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

EFFEKTE VON CURCUMIN AUF GENEXPRESSION UND FUNKTION PROINFLAMMATORISCH AKTIVIERTER MIKROGLIA

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Maria Elena Lippe

2013

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

EFFEKTE VON CURCUMIN AUF GENEXPRESSION UND FUNKTION PROINFLAMMATORISCH AKTIVIERTER MIKROGLIA

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Maria Elena Lippe

2013

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr.Thomas Langmann
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Herbert Jägle
Tag der mündlichen Prüfung:	15. November 2013

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 1

2 EINLEITUNG 3

2.1 Neurodegenerative Erkrankungen 3

2.2 Immunsystem des ZNS 3

2.3 Mikroglia 4
2.3.1 Mechanismen proinflammatorischer Mikroglia-Aktivierung 4
2.3.2 Rolle der Mikroglia in neurodegenerativen Erkrankungen 5

2.4 Curcumin 6

2.5 Zielsetzung der Arbeit 8

3 MATERIAL 9

3.1 Geräte 9

3.2 Verbrauchsmaterialien 10

3.3 Chemikalien 11

3.4 Medien und Supplemente 11

3.5 Puffer und Lösungen 11

3.6 Kit-Systeme 12

3.7 Zelllinien 12

3.8 Oligonukleotide 13

3.9 Software 13

4 METHODEN 14

4.1 Überblick über die Abfolge der experimentellen Schritte 14

4.2 Zellkultur 14
4.2.1 Murine Mikroglia-Zelllinie BV-2 15
4.2.2 Murine 661W Photorezeptor-Zelllinie 15
4.2.3 Murine Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 15
4.2.4 Konservierung und Auftauen der Zellen 15
4.2.5 Splittung der Zellkulturen 15
4.2.6 Zellzahlbestimmung und Aussaat 16
4.2.7 Stimulation 16
4.2.8 Zellernte und Gewinnung von Zellüberständen 16

4.3 Funktionsassays 17
4.3.1 Stickstoffmonoxid Assay 17
4.3.2 Laktat-Dehydrogenase Aktivitätsassay 18

4.4 RNA-Isolierung 19

4.5 Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle von RNA 19

4.6 Reverse Transkription 20

4.7 DNA-Mikroarray Analyse 20

4.8 TaqMan® quantitative Real-Time RT-PCR 21

4.9 Statistische Datenauswertung 24

5 DURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE 25

5.1 Genomweiter Effekt des Curcumin auf BV-2 Mikroglia 25
5.1.1 Bestimmung der Genexpression durch Microarray-Analyse 25
5.1.2 Biostatistische Auswertung der Microarray-Daten (via SAM) 25
5.1.3 Genomweite Änderung der Genexpression nach Stimulation mit Curcumin 26

5.2 Differentielle Expression ausgewählter Zielgene des Curcumin 27
5.2.1 Validierung signifikant regulierter Gene durch real-time qRT-PCR 27
5.2.2 Hochregulierung der Genexpression nach Stimulation mit Curcumin 27
5.2.3 Reduzierung der Genexpression nach Stimulation mit Curcumin 28

5.3 Einfluss von Curcumin auf Zellmorphologie aktivierter RAW-Makrophagen 30

5.4 Wirkung des Curcumin auf funktionelle Eigenschaften aktivierter RAW-Makrophagen 31
5.4.1 Einfluss von Curcumin auf Stickstoffmonoxid-Freisetzung aktivierter RAW-Makrophagen 31
5.4.2 Inkubation von 661W Photorezeptorzellen mit MKM 32
5.4.3 Effekt des MKM auf die Morphologie von 661W Zellen 32
5.4.4 Effekt des MKM auf die Laktat-Dehydrogenase-Freisetzung durch 661W Photorezeptorzellen 33

6 DISKUSSION 35

6.1 Immunmodulierende Wirkung von Curcumin auf das Transkriptom aktivierter BV-2 Mikroglia 35
6.1.1 Curcumin induziert die Expression antiinflammatorischer und neuroprotektiver Gen-Cluster in aktivierter BV-2 Mikroglia 35
6.1.2 Curcumin supprimiert die Expression proinflammatorischer Gene in aktivierten BV-2 Mikroglia 37

6.2 Curcumin reduziert Neurotoxizität aktivierter RAW-Makrophagen 38

6.3 Ausblick 38

7 ZUSAMMENFASSUNG 39

8 LITERATURVERZEICHNIS 40

9 ANHANG 45

9.1 Abbildungsverzeichnis 45

9.2 Tabellenverzeichnis 45

1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AP1	Activator protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
β-ME	β-Mercaptoethanol
C3	Complement C3
CCL2	Chemokine (C-C) motif ligand 2
cDNA	Complementary DNA, „copy“DNA
COX-2	Cyclooxygenase-2
DLL1	Delta-like 1
DMEM	Dulbecco modified eagle`s medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
EGR2	Early growth response 2
FCS	Fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FDR	False discovery rate
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
LPS	Lipopolysaccharide
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MKM	Makrophagen-konditioniertes Medium
MS	Multiple Sklerose
NTNG1	Netrin G1
NF-κB	Nuclear factor ‚kappa-light-chain-enhancer‘of activated B-cells

NO	Stickstoffmonoxid
mRNA	Messenger RNA
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
P/C	Penicillin/Streptomycin
PECAM1	Platelet endothelial cell adhesion molecule 1
PPARα	Peroxisome proliferator activated receptor α
PTGS2	Prostaglandin endoperoxide synthase 2
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPM	Revolutions per Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TLR2	Toll-like receptor 2
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
ZNS	Zentrales Nervensystem

2 Einleitung

2.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen sind Prozesse, die zum progredienten Untergang von lokalisierten bzw. über das gesamte ZNS verteilten Neuronensystemen führen. Gemeinsam sind ihnen das oft sporadische Auftreten und der schleichende Verlauf, welcher in Verbindung mit einem meist späten Beginn (50. – 75. Lebensjahr), zu einer Häufung der neurodegenerativen Erkrankungen im fortgeschrittenen Alter führt. Aufgrund eines zunehmenden Anteils älterer Menschen in der Bevölkerung, insbesondere der industrialisierten Welt, steigt die Bedeutung dieser Krankheitsgruppe (Hebert, Beckett, & al., 2001) (Hebert, Scherr, & al., 2003). Mit Abstand am häufigsten ist die Alzheimer-Krankheit, gefolgt von Morbus Parkinson und Amyotropher Lateralsklerose (ALS).
Je nach betroffener ZNS-Region, unterscheiden sich die einzelnen Erkrankungen in den Symptomen die sie hervorrufen, in voller Ausprägung gehen sie jedoch immer mit schweren neurologischen Ausfällen und Demenz einher. Im finalen Stadium besteht schwerste Behinderung und Pflegebedürftigkeit. Den Tod finden die Patienten aufgrund von Sekundärkomplikationen (Infekte, Lungenembolien), kardiovaskulären Komplikationen oder durch den Ausfall lebenswichtiger zerebraler Funktionen (Jellinger, 2005).
Die genauen Ursachen für die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen sind bis heute nicht geklärt. Als beteiligte Faktoren werden Mitochondrien-Dysfunktion und daraus resultierender oxidativer Stress, sowie genetische Veränderungen diskutiert.
Als wichtigster pathogenetischer Mechanismus gilt die Akkumulation abnorm gefalteter Proteine (Amyloid-β, Tau, α-Synuclein), die über Aggregation zu filamentösen Strukturen, zu der Bildung von Amyloid und anderer Proteinablagerungen führt. Je nachdem welche die fehlerhaft gefalteten Proteine sind und wo sich deren Aggregate ablagern, zeigt sich ein unterschiedliches klinisches Bild (Skovronsky & al., 2006). So führt die Bildung des pathologischen Proteins Amyloid-β zur Entstehung von Amyloid-Plaques, welche morphologisches Kennzeichen der Alzheimer-Erkrankung sind. Der Morbus Parkinson kennzeichnenden Häufung von Lewy-Körpern, liegt Bildung und Zusammenlagerung von α-Synuclein zugrunde.
Begleitet ist diese pathologische Protein-Akkumulation von einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems des ZNS und einer dadurch ausgelösten Inflammation. Die ursprünglich gegen das krankheitsauslösende Proteinaggregat gerichtete Entzündungsreaktion, wirkt sich in ihrem Verlauf zunehmend schädigend auf Neuronen aus. Dieses Phänomen ist für eine Reihe neurodegenerativer Erkrankungen beschrieben worden, darunter die Alzheimer-Krankheit, Morbus Parkinson und ALS (Akiyama & al., 2000).

