und detektiert werden kann [53].



Die Auswertung der real-time RT-PCR erfolgte durch relative Quantifizierung mittels der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode. Während der PCR steigt die Replikation der cDNA exponentiell gemäß der Gleichung

$$X_n = X_0 \cdot (1 + E_X)^n \quad (\text{Gleichung 1})$$

mit X_n als Anzahl der Zielmoleküle beim Zyklus n , X_0 als Anzahl der Zielmoleküle zu Beginn, E_X als Amplifikationseffizienz, und n als Anzahl der Zyklen.

Ein Schwellenwert C_T (cycle threshold) wird festgelegt, der angibt, bei welchem Zyklus eine bestimmte Menge des amplifizierten Zielmoleküls – gemessen anhand der Fluoreszenz – erreicht wird. Je höher die Anzahl der Zielmoleküle zu Beginn ist, also je höher die Expression, desto früher wird der Schwellenwert erreicht. Somit ergibt sich die Gleichung

$$X_T = X_0 \cdot (1 + E_X)^{C_{TX}} \quad (\text{Gleichung 2})$$

mit X_T als Schwellenanzahl der Zielmoleküle, und C_T als Schwellenzyklusanzahl.

Um einen Bezugspunkt zu haben, wird ein so genanntes Housekeeper-Gen mitgemessen, das als endogenes Referenzgen dient und in allen Experimenten möglichst konstant exprimiert werden sollte. In den durchgeführten Versuchen wurde hierfür das murine Glucuronidase-β-Gen (Gusb) verwendet. Die Gleichung für das Housekeeper-Gen lautet analog zu Gleichung 2

$$R_T = R_0 \cdot (1 + E_R)^{C_{TR}} \quad (\text{Gleichung 3})$$

mit R_T als Schwellenanzahl des Housekeeper-Gens und R_0 als die Anzahl des Housekeeper-Gens zu Beginn.

Führt man eine Normalisierung der Zielmoleküle auf das Housekeeper-Gen aus, wodurch eventuelle Schwankungen der absoluten Anzahl zwischen den einzelnen Proben ausgeglichen werden, so erhält man die Gleichung

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0 \cdot (1 + E_X)^{C_{TX}}}{R_0 \cdot (1 + E_R)^{C_{TR}}} \quad (\text{Gleichung 4})$$

Nimmt man jetzt an, dass die Amplifikationseffizienz beide Male die gleiche ist ($E_X = E_R$), so erhält man

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0}{R_0} \cdot (1 + E)^{C_{TX} - C_{TR}} \quad (\text{Gleichung 5})$$

mit E als allgemeiner Amplifikationseffizienz.

Ersetzt man $C_{TX} - C_{TR}$ durch ΔC_T und den Quotienten X_0/R_0 durch X_N , und dividiert durch $(1 + E)^{\Delta C_T}$, so ergibt das die Gleichung

$$X_N = \frac{X_T}{R_T} \cdot (1 + E)^{-\Delta C_T} \quad (\text{Gleichung 6})$$

mit X_N als Menge des auf das Referenzgen normalisierten Zielmoleküls.

Um eine relative Quantifizierung zu erhalten, werden die Expressionswerte auf einen Kalibrator bezogen. Als Kalibrator diente in den durchgeföhrten Experimenten eine unstimulierte Kontrollprobe.

$$\frac{X_{Nq}}{X_{Nk}} = \frac{\frac{X_T}{R_T} \cdot (1+E)^{-\Delta C_{Tq}}}{\frac{X_T}{R_T} \cdot (1+E)^{-\Delta C_{Tk}}} = (1+E)^{\Delta C_{Tq} - \Delta C_{Tk}} \quad (\text{Gleichung 7})$$

mit X_{Nq} als X_N jeder Probe, X_{Nk} als X_N des Kalibrators, ΔC_{Tq} als ΔC_T jeder Probe, und ΔC_{Tk} als ΔC_T des Kalibrators.

Verwendet man anstelle von $\Delta C_{Tq} - \Delta C_{Tk}$ nun $\Delta\Delta C_T$, wird davon ausgegangen, dass bei genügend Substraten und unter guten Bedingungen die Amplifikationseffizienz nahezu 1 ist, und führt man sich vor Augen, dass der Quotient X_{Nq}/X_{Nk} die normalisierte und kalibrierte relative Menge des Zielmoleküls darstellt, ergibt sich

$$\text{relative Menge} = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad (\text{Gleichung 8})$$

[54]

Zur Amplifikation von 50ng cDNA wurde ein Taqman ABI7900HT real time PCR detection system (Applied Biosystems™ by Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA) genutzt. Es wurden Triplikatmessungen durchgeföhrte in jeweils 10µl Reaktionsgemisch bestehend aus 1 x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems™ by Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA), 200nM Primer und 0,25µl Dual-labelled probe (Universal ProbeLibrary, F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz). Folgende Reaktionsparameter wurden eingestellt: 95°C für 10 Minuten, anschließend 40 Zyklen Denaturierung bei 95°C für 15 Sekunden, Annealing bei 60°C für 1 Minute und Elongation bei 72°C für 2 Minuten. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der ABI sequence detector software version 2.3 (Applied Biosystems™ by Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA) analysiert, wobei die $\Delta\Delta Ct$ -Methode für relative Quantifizierung angewandt wurde. Für statistische Berechnungen wurde die GraphPad QuickCalcs- Software (GraphPad Software, Inc, La Jolla, Californien, USA) verwendet. Die benutzten Primer-Sequenzen mit der zugehörigen Roche Universal ProbeLibrary-Nummer sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Primer-Paare und Roche Universal ProbeLibrary-Nummern für die quantitative real-time RT-PCR

Gen	Forward - Primer (5'-3')	Reverse - Primer (5'-3')	Roche Universal ProbeLibrary
AA467197	aatgggtggatcctactcaacc	gttgcctccggacttt	17
Blvrb	tcctcgagttctcagctt	gcaccgtcacctataacct	81
C3	accttacctcgcaagttct	ttttagagctgtggtcagg	76
CD36	ttgaaaagtctcgacattgag	tcagatccgaacacagcgt	6
CD83	gcttcctatgcagtgtctg	ggatcgtagggaaataggc	2
Cfb	ctcgaacctgcagatccac	tcaaaagtctgcggcgtcq	1
Cst7	atgtcagcaagccctggta	ggtcttcgtcatgttagttcg	67
Cxcl10	gctgccgtcatttctgc	tctcaactggccgtcatc	3
Ddit3	ccaccacacctgaaaggcag	tcctcataccaggcttcca	33
Gbp2	tgttagacaaaaggctcagacaga	gataaaggcatctcgcttgg	62
Gbp3	aagattgagctggctacca	gaaactcttgagaacctttgc	73
Gclm	tggagcagctgtatcgtgg	caaaggcagtcaaatctggtg	18
Gusb	gtgggcattgtgtacccgt	atttttgtccggcgaac	25
Hmox1	ctgctagcctggtgcaga	ccaacaggaagctgagagtga	25
Hp	ccctgggagctgtgtca	ctttggcagctgtcatctt	15
Hprt1	tcctcctcagaccgtttt	cctggttcatcatcgcta	95
Ifi44	ctgattacaaaagaagacatgacac	aggcaaaaccaaagactcca	78
Ifitm3	aacatgccagagagggtgc	accatctccgatccctagac	84
Ifitm6	ccggatcacattacccgtc	catgtcgcccaccatctt	27
IL-6	gatggatgctaccaaactggat	ccaggttagctatggtactccaga	6
iNOS	cttggccacggacgagac	tcattgtactctgagggctga	13
Irf7	cttcagcacccatccgaga	tgttagtgggtgacccttgc	25
Kdr	cagtggactggcagctagaag	acaaggcatacgggcttgg	68
Lcn2	atgtcacccatctggtc	cctgtcatatcccgagat	1
Lpcat1	aatgtgaggcgtgtcatgg	ggcagtcctcaaatgtatagtc	81
Marco	cagagggagagacttagcag	gccccgacaaattcaccatt	20
Mpeg1	cacagtgagcctgcacttaca	gcgccttccaatagcttta	69
Nupr1	gatggaatcctggatgaatatga	gtccgcacccctggaccc	64
Rnf145	catggactctggcttcata	aataaaaagtgtcccgaaacctq	67
Saa3	atgctcggggaaactatgtat	acagcctctggcatcg	26
Slpi	gtgaatccgttcccattcg	cctgagtttgacgcaccc	69
Srxn1	gctatgccacacagagaccata	gtggggaaagctgggtcct	33
Trib3	gctatcgagccctgcact	acatgctgggtggtaggc	98

2.11 Gelelektrophorese und Western Blots

Western-Blotting (Immunoblotting) in Kombination mit einer eindimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine Methode, um einen Überblick über die Proteinexpression zu erhalten. Zellextrakte werden in eine Lösung des anionischen Detergens

Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgenommen, wodurch nichtkovalente Wechselwirkungen unterbunden werden. In einem Polyacrylamid-Gel wird eine elektrische Spannung angelegt, wodurch die Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Anschließend erfolgt die Übertragung der großenfraktionierten Proteine auf eine Membran (blotting), wo sie spezifischen Antikörpern ausgesetzt werden. Das entstehende Bild wird auf einem Film entwickelt [55].

Hierzu wurden BV-2-Zellen in PBS bei 1000g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend mittels einer 10ml-Spritze (BD Discardit™ II, Becton Dickinson S.A., Madrid, Spanien) mit einer 20 Gauche-Nadel (BD Microlance™ 3, Becton Dickinson S.A., Madrid, Spanien) durch mehrmaliges Resuspendieren homogenisiert. Die Proteinkonzentration wurde unter Hinzuziehung des Bradford-Assays (Roti-quant®; Roth, Karlsruhe) bestimmt und dann 20µg Proteinextrakt zur weiteren Analyse verwendet. Natriumdodecylsulfat (SDS) -Sample Buffer (Sigma-Aldrich Co., Steinheim) wurde zugegeben, und bei einer Spannung von 200V für 35 Minuten erfolgte die Proteinauf trennung mittels Gel-elektrophorese unter Verwendung des NuPAGE® 4-12% Bis-Tris-Gels (Invitrogen GmbH, Darmstadt). Für die Western Blots wurden die Proteine mit einer Stromstärke von 1,7mA pro Quadratzentimeter Membran elektrophoretisch auf Polyvinylidendifluoride-Membranen (Millipore, Bedford, Massachusetts, USA) transferiert und mit 3% Albumin Fraktion V (pH 7) Blotting grade (AppliChem, Darmstadt) in PBS über Nacht bei 4°C geblockt. Anschließend wurden die Membranen für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit einem polyklonalen Ziegen-Antikörper gegen murinen Factor B (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt) der Konzentration 0,4µg/ml in PBS mit 0,2% w/v Natriumazit und anschließend mit 1:40000 Anti-Ziegen-IgG, die mit Meerrettichperoxidase konjugiert sind (H&LCh (Rabbit) Peroxidase Conj., Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt), für eine Stunde bei Raumtemperatur markiert. Die Visualisierung der Western Blots erfolgte mit SuperSignal West PICO Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA). Als Positivkontrolle fungierte humaner Faktor B (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt).

2.12 Software:

Neben der oben extra aufgeführten Software wurde Microsoft Office 2003 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) für die Datenverarbeitung genutzt. Säulendiagramme wurden mit SigmaPlot 8.0 (Systat Software GmbH, Erkrath) erstellt, die weitere Bearbeitung und Anfertigung von Grafiken erfolgte mit CorelDRAW X4 (Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada).

3 Ergebnisse

3.1 Effekt von Luteolin auf vier ausgewählte pro-inflammatorische Marker

Um das vorgesehene Zellkultursystem zu prüfen und eine Grundlage für weitere Analysen des genomweiten Transkriptionseffekts von Luteolin auf Mikrogliazellen zu erhalten, wurde zu Beginn der Dosis-abhängige Effekt von Luteolin auf die Expression von vier proinflammatorischen Markergenen untersucht. Dafür wurden für eine qRT-PCR Gene ausgewählt mit unterschiedlichen Expressionslevels und verschiedenen Induktionsmechanismen, die somit als Positivkontrolle fungieren sollten.

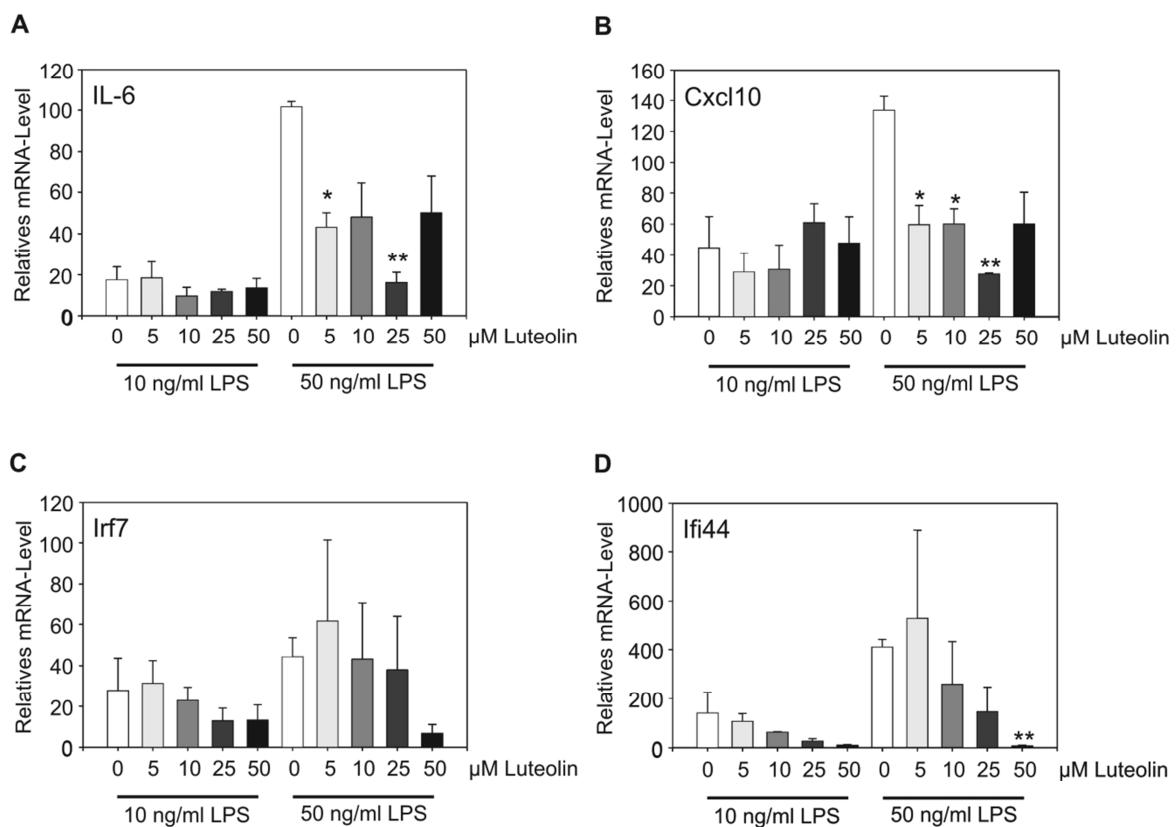


Abb 1: Dosis-abhängige Suppression von proinflammatorischer, durch LPS induzierter Genexpression in BV-2-Mikroglia

BV-2-Mikrogliazellen wurden mit den aufgeführten Luteolinkonzentrationen eine Stunde vorbehandelt und anschließend mit 10 ng/ml beziehungsweise 50 ng/ml LPS für 24 Stunden stimuliert. Die Genexpressionslevel von **A** Interleukin 6 (IL-6), **B** Chemokin (C-X-C-motif) ligand 10 (Cxcl10), **C** Interferon-regulatory factor 7 (Irf7), und **D** Interferon-induced protein 44 (Ifi44) wurden mittels real-time qRT-PCR ermittelt. Die Expression wurde auf das Kontrollgen Gusb normalisiert und die mRNA-level (+/- Standardabweichung vom Mittelwert (SEM)) relativ zu einer Mock-behandelten Kontrolle dargestellt. Die Ergebnisse resultieren aus zwei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikatmessungen erfolgten. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ für 5, 10, 25 und 50 μM Luteolin gegenüber 0 μM Luteolin bei 10 ng/ml beziehungsweise 50 ng/ml LPS.