2.2 Immunsystem des ZNS

Das ZNS ist als sogenanntes immunprivilegiertes Organ durch diverse Mechanismen (Blut-Hirn-Schranke, Fehlen von Antigenpräsentierenden Zellen, Fehlen eines Lymphsystems u.a.) vor einem unkontrollierten Eindringen von Immunzellen geschützt. Da Nervengewebe in nur geringem Maß regenerationsfähig ist, muss es einem Angriff durch Zellen des Immunsystems entzogen werden, dessen Abwehrmechanismen auch gegen körpereigene Strukturen gerichtet sein können. Zu seinem Schutz vor pathogenen Einflüssen besitzt das Gehirn eine einzige ihm eigene, spezifische Population von Zellen des Immunsystems: die Mikroglia.

2.3 Mikroglia

Mikrogliazellen sind die ortsständigen Gewebsmakrophagen des ZNS. Gleichzeitig zählen sie zu den Gliazellen. Unter dem Begriff der Glia werden Zellen des Nervengewebes zusammengefasst, welche keine Neuronen sind. Neben den Mikroglia kommen im ZNS die Neuroglia (Astrozyten, Oligodendrozyten) und die Radialglia vor. Gliazellen erfüllen vielfältige Aufgaben: Neben ihrer Funktion als Stützgerüst für Neuronen, sorgen sie für deren elektrische Isolierung und wirken modulierend auf die synaptische Übertragung ein. Außerdem beteiligen sie sich am Stofftransport im Gehirn und an der Aufrechterhaltung der neuronalen Homöostase.
Während der Embryonalentwicklung wandern primitive Makrophagen, als Vorläufer der Mikroglia, aus dem Dottersack in Gehirn, Rückenmark und Retina ein, noch bevor sich die Blut-Hirn-Schranke ausgebildet hat (Ginhoux & al., 2010). Bislang ist jedoch ungeklärt, wie sich die Mikroglia-Population nach vollständiger Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke im ausgereiften ZNS erneuert. Es stellt sich die Frage, ob sich unter physiologischen Bedingungen die Regeneration residenter Mikroglia durch Einwanderung monozytärer Zellen aus der Blutstrombahn vollzieht oder ob die Population durch In-situ-Proliferation aufrechterhalten wird.
Im gesunden Gehirn wirken Mikroglia entscheidend mit an der Aufrechterhaltung der neuronalen Homöostase: Sie phagozytieren apoptotische Zellen und Zelltrümmer, setzten neurotrophe Faktoren frei und wirken mit an der synaptischen Signalübermittlung (Streit, 2002) (Hanisch & Kettenmann, 2007) (Wake & al., 2009). Solange Mikrogliazellen sich in einem sogenannten „ruhenden“ Zustand befinden, weisen sie stark verzweigte, kontinuierlich sich bewegende Zellfortsätze auf, mit denen sie ihre Umgebung überwachen (Nimmerjahn, Kirchhoff, & Helmchen, 2005). In diesem Zustand werden sie erhalten durch unentwegte Kommunikation mit Neuronen. Inhibitorisch wirkende neuronale Liganden, wie CD 200 oder CX3CL1 verhindern durch Interaktion mit den entsprechenden Rezeptoren der Mikrogliazellen deren proinflammatorische Aktivierung und fördern gleichzeitig die Aktivität, welche der Homöostase-Aufrechterhaltung dient (Hoek & al., 2000) (Cardona & al., 2006). Fallen diese inhibitorischen Signale von Neuronen weg oder empfangen sie Warnsignale von geschädigten Zellen, wie extrazellulär freigesetztes ATP oder erhöhte Neurotransmitter-Konzentrationen, findet eine Aktivierung der Mikrogliazelle statt (Haynes & al., 2006) (Ransohoff & Perry, 2009).

2.3.1 Mechanismen proinflammatorischer Mikroglia-Aktivierung

Mikroglia sind die residenten Immunzellen des ZNS und gewährleisten dort als solche, neben der Homöostase-Aufrechterhaltung, die angeborene Immunität. Diese umfasst Erkennung und Abwehr von Pathogenen, sowie Unterstützung geschädigter Neuronen bei ihrer Regeneration.
Die Aktivierung von Mikroglia führt morphologisch zu einer Rückbildung ihrer Zellfortsätze und hin zur Ausbildung einer amöboiden Form mit gedunsen erscheinendem Zellleib. Ursächlich für diese Transformation sind lokale Warnsignale. Dies können proinflammatorische Zytokine, wie TNF-α oder abnorme körpereigene Proteine, wie β-Amyloid sein. Es können Bestandteile infektiöser Pathogene sein, sogenannte Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), wie zum Beispiel LPS als bakterielles Antigen (Zielasek & Hartung, 1996). Desweiteren können Moleküle auslösend sein, die unter dem Überbegriff der Damage-associated molecular patterns (DAMPs) zusammengefasst werden. Mehrheitlich sind dies Proteine nukleären oder zytosolischen Ursprungs, welche im Rahmen nicht-infektiöser Entzündungsreaktionen eine Immunantwort auslösen. Beispiele für DAMPs,

die in Folge einer Schädigung des Nervengewebes freigesetzt werden und an Immunrezeptoren von Mikroglia binden, sind das von apoptotischen Neuronen freigesetzte high-mobility group protein 1 (HMGB1), das beispielsweise an Toll-like-Rezeptoren (TLR2, TLR4) bindet (Gao & al., 2011). Sowie das Nukleotid ATP, welches ebenfalls von geschädigten Zellen abgesondert wird und mit dem P2Y12-Rezeptor interagiert (Haynes & al., 2006).
Die durch die unterschiedlichen Stimuli angestoßenen Signaltransduktions-Wege konvergieren in der Translokation von Transkriptionsfaktoren in den Zellkern, zu einer verstärkten Transkription proinflammatorischer Gen-Cluster führend. Ein für die Regulation der Immunantwort zentraler Transkriptionsfaktor ist Nuclear fact*or ,kappa*-light-chain-*enhancer'* of activated B-cells (NF-κB), speziell für die Entstehung von Entzündung scheint er eine wichtige Rolle zu spielen. Darüber hinaus ist er vorrangig beteiligt an der Regulation von Zellproliferation und Apoptose. Doch dies sind nur seine bekanntesten Funktionen. NF-κB ist in allen Geweben des menschlichen Organismus vorhanden und so wie er in jeglichen Zellen des Immunsystems seine regulatorischen Funktionen erfüllt, tut er dies auch in Mikroglia, als den Immunzellen des ZNS (Kaltschmidt, Widera, & Kaltschmidt, 2005).
Die im Rahmen der Mikroglia-Aktivierung erhöhte Transkriptionsrate proinflammatorischer Gene, führt zur vermehrten Expression von proinflammatorischen Zytokinen (wie TNF-α, IL-6, IL-1) Chemokinen (CCL2) und Enzymen (wie iNOS, COX-2). Gleichzeitig werden, im aktivierten Zustand antiinflammatorische Rückkopplungs-Mechanismen induziert, um ein Überschießen der Immunantwort zu verhindern. Hierzu gehört die Sezernierung antiinflammatorisch wirkender Zytokine (TGF-β, IL-10, IL-4). Außerdem setzten, in Folge von Gewebsschädigung aktivierte Mikroglia neurotrophe Faktoren frei (NGF, FGF), welche die Regeneration von Neuronen fördern (Aloisi, 2001) (Hanisch & Kettenmann, 2007).

2.3.2 Rolle der Mikroglia in neurodegenerativen Erkrankungen

Chronisch aktivierte Mikroglia und reaktive Mikrogliose wurden in diversen neurodegenerativen Erkrankungen beobachtet und haben, aller bisherigen Erkenntnis nach eine zentrale Bedeutung für deren Entstehung, darunter die Alzheimer-Krankheit, Morbus Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose, Multiple Sklerose und hereditäre Photorezeptor-Dystrophien, um hier nur die häufigsten zu nennen. Im Folgenden werden sie jeweils kurz beschrieben.
Die Alzheimer-Krankheit ist häufigste Ursache für Demenz, dem Verlust kognitiver Funktionen wie Gedächtnis, Orientierung, Denkvermögen und Sprache. Die Erkrankung ist durch zwei pathologische Hauptveränderungen gekennzeichnet: Zum Einen die extrazelluläre und intravaskuläre Ablagerung von β-Amyloid-Plaques, entstanden durch Abbaustörungen des im ZNS ubiquitär vorkommenden Amyloid-Vorläufer-Proteins (Amyloid precursor protein, APP). Zum Anderen findet sich intrazellulär, in den Neuronen aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein bestehendes Neurofibrillen-Geflecht (Neurofibrillary tangle, NFT). Hirngewebe mit Anhäufung von β-Amyloid-Plaques und NFT ist reich an aktivierter Mikroglia (McGeer & McGeer, 1999). Es konnte nachgewiesen werden, dass Bestandteile des β-Amyloid, sowie APP an sich, aktivierend auf Mikroglia wirken (Schubert & al., 2000). Während bislang die im Rahmen einer Alzheimer-Erkrankung auftretende Neuroinflammation lediglich als Reaktion auf die degenerativen Veränderungen verstanden wurde, besteht zunehmend Anlass sie zugleich als ursächlichen Faktor zu sehen. Neuere wissenschaftliche Ergebnisse lassen einen fördernden Einfluss der von aktivierter Mikroglia freigesetzten Zytokine auf die Bildung von β-Amyloid-Plaques und NFT vermuten (Heneka & al., 2010).