Interleukin 6 (IL-6) ist ein bereits bekanntes Zielzytokin von Luteolin [40], Chemokin (C-X-C-motif) ligand 10 (Cxcl10), Interferon-regulatory factor 7 (Irf7), und Interferon-inducible protein 44 (Ifi44) sind, wie in früheren Studien gezeigt, LPS-sensitive Gene in der Mikroglia [56]. BV-2-Mikrogliazellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen

Luteolin (0, 5, 10, 25, und 50 μ M) für eine Stunde vorbehandelt und anschließend mit LPS (10 und 50 ng/ml) für 24 Stunden stimuliert, wobei weder das verabreichte Luteolin noch LPS in dieser Zeit die Proliferationsrate oder das Überleben der Zellen beeinflussten. Die Ergebnisse der durchgeföhrten qRT-PCR (Abb 1) zeigen, dass die mRNA-Level von IL-6 (Abb 1A), Cxcl10 (Abb 1B), Irf7 (Abb 1C), und Ifi44 (Abb 1D) durch 10 ng/ml LPS induziert und durch 50ng/ml weiter gesteigert werden, durch Luteolin aber dosisabhängig reduziert werden. In dieser Studie stellt sich der Effekt von Luteolin am deutlichsten bei einer Konzentration von 50 μ M und bei 50 ng/ml LPS dar, weshalb die weiteren Experimente mit diesen Konzentrationen durchgeföhrten wurden.

3.2 Globale Veränderungen der Transkription in Mikroglia durch Luteolin

Um ein Transkriptionsprofil zu erhalten und so durch Luteolin hervorgerufene Expressionsunterschiede in nicht-aktivierter und aktivierter Mikroglia zu erfassen, wurde mit Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 GeneChips eine Microarray-Analyse vorgenommen. Dazu wurden BV-2-Zellen zum einen nicht stimuliert oder mit 50 ng/ml LPS aktiviert, und nach 1 Stunde beide mit 50 μ M Luteolin behandelt. So wurden 12 Microarray-Analysen von 3 unabhängigen Stimulationsexperimenten durchgeföhrten, dabei wurden hoch stringenten Bedingungen mit einer minimalen Signalintensität von 50 Fluoreszenzeinheiten eingehalten. Der komplette dabei gewonnene Rohdatensatz wurde als Affymetrix CEL-files als Record GSE18740 in der NCBI GEO-Datenbank gespeichert und ist dort der Öffentlichkeit zugänglich.

Um ein Übersichtsmuster der 4 verschiedenen Zustände – unstimuliert als Kontrolle, 24 Stunden stimuliert mit 50 μ M Luteolin, aktiviert mit 50 ng/ml LPS, aktiviert mit 50 ng/ml LPS und stimuliert mit 50 μ M Luteolin für 24 Stunden – zu erhalten, wurde der Gene Expression Dynamics Inspector (GEDI) genutzt. Dieses Matlab R13-Programm erstellt auf Basis selbst-organisierender Karten farbkodierte Mosaiken, wobei jedes Mosaikteilchen eine Gengruppe oder ein Gencluster darstellt, das in ähnlichem Maß exprimiert wird [51]. Da somit GEDI eher expressionslevel- als genorientiert ist, vereinfacht dies die Identifikation von genomweiten Mustern. Die 4 GEDI-Karten (Abb 2 A) zeigen deutlich eine dynamische Expressionsregulation in stimulierter Mikroglia gegenüber unstimulierter, vor allem gut sichtbar in der mit einem weißen Kreis markierten Region. Die dortige Expression ist bei LPS-Stimulation merklich erhöht, eine Behandlung mit Luteolin aber bewirkt eine gegenteilige Regulation. Somit wird ersichtlich, dass Luteolin das globale Expressionsprofil aktivierter und in geringerem Ausmaß auch ruhender Mikroglia maßgeblich beeinflusst.

Da bereits gezeigt wurde, dass die Einzelprobenanalyse eines Affymetrix Microarrays durch die Verwendung des Genomatix ChipInspector unter Berücksichtigung des Significance Analysis of Microarray (SAM) –Algorithmus verbessert werden kann [57], wurde

der ChipInspector benutzt, um die Daten weiter zu analysieren. Es wurden eine Falsch-Positiv-Rate von 0,1%, nicht weniger als 3 signifikante Proben, und eine minimale Log2-Ratio von 1, was einem Fold Change (FC) von 2,0 entspricht, akzeptiert. Damit wurden 18 signifikant regulierte Gene im Vergleich von Luteolin-behandelter Mikroglia gegenüber der unbehandelten Kontrolle identifiziert und 54 Gene im Vergleich von LPS- und Luteolin-behandelter Mikroglia gegenüber LPS-aktivierter (Tabelle 2). Hier spricht die Anzahl der regulierten Gene dafür, dass der Luteolineffekt in aktivierter Mikroglia größer ist als in ruhender, was im Einklang mit den oben erwähnten Erkenntnissen aus den GEDI-Karten steht.

3.3 Regulation wichtiger immunregulatorischer Signalwege und Veränderung des transkriptorischen Phänotyps von Mikroglia durch Luteolin

Als nächster Schritt wurde versucht, die identifizierten Luteolin-regulierten Expressionsmuster in einen biologischen Zusammenhang zu bringen. Dafür wurden alle signifikant unterschiedlich regulierten Gene dazu verwendet, eine Klassifikation in funktionelle Kategorien vorzunehmen, was mittels der Database for Annotation, Visualisation, and integrated Discovery (DAVID) erfolgte. Dabei fielen in Luteolin-behandelter ruhender Mikroglia vor allem eine gesteigerte Expression von Transkripten der funktionellen Kategorien Antioxidans, Phagozytose und Antiinflammation und eine verminderte Expression in den Kategorien Proinflammation und Apoptose auf (Abb 2 B links). Dies spricht dafür, dass Luteolin antioxidantische und antiinflammatorische transkriptionelle Programme initiiert, die auf eine M2-Makrophagen-Polarisation hindeuten, und gleichzeitig proinflammatorische und proapoptotische Genexpression hemmt.

In LPS-aktivierter Mikroglia dagegen lassen sich nach Luteolinbehandlung 11 Gene vor allem aus den Kategorien Lipidmetabolismus, Antigenpräsentation und Antioxidans mit gesteigerter Expression identifizieren. Eine große Zahl zeigt jedoch eine verminderte Expression, besonders aus den Kategorien Proinflammation, Toll-like-Rezeptor (TLR)-Signalweg, Akut-Phase-Antwort, Apoptose und Komplementfaktoren (Abb 2 B rechts). Auch Transkripte, die sich nicht in diese Kategorien fassen lassen und bisher nicht mit Mikroglia-Aktivierung oder Flavonoid-Stimulation in Verbindung gebracht wurden, wurden bei der Analyse als signifikant identifiziert.

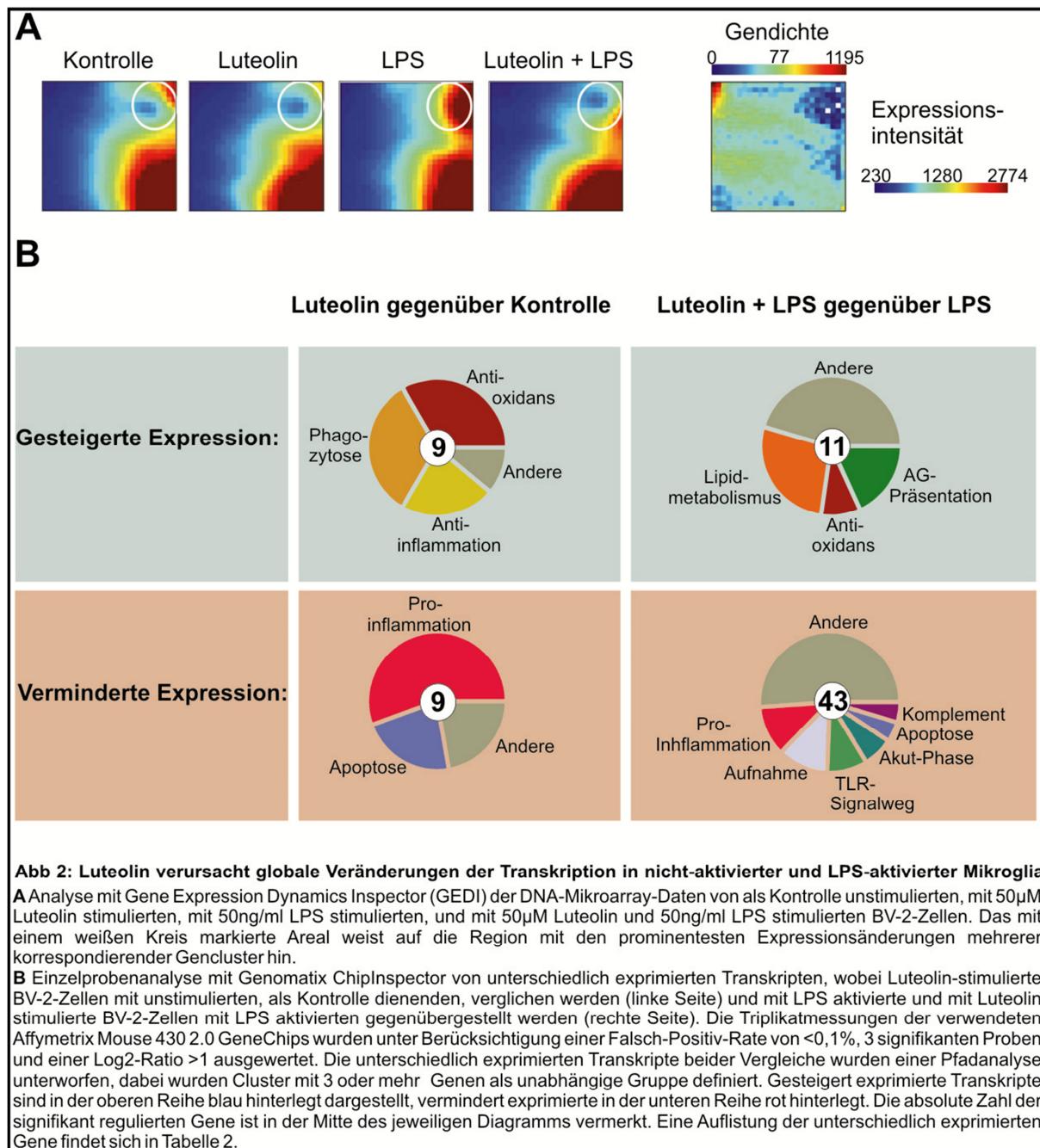


Tabelle 2: Unterschiedlich exprimierte Transkripte nach 24 Stunden Stimulation von BV-2- Zellen mit Luteolin

	Entrez Gene ID	Symbol	Genname	Fold Change	Coverage
50µM Luteolin für 24 Stunden gegenüber einer unstimulierten Kontrolle:					
vermehrt exprimiert:	74315	Rnf145	Ring finger protein 145	2,87	11
	76650	Srxn1	Sulfiredoxin 1 homolog	2,38	5
	19252	Dusp1	Dual specificity phosphatase 1	2,35	10
	12267	C3ar1	Complement component 3a receptor 1	2,30	22
	12491	Cd36	CD36 antigen	2,28	10
	12475	Cd14	CD14 antigen	2,25	10
	233016	Blvrb	Biliverdin reductase B	2,22	9
	15368	Hmox1	Heme oxygenase 1	2,17	10
	210992	Lpcat1	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1	2,13	11
vermindert exprimiert:	13198	Ddit3	DNA-damage inducible transcript 3	-5,21	11
	12862	Cox6a2	Cytochrome c oxidase, subunit VI a, Polypeptide 2	-2,89	9
	228775	Trib3	Tribbles homolog 3	-2,62	22
	56312	Nupr1	Nuclear protein 1	-2,36	15
	13011	Cst7	Cystatin F	-2,19	9
	223920	Soat2	Sterol-O-acyltransferase 2	-2,16	8
	16149	Cd74	CD74 antigen	-2,10	8
	17064	Cd93	CD93 antigen	-2,08	11
	213002	Ifitm6	Interferon induced transmembrane protein 6	-2,06	8
50 ng/ml LPS + 50µM Luteolin für 24 Stunden gegenüber 50 ng/ml LPS:					
vermehrt exprimiert:	74315	Rnf145	Ring finger protein 145	3,17	11
	210992	Lpat1	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1	2,55	11
	12522	Cdb3	CD83 antigen	2,51	11
	14630	Gclm	Glutamate-cystine ligase, modifier subunit	2,46	10
	16889	Lipa	Lysosomal acid lipase A	2,31	6
	56336	B4gal5t	Udp-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 5	2,3	8
	14950	H13	Histocompatibility 13	2,3	7
	14104	Fasn	Fatty acid synthase	2,28	4
	12125	Bcl2l11	BCL2-like 11	2,16	9
	216345	Ccdc131	Coiled-coil domain containing 131	2,11	7
vermindert exprimiert:	66141	Ifitm3	Interferon induced transmembrane protein 3	-13,74	9
	433470	AA467197	Expressed sequence AA467197, miR-147	-9,32	9
	16819	Lcn2	Lipocalin 2	-6,87	10
	14469	Gbp2	Guanylate binding protein 2	-6,41	16
	14962	Cfb	Complement factor B	-5,94	8
	13198	Ddit3	DNA-damage inducible transcript 3	-5,58	11
	16181	Il1rn	Interleukin 1 receptor antagonist	-5,28	33
	55932	Gbp3	Guanylate binding protein 3	-4,72	10
	56312	Nupr1	Nuclear protein 1	-4,35	15
	75345	Slamf7	SLAM family member 7	-4,14	9
	20210	Saa3	Serum amyloid A 3	-3,78	7
	17386	Mmp13	Matrix metalloproteinase 13	-3,63	11
	15439	Hp	Haptoglobin	-3,56	11
	17167	Marco	Macrophage receptor with collagenous structure	-3,34	8
	12266	C3	Complement component 3	-3,29	6
	12070	Cp	Ceruloplasmin	-3,05	5
	13011	Cst7	Cystatin F	-3,03	9
	23882	Gadd45g	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	-2,95	11
	242341	Atp6v0d2	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit D2	-2,81	13
	60774	Ms4a6d	Membrane-spanning 4 domain, subfamily A, member 6D	-2,75	19
	83673	Snhg1	Small nucleolar RNA host gene 1	-2,75	24
	12494	Cd38	CD38 antigen	-2,73	6
	19655	Rbmx	RNA binding motif protein, X chromosome	-2,73	11
	56405	Dusp14	Dual specificity phosphatase 14	-2,68	10
	213002	Ifitm6	Interferon induced transmembrane protein 6	-2,57	8
	12517	Cd72	CD72 antigen	-2,55	9
	14129	Fcgr1	Fc receptor, IgG, high affinity I	2,55	11
	14130	Fcgr2b	Fc receptor, IgG, low affinity IIb	-2,48	27
	231532	Arhgap24	Rho GTPase activating protein 24	-2,46	8
	29818	Hspb7	Heat shock protein family member 7 (cardiovascular)	-2,45	5
	17476	Mpeg1	Macrophage expressed gene 1	-2,43	6
	66222	Serpinb1a	Serine peptidase inhibitor clade B member 1a	-2,41	10
	78771	Mctp1	Multiple C2 domains, transmembrane 1	-2,39	8
	20568	Slpi	Sekretory leukocyte peptidase inhibitor	-2,39	9
	12507	Cd5	CD5 antigen	-2,35	9
	50778	Rgs1	Regulator of G-protein signaling 1	-2,35	11
	21897	Tlr1	Toll-like receptor 1	-2,20	5
	16149	Cd74	CD74 antigen	-2,17	5
	73167	Arhgap8	Rho GTPase activating protein 8	-2,13	8
	15064	Mr1	Major histocompatibility complex class I-related	-2,06	7
	347722	Centg2	Centaurin, gamma 2	-2,04	11
	98365	Slamf9	SLAM family member 9	-2,04	8
	72999	Insig2	Insulin induced gene 2	-2,00	8

3.4 Validierung der Microarray-Daten mittels qRT-PCR

3.4.1 Auswahl der zu validierenden Gene

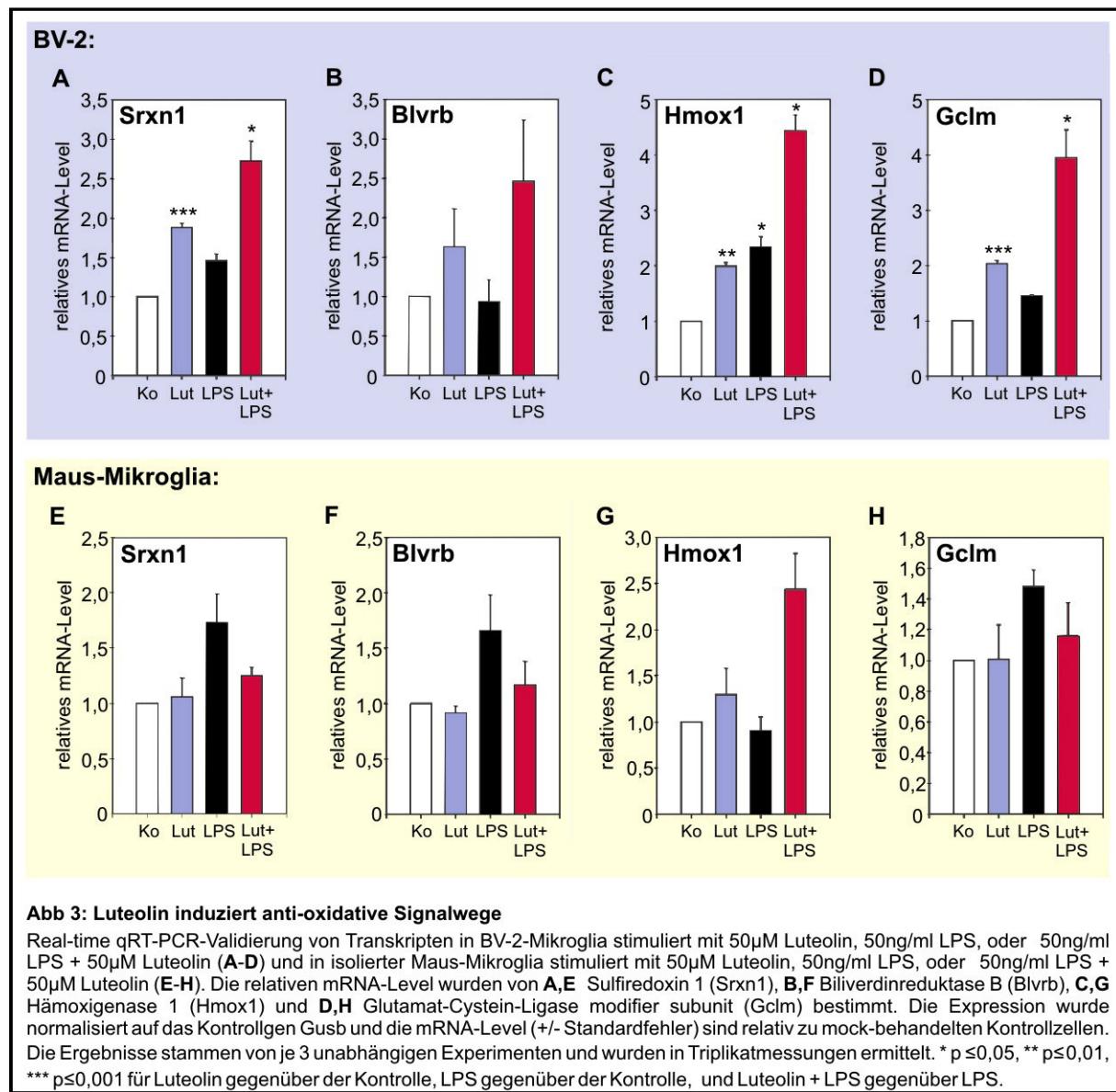
Um die aus den Microarrays erhaltenen Informationen zu bestätigen, wurden real-time qRT-PCR's durchgeführt.

Es wurden BV-2-Zellen kultiviert und in bereits erwähntem Schema unbehandelt als Kontrolle, mit 50 µM Luteolin für 24 Stunden, mit 50 ng/ml LPS und mit 50 ng/ml LPS und 50 µM Luteolin 1 Stunde danach für 24 Stunden stimuliert. Daneben wurde Mikroglia aus Gehirnen von 6 Wochen alten C57BL/6 Mäusen nach etabliertem Schema gewonnen, für 11 Tage kultiviert, und anschließend nach demselben Schema wie bei den BV-2-Zellen mit 50 µM Luteolin, 50 ng/ml LPS oder beidem behandelt, um eventuelle Unterschiede zur immortalisierten BV-2-Zelllinie zu identifizieren.

Bei der Auswahl der zu validierenden Gene konzentrierten wir uns auf repräsentative Transkripte der oben genannten funktionellen Kategorien, die bisher noch nicht als Flavonoid-Ziele beschrieben waren oder deren Funktion in Mikroglia noch nicht genau erfasst war. Dabei wurden 23 Gene ausgewählt, die diesen Vorstellungen entsprachen.

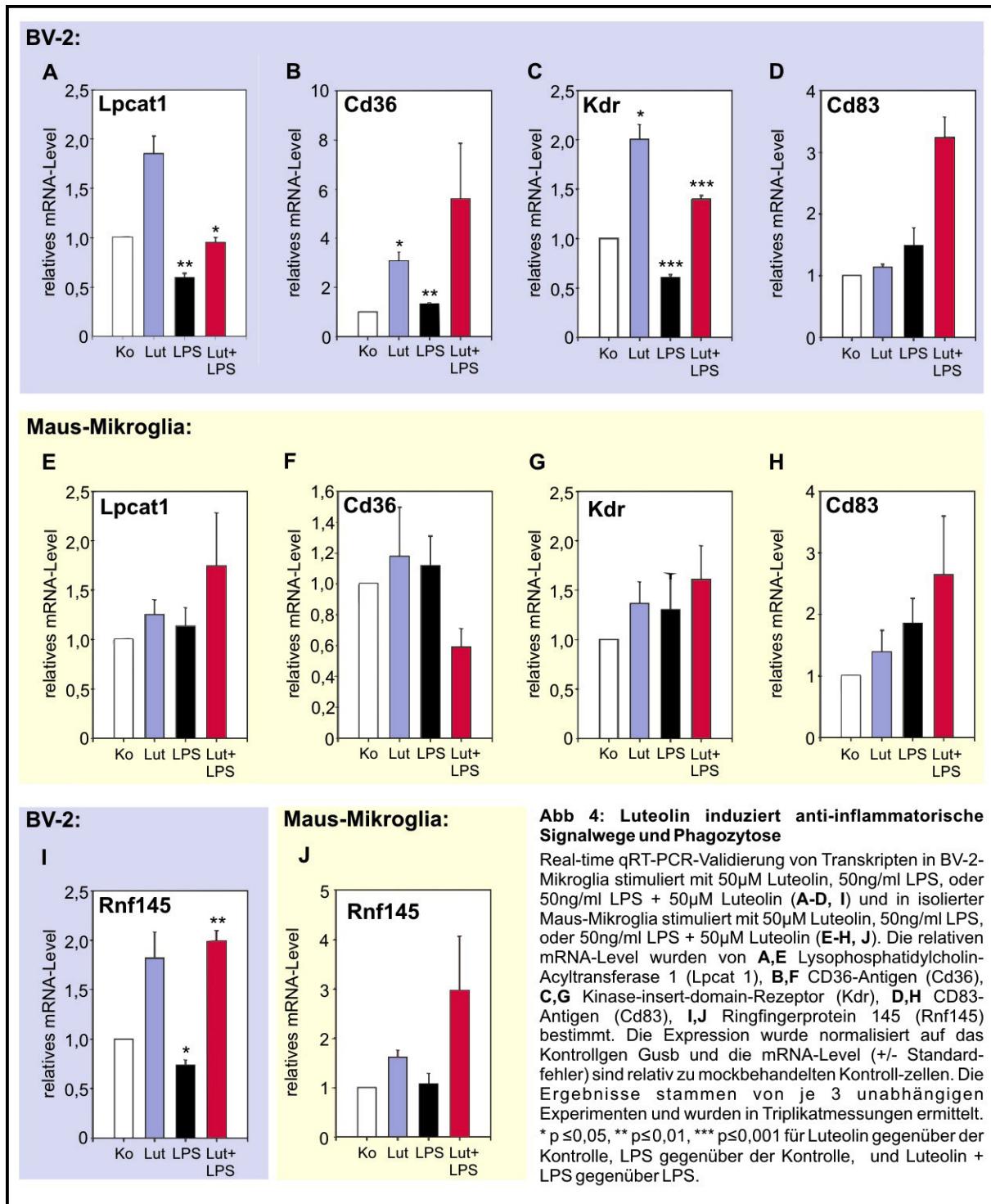
3.4.2 Induktion anti-oxidativer Signalwege durch Luteolin

Sulfiredoxin 1 (Srxn1), Biliverdin-Reduktase B (Blvrb), Hämoxigenase 1 (Hmox1), und Glutamat-Cystein-Ligase (Gclm) sind Komponenten der zellulären Protektion vor oxidativem Stress [58-61], die durch Stimulation mit Luteolin in BV-2-Mikroglia induziert werden. Eine solche Induktion ließ sich für die Hämoxigenase 1 auch in primärer Maus-Mikroglia bestätigen (Abb 3).



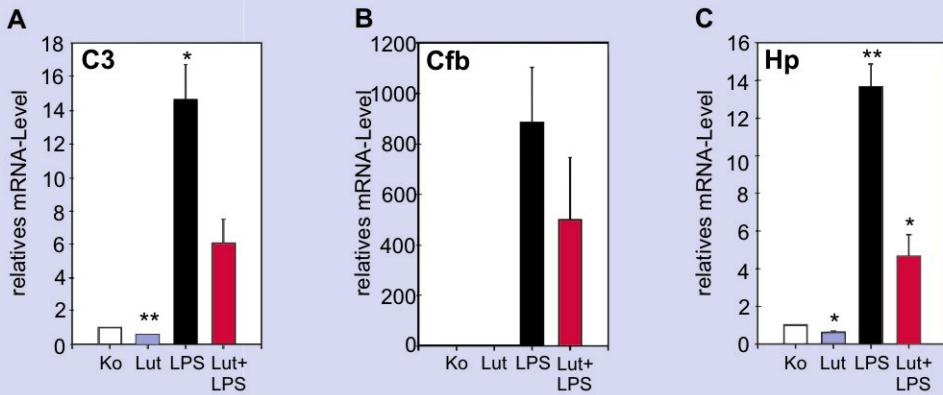
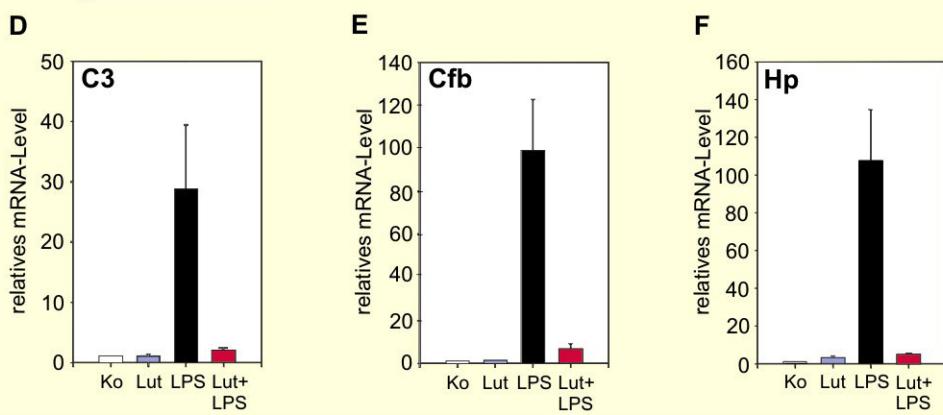
3.4.3 Induktion anti-inflammatorischer Signalwege und Phagozytose durch Luteolin

Desweiteren ließen sich gesteigerte mRNA-Level von Lysophosphatidylcholin-Acyltransferase 1 (Lpcat1), CD36-Antigen (Cd36), Kinase insert domain-Rezeptor (Kdr alias Vegfr2), und CD83-Antigen (Cd83) sowohl in BV-2-Mikroglia als auch in primärer Maus-Mikroglia bestätigen (Abb 4 A-H). Lpcat1 katalysiert die Inaktivierung inflammatorischer Lipide [62], die Funktion von Cd83 ist derzeit kontrovers diskutiert, allerdings wurde gezeigt, dass es in Dendritischen Zellen und Makrophagen zu einer schnellen Oberflächenexpression des im Zytoplasma gelöst vorhandenen Moleküls bei Aktivierung mit LPS kommt. Dieser Prozess scheint aber post-translational zu sein [63]. Cd36 und Kdr sind Oberflächenrezeptoren, die bei Phagozytose und chemotaktischer Migration involviert sind [64, 65]. Überdies finden sich beim Ringfingerprotein 145 (Rnf145), dessen Funktion derzeit nicht bekannt ist, stark erhöhte Expressionswerte (Abb 4 I,J).