Charakteristisch für die Parkinson-Krankheit ist eine pathologische Ablagerung des veränderten und fehlgefalteten Hirnproteins α-Synuclein als Lewy-Körper in Neuronen. Die Leitsymptome, verlangsamte Bewegungen bis zur Bewegungslosigkeit, Muskelstarre bzw. –zittern und Haltungsinstabilität, sind vornehmlich bedingt durch den Untergang dopaminerger Neurone der Substantia nigra und des Striatums (Beide Strukturen sind den Basalganglien zugehörig, ein Bestandteil des extrapyramidalmotorischen Systems). Auch hier treten aktivierte Mikroglia gehäuft in Bereichen degenerierter Neurone auf und sind, als diese Erkrankung möglicherweise mit verursachende und in ihrem Verlauf verstärkende Effektoren identifiziert worden. α-Synuclein wirkt hier aktivierend auf die Mikroglia (Block & Hong, 2007) (Ghosh & al., 2007). Daten, welche mithilfe von Tiermodellen des Morbus Parkinson gewonnen wurden, legen als eine wichtige Ursache oxidativen Stress nahe, welcher durch Erzeugung von ROS in alarmierten Mikroglia entsteht (Jackson-Lewis & Smeyne, 2005).
Die Amyotrophe Lateralsklerose besteht in der selektiven Degeneration motorischer Neuronen, insbesondere des Rückenmarks, des Hirnstamms und der motorischen Hirnrinde. Die Klinik bietet ein Nebeneinander von Spastik und schlaffer Lähmung mit muskulärer Atrophie, deren Ausmaß im Verlauf progredient zunimmt. Pathologisches Kennzeichen dieser Erkrankung sind Ubiquitin-positive Zytoplasma-Einschlüsse in degenerierenden Neuronen, einhergehend mit ausgeprägter Neuroinflammation (McGeer & McGeer, 2002). Die genauen Mechanismen von Neuroinflammation im Rahmen der ALS und die Rolle der Mikroglia darin, sind noch ungeklärt und Gegenstand gegenwärtiger Forschung (Philips & Robberecht, 2011).
Multiple Sklerose ist eine demyelinisierende entzündliche Erkrankung des ZNS, deren Genese vermutlich autoimmun bedingt ist. Da die Entmarkungsherde überall lokalisiert sein können, ist die Symptomatik der Betroffenen äußerst divers. Sehstörungen und Ausfälle der Okulomotorik sind häufig, aber kein Diagnosekriterium der MS. Besonders in frühen Stadien der Erkrankung scheinen aktivierte Mikroglia, indem sie Myelin als Antigen präsentieren und so die Rekrutierung von T-Zellen, Granulozyten und Makrophagen fördern, eine wichtige Rolle einzunehmen (Raivich & Banati, 2004).
In erblich bedingter Photorezeptor-Dystrophie ist frühzeitige Mikroglia-Aktivierung ebenfalls feststellbar, wie mehrere Untersuchungen anhand von Tiermodellen zeigen konnten. Desweiteren ergaben Experimente an einer Photorezeptor-Zelllinie, dass aktivierte Mikroglia die Apoptose von retinalen Zellen induzieren (Langmann, 2007).
Zusammenfassend weist eine Fülle von Daten auf eine zentrale Bedeutung der Mikrogliazellen für die Entstehung und den Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen hin. Ein vielversprechender Ansatz, um Neurodegeneration in Gehirn und Retina zu verhindern, ist daher die gezielte pharmakologische Beeinflussung dieser Zellen.

2.4 Curcumin

Ein aufgrund seiner Wirkung gegenüber proinflammatorisch aktivierter Mikroglia, für die Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen vielversprechender Wirkstoff ist Curcumin. Über die Beeinflussung der Mikroglia, übt diese Substanz eine dämpfende Wirkung auf Neuroinflammation aus und unterstützt gleichzeitig aktiv den Erhalt von Neuronen.
Curcumin ((E, E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) ist ein natürlich vorkommender Stoff, kann jedoch auch synthetisch hergestellt werden. Es gehört zu der Stoffgruppe der pflanzlichen Polyphenole. Neben weiteren Curcuminoiden (Demethoxycurcumin, Bisdemethoxycurcumin und Cyclocurcumin = Curcumin II-IV) ist Curcumin (Curcumin I) Hauptbestandteil von Kurkuma (Turmeric), einem aus dem getrockneten Rhizom der Pflanze Curcuma longa (oder Gelbwurzel, Familie der

Ingwergewächse) gewonnenen Pulvers, welches insbesondere bekannt ist als Zutat in Currymischungen. Als Bestandteil von Kurkuma, verleiht Curcumin dem Currypulver seine charakteristische orange-gelbe Farbe. Die Gewinnung aus Kurkuma geschieht mittels Lösemittelextraktion, wobei üblicherweise 95-prozentiges Ethanol verwendet wird.

Abbildung 1: Curcumin als Inhaltsstoff von Kurkuma, einem Pulver, welches aus dem getrockneten Rhizom der Curcuma longa-Pflanze hergestellt wird.

(Quellen: medicinewheel44.blogspot.com, botanical-herbs.com, planetayurveda.com)

Curcumin ist lipophil bzw. schlecht wasserlöslich. Um es in Lösung zu bringen, eignen sich organische Lösungsmittel wie Aceton, Ethanol oder DMSO. Wegen seiner geringen Wasserlöslichkeit wird es über den Magen-Darm-Trakt nur mäßig aufgenommen. Aus diesem Grund, sowie wegen seiner raschen Metabolisierung und Elimination im menschlichen Körper, besitzt es eine eher schlechte Bioverfügbarkeit. Eine Verbesserung der Resorption soll durch die Bildung von Curcumin-Phospholipid-Komplexen (Gupta & Dixit, 2011) oder aber durch die Verbindung mit Liposomen (Chen & al., 2012), Mizellen (Podaralla & al., 2012) oder Nanopartikeln aus PLGA (Polylactid-co-Glycolid) (Doggui & al., 2012) erreicht werden. Außerdem kann seine hepatische Metabolisierung durch kombinierte Verabreichung mit Piperin, einem Wirkstoff des schwarzen Pfeffers, verlangsamt und dadurch die Bioverfügbarkeit von Curcumin um 2000% gesteigert werden (Shoba & al., 1998). Die geringe Bioverfügbarkeit ist wohl mit ein Grund, weshalb Curcumin bei oraler Aufnahme selbst hoher Dosen (von bis zu 15g pro Tag) eine gute Verträglichkeit zeigt. In klinischen Studien wurde als Nebenwirkung lediglich eine erhöhte Neigung zu Diarrhö festgestellt (Sharma & al., 2004). Der Zeitraum solcher Untersuchungen umfasst nur einige Monate, weshalb es nicht möglich ist durch sie die Langzeit-Wirkung von Curcumin auf den Menschen zu erfassen. Gleichwohl kann die indische Bevölkerung, in der gemeinhin eine lebenslange Aufnahme von bis zu 100mg täglich stattfindet, als Beleg dafür gelten, dass Curcumin als gesundheitlich unbedenklich einzustufen ist (Chainani-Wu, 2003).
Curcumin findet, als Inhaltsstoff von Kurkuma, heutzutage Verwendung als Gewürz, z.B. in Currypulver, als Nahrungsergänzungsmittel und als Bestandteil von pflanzlichen Arzneimitteln. Curcumin in reiner Form wird als Lebensmittelfarbstoff (E100) eingesetzt.
Die Geschichte der Nutzung von Kurkuma reicht einige tausend Jahre zurück. Die am weitesten zurückreichende Tradition besteht in Indien, wo Kurkuma seit jeher als Gewürz und Heilmittel Verwendung findet. Es stellt einen der bedeutendsten Wirkstoffe in der Ayurveda-Medizin dar. Aber auch in der traditionellen Medizin Japans, Chinas und Südostasiens spielt es eine wichtige Rolle. Hier erkannte man bereits früh das anti-entzündliche und anti-infektiöse bzw. immunstimulierende Potential dieser Substanz. Das Anwendungsgebiet von Kurkuma erstreckte sich schon immer über eine Vielzahl von Leiden. Um nur einige zu