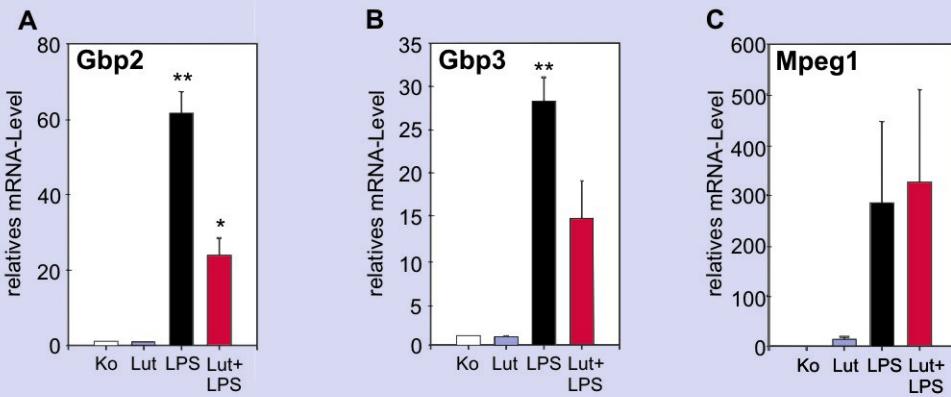
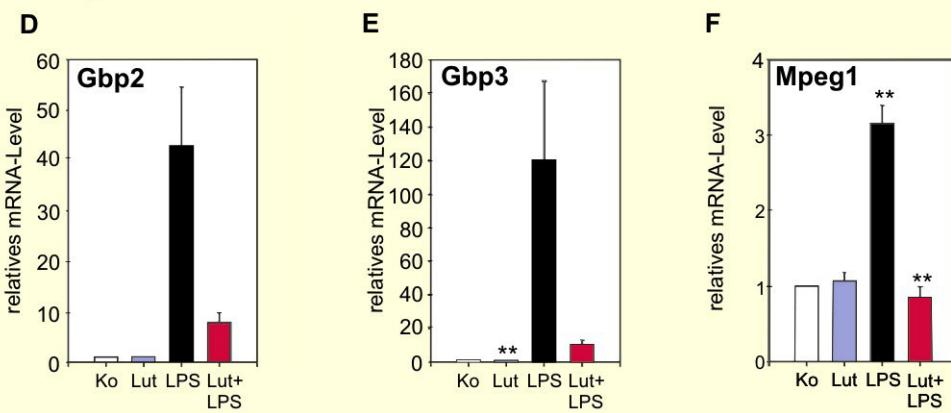


3.4.4 Verminderung der pro-inflammatorischen Aktivierung und der Akute-Phase-Reaktion durch Luteolin

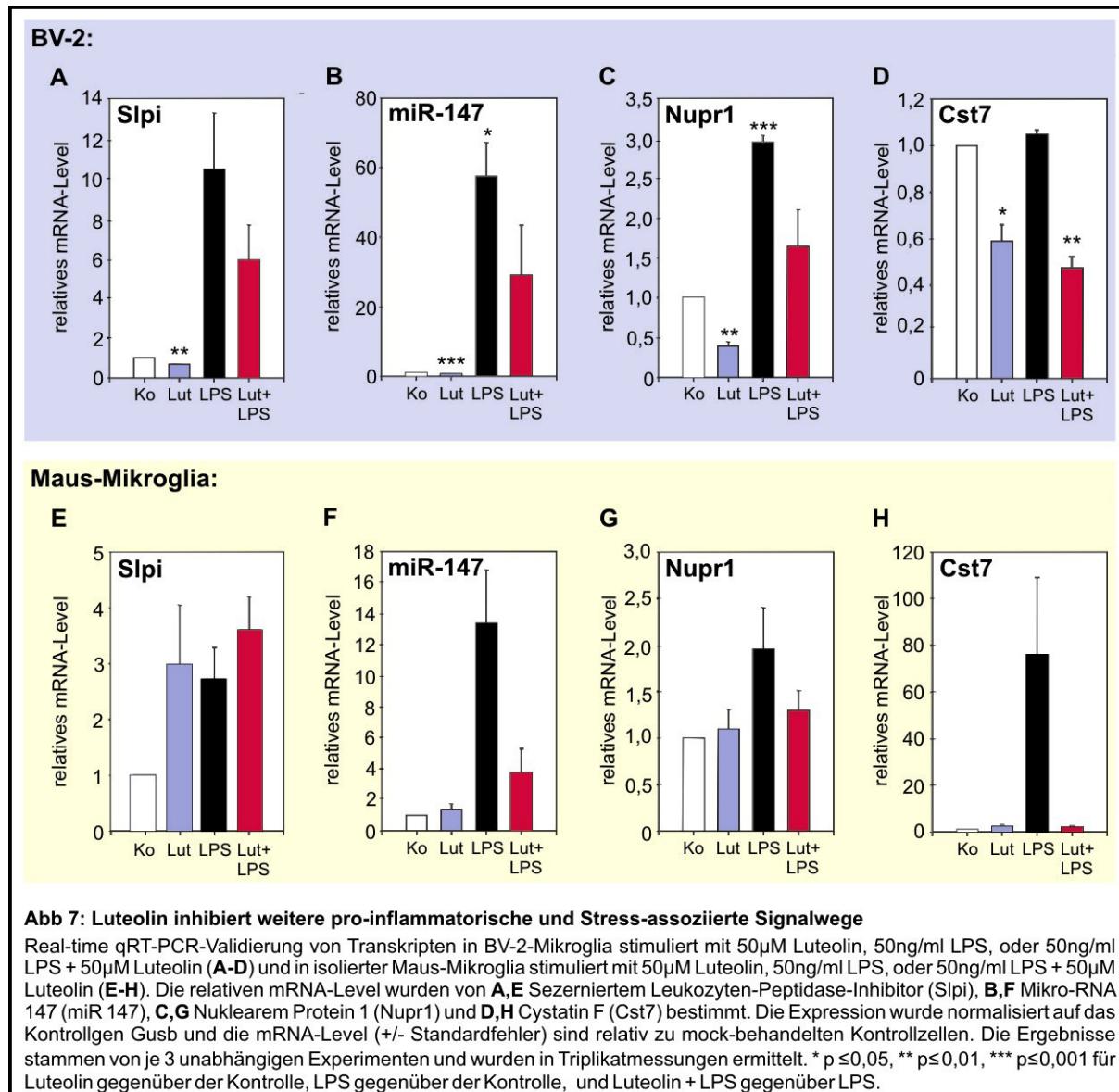
Außerdem wurden Gene mittels real-time qRT-PCR analysiert, die eine verminderte Expression bei Luteolingabe zeigten und bei der pro-inflammatorischen Aktivierung und Akuten-Phase-Reaktion eine Rolle spielen. Komplementfaktor 3 (C3), Komplementfaktor B (Cfb), und das Akute-Phase-Protein Haptoglobin (Hp) wiesen deutlich erniedrigte mRNA-Level sowohl in der BV-2-Zelllinie als auch in primärer Maus-Mikroglia auf (Abb 5). Ähnliches wurde bei dem Makrophagen-spezifischen Östradiol-abhängigen Makrophagen-exprimierten Gen 1 (Mpeg1) in primärer Mikroglia und den pro-inflammatorischen Guanylat-Bindeproteinen 2 und 3 (Gbp2 und Gbp3) in der BV-2-Zelllinie und in primärer Mikroglia sichtbar (Abb 6). Guanylat-Bindeproteine sind durch ihre Oligomerisations-abhängige Stimulation der Hydrolyse von GTP charakterisiert. Im Gegensatz zu Gbp4 und Gbp5 wird die Expression von Gbp2 und Gbp3 nicht nur durch Interferon γ (INF- γ), sondern auch durch Tumor-Nekrosefaktor α (TNF α) und Interleukin 1 β (IL-1 β) induziert [66,67]. Beim Sezernierten Leukozyten-Peptidase-Inhibitor (Slpi) war eine Reduktion in BV-2-Zellen feststellbar, es ließ sich jedoch in primärer Mikroglia nicht bestätigen. Eine ähnliche Tendenz wie bei Gbp2 und Gbp3 ließ sich bei der kürzlich identifizierten Mikro-RNA miR-147 (vormals AA467197), die in den Toll-like-Rezeptor-Signalweg involviert ist [68], dem Nuklearen Protein 1 (Nupr1 alias p8), das ebenfalls mit Stress assoziiert ist [69], und Cystatin F (Cst7 alias Leukocystatin), das als Fraktion von Zellen des angeborenen Immunsystems sezerniert und wiederum durch Proteasen aktiviert wird [70], beobachten (Abb 7).

BV-2:**Maus-Mikroglia:****Abb 5: Luteolin inhibiert Signalwege der Akuten-Phase-Reaktion**

Real-time qRT-PCR-Validierung von Transkripten in BV-2-Mikroglia stimuliert mit 50 μ M Luteolin, 50ng/ml LPS, oder 50ng/ml LPS + 50 μ M Luteolin (**A-C**) und in isolierter Maus-Mikroglia stimuliert mit 50 μ M Luteolin, 50ng/ml LPS, oder 50ng/ml LPS + 50 μ M Luteolin (**D-F**). Die relativen mRNA-Level wurden von **A,D** Komplementfaktor 3 (C3), **B,E** Komplementfaktor B (Cfb) und **C,F** Haptoglobin (Hp) bestimmt. Die Expression wurde normalisiert auf das Kontrollgen Gusb und die mRNA-Level (+/- Standardfehler) sind relativ zu mock-behandelten Kontrollzellen. Die Ergebnisse stammen von je 3 unabhängigen Experimenten und wurden in Triplikatmessungen ermittelt. * p \leq 0,05, ** p \leq 0,01, *** p \leq 0,001 für Luteolin gegenüber der Kontrolle, LPS gegenüber der Kontrolle, und Luteolin + LPS gegenüber LPS.

BV-2:**Maus-Mikroglia:****Abb 6: Luteolin inhibiert pro-inflammatorischen Guanylat-Bindeproteine und Makrophagen-spezifische Proteine**

Real-time qRT-PCR-Validierung von Transkripten in BV-2-Mikroglia stimuliert mit 50µM Luteolin, 50ng/ml LPS, oder 50ng/ml LPS + 50µM Luteolin (**A-C**) und in isolierter Maus-Mikroglia stimuliert mit 50µM Luteolin, 50ng/ml LPS, oder 50ng/ml LPS + 50µM Luteolin (**C-F**). Die relativen mRNA-Level wurden von **A,D** Guanylat-Bindeprotein 2 (Gbp2), **B,E** Guanylat-Bindeprotein 3 (Gbp3), und **C,F** Makrophagen-exprimiertem Gen 1 (Mpeg1) bestimmt. Die Expression wurde normalisiert auf das Kontrollgen Gusb und die mRNA-Level (+/- Standardfehler) sind relativ zu mock-behandelten Kontrollzellen. Die Ergebnisse stammen von je 3 unabhängigen Experimenten und wurden in Triplikatmessungen ermittelt. * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001 für Luteolin gegenüber der Kontrolle, LPS gegenüber der Kontrolle, und Luteolin + LPS gegenüber LPS.



3.4.5 Inhibition pro-apoptotischer Signalwege und Verminderung von Genen der Deramifizierung durch Luteolin

Als dritte Gruppe wurden Gene, die mit Apoptose und Formveränderung von Mikroglia in Zusammenhang stehen und bei Luteolingabe vermindert exprimiert worden waren, durch qRT-PCR validiert (Abb 8). Es handelt sich um die apoptotischen Mediatoren DNA-damage inducible transcript 3 (Ddit3 alias Chop oder Gadd153) [71] und das Tribbles homolog 3 [72] und die Moleküle Makrophagen-Rezeptor mit kollagener Struktur (Marco) und Lipocalin 2 (Lcn2), die eine duale Rolle in Apoptose und Deramifizierung in aktivierter Mikroglia spielen [73, 74]. Die Ergebnisse der Micro-Arrays, dass pro-apoptotische Signalwege durch Luteolin vermindert werden, bestätigten sich für Ddit3 und Trib3 in der BV-2-Zelllinie, konnten jedoch in primärer Maus-Mikroglia nicht nachgewiesen werden. Für das Trib3 wurden sogar hochsignifikant vermehrte Expressionswerte in primärer Maus-Mikroglia erkannt. Für Marco und Lcn2 bekräftigte die qRT-PCR die Ergebnisse der Micro-Arrays sowohl in BV-2-Zellen als auch in primärer Maus-Mikroglia.