nennen: Verdauungsbeschwerden, Lebererkrankungen, Gelenkbeschwerden, Erkrankungen der Atemwege, Augenerkrankungen, Menstruationsbeschwerden, Kopfschmerzen, Behandlung von Wunden und Ausschlägen (Ammon & Wahl, 1991).
Die grundlegende pharmakologische Wirkungsweise des Curcumin beruht auf verschiedenen Aspekten: Es besitzt antiinflammatorische, antimikrobielle, antioxidative und antikanzerogene Wirkung (Maheshwari & al., 2006). Dem liegt insbesondere sein modulierender Einfluss auf das Immunsystem zugrunde. Da bei vielen Krankheiten, auch neurodegenerativen Erkrankungen, malignen Erkrankungen, Arteriosklerose und Diabetes, ein entzündliches Geschehen maßgeblich beteiligt ist, zeigt Curcumin hier viele günstige Effekte. Es wirkt immunmodulierend, indem es die Aktivität von T-Zellen, B-Zellen, Neutrophilen, natürlichen Killerzellen, dendritischen Zellen und Makrophagen beeinflusst (Jagetia & Aggarwal, 2007).
Eine Aktivierung der Mikroglia wird durch Curcumin gedämpft, indem es die Freisetzung von NO (Jung & al., 2006) und vielen proinflammatorischen Zytokinen, wie etwa IL-1, IL-6 und TNF (Jin & al., 2007) reduziert. Außerdem verhindert es die LPS-induzierte Aktivierung der COX-2 (Kang & al., 2004). Die meisten dieser Effekte übt es über die Inhibierung des Transkriptionsfaktors NF-κB und daneben AP-1 (Activator protein 1), sowie STATs (Signal transducers and activators of transcription) aus.
Bislang existieren etwas mehr als 70 klinische Studien – ca. 40 davon sind bereits abgeschlossen - in denen das therapeutische Potential von Curcumin erforscht wird. Schwerpunktmäßig wird die Behandlung von neoplastischen und chronisch-entzündlichen Erkrankungen, insbesondere des Gastrointestinaltrakts, sowie von neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer und anderen kognitiven Störungen untersucht (www.clinicaltrials.gov). Die aktuelle Studienlage zeigt, dass Curcumin verschiedenste pathologische Zustände, über seine Mikroglia-modulierende Wirkung heilsam beeinflussen kann.

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Mikroglia spielt eine zentrale Rolle im angeborenen Immunsystem des ZNS, für die neuronale Homöostase und somit für die Entstehung und den Verlauf von Neuroinflammation. Deshalb sind diese Zellen als Angriffspunkt für die Pharmakotherapie neurodegenerativer Erkrankungen besonders interessant. Curcumin stellt hier, aufgrund seiner dämpfenden Wirkung auf aktivierte Mikroglia, einen vielversprechenden Wirkstoff dar.
Dieser Effekt des Curcumin ist auf Genexpressions-Ebene bereits hinlänglich untersucht worden, jedoch beschränkt auf wenige Beispiele, wie proinflammatorische Zytokine, iNOS und COX-2.
In dieser Arbeit wurde, durch die Erstellung genomweiter Transkriptionsprofile per DNA-Microarray, die Wirkung von Curcumin auf die Genexpression ruhender und LPS-aktivierter BV-2 Mikroglia untersucht. Indem ein Überblick über die Veränderungen des Transkriptoms durch Curcumin geschaffen wurde, konnten bisher unbekannte Zielgene dieser Substanz entdeckt werden. Anschließend wurden die, per Microarray-Analyse identifizierten, differentiell exprimierten Gene mithilfe qRT-PCR validiert.
Effekte des Curcumin auf morphologischer bzw. funktioneller Ebene, wurden an einer RAW-Makrophagen-Zelllinie untersucht. Die Funktionsanalyse anhand NO- und LDH-Nachweis, sollte Aufschluss über die Wirkung von Curcumin auf die Neurotoxizität aktivierter Mikroglia bringen.

3 Material

3.1 Geräte

pH-Meter Microprocessor pH 535	WTW Weilheim
Autoklav	Gössner, Hamburg
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent, USA
Sterilbank / Laminar-Flow-Werkbank	BDK Luft- & Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, D
BMG FluoStar Optima Plate reader	BMG Labtech, Offenburg, D
Präzisionswaage 2254	Sartorius, Göttingen, D
Wasserbad	GFL, Burgwedel, D
Vortex Genie 2 G-560E	Scientific Industries, USA
Thermoblöcke/-mixer : Thermomixer 5436 Thermoblock Techne DB3	 Eppendorf, Hamburg, D Techne ThermoDux, Wertheim, D
Zentrifugen : Zentrifuge Tischzentrifuge Biofuge fresco Tischzentrifuge Biofuge pico Zentrifuge *Megafuge*® 1.0R	 Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode, D Heraeus, Hanau, D Heraeus, Hanau, D Heraeus, Hanau, D
Mikroskope : Durchlichtmikroskop DMIL HC Phasenkontrast-Mikroskop Nikon Eclipse Ti	 Leica, Wetzlar, D Nikon, JP
Inkubator/Brutschrank CB 210	Binder, Tuttlingen, D
Einkanal-/Mehrkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg, D

Pipettierhilfe *PIPETBOY®*	Integra Biosciences GmbH, Fernwald, D
NanoDrop ND-1000 photometer	PeqLab, Erlangen, D
Thermocycler TProfessional TRIO	Biometra, Göttingen, D
ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System	Applied Biosystems, USA
Agilent G2565CA Microarray Scanner System	Agilent, USA

3.2 Verbrauchsmaterialien

optical adhesive cover (Kat.-Nr. 4311971)	Applied Biosystems, USA
Zellkulturflaschen T-75, Belüftungskappe rot	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellschaber, 25cm	Sarstedt, Nümbrecht, D
BD Plastipak Tuberkulinspritzen ohne Kanüle, 1ml	Becton, Dickinson and Company, USA
BD Microlance Standardkanülen 3 Nr.1/ 20G gelb 0,9×40mm	Becton, Dickinson and Company, USA
10µl, 100µl, 200µl, 1000µl Filterspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, D Eppendorf, Hamburg, D
10µl, 100µl, 1000µl Pipettenspitzen	Omnitip, PL, Eppendorf, Hamburg, D
0,2/0,5ml PCR Cups	Brand Life Science Products, Wertheim, D
0,5ml, 1,5ml, 2ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, D Sarstedt, Nümbrecht, D
15ml, 50ml Falcon Tube	Sarstedt, Nümbrecht, D
Kryoröhrchen	Nunc, USA

BD Falcon 6-well Flat-Bottom Tissue Culture Plates with Lids	Becton, Dickinson and Company, USA
384-Well Thermo-Fast plate (Kat.-Nr. TF-0384) (TaqMan)	ABgene, UK
96-Well Mikroplatte, PS, F-Boden, glasklar; Art.-Nr.: 655101-ORT	Greiner bio-one, Kremsmünster, A
Einmalhandschuhe	Kimberly-Clark, USA
2ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, D

3.3 Chemikalien

DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Curcumin C7727	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
E.coli 0111:B4 LPS	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
B-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
RNase freies Wasser	Qiagen, Hilden, D

3.4 Medien und Supplemente

RPMI 1640 (ohne L-Glutamin), 500ml	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
DMEM (high glucose 4,5 g/l), 500ml	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
L-Glutamin	AppliChem, Darmstadt, D
Penicillin/Streptomycin (P/S)	PAA, Pasching, Österreich
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

3.5 Puffer und Lösungen

PBS-Puffer (1×)	1,5 M NaCl, 83 mM Na2HPO4, 17 mM H2PO4 x H2O (pH7.4)

Trypsin/EDTA (10×)	PAA, A
RLT-Puffer	Qiagen, Hilden, D

3.6 Kit-Systeme

RNeasy® Protect Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAshredder™	Qiagen, Hilden, D
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Böblingen, D
Whole Mouse Genome Microarray Kit, 4x44K (014868)	Agilent Technologies, Böblingen, D
Griess Reagent System (Cat. #: G2930)	Promega, USA
CytoTox 96® Nonradioactive Cytotoxicity Assay (Part. # TB163)	Promega, USA
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St.Leon-Rot, D
TaqMan® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Agilent Quick-Amp Labeling Kit	Agilent, USA
Agilent G2534A Microarray Chamber Kit	Agilent, USA

3.7 Zelllinien

BV-2	Prof. Ralph Lucius (Klinik für Neurologie, CAU, Kiel)
RAW 264.7	LGC Promochem, UK
661W	Prof. Muayyad Al-Ubaidi (University of Illinois, Chicago, IL, USA)

3.8 Oligonukleotide

Gen	F-Primer (5'-3')	R-Primer (5'-3')	Sonde (Roche Probe Library)
Atp5b	ggcacaatgcaggaaagg	tcagcaggcacatagatagcc	77
C3	accttacctcggcaagtttct	ttgtagagctgctggtcagg	76
Ccl2	catccacgtgttggctca	gatcatcttgctggtgaatgagt	62
Dll1	ttcaactgtgagaagaagatggat	gccgaggtccacacactt	103
Egr2	ctacccggtggaagacctc	aatgttgatcatgccatctcc	60
Il4	catcggcattttgaacgag	cgagctcactctctgtggtg	2
Il6	gatggatgctaccaaactggat	ccaggtagctatggtactccaga	6
Nos2	ctttgccacggacgagac	tcattgtactctgagggctga	13
Ntng1	aggggcaagagaccaagg	agggatggtgtctatcgtcct	103
Pecam1	cggtgttcagcgagatcc	cgacaggatggaaatcacaa	45
Perp1	tcatatgccggctcacct	atccactggcgtctggagt	110
Pparα	ccgagggctctgtcatca	gggcagctgactgaggaa	11
Ptgs2	gatgctcttccgagctgtg	ggattggaacagcaaggattt	45
Stat1	aaatgtgaaggatcaagtcatgtg	catcttgtaattcttctagggtcttga	15
Tlr2	accgaaacctcagacaaagc	cagcgtttgctgaagagga	49

3.9 Software

SigmaPlot	SYSTAT Software.
Agilent Feature Extraction Software	Agilent, USA
Genomatix ChipInspector Program	Genomatix, München, D
ABI sequence detector software vers. 2.3	Applied Biosystems, USA

4 Methoden

4.1 Überblick über die Abfolge der experimentellen Schritte

Die Kulturen der Mikroglia- bzw. Makrophagen-Zelllinien wurden nach Stimulation mit LPS, Curcumin, sowie der Kombination beider Substanzen und einer 6-stündigen bzw. 24-stündigen Inkubationszeit fotografiert. Hierauf erfolgte die Ernte der Zellen und ihrer Überstände. Die durch die Makrophagen konditionierten Überstände wurden auf ihren Stickstoffmonoxid-Gehalt untersucht und mit ihnen wurden Kulturen einer Photorezeptor-Zelllinie inkubiert. Die Photorezeptorzellen wurden anschließend bezüglich ihrer Schädigung in dem konditionierten Medium durch einen Laktat-Dehydrogenase-Assay untersucht. Aus den Zellen der Mikroglia-Kulturen wurde die RNA isoliert, deren Konzentration bestimmt, eine Qualitätskontrolle durchgeführt und eine festgelegte Menge RNA zwecks späterer Verwendung für die qRT-PCR in cDNA umgeschrieben. Eine DNA Mikroarray-Analyse wurde durchgeführt um das globale mRNA-Expressionsprofil der Mikroglia zu bestimmen. Zur eigentlichen Quantifizierung der Expression bestimmter pro-bzw. antiinflammatorischer Marker-Gene, sowie neu entdeckter Curcumin-Zielgene wurden die cDNA-Proben anschließend mit Hilfe der TaqMan Real-Time qRT-PCR vermessen.

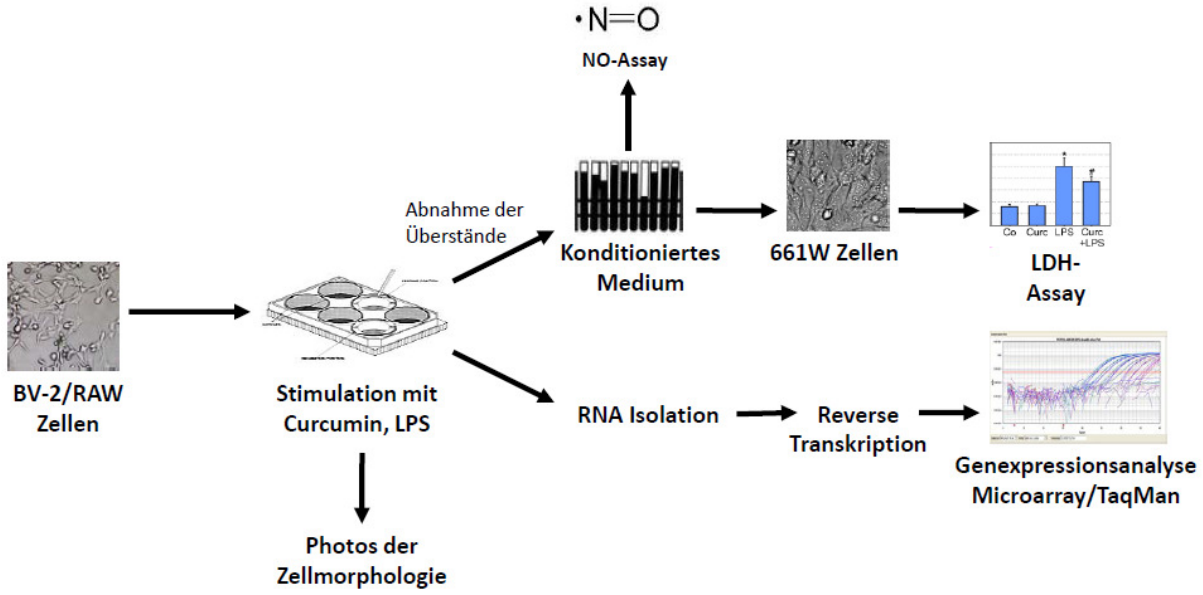

Abbildung 2: Diagramm des experimentellen Aufbaus

4.2 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Laminar-Flow-Werkbank durchgeführt. Die Zelllinien wurden bei 37°C und einem CO_2-Partialdruck von 5% im Inkubator in (mittleren) Zellkulturflaschen kultiviert.
Die Zellkulturmedien wurden bevor sie in Kontakt mit den Zellen kamen auf ca. 37°C aufgewärmt. Eine Splittung der Kulturen erfolgte in der Regel alle zwei bis drei Tage.
Es wurden drei Zelllinien verwendet:

4.2.1 Murine Mikroglia-Zelllinie BV-2

BV-2 Zellen sind Mausembryonen entstammende Mikroglia, die durch Transfektion mit einem (rekombinanten) Retrovirus immortalisiert wurden. Sie behalten weitgehend die Eigenschaften primärer Mikroglia bei und sind somit ein geeignetes Modell für die Untersuchung pathophysiologischer Vorgänge im ZNS (Blasi & al., 1990).
BV-2 Zellen wurden in einem Zellkulturmedium kultiviert, bestehend aus RPMI 1640-Medium mit den folgenden Zusätzen: 5% FCS, 1% L-Glutamin, 1% P/S und 1,95µl β-ME. Sie wachsen semi-adhärent.

4.2.2 Murine 661W Photorezeptor-Zelllinie

661W Photorezeptorzellen entstammen Retinoblastomen transgener Mäuse. Die Zellen zeigen sowohl Eigenschaften der retinalen Zapfen, als auch die Morphologie von Neuronen mit ihren faserartigen Ausläufern. Sie wachsen adhärent als Monolayer-Kultur. Diese Zelllinie wird bevorzugt in der Erforschung von Therapie bzw. Prävention der degenerativen Erkrankungen der Retina, speziell der Retinalen Dystrophien eingesetzt (Tan & al., 2004). Als besonderes Charakteristikum reagieren sie wie retinale Zellen auf lichtinduzierten oxidativen Stress mit Apoptose (Krishnamoorthy & al., 1999).
Die 661W Zellen wurden kultiviert in DMEM (high glucose 4,5 g/l)-Medium mit den Zusätzen 10% FCS und 1% P/S.

4.2.3 Murine Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7

Diese Makrophagen-Zelllinie stammt von Tumoren der Maus, die durch ein (das Abelson-Maus-Leukämie-Virus)Retrovirus induziert wurden. Sie wächst semi-adhärent und zeigt die Morphologie von Makrophagen. In der Morphologie dieser Zellen prägt sich die LPS-Aktivierung sowie die dämpfende Wirkung des Curcumin besonders stark aus.
Die Kultivierung erfolgt in dem für 661W Photorezeptorzellen verwendeten, zuvor beschriebenen Zellkulturmedium.