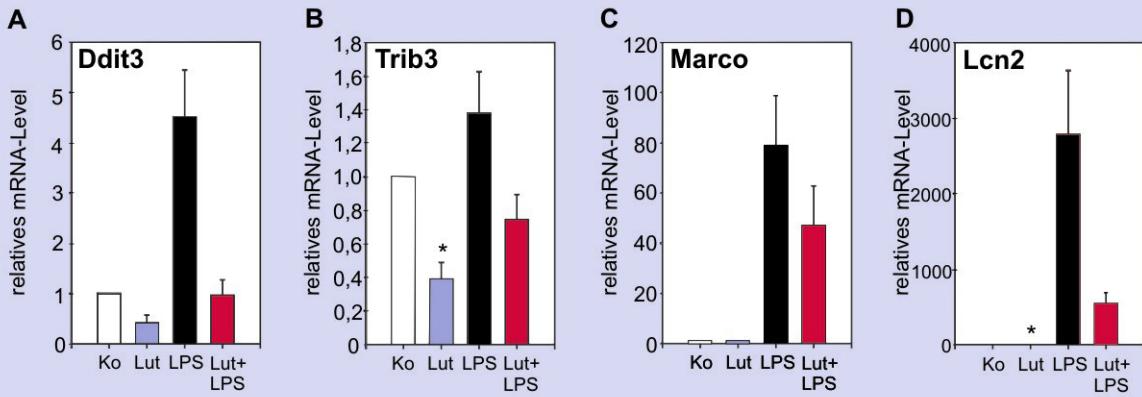
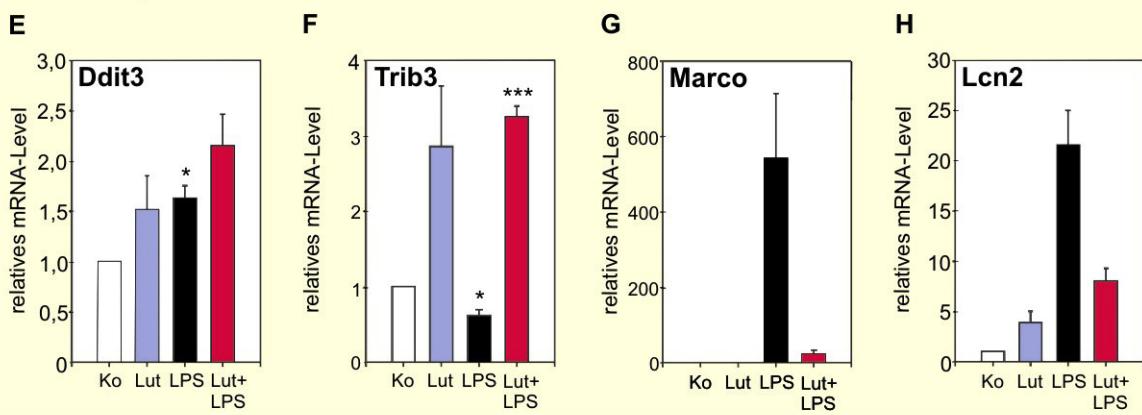
BV-2:**Maus-Mikroglia:**

Abb 8: Luteolin inhibiert Apoptose-assoziierte Signalwege nur in der BV-2-Zelllinie und vermindert Gene der De-Ramifizierung in der BV-2-Zelllinie und in primärer Mikroglia

Real-time qRT-PCR-Validierung von Transkripten in BV-2-Mikroglia stimuliert mit 50µM Luteolin, 50ng/ml LPS, oder 50ng/ml LPS + 50µM Luteolin (**A-D**) und in isolierter Maus-Mikroglia stimuliert mit 50µM Luteolin, 50ng/ml LPS, oder 50ng/ml LPS + 50µM Luteolin (**E-H**). Die relativen mRNA-Level wurden von **A,E** DNA-damage-inducible transcript 3 (Ddit3), **B,F** Tribbles homolog 3 (Trib3), **C,G** Makrophagen-Rezeptor mit kollagener Struktur (Marco), und **D,H** Lipocalin 2 (Lcn2) bestimmt. Die Expression wurde normalisiert auf das Kontrollgen Gusb und die mRNA-Level (+/- Standardfehler) sind relativ zu mock-behandelten Kontrollzellen. Die Ergebnisse stammen von je 3 unabhängigen Experimenten und wurden in Triplikatmessungen ermittelt. * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001 für Luteolin gegenüber der Kontrolle, LPS gegenüber der Kontrolle, und Luteolin + LPS gegenüber LPS.

3.5 Reduktion der Menge an enzymatisch aktiven Spaltprodukten des Komplementfaktors B durch Luteolin

Da die Annahme, dass erhöhte mRNA-Level auch tatsächlich mit erhöhtem Gehalt an exprimierten Protein einhergehen, bestätigt werden sollte, wurde eine Western Blot-Analyse von einem Produkt der mit qRT-PCR validierten Gene durchgeführt. Dafür wurden unbehandelte, mit 50 μ M Luteolin behandelte, mit 50 ng/ml LPS aktivierte oder mit 50 μ M Luteolin und 50 ng/ml LPS kostimulierte BV-2- Zellen für 24 Stunden inkubiert und 20 μ g Zelllysat je Probe verwendet.

Wir entschieden uns, den Komplementfaktor B (Cfb) zu untersuchen, denn Cfb nimmt als C3/C5-Konvertase eine zentrale Rolle in der angeborenen Immunantwort ein und wird in Zusammenhang mit der altersabhängigen Makuladegeneration gebracht [75]. Das 93 000 Dalton schwere Molekül wird bei Aktivierung durch Faktor D gespalten, wobei das Spaltprodukt Bb als Serin-Protease die enzymatische Funktion der C3/C5-Konvertase übernimmt. Faktor B besteht aus 3 globulären Domänen von annähernd gleicher Größe, von denen zwei das Bb-Fragment bilden, jedoch ist nur die 33 kDa-Domäne in der Lage, an C3b zu binden [76].

Sowohl BV-2-Zellen als auch primäre Mikroglia zeigten für Cfb bei LPS-Aktivierung deutlich erhöhte mRNA-Level, welche durch Koinkubation mit Luteolin deutlich reduziert wurden. Dieser Effekt konnte mittels Western Blot zwar nicht für das komplette Protein nachgewiesen werden, er bestätigte sich aber in Bezug auf die enzymatisch aktiven Spaltprodukte. In der Positivkontrolle zeigt sich deutlich die aktivierte Bb-Fraktion bei etwa 60 kDa, in den Zelllysaten ausschließlich bei LPS-stimulierter Mikroglia sichtbar. Deutlich erkennbar wird der reduzierende Effekt von Luteolin insbesondere im Bereich von 33 kDa, in dem sich die Domäne mit Bindungsfähigkeit an C3b befindet. Hier zeigt sich eine deutlich verminderte Nachweisbarkeit bei Luteolin-behandelten Zelllysaten ruhender und aktiverter Mikroglia (Abb 9).

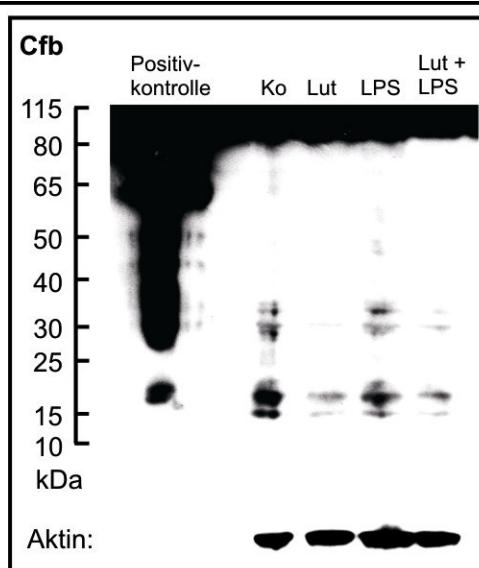


Abb 9: Luteolin reduziert enzymatische Spaltprodukte des Komplementfaktors B

Western Blot-Analyse von Komplementfaktor B (Cfb) in BV-2-Mikroglia stimuliert mit 50µM Luteolin, 50ng/ml LPS, oder 50µM Luteolin + 50ng/ml LPS. Es wurde je 20µg Zelllysat eingesetzt, als Positivkontrolle wurde humaner Faktor B verwendet.

3.6 Änderung der Morphologie in Mikroglia und Inhibition der NO-Sekretion durch Luteolin

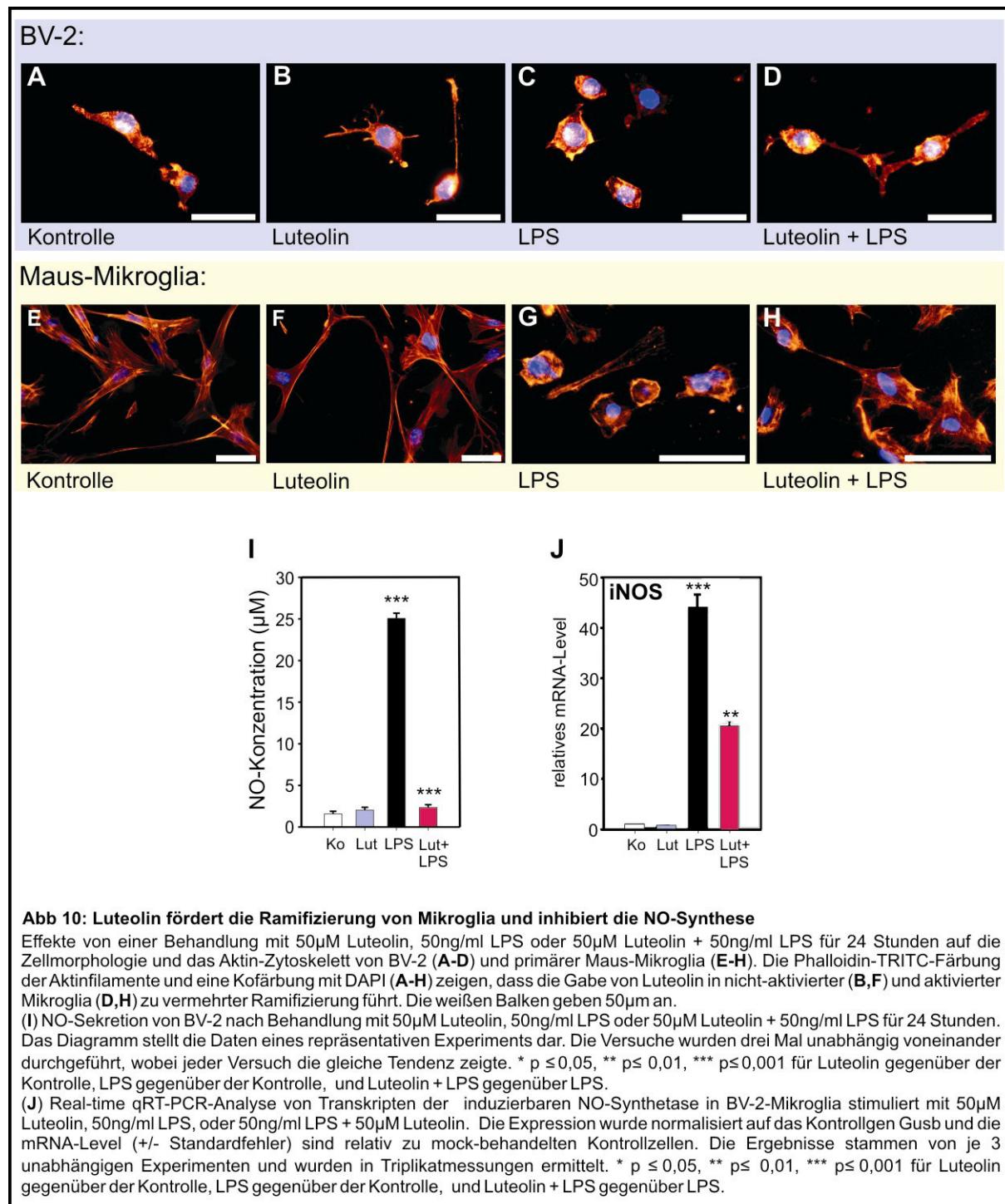
Um herauszufinden, ob die festgestellten Änderungen des Expressionsprofils Luteolin-stimulierter Mikroglia tatsächlich auch zu einer Modifikation funktioneller Eigenschaften führten, wurden weitere Versuche in diese Richtung durchgeführt.

Da eine verminderte Expression de-ramifizierender Gene aufgefallen war, erfolgte zunächst eine phänotypische Charakterisierung. Der allgemeine Aktivierungsstatus hat morphologische Korrelate. Ruhende Mikroglia zeigt physiologisch eine ausgeprägte Ramifizierung mit langen Zellausläufern, wohingegen durch inflammatorische Prozesse aktivierte Mikroglia eine runde Form mit kurzen Philopodien annimmt. Dies spiegelt sich vor allem in der Zellform und der Organisation des Zytoskeletts wider [8]. Um Änderungen in der Morphologie zu erkennen und Zellausläufer darstellen zu können, wurde eine Färbung mit Phalloidin-TRITC durchgeführt. Dabei stellten sich die unstimulierten BV-2-Zellen flach und mit einigen Philopodien dar (Abb 10 A). BV-2-Zellen, die für 24 Stunden mit Luteolin inkubiert wurden, präsentierten sich ramifiziert und bildeten oft lange, dünne Zellfortsätze aus (Abb 10 B). Eine LPS-Aktivierung von BV-2-Mikroglia verursachte die Ausbildung einer runden, kompakten Zellform mit eingezogenen, kurzen Philopodien (Abb 10 C). Eine Koinkubation von LPS-aktivierten BV-2-Zellen mit Luteolin führte dagegen zu einer persistierenden Ramifikation, womit die Zellen morphologisch dem ruhenden Typus ähnelten (Abb 10 D). Dieser Effekt ließ sich in ähnlicher Weise auch in primärer Maus-Mikroglia darstellen (Abb 10 E-H).

In diesem Zusammenhang war nun von Interesse, ob Luteolin neben morphologischen Veränderungen auch eine verminderte Sekretion toxischer Metabolite bewirkt. Aus diesem Grund wurden die NO- Konzentrationen in den Überständen der BV-2-Zellen gemessen. Eine alleinige Gabe von 50 μ M Luteolin bewirkte keine signifikanten Änderung der NO-Konzentration, wohingegen eine LPS-Aktivierung mit 50 ng/ml die sezernierte NO-Menge erheblich steigerte. Eine Koinkubation mit 50 μ M Luteolin konnte eine Steigerung beinahe komplett verhindern (Abb 10 I). Der Versuch konnte nicht mit primärer Mikroglia nachvollzogen werden, da die Zelldichten erheblich geringer als bei der BV-2-Zelllinie waren und somit die sezernierten NO-Mengen unterhalb der Detektionsgrenze lagen.

Es wurde bereits beschrieben, dass Luteolin die NO-Sekretion in LPS-stimulierter BV-2-Mikroglia über eine verminderte Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) reduziert [77]. Um dies unabhängig zu prüfen, wurde eine qRT-PCR-Messung der iNOS-mRNA-Level in BV-2-Mikroglia durchgeführt, die mit 50 μ M Luteolin, 50 ng/ml LPS oder 50 μ M Luteolin und 50 ng/ml LPS für 24 Stunden stimuliert worden waren. Dabei wiesen die LPS-aktivierten Proben eine starke Steigerung der iNOS-mRNA-Level auf, wohingegen eine Kostimulation mit Luteolin die iNOS-mRNA-Level etwa auf die Hälfte senkte.

Somit stellt eine verminderte Expression der iNOS eine plausible Erklärung für die verminderte NO-Sekretion dar.



3.7 Verminderung der Neurotoxizität auf Photorezeptoren durch Luteolin

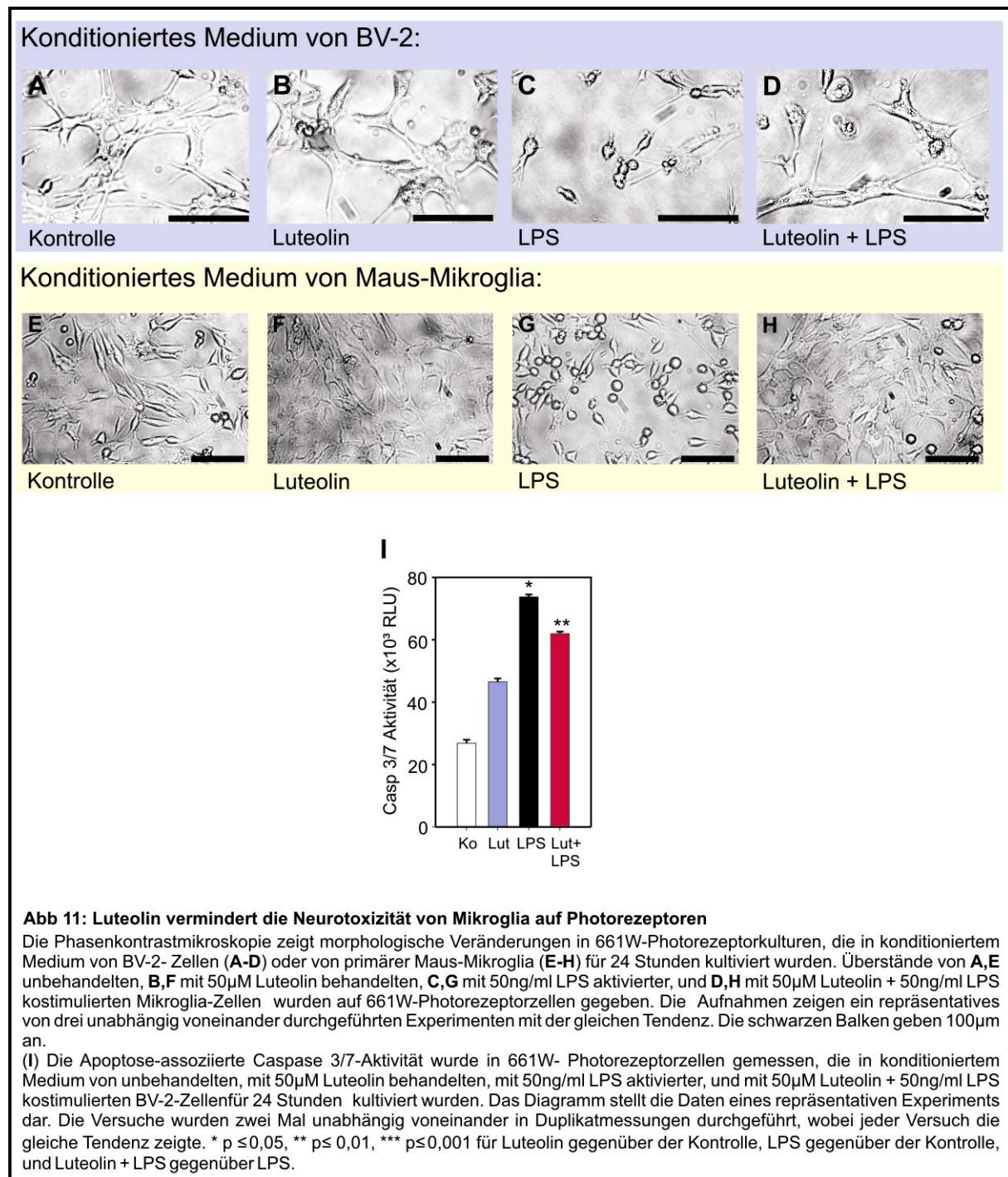
Zur Testung der Hypothese, dass Luteolin die Neurotoxizität von Mikroglia reduziert, wurde ein Zellkultursystem von 661W-Photorezeptorzellen mit konditioniertem Medium von BV-2-Zellen oder primärer Maus-Mikroglia eingeführt. 661W ist eine aus der Retina stammende Photorezeptorzelllinie [78], die ein verlässliches Modell darstellt, um Neurotoxizität von Mikroglia insbesondere im Kontext der Retina-Degeneration zu untersuchen [56]. Konfluent wachsende Zellen der 661W-Photorezeptorzelllinie weisen normalerweise eine flache, weit ausgebreitete Form auf und sind über multiple Ausläufer miteinander verbunden [79].

661W-Photorezeptorzellen wurden für 24 Stunden mit Zellüberständen von BV-2-Zellen beziehungsweise primärer Mikroglia – so genanntem konditioniertem Medium (MCM) – inkubiert, die wiederum mit 50 μ M Luteolin, 50 ng/ml LPS oder 50 μ M Luteolin und 50 ng/ml LPS für 24 Stunden behandelt worden waren. Die Zellmorphologie wurde mittels Phasenkontrast-Mikroskopie begutachtet.

661W-Zellen wuchsen nach 24 Stunden in ihrem eigenen Medium konfluent. Konditioniertes Medium von BV-2-Zellen und primärer Mikrogliazellen, die unbehandelt oder nur mit Luteolin inkubiert worden waren, beeinflusste die Zellmorphologie der 661W-Photorezeptorzellen nicht (Abb 11 A,B,E,F). Wurde dagegen konditioniertes Medium von LPS-aktivierter Mikroglia den Photorezeptorzellen zugeführt, erschienen sie verlängert und kleiner, was zu auffallend zellfreien Arealen in der Zellkultur führte (Abb 11 C,G). Wurde konditioniertes Medium von LPS-aktivierten Zellen, die mit Luteolin koinkubiert worden waren, den 661W-Zellen verabreicht, so erlangten sie eine annähernd normale Zellmorphologie (Abb 11 D,H). Eine direkte Exposition der 661W-Photorezeptoren gegenüber Luteolin oder LPS in den verwendeten Konzentrationen zeigte keine Effekte auf die Zellmorphologie. Somit kann angenommen werden, dass die erkennbaren Veränderungen der Photorezeptoren auf eine Änderung der von Mikroglia sezernierten Stoffe zurückzuführen ist.

Auch hierbei wurde versucht, eine Korrelation der mikroskopisch sichtbaren Veränderungen mit funktionellen Daten zu erfassen. Dazu wurde der Einfluss von Produkten, die von Mikroglia sezerniert werden, auf den Apoptose-Signalweg mittels der Messung der Aktivität von Caspase 3 und 7 in dem oben beschriebenen neuronalen Zellmodell untersucht. Es zeigte sich in der Gegenwart von konditioniertem Medium von LPS-aktivierten BV-2-Zellen eine starke Induktion der Caspase 3/7-Aktivität. Durch eine Kostimulation mit Luteolin konnte die Caspase-Aktivität, die als Zeichen für Apoptose angesehen werden kann, signifikant vermindert werden. Bei der Gabe von konditioniertem Medium von unstimulierten oder mit Luteolin behandelten BV-2-Zellen war kein signifikanter Effekt auf die Apoptose von 661W-Photorezeptorzellen erkennbar (Abb 11 I).

Somit kann festgehalten werden, dass Luteolin die Neurotoxizität von Mikroglia vermindert, wobei die Vermutung naheliegt, dass dies über eine verminderte Produktion von neurotoxischen Substanzen zustande kommt.



4 Diskussion

4.1 Globale Veränderung des Transkriptoms von Mikroglia durch Luteolin

Wie andere pflanzliche Flavonoide besitzt Luteolin diverse biologische Eigenschaften sowie ein anti-mutagenes und anti-tumorigenes Potenzial [80]. Obwohl viele Untersuchungen bezüglich einer protektiven Wirkung bei neurodegenerativen, allergischen oder chronisch entzündlichen Erkrankungen durchgeführt wurden [34], existiert wenig Information über Transkriptionsmechanismen oder molekulare Ziele von Luteolin. Aus diesem Grund wurde von uns die erste genomweite Studie von Luteolin-vermittelten Transkriptionseffekten in Mikroglia durchgeführt.

Überraschenderweise zeigte sich, dass Luteolin einen starken und vielfältigen Einfluss auf das Transkriptom zum einen von ruhender, insbesondere aber von LPS-aktivierter Mikroglia ausübt. Die Daten der Microarray-Untersuchungen ermöglichen das Erkennen mehrerer Luteolin-regulierter Signalwege.

4.2 Verstärkte anti-oxidative Wirkung von Luteolin in der BV-2-Zelllinie

Es stellte sich heraus, dass Luteolin nicht nur die direkte anti-oxidative Wirkung besitzt, die durch die Struktur der Flavonoide gegeben ist [81], sondern auch die Expression von anti-oxidativ wirkenden Enzymen induziert. Das zeigen die deutlich gesteigerten Expressionswerte von Srxn1, Blvrb, Hmox1, und Gclm in BV-2-Zellen. Der stimulierende Effekt auf die Expression von Hmox1 steht im Einklang mit einer bereits an anderer Stelle für die Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 beschriebenen Expressionssteigerung dieses Gens durch das Flavonoid. Stimulation mit Luteolin induziert die Bindung des Transkriptionsfaktors NF-E2-related factor 2 (Nrf2) an anti-oxidative Antwortmoleküle (anti-oxidant response elements, ARE) in der Hmox1-Promotorregion [82], wobei Luteolin ein potenter Aktivator von Nrf2 ist [83]. Auch die regulatorische Region von Srxn1, dessen Expressionswerte in der BV-2-Zelllinie bei Luteolinstimulation erhöht waren, beinhaltet ARE [84]. Daneben zeigten Fibroblasten aus von Nrf2 -/- Mausembryos signifikant niedrigere Blvrb- und Gclm-Expressionslevel bei Diquat-Induktion [85]. Das legt den Schluss nahe, dass die gesteigerte Expression von Srxn1, Blvrb und Gclm ebenfalls auf die Aktivierung von Nrf2 zurückzuführen ist. Unterstützt wird die Annahme durch die Tatsache, dass in mehreren neurodegenerativen Erkrankungen in Zusammenhang mit Mikroglia dem Nrf2 ein protektiver Effekt zugesprochen wird [86]. In Anbetracht dessen, dass in primärer Mikroglia nur für Hmox1 gesteigerte Expressionslevel nachgewiesen werden konnten, muss das allerdings teilweise relativiert werden. So bleibt festzuhalten, dass in unseren Untersuchungen in der aus Tumorzellen generierten immortalisierten BV-2-Zelllinie ein

einheitig stärkerer und weitreichenderer anti-oxidativer Effekt als bei primären Zellen auftrat.

4.3 Erhöhung der Phagozytose-Aktivität von Mikroglia durch Luteolin

Des Weiteren verstärkte Luteolin die mRNA-Synthese von anderen Genen, die eine Rolle bei anti-inflammatorischen Reaktionen spielen. Lpcat1 konvertiert den Lysoplatelet activation factor zum Platelet activation factor und Lysophosphatidylcholin zu Phosphatidylcholin [87], wobei Lysophosphatidylcholin neuroinflammatorische Prozesse im Gehirn auslöst, die Hemmung des Lysophosphatidylcholin- Signalwegs in Astrozyten und Mikroglia dagegen neuroprotektiv wirkt [88]. Da Lpcat1 in der Retina stark exprimiert ist, kann man somit mutmaßen, dass Luteolin-induzierte hohe Lpcat1-Expressionslevel zu verminderten Lysophosphatidylcholin-Leveln führen und damit dort neuroprotektiv wirken.

Außerdem steigerte Luteolin auch die mRNA-Level von Cd36 und Kdr (alias Vegfr2). CD36 steht mit dem Zytoskelett in Verbindung und steuert in Mikroglia die Zellmigration und Phagozytose [89], Kdr hingegen ist, wie bereits erwähnt, in die chemotaktische Antwort von Mikroglia involviert [90]. Daraus lässt sich folgern, dass es bei Luteolingabe durch die gesteigerte Expression beider Gene zu einer gesteigerten phagozytotischen Aktivität ohne vermehrte Entzündungsreaktion kommt. Die Rolle des Ringfingerproteins Rnf145 sowie die des Oberflächenrezeptors Cd83 hierbei bleibt noch zu klären.

4.4 Entfachung anti-inflammatorischer Wirkung von Luteolin auch über NFkB-unabhängige Signalwege

Es wurde bereits in mehreren Analysen gezeigt, dass Luteolin in verschiedenen Zelltypen die Expression proinflammatorischer Zytokine mittels einer Hemmung des NFkB-Signalweges vermindert [33]. Die Daten, die wir aus den Microarrays erhielten, bestätigen dies. Bei unseren Untersuchungen mit primärer Mikroglia trat dieser Effekt sogar verstärkt zutage. Dabei wurde auch eine verminderte Expression von weiteren NFkB-Zielgenen wie der kürzlich entdeckten microRNA miR-147 offengelegt [91].

Daneben aber wurde nachgewiesen, dass Luteolin die IL-6-Produktion in Mikroglia vor allem über ein Inhibieren des JNK-Signalweges und eine AP1-Aktivierung vermindert, ohne die DNA-Bindung von NFkB oder die zellulären Level von I kB- α zu beeinflussen [52]. Unsere durchgeföhrten Expressionsprofile bestätigten auch dies. Wir konnten mehrere Gene identifizieren, deren Expression durch Luteolin reduziert wird und die unabhängig von NFkB reguliert werden. Wir fanden eine stark verminderte Expression und eine Reduzierung der aktiven Spaltprodukte von Komplementfaktor 3, der durch AP1 reguliert wird [91], niedrigere mRNA-Level des Akute-Phase-Proteins Haptoglobin und der proinflammatorischen GTPasen Gbp2 und Gbp3, die durch STATs (signal transducer

and activators of transcription) gesteuert werden [92,93]. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass Luteolin die proinflammatorische Aktivierung von Mikroglia auf mehreren unterschiedlichen Wegen dämpft.

4.5 Sensibilisierung primärer Mikroglia gegenüber Apoptose durch Luteolin

Neben proinflammatorischen Genen wurden auch pro-apoptotische Gene identifiziert, die in der BV-2- Zelllinie bei Luteolingabe vermindert auftraten. Apoptose ist zusammen mit hohem Lebensalter ein Risikofaktor für neurodegenerative Veränderungen [94], dabei scheint Mikroglia gegenüber Apoptose anfälliger zu sein als Makrophagen [95]. Für Luteolin wird bereits eine anti-apoptotische Wirkung mit einer Steigerung der Bcl-2/Bax-Ratio in ischämischem Herzgewebe angenommen [96]. Ddit3 und Trib3 induzieren Stress-und NO-abhängige Apoptose [71,72] und zeigten beide bei LPS-Stimulation eine gesteigerte Expression, bei Luteolingabe eine verminderte. Bei Versuchen mit primärer Mikroglia trat jedoch hochsignifikant eine gegenteilige Regulation auf. Trib3 wurde durch LPS vermindert und durch Luteolin vermehrt exprimiert. In Anbetracht dessen, dass auch die oben beschriebenen Gene antioxidativer Moleküle in primärer Mikroglia nicht signifikant erhöht waren, kann angenommen werden, dass zwar bei Zellen der immortalisierten BV-2-Zelllinie Luteolin das Überleben von Stress-aktivierter Mikroglia fördert, bei primärer Mikroglia jedoch ein anderer Antwortmechanismus gegenüber oxidativem Stress vorzuherrschen scheint und somit diese durch Luteolin eher bezüglich Apoptose sensibilisiert wird.