4.2.4 Konservierung und Auftauen der Zellen

Die dauerhafte Lagerung der Zelllinien erfolgte in Flüssigstickstoff. Das Einfriermedium bestand aus Zellkulturmedium, angereichert mit 50% FCS und 10% DMSO.
Zum Auftauen wurden die Zellen in ein 37°C warmes Wasserbad überführt, anschließend das Einfriermedium mit 20ml Zellkulturmedium verdünnt und die Zellsuspension für 10 Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde per Vakuum-Saugpumpe entfernt und das Zellpellet in 10ml frischem Medium resuspendiert.

4.2.5 Splittung der Zellkulturen

Die Splittung der Kulturen erfolgte bei weitgehender Konfluenz. Die Ablösung vom Flaschenboden geschah bei den BV-2 und RAW Zellen durch Abschaben, wobei das Medium zunächst erneuert, dann der Zellrasen durch einen Zellschaber sanft von dem Flaschenboden

gelöst und die entstandene Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche mit jeweils 10ml frischem Medium überführt wurde.
Die Adhäsion der 661W Zellen wurde durch Einwirken von Trypsin aufgehoben. Hierbei wurden, nach Absaugen des alten Mediums 5ml einfach konzentrierter Trypsin-Lösung zugegeben, die für 5-10 Minuten im Brutschrank inkubierte. Sobald ein Ablösen der Zellen einsetzte, wurde der Flaschenboden mit 20ml frischem Medium abgespült und die resultierende Zellsuspension für 10 Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 10ml frischem Medium resuspendiert.

4.2.6 Zellzahlbestimmung und Aussaat

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Kultur wurde wie bei der Splittung beschrieben eine Zellsuspension in frischem Medium hergestellt und 10µl davon wurden in eine modifizierte Neubauer-Zählkammer gefüllt. Anschließend wurden vier der großen Quadrate der Kammer ausgezählt. Die Gesamtzellzahl einer Kultur konnte dann folgendermaßen berechnet werden: Mittelwert aus den vier großen Quadraten × 10.000 (Zählfaktor der Kammer)= Zellzahl/ml, Zellzahl/ml × Volumen der Zellsuspension = Gesamtzellzahl.
Für die Stimulationsversuche wurden die Zellen schließlich auf 6-Well-Platten ausgesät. Die Zellzahl, die pro Well mit 2ml Kulturmedium ausgesät wurde betrug für BV-2 und RAW Zellen 1 Million, für 661W Zellen 250.000.

4.2.7 Stimulation

24 Stunden nach der Aussaat und nach vorherigem Mediumwechsel wurden die Stimulationsversuche der BV-2 und RAW Zellen mit LPS und Curcumin durchgeführt. Aktiviert wurden die Zellen mit dem als Endotoxin wirkenden LPS. Curcumin wurde in DMSO gelöst und den Zellkulturen in Konzentrationen zugefügt, die 0,05% des Gesamtvolumens nie überstiegen. Die Curcumin-Stammlösung lag vor in einer Konzentration von 10mg/ml bzw. 27,1mM. Den Zellkulturen wurden LPS und Curcumin in Konzentrationen von100ng/ml bzw. 20µM zugefügt. Diese Stimulationsbedingungen sind zuvor durchgeführten Experimenten entlehnt (Jin & al., 2007) (Dirscherl & al., 2010). Die Inkubationszeit betrug 6 Stunden bei BV-2 Mikroglia und 24 Stunden bei RAW-Makrophagen. Im Falle einer kombinierten Stimulation (LPS + Curcumin), wirkte LPS eine Stunde lang ein, bevor Curcumin zugegeben wurde.
Ebenfalls 24 Stunden nach Aussaat und nach Mediumwechsel wurden die 661W Zellen mit durch RAW-Makrophagen konditioniertem Medium für 24 Stunden inkubiert.

4.2.8 Zellernte und Gewinnung von Zellüberständen

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden, im Falle der RAW-Zellkulturen, zunächst die Zellüberstände abgenommen und für 10 Minuten bei 4.000 rpm zentrifugiert. Um den so geschiedenen Zelldetritus nicht zu verschleppen, wurde der Überstand wiederum abgenommen. und das so gewonnene konditionierte Medium möglichst zeitnah zu den 661W Zellkulturen gegeben bzw. auf seinen NO-Gehalt untersucht.
Nach Abnahme der Zellüberstände wurden die Zellen einmalig mit einfach konzentriertem PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit einer Mikroskopkamera Bilder aufgenommen. Schließlich wurde zur Ernte der Zellen 250µl Lysepuffer, bestehend aus RLT-Puffer + 1% β-ME je Well zugegeben. Die Zellen wurden mit dem Zellschaber abgetragen und im

Lysepuffer suspendiert in Eppendorfcups überführt. Erfolgte die RNA-Isolierung nicht am selbigen Tag, wurden die geernteten Zellen für eine spätere Weiterverarbeitung bei -80°C eingefroren.

4.3 Funktionsassays

4.3.1 Stickstoffmonoxid Assay

Das in Zellen des Immunsystems, insbesondere Makrophagen, im Rahmen einer entzündlichen Reaktion gebildete freie Radikal Stickstoffmonoxid wird durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) produziert. Stimuli für deren Induktion sind inflammatorische Zytokine und Bakterien bzw. deren Bestandteile (wie LPS). NO ist ein für die Immunabwehr wichtiger Mediator der Zytotoxizität mit sowohl nützlicher als auch schädlicher Wirkung: Als nützlich erweist es sich bei der Schädigung von mikrobiellen Krankheitserregern, schädlich wirkt es, sobald körpereigene Zellen angegriffen werden. Letzteres kann insbesondere in dem Verlauf einer chronisch-entzündlichen Erkrankung geschehen.
Absicht des vorliegenden Versuchs war es, die Wirkung von Curcumin auf die NO-Freisetzung durch LPS-aktivierte RAW-Makrophagen zu bestimmen.
Zu diesem Zweck wurde eine Messung des NO-Gehalts der Kulturmedien von unterschiedlichen RAW-Stimulationsansätzen mit dem kolorimetrischen Griess-Test durchgeführt.
Da NO nur eine Halbwertszeit von wenigen Sekunden besitzt, wird für den Nachweis sein in wässriger Lösung stabilerer Metabolit Nitrit (NO_2-) gemessen. Mit Sulfanilsäure bildet Nitrit Diabenzolsulfonsäure, die mit α-Naphthylamin (NED) zu einem roten Azofarbstoff komplexiert (siehe Abbildung 3). Schließlich wird dieser photometrisch im Plate Reader bestimmt. Bei dieser Methode ist der Nachweis von Nitrit mit einer unteren Nachweisgrenze von 2,5µM möglich.

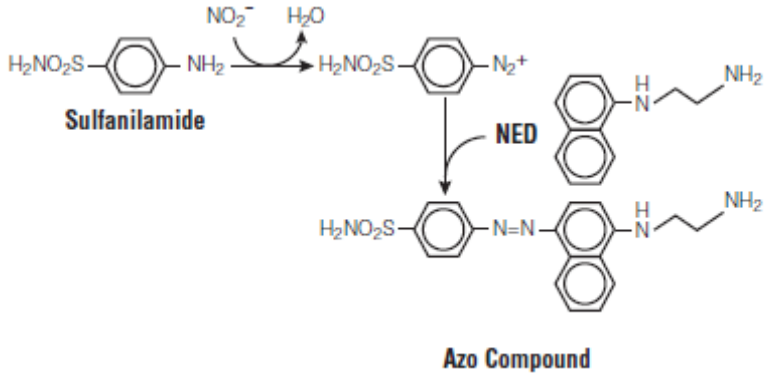

Abbildung 3: NO-Nachweis mittels Griess-Reagenz

Die Anfertigung einer Nitratstandardkurve als Eichgeraden wurde nach den Angaben des Herstellers und in dem verwendeten Zellkulturmedium als Matrix durchgeführt. Zu jeweils 50µl des zu messenden Zellkultur-Mediums der RAW-Makrophagen wurden nacheinander 50µl Sulfanilamid-Lösung und 50µl NED-Lösung in eine 96-Well Platte pipettiert, gefolgt von jeweils 10 minütiger Inkubation. Eine Leerprobe (hier wurde nur Zellkulturmedium mit dem Reagenz inkubiert) wurde hinzugefügt, um ein Störsignal, eventuell verursacht durch

Substanzen des Zellkulturmediums, zu detektieren. Die photometrische Messung im Standard 96-Well Plate Reader erfolgte bei einer Wellenlänge von 535nm. Die Messwerte der in Triplikaten vorliegenden Proben wurden gemittelt.