4.6 Induktion morphologischer Veränderungen in Mikroglia durch Luteolin

Unerwarteterweise deckte unser Datensatz auf, dass Luteolin die Expression von Lcn2 und Marko vermindert. Die beiden Moleküle sind in die Ramifizierung und die Filopodienbildung von Mikroglia involviert. Es wurde kürzlich von Lee *et al.* gezeigt, dass dauerhafte Expression von Lcn2 in der BV-2-Zelllinie – der selben Zelllinie, die auch in unseren Experimenten verwendet wurde – eine runde Zellform mit einem Verlust von Zellfortsätzen nach sich zieht [73]. Ebenso verursacht eine Überexpression von Marco in dendritischen Zellen eine runde Form und verminderte Antigenaufnahme [74]. Somit nahmen wir an, dass die beobachteten Veränderungen in den mRNA-Level der beiden Gene auch morphologische Unterschiede nach sich ziehen dürften.

Die hierauf durchgeführten morphologischen und funktionellen Experimente unterstützten diese Annahmen. Luteolin verändert direkt den Phänotyp von Mikroglia, indem es sowohl bei der BV-2-Zelllinie als auch bei primärer Mikroglia die Filopodienformation anregt und eine Ramifizierung hervorruft. Der Effekt trat sogar bei starker LPS-Aktivierung auf.

4.7 Protektion von Photorezeptorzellen vor LPS-induzierter Mikroglia-Toxizität durch Luteolin

Darüber hinaus war die Produktion des zytotoxisch wirkenden NO von LPS-aktivierter Mikroglia bei Koinkubation mit Luteolin komplett gehemmt. Wir erforschten die Effekte von konditioniertem Medium von Mikroglia, das auf Photorezeptorzellen der Zelllinie 661W gegeben wurde. Somit konnten wir zeigen, dass eine Behandlung mit Luteolin Photorezeptorzellen vor LPS-induzierter Mikroglia-Toxizität schützt. Von einem protektiven Effekt, den Luteolin über eine konzentrations-abhängige Hemmung der NO-Sekretion von kultivierter Ratten-Mikroglia auf dopaminerige Neuronen ausübt, wurde kürzlich berichtet [38], was unsere Ergebnisse bestätigt.

5 Zusammenfassung

Wir konnten mit dieser Arbeit zeigen, dass das Flavonoid Luteolin ein potenter Modulator der Aktivierung, der Zellform und der Funktionen von Mikroglia ist. Sowohl in ruhender wie auch in LPS-aktivierter Mikroglia verursacht Luteolin globale Veränderungen des Transkriptoms, was zu einem M2-ähnlichen Phänotyp mit anti-inflammatoryischen und neuroprotektiven Eigenschaften führt. Dies geschieht mittels einer Modulation von mehreren, auch von NFkB unabhängigen Signalwegen. Damit bieten unsere Ergebnisse eine Grundlage für die Entwicklung von immun-modulatorischen und neuroprotektiven Therapien neurodegenerativer Erkrankungen.

6 Literaturverzeichnis

1. Wimo A, Winblad B, Aguero-Torres H, von Strauss E: **The Magnitude of Dementia Occurrence in the World.** *Alzheimer Disease and Associated Disorders* Vol. 17, No. 2, pp. 63–67; © 2003 Lippincott Williams & Wilkins, Inc., Philadelphia.
2. Schapira AHV: **Parkinson's disease.** *BMJ* Volume 318, 30 january 1999, pp. 311-314
3. Ding X, Patel M, Chan CC: **Molecular pathology of age-related macular degeneration.** *Prog Retin Eye Res.* 2009 January ; 28(1): 1-18. doi:10.1016/j.preteyeres.2008.10.001.
4. El Khoury J, Luster AD: **Mechanisms of microglia accumulation in Alzheimer's disease: therapeutic implications.** *Trends Pharmacol Sci* 2008, 29:626-632.
5. Orr CF, Rowe DB, Halliday GM: **An inflammatory review of Parkinson's disease.** *Prog Neurobiol* 2002, 68:325-340.
6. Sargsyan SA, Monk PN, Shaw PJ: **Microglia as potential contributors to motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis.** *Glia* 2005, 51:241-253.
7. Raivich G, Banati R: **Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease.** *Brain Res Brain Res Rev* 2004, 46:261-281.
8. Langmann T: **Microglia activation in retinal degeneration.** *J Leukoc Biol* 2007, 81:1345-1351. 18.
9. Schuetz E, Thanos S: **Microglia-targeted pharmacotherapy in retinal neurodegenerative diseases.** *Curr Drug Targets* 2004, 5:619-627.
10. Gupta N, Kimberly E. Brown KE, Milam AH: **Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration.** *Experimental Eye Research* 2003, 76:463-471
11. Hanisch UK: **Microglia as a source and target of cytokines.** *Glia* 2002, 40:140-155.
12. Hanisch UK, Kettenmann H: **Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain.** *Nat Neurosci* 2007, 10:1387-1394.
13. Streit WJ: **Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS.** *Glia* 2002, 40:133-139.
14. Streit WJ: **Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease.** *Brain Res Brain Res Rev* 2005, 48:234-239.

15. Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P: **The origin and cell lineage of microglia: new concepts.** *Brain Res Rev* 2007, 53: 344-354.
16. Julian D, Li J, Bartel S, Broker J, Li X, Kirkpatrick JB: **Cell surface morphology identifies microglia as a distinct class of mononuclear phagocyte.** *J Neurosci* 1995, 15:7712-7726.
17. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB: **ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo.** *Nat Neurosci* 2005, 8:752-758.
18. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F: **Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo.** *Science* 2005, 308:1314 - 1318.
19. Broderick C, Hoek RM, Forrester JV, Liversidge J, Sedgwick JD, Dick AD: **Constitutive retinal CD200 expression regulates resident microglia and activation state of inflammatory cells during experimental autoimmune uveoretinitis.** *Am J Pathol* 2002, 161:1669-1677.
20. Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, Huang D, Kidd G, Dombrowski S, Dutta R, Lee JC, Cook DN, Jung S, Lira SA, Littman DR, Ransohoff RM: **Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor.** *Nat Neurosci* 2006, 9:917-924.
21. Dick AD, Carter D, Robertson M, Broderick C, Hughes E, Forrester JV, Liversidge J: **Control of myeloid activity during retinal inflammation.** *J Leukoc Biol* 2003, 74:161-166.
22. Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan WB, Julius D: **Control of myeloid activity during retinal inflammation.** *Nat Neurosci* 2006, 9:1512-1519
23. Ransohoff RM, Perry VH: **Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses.** *Annu Rev Immunol* 2009, 27:119-145.
24. Schuetz E, Thanos S: **Microglia-targeted pharmacotherapy in retinal neurodegenerative diseases.** *Curr Drug Targets* 2004, 5: 619-627.
25. Hume DA: **Differentiation and heterogeneity in the mononuclear phagocyte system.** *Mucosal Immunol* 2008, 1:432-441.
26. Gordon S, Taylor PR: **Monocyte and macrophage heterogeneity.** *Nat Rev Immunol* 2005, 5:953-964.
27. Mosser DM: **Monocyte and macrophage heterogeneity.** *J Leukoc Biol* 2003, 73:209-212.
28. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M: **Macrophage activation and polarization.** *Front Biosci* 2008, 13:453-461.
29. Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C, Moreno-Gonzalez I, Torres M, Sanchez-Varo R, Ruano D, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J: **Inflammatory re-**

- sponse in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic.** *J Neurosci* 2008, 28:11650-11661.
30. Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG: **Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord.** *J Neurosci* 2009, 29:13435-13444.
31. Zhang Z, Zhang ZY, Schluesener HJ: **Compound A, a plant origin ligand of glucocorticoid receptors, increases regulatory T cells and M2 macrophages to attenuate experimental autoimmune neuritis with reduced side effects.** *J Immunol* 2009, 183:3081-3091.
32. Lleo A, Galea E, Sastre M: **Molecular targets of non-steroidal antiinflammatory drugs in neurodegenerative diseases.** *Cell Mol Life Sci* 2007, 64:1403-1418.
33. Lopez-Lazaro M: **Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin.** *Mini Rev Med Chem* 2009, 9:31-59.
34. SeelingerG, Merfort I, Schempp CM: **Anti-Oxidant, Anti-Inflammatory and Anti-Allergic Activities of Luteolin.** *Planta Med* 2008; 74: 1667-1677
35. Chen CY, Peng WH, Tsai KD, Hsu SL: **Luteolin suppresses inflammation-associated gene expression by blocking NF-kappaB and AP-1 activation pathway in mouse alveolar macrophages.** *Life Sci* 2007, 81:1602-1614.
36. Hu C, Kitts DD: **Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells.** *Mol Cell Biochem* 2004, 265:107-113.
37. Harris GK, Qian Y, Leonard SS, Sbarra DC, Shi X: **Luteolin and chrysin differentially inhibit cyclooxygenase-2 expression and scavenge reactive oxygen species but similarly inhibit prostaglandin-E2 formation in RAW 264.7 cells.** *J Nutr* 2006, 136:1517-1521.
38. Chen HQ, Jin ZY, Wang XJ, Xu XM, Deng L, Zhao JW: **Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation-induced injury through inhibition of microglial activation.** *Neurosci Lett* 2008, 448:175-179.
39. Rezai-Zadeh K, Ehrhart J, Bai Y, Sanberg PR, Bickford P, Tan J, Shytle RD: **Apigenin and luteolin modulate microglial activation via inhibition of STAT1-induced CD40 expression.** *J Neuroinflammation* 2008, 5:41.
40. Jang S, Kelley KW, Johnson RW: **Luteolin reduces IL-6 production in microglia by inhibiting JNK phosphorylation and activation of AP-1.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105:7534-7539

41. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: **Molecular biology of the cell, fourth edition.** Garland Science, New York, New York, USA, 2001 S. 472 ff
42. Blassi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R., Bistoni F: **Immortalization of murine microglial cells by v-raf/v-myc carrying retrovirus.** *J. Neuroimmunol* 1990, 27: 229 – 237
43. Weigelt K, Ernst W, Walczak Y, Ebert S, Loenhardt S, Klug M, Rehli M, Weber BHF, Langmann T: **Dap12 expression in activated microglia from retinoschisin-deficient retina and its PU.1-dependent promoter regulation.** *J Leukoc Biol* 2007, 82: 1564-1574
44. Mandal NA, Patlolla JMR, Zheng L, Agbaga MP, Tran JTA, Wicker L, Kasus-Jacobi A, Elliott MH, Rao CV, Anderson RE: **Curcumin Protects Retinal Cells from Light-and Oxidant Stress-induced Cell Death.** *Free Radic Biol Med.* 2009 March 1; 46(5): 672-679
45. Strachan T, Read AP: **Molekulare Humangenetik, 3. Auflage.** Elsevier GmbH, München, 2005, S.73
46. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: **Molecular biology of the cell, fourth edition.** Garland Science, New York, New York, USA, 2001, S. 927 f
47. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: **Molecular biology of the cell, fourth edition.** Garland Science, New York, New York, USA, 2001, S. 556
48. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: **Molecular biology of the cell, fourth edition.** Garland Science, New York, New York, USA, 2001, S. 838 f
49. Strachan T, Read AP: **Molekulare Humangenetik, 3. Auflage.** Elsevier GmbH, München, 2005, S. 143 ff
50. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC, Gaasterland T, Glenisson P, Holstege FC, Kim IF, Markowitz V, Matese JC, Parkinson H, Robinson A, Sarkans U, Schulze-Kremer S, Stewart J, Taylor R, Vilo J, Vingron M: **Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data.** *Nat Genet* 2001, 29:365-37
51. Eichler GS, Huang S, Ingber DE: **Gene Expression Dynamics Inspector (GEDI): for integrative analysis of expression profiles.** *Bioinformatics* 2003, 19:2321-2322
52. Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA: **DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery.** *Genome Biol* 2003, 4:3

53. Ginzinger DG: **Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream.** *Experimental Hematology* 30 (2002) 503-512
54. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method.** *Methods.* 2001 Dec, 25(4):402-8
55. Strachan T, Read AP: **Molekulare Humangenetik, 3. Auflage.** Elsevier GmbH, München, 2005, S. 231 f
56. Ebert S, Schöberl T, Walczak Y, Stöcker K, Stempf T, Möhle C, Weber BHF, Langmann T: **Chondroitin sulfate disaccharide stimulates microglia to adopt a novel regulatory phenotype.** *J Leukoc Biol* 2008, 84:736-740
57. Weigelt K, Lichtinger M, Rehli M, Langmann T: **Transcriptomic profiling identifies a PU.1 regulatory network in macrophages.** *Biochem Biophys Res Commun* 2009, 380:308-312
58. Wegiel B, Baty CJ, Gallo D, Csizmadia E, Scott JR, Akhavan A, Chin BY, Kaczmarek E, Alam J, Bach FH, Zuckerbraun BS, Otterbein LE: **Cell surface biliverdin reductase mediates biliverdin-induced anti-inflammatory effects via phosphatidylinositol 3-kinase and Akt.** *J Biol Chem.* 2009 Aug 7;284(32):21369-78
59. Doi Y, Mizuno T, Maki Y, Jin S, Mizoguchi H, Ikeyama M, Doi M, Michikawa M, Takeuchi H, Suzumura A.: **Microglia activated with the toll-like receptor 9 ligand CpG attenuate oligomeric amyloid β neurotoxicity in in vitro and in vivo models of Alzheimer's disease.** *Am J Pathol.* 2009 Nov;175(5):2121-32
60. Bea F, Hudson FN, Chait A, Kavanagh TJ, Rosenfeld ME: **Induction of glutathione synthesis in macrophages by oxidized low-density lipoproteins is mediated by consensus antioxidant response elements.** *Circ Res.* 2003 Mar 7;92(4):386-93
61. Noh YH, Baek JY, Jeong W, Rhee SG, Chang TS: **Sulfiredoxin Translocation into Mitochondria Plays a Crucial Role in Reducing Hyperoxidized Peroxiredoxin III.** *J Biol Chem.* 2009 Mar 27;284(13):8470-7
62. Cheng L, Han X, Shi Y.: **A regulatory role of LPCAT1 in the synthesis of inflammatory lipids, PAF and LPC, in the retina of diabetic mice.** *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009 Dec;297(6):E1276-82
63. Cao W, Lee SH, Lu J.: **CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells.** *Biochem J.* 2005 Jan 1;385(Pt 1):85-93