4.3.2 Laktat-Dehydrogenase Aktivitätsassay

Werden Zellen geschädigt, geht die Integrität ihrer Zellmembran verloren und das zytosolische Enzym Laktat-Dehydrogenase (LDH), welches im Zellkultur-Überstand nachgewiesen werden kann, wird freigesetzt. Die Quantifizierung der LDH-Aktivität, die proportional ist zu der Menge an lysierten Zellen, ermöglicht somit das Ausmaß der Zytotoxizität im Rahmen einer entzündlichen Reaktion zu bestimmen, sowie deren Dämpfung durch Einwirkung antiinflammatorisch wirkender Faktoren, wie Curcumin. Die Zytotoxizität inflammatorisch aktivierter Immunzellen, welche körpereigene Zellen schädigt, wurde in dieser Arbeit anhand des folgenden Modells untersucht: Mit dem durch RAW-Makrophagen konditionierten Zellkultur-Medium (MKM), wobei diese Zellen zuvor unstimuliert blieben oder mit 20µM, 100 ng/ml LPS und 20µM Curcumin + 100 ng/ml LPS für 24h stimuliert worden waren, wurden 661W-Photorezeptorzellen inkubiert. Nach weiteren 24h, während denen das MKM auf die 661W-Zellen einwirkte, wurden die Überstände abgenommen und die jeweilige LDH-Aktivität gemessen.
Das hier verwendete enzymatische Testverfahren basiert auf der LDH-katalysierten Umwandlung von Laktat zu
Pyruvat, die zu der Reduktion von NAD^+ zu $NADH + H^+$ führt. In der sich anschließenden durch Diaphorase katalysierten Redoxreaktion wird das Tetrazoliumsalz INT zu rotem Formazan reduziert, dessen Menge proportional ist zu der Anzahl an lysierten Zellen und welches photometrisch quantifiziert wird (siehe Abbildung 4).

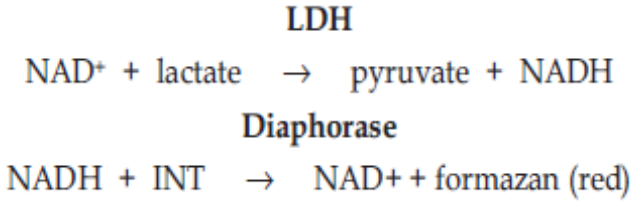

Abbildung 4: Chemische Reaktionen, die dem CytoTox 96® Assay zugrunde liegen

Zwecks Durchführung der Messung wurden zu jeweils 50µl der zu analysierenden Überstände der 661W Photorezeptorzellen nacheinander 50µl Substrate Mix und nach 30-minütiger Inkubation 50µl Stop solution in eine 96-Well Platte pipettiert. In einer Verdünnung im Verhältnis von 1:6 durch Vermischen der Proben mit PBS-Puffer (je Well 120µl der Probe + 600µl PBS vermischt und das Gemisch anschließend in eine Küvette gefüllt), wurde die spektrophotometrische Messung bei einer Wellenlänge von 490nm durchgeführt. Als Leerkontrolle wurde eine Küvette mit reinem PBS-Puffer mitgemessen. Die Messwerte der in Triplikaten vorliegenden Proben wurden gemittelt und auf die Kontrollprobe (661W-Zellen, die nicht mit MKM inkubiert wurden) normalisiert.

4.4 RNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA aus den Zelllysaten der BV-2 Mikroglia wurde mittels RNeasy® Mini Kits durchgeführt. Dabei wurde nach der Anleitung des Herstellers vorgegangen (Protokoll: Purification of Total RNA from Animal Cells Using Spin Technology).
Bei dieser Methode handelt es sich um eine spezifische Aufreinigung der Total-RNA über hydrophile Siliziumgel-Säulen unter Verwendung geeigneter Puffersysteme. Vorbereitend wurden die in Lysepuffer suspendierten Zellen mit RPE-Waschpuffer vermischt und zwecks besserer Homogenisierung 10-15 Mal mit einer Kanüle aufgezogen. Anschließend wurde, um die entsprechenden Bedingungen für die RNA-Bindung an die Silikatmatrix zu schaffen Ethanol zugegeben. Das Lysat wurde dann mittels Zentrifugation über die in einer Säule befindliche Silikatmembran filtriert, wobei die RNA daran bindet, während alle übrigen Zellbestandteile in den folgenden Waschschritten ausgewaschen werden. Die RNA wurde abschließend in 50µl RNase-freiem Wasser eluiert.

4.5 Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle von RNA

Die Konzentration der RNA wurde spektrophotometrisch mittels des NanoDrop ND-1000 Photometer bestimmt. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass Licht einer bestimmten Wellenlänge, die beim Absorptionsmaximum der zu untersuchenden Substanz liegen sollte, beim Passieren einer Lösung mit dieser Substanz absorbiert wird. Die Stärke der Absorption hängt neben dem spezifischen Extinktionskoeffizienten ε und der durchstrahlten Flüssigkeitsschichtdicke D von der Konzentration der besagten Substanz ab. Dieser Zusammenhang wird im Lambert-Beerschen-Gesetz formuliert: $E = \varepsilon \times c \times D$ (E: Extinktion, ε: molarer Extinktionskoeffizient [L x mol^{-1} x cm^{-1}], c: Konzentration [mol/L], D: Flüssigkeitsschichtdicke [cm]) Somit kann man bei bekanntem Extinktionskoeffizienten und konstanter Schichtdicke durch die Messung der Extinktion die Konzentration der zu messenden Substanz bestimmen. Vor dem eigentlichen Messen der Proben wurde eine Leerprobe mit Millipore-Wasser gemessen, dem Medium in dem die RNA eluiert war. Somit konnte die durch das Wasser hervorgerufene Extinktion im Folgenden durch den NanoDrop herausgerechnet werden. Die Messung erfolgte bei 260nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Je Probe wurde ein Volumen von 2µl vermessen. Die resultierende RNA-Konzentration gibt das Gerät in ng/µl an.
Die Integrität von RNA kann durch ubiquitär vorkommende RNasen leiden. Zur Qualitätsbestimmung der RNA wurde der Agilent 2100 Bioanalyzer mit dem dazugehörigen Agilent RNA 6000 Nano Kit verwendet. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf einer miniaturisierten Kapillarelektrophorese (Lab-On-Chip Verfahren). Hierbei erfolgt die elektrophoretischen Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe bzw. Molekulargewicht. Dies geschieht in einem Minichip, welcher aus einem Netzwerk untereinander verbundener Kanäle besteht. Die Erfassung der RNA-Fragmente erfolgt mittels einer laserinduzierten Fluoreszensdetektion. Die Menge der gemessenen Fluoreszens korreliert mit der Menge an RNA einer bestimmten Größe in einer Probe. Der Messvorgang schließt ab mit der Erstellung eines Elektropherogramms für jede eingesetzte RNA-Probe. Anhand des entstehenden Elektropherogramms wird durch die an das Gerät angeschlossene Software (Agilent Expert 2100, Agilent Technologies) ein Maß für die RNA-Integrität (RNA integrity number, RIN) berechnet. Die RIN kann auf einer Skala von 0 bis 10 liegen, wobei die RNA-Integrität umso größer ist, je höher die RIN ist.