64. Koenigsknecht J, Landreth G.: **Microglial phagocytosis of fibrillar beta-amyloid through a beta1 integrin-dependent mechanism.** *J Neurosci.* 2004 Nov 3;24(44):9838-46
65. Ryu JK, Cho T, Choi HB, Wang YT, McLarnon JG: **Microglial VEGF receptor response is an integral chemotactic component in Alzheimer's disease pathology.** *J Neurosci.* 2009 Jan 7;29(1):3-13
66. Sarvari M, Hrabovszky E, Kallo I, Solymosi N, Toth K, Liko I, Szeles J, Maho S, Molnar B, Liposits Z: **Estrogens regulate neuroinflammatory genes via estrogen receptors alpha and beta in the frontal cortex of middle-aged female rats.** *J Neuroinflammation.* 2011 Jul 20;8(1):82
67. Tripal P, Bauer M, Naschberger E, Mörtinger T, Hohenadl C, Cornali E, Thurau M, Stürzl M: **Unique features of different members of the human guanylate-binding protein family.** *J Interferon Cytokine Res.* 2007 Jan;27(1):44-52.
68. Liu G, Friggeri A, Yang Y, Park YJ, Tsuruta Y, Abraham E: **miR-147, a microRNA that is induced upon Toll-like receptor stimulation, regulates murine macrophage inflammatory responses.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Sep 15;106(37):15819-24
69. Plant SR, Wang Y, Vasseur S, Thrash JC, McMahon EJ, Bergstrahl DT, Arnett HA, Miller SD, Carson MJ, Iovanna JL, Ting JP: **Upregulation of the stress-associated gene p8 in mouse models of demyelination and in multiple sclerosis tissues.** *Glia.* 2006 Apr 1;53(5):529-37
70. Watts C: **The endosome-lysosome pathway and information generation in the immune system.** *Biochim Biophys Acta.* 2011 Jul 18.
71. Gotoh T, Oyadomari S, Mori K, Mori M: **Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is mediated by endoplasmic reticulum stress pathway involving ATF6 and CHOP.** *J Biol Chem.* 2002 Apr 5;277(14):12343-50
72. Shang YY, Wang ZH, Zhang LP, Zhong M, Zhang Y, Deng JT, Zhang W: **TRB3, upregulated by ox-LDL, mediates human monocyte-derived macrophage apoptosis.** *FEBS J.* 2009 May;276(10):2752-61
73. Lee S, Lee J, Kim S, Park JY, Lee WH, Mori K, Kim SH, Kim IK, Suk K: **A dual role of lipocalin 2 in the apoptosis and deramification of activated microglia** *J Immunol.* 2007 Sep 1;179(5):3231-41
74. Granucci F, Petralia F, Urbano M, Citterio S, Di Tota F, Santambrogio L, Ricciardi-Castagnoli P: **The scavenger receptor MARCO mediates cytoskeleton rearrangements in dendritic cells and microglia.** *Blood.* 2003 Oct 15;102(8):2940-7
75. Ryu E, Fridley BL, Tosakulwong N, Bailey KR, Edwards AO: **Genome-wide association analyses of genetic, phenotypic, and environmental risks in the age-related eye disease study.** *Mol Vis.* 2010 Dec 17;16:2811-21

76. Lambris JD, Müller-Eberhard HJ: **Isolation and Characterization of a 33,000-Dalton Fragment of Complement Factor B with Catalytic and C3b Binding Activity.** *The Journal of biological chemistry*, Vol. 259, No. 20, Issue of October 25, pp. 12685-12690, 1984
77. Kim JS, Lee HJ, Lee MH, Kim J, Jin C, Ryu JH: **Luteolin inhibits LPS-stimulated inducible nitric oxide synthase expression in BV-2 microglial cells.** *Planta Med.* 2006 Jan;72(1):65-8
78. al-Ubaidi MR, Font RL, Quiambao AB, Keener MJ, Liou GI, Overbeek PA, Baehr W: **Bilateral retinal and brain tumors in transgenic mice expressing simian virus 40 large T antigen under control of the human interphotoreceptor retinoid-binding protein promoter.** *J Cell Biol.* 1992 Dec;119(6):1681-7
79. Tan E, Ding XQ, Saadi A, Agarwal N, Naash MI, Al-Ubaidi MR: **Expression of cone-photoreceptor-specific antigens in a cell line derived from retinal tumors in transgenic mice.** *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004 Mar;45(3):764-8
80. Ross JA, Kasum CM: Dietary flavonoids: **Bioavailability, metabolic effects, and safety.** *Annu Rev Nutr* 2002, 22:19-34.
81. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G: **Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids.** *Free Radic Biol Med* 1996, 20:933-956.
82. Li N, Venkatesan MI, Miguel A, Kaplan R, Gujuluva C, Alam J, Nel A: **Induction of heme oxygenase-1 expression in macrophages by diesel exhaust particle chemicals and quinones via the antioxidant-responsive element.** *J Immunol* 2000, 165:3393-3401.
83. Lim JH, Park HS, Choi JK, Lee IS, Choi HJ: **Isoorientin induces Nrf2 pathway-driven antioxidant response through phosphatidylinositol 3-kinase signaling.** *Arch Pharm Res* 2007, 30:1590-1598.
84. Singh A, Ling G, Suhasini AN, Zhang P, Yamamoto M, Navas-Acien A, Cosgrove G, Tuder RM, Kensler TW, Watson WH, Biswal S: **Nrf2-dependent sulfiredoxin-1 expression protects against cigarette smoke-induced oxidative stress in lungs.** *Free Radic Biol Med* 2009, 46:376-386.
85. Osburn WO, Wakabayashi N, Misra V, Nilles T, Biswal S, Trush MA, Kensler TW: **Nrf2 regulates an adaptive response protecting against oxidative damage following diquat-mediated formation of superoxide anion.** *Arch Biochem Biophys* 2006, 454:7-15.
86. de Vries HE, Witte M, Hondius D, Rozemuller AJ, Drukarch B, Hoozemans J, van Horssen J: **Nrf2-induced antioxidant protection: a promising target to counteract ROS-mediated damage in neurodegenerative disease?** *Free Radic Biol Med* 2008, 45:1375-1383.

87. Harayama T, Shindou H, Ogasawara R, Suwabe A, Shimizu T: **Identification of a novel noninflammatory biosynthetic pathway of platelet-activating factor.** *J Biol Chem* 2008, 283:11097-11106.
88. Sheikh AM, Nagai A, Ryu JK, McLarnon JG, Kim SU, Masuda J: **Lysophosphatidylcholine induces glial cell activation: role of rho kinase.** *Glia* 2009, 57:898-907.
89. Stuart LM, Bell SA, Stewart CR, Silver JM, Richard J, Goss JL, Tseng AA, Zhang A, El Khoury JB, Moore KJ: **CD36 signals to the actin cytoskeleton and regulates microglial migration via a p130Cas complex.** *J Biol Chem* 2007, 282:27392-27401.
90. Shenoy AR, Kim BH, Choi HP, Matsuzawa T, Tiwari S, MacMicking JD: **Emerging themes in IFN-gamma-induced macrophage immunity by the p47 and p65 GTPase families.** *Immunobiology* 2007, 212:771-784.
91. Martin CB, Ingersoll SA, Martin BK: **Transcriptional control of the C3a receptor gene in glial cells: Dependence upon AP-1 but not Ets.** *Mol Immunol* 2007, 44:703-712.
92. Ramsauer K, Farlik M, Zupkovitz G, Seiser C, Kroger A, Hauser H, Decker T: **Distinct modes of action applied by transcription factors STAT1 and IRF1 to initiate transcription of the IFN-gamma-inducible gbp2 gene.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, 104:2849-2854.
93. Zauberman A, Lapter S, Zipori D: **Smad proteins suppress CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) beta- and STAT3-mediated transcriptional activation of the haptoglobin promoter.** *J Biol Chem* 2001, 276:24719-24725.
94. Streit WJ, Braak H, Xue QS, Bechmann I: **Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease.** *Acta Neuropathol* 2009, 118:475-485.
95. White CA, McCombe PA, Pender MP: **Microglia are more susceptible than macrophages to apoptosis in the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis through a mechanism not involving Fas (CD95).** *Int Immunol* 1998, 10:935-941.
96. Fang F, Li D, Pan H, Chen D, Qi L, Zhang R, Sun H: **Luteolin Inhibits Apoptosis and Improves Cardiomyocyte Contractile Function through the PI3K/Akt Pathway in Simulated Ischemia/Reperfusion.** *Pharmacology* 2011;88:149-158

7 Anhang

7.1 Publikation

Der überwiegende Teil dieser Arbeit wurde im Jahr 2010 folgendermaßen publiziert:

Konstantin Dirscherl, Marcus Karlstetter, Stefanie Ebert, Dominik Kraus, Julia Hlawatsch, Yana Walczak, Christoph Moehle, Rudolf Fuchshofer, Thomas Langmann

Luteolin triggers global changes in the microglial transcriptome leading to a unique antiinflammatory and neuroprotective phenotype

Journal of Neuroinflammation 2010 7:3.

Impact-Factor 2010: 5,785

Link:

<http://www.jneuroinflammation.com/content/pdf/1742-2094-7-3.pdf>

7.2 Danksagung

Mein Dank gilt all denen, die mich in so vielfältiger Weise bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Zuallererst danke ich dem Arbeitsgruppenleiter am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg, Herrn Prof. Dr. Thomas Langmann, für das angebotene Thema, die vielseitigen zur Verfügung gestellten Mittel und Möglichkeiten, aber auch ganz besonders für seine beinahe immer offene Tür und die stets freundliche, persönliche Betreuung meiner Arbeit, die er auch nach dem Wechsel nach Köln unvermindert fortgesetzt hat.

Mein Dank gebührt Herrn Dekan Prof. Dr. Bernhard Weber, Direktor des Instituts für Humangenetik der Universität Regensburg, für die Möglichkeit, am Institut Erfahrungen in wissenschaftlichem Arbeiten und Forschen gesammelt haben zu können.

Herrn Prof. Dr. Claus Hellerbrand gilt mein Dank, da er sich spontan, freundlich und sehr unkompliziert als Zweitkorrektor zur Verfügung gestellt hat.

Ich danke den Kolleginnen und Kollegen im Labor für die Einarbeitung in die Labortechniken und die zahlreichen Denkanstöße, die mir oftmals enorm weitergeholfen haben. Besonderer Dank gilt hier Dr. Stefanie Ebert für die intensive Betreuung und Anleitung, Yana Walczak für die Hilfe in technischen Dingen, der Zellkultur und ein stets offenes Ohr, Marcus Karlstetter vor allem für seine Hilfe der Datenauswertung und Ergebnisinterpretation, Daniela Hilfinger und Dr. Ulrike Friedrich.

Nicht zuletzt gebührt meiner Familie, Frau Helma Steger, meinen Freunden und meiner Freundin ein großer Dank für ihre Hilfsbereitschaft, Flexibilität und ganz, ganz viele offene Ohren.

7.3 Lebenslauf

Konstantin Richard Franz Dirscherl

Adresse

Zilstrasse 16
CH-9016 Sankt Gallen
E-Mail: konscom@web.de

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 15.10.1985
Geburtsort: Regensburg
Familienstand: ledig

Ausbildung:

1992 – 1996: Grundschule Irlbach
1996 – 2005: Musikgymnasium der Regensburger Domspatzen
Abschluss: Abitur, Note 1,3
2006 - 2012: Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
Abschluss: Staatsexamen, Note 2,16
19.11.2012: Approbation
seit 01.03.2013: Assistenzarzt am Institut für Anästhesiologie, Kantonsspital Sankt Gallen

Praktische Erfahrung

Zivildienst

Juli 2005 – März 2006: Landschaftspflegehelfer am Stadtgartenamt Regensburg

Pflegepraktikum

Mai – August 2006: Caritas-Krankenhaus St. Josef (Regensburg)

Famulaturen

07.09. – 06.10.2009: Dr. Laurence, Sacred Heart Hospital Jalandhar (Indien):
Ambulanz, Notaufnahme, Intensivstation
15.02. – 02.03.2010 und 27.03. – 10.04.2010:
Dr. Bumes, Caritas-Krankenhaus St. Josef (Regensburg):
Innere Medizin I
02.08. – 03.09.2010: Prof. Dr. Nilsson, Akademiska Sjukhuset (Uppsala):
Orthopädie
14.02. – 15.03.2011: Prof. Dr. Stroszczynski, Universitätsklinikum Regensburg:
Radiologie
04.04. – 10.04.2011: Prof. Dr. Grifka, Orthopädische Klinik für die Universität Regensburg: Orthopädie

Praktisches Jahr

- 29.08. – 18.12.2011: Prof. Dr. Konrad, Kantonsspital Luzern (Schweiz): Anästhesie
- 19.12.2011-08.04.2012: Prof. Dr. Fürst, Caritas-Krankenhaus St. Josef (Regensburg): Chirurgie
- 09.04. – 17.06.2012: Arvid Hamrin, Länssjukhuset Sundsvall-Härnösand (Schweden): Innere Medizin
- 18.06. – 29.07.2012: Prof. Dr. Salzberger, Universitätsklinikum Regensburg: Innere Medizin

Studienbegleitende Nebentätigkeiten

- seit 2007: Sitzwache im Bezirksklinikum Regensburg (Schwerpunkt Neurologie und Psychiatrie)
- seit 2008: Mitglied der Forschergruppe FOR 1075
- Juli – August 2011: Studentische Hilfskraft am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg

Promotion

- seit 2008: „Luteolin verursacht globale Veränderungen im Transkriptom von Mikroglia und führt zu einem anti-inflammatorischen, neuroprotektiven Phänotyp“
Betreuer: Prof. Dr. Langmann, Institut für Humangenetik der Universität Regensburg, seit 2012 am Institut für experimentelle Immunologie des Auges der Universität Köln
- Januar 2010: Publikation im Journal of Neuroinflammation:
Luteolin triggers global changes in the microglial transcriptome leading to a unique antiinflammatory and neuroprotective phenotype

Zusatzkenntnisse

- Sprachen: Englisch in Wort und Schrift, Schwedisch- und Französischkenntnisse
- Wahlkurse: Englisch für Naturwissenschaftler, Notfallmedizin, forensische Psychiatrie
- EDV: Tastschreibkurs, Umgang mit Word, Excel, PowerPoint, SigmaPlot, SAP

Auszeichnungen und Förderung:

- 2000: „Jugend musiziert“: 2. Platz in der Kategorie „Klavier Vierhändig“
- 2005: „Kai-Uwe von Hassel-Preis“ für Verdienste um die Schulgemeinschaft
- 2008-2012: Stipendiat des Cusanuswerks (Begabtenförderwerk der katholischen Kirche in Deutschland)

Sankt Gallen, 11.07.2013

Konstantin Dirscherl