4.6 Reverse Transkription

Da man für die nachfolgende PCR DNA benötigt, wird die RNA zuvor transkribiert. Die hier zum Einsatz kommende Reverse Transkriptase erfüllt eine Doppelfunktion: Sie führt als RNA-abhängige DNA-Polymerase die cDNA-Synthese mit der mRNA als Matrize durch, wobei ein RNA-DNA-Hybrid entsteht (auch Einzelstrangsynthese genannt). In ihrer zweiten Funktion als RNA-DNA-Hybridabhängige Exoribonuklease (RNase H) degradiert sie die RNA, sodass der cDNA-Einzelstrang zurückbleibt.
Das Umschreiben von RNA in komplementäre cDNA erfolgte mit dem RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit. Zu Beginn stand die Überlegung wie groß die benötigte Menge an zu transkribierender RNA sein sollte, um vor allem für die Durchführung der späteren RTq-PCR ausreichend cDNA zur Verfügung zu haben. Diese Menge wurde unter Berücksichtigung der Anzahl der Ansätze (Doppel-/Trippelansätze), der Anzahl der zu untersuchenden Gene, sowie des Well-Volumens einer für den TaqMan verwendeten 384-Well-Platte bestimmt:
RNA-Masse = 2,5µl (Well-Volumen) × Gen-Anzahl × Doppel-/Trippelansatz.
Die Ausgangs-RNA wurde mit 1µl des spezifischen Erststrang-Primers (random hexamer primer) und einem variablen Volumen von RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12µl aufgefüllt. Das Volumen des Ansatzes konnte größer ausfallen, bedingt durch eine geringe Ausbeute an RNA, das heißt die nämliche Masse an RNA war in einem größeren Volumen zu finden. Um dennoch auf ein Volumen von 11µl (abzüglich des Primers) zu kommen, ließ man Flüssigkeit im Vakuum verdunsten. Die weiteren Arbeitsschritte wurden gemäß dem QuickProtocol™ für den RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit durchgeführt: Den Ansätzen wurden nach fünfminütiger Inkubation bei 70°C der Master-Mix zugegeben. Dieser wurde frisch angesetzt und enthielt je Ansatz 4µl Reaktions-Puffer, 2µl dNTP-Mix, sowie 1µl RNase-freies Wasser. Anschließend wurden die Ansätze für 5 Minuten bei 25°C inkubiert und je 1µl Reverse Transkriptase zugegeben, bevor sie für die Durchführung der eigentlichen Transkription in einen zyklisch programmierbaren Thermoblock, den Thermocycler überführt wurden. Hier erfolgte standardmäßig die Erwärmung auf 25°C für 10 Minuten, sodann auf 42°C für 60 Minuten und abschließend das Stoppen der Reaktion bei 70°C für 10 Minuten. Sämtliche Arbeitsschritte außerhalb der Inkubationszeiten im Thermoblock bzw. Thermocycler erfolgten bei Lagerung auf Eis. Die resultierende cDNA-Menge ist der jeweiligen eingesetzten RNA-Menge gleich (Endvolumen 20µl).

4.7 DNA-Mikroarray Analyse

Die Mikroarray-Analyse ist in der Lage, die Genexpressionsprofile tausender Gene in einem einzelnen Experiment zu erfassen. Auf diese Weise kann innerhalb kurzer Zeit ein großer Genpool auf vielversprechende Kandidaten-Gene durchsucht werden.
In der cDNA-Mikroarray Technik sind genspezifische cDNA-Sequenzen auf einem speziellen Objektträger immobilisiert und werden mit den zu untersuchenden Fluoreszenzmarkierten cDNA-Abschnitten hybridisiert. Aus der Intensität des jeweiligen Fluoreszenzsignals wird die relative Expressionsaktivität abgeleitet.
Für die Durchführung der Expressionsanalysen wurden 4 × 44 K Mikroarrays der Firma Agilent Technologies verwendet.
In einem ersten Schritt geschieht die Fluoreszensmarkierung der zu untersuchenden RNA-Proben mit Hilfe des Quick Amp Labeling Kit, One-Color. Die erhaltene fluoreszierende cRNA wird nun durch das RNeasy Mini Kit aufgereinigt und per NanoDrop ND-1000 Photometer quantifiziert. Schließlich werden die Proben durch Inkubation in Agilent

SureHyb-Kammern für 17 Stunden bei 65°C und unter permanentem Rotieren auf die DNA-Microarrays hybridisiert. Nachdem die Arrays gewaschen worden sind, werden sie durch das Agilent G2565CA Microarray Scanner System gelesen und die so ermittelten Intensitätswerte in Form von TIFF-Files mittels Agilent Feature Extraction Software bearbeitet.
Der vollständige Datensatz ist unter http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/ im National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus unter der Kennung GSE23639 öffentlich einsehbar. Alle dort hinterlegten Daten entsprechen den Richtlinien der Minimum information about a microarray experiment (MIAME).
Abschließend wurden die in statistisch signifikanter Weise differentiell regulierten Transkripte mit Hilfe des Genomatix ChipInspector-Programms identifiziert, den Significance Analysis of Microarray (SAM)-Algorithmus nutzend. Die Daten wurden als fold-change (FC) der Transkript-Level, bezogen auf die jeweilige Kontrolle angegeben: Änderung der Transkriptionsrate in mit Curcumin stimulierten gegenüber unstimulierten BV-2 Mikroglia als Kontrolle und mit LPS + Curcumin stimulierten versus mit LPS stimulierten Zellen. Als signifikant wurde eine minimale Änderung des FC um den Faktor 2,0 definiert.
Die False Discovery Rate (FDR), die den Anteil der Gene angibt die fälschlicherweise als signifikant erkannt wurden, lag bei 0,1%.

4.8 TaqMan® quantitative Real-Time RT-PCR

Da die Mikroarray-Analyse eine lediglich semiquantitative Erfassung der Genexpression erlaubt und zudem zahlreiche potentielle Fehlerquellen enthält, wird zur exakteren Quantifizierung und Validierung der erhaltenen Ergebnisse eine quantitative real-time RT-PCR durchgeführt.
Die quantitative real-time RT-PCR ermöglicht neben der Vervielfältigung von Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion beruht, auch deren Quantifizierung.
Die Polymerase-Kettenreaktion als eine Methode für die Vervielfältigung von spezifischen DNA bzw. cDNA-Sequenzen, beruht auf der zyklischen Wiederholung dreier Reaktionsschritte, die bei unterschiedlichen Temperaturen ablaufen. Zuerst wird die DNA durch Erhitzen auf bis zu 95°C denaturiert, wobei es zur Auftrennung in die Einzelstränge kommt. In der darauffolgenden Annealing-Phase lagern sich die Primer bei ca. 50-60°C (die optimale Temperatur ist abhängig von dem jeweils verwendeten Primer) an die DNA-Einzelstränge an. Während der Elongationsphase wird der Komplementär-Strang durch die Taq-Polymerase synthetisiert. Dieser Zyklus von Denaturierung, Hybridisierung mit dem Primer und Elongation wird mehrfach wiederholt. Die Reaktionsparameter waren hier wie folgt:

2min 50°C hold
30min 60°C hold
5min 95°C hold
20sec 94°C Denaturierung
1min 60°C Annealing/Elongation } 45 Zyklen

Ein Reaktionsansatz für die Amplifikation von 50ng cDNA belief sich auf ein Gesamtvolumen von 10µl und setzte sich folgendermaßen zusammen:
5µl Gene Expression Master Mix
1µl forward Primer 200nM
1µl reverse Primer 200nM
0,125µl Sonde
0,375µl RNase-freies Wasser
2,5µl cDNA
Jeder Ansatz wurde in Triplikaten auf die Platte pipettiert und gemessen. Die für die real-time qRT-PCR Validierung verwendeten Primer und Sonden sind aufgelistet unter 3.10. Oligonukleotide.

Die Quantifizierung wird erreicht durch die Messung der von markierten Sonden ausgehenden Fluoreszenz, die proportional zur Anzahl der PCR-Produkte zunimmt. Ab dem Erreichen einer Schwelle (Threshold) ist die Fluoreszenz detektierbar, indem sie sich vom Hintergrundsignal abhebt. Ein Maß für die Expressionsintensität des jeweiligen Gens ist nun der sog. Ct (Cycle threshold)-Wert, der die Anzahl an Zyklen wiedergibt, die bis zum Erreichen der Schwelle, d.h. bis zur Detektion eines Signals durchlaufen werden müssen. Je höher also der Ct-Wert ist, desto kleiner ist die Ausgangmenge an DNA und somit desto geringer die Expression.
Die TaqMan-Technologie ist eine quantitative real-time RT-PCR Methode, die sich durch die Verwendung von auf dem Prinzip des Fluorescence resonance energy transfer (FRET) basierenden, sogenannten Hydrolyse-Sonden auszeichnet. Das FRET-Prinzip nutzende Sonden sind mit zwei Fluorochromen ausgestattet, einem Donor-und einem Akzeptor-Fluorochrom. Befinden sich beide in ausreichender Nähe zueinander, gibt der von einer Lichtquelle angeregte Donor einen Teil seiner Energie an den Akzeptor ab. Vergrößert sich die Distanz zwischen ihnen, so nimmt FRET ab und somit das Fluoreszenzsignal des Donors zu. Im Falle des TaqMan sind Donor bzw. hier: Reporter und Akzeptor bzw. hier: dark Quencher, auf derselben Sonde lokalisiert (sog. Double-dye Oligos). Während der Synthese des Gegenstranges, baut die Taq-Polymerase die Sonde an ihrem 5`-Ende ab, wo sich der Quencher befindet. Die so entstandene Trennung der Fluorochrome befähigt den Reporter das von ihm ausgehende Fluoreszenzsignal abzustrahlen und detektierbar zu machen (siehe Abb. 5).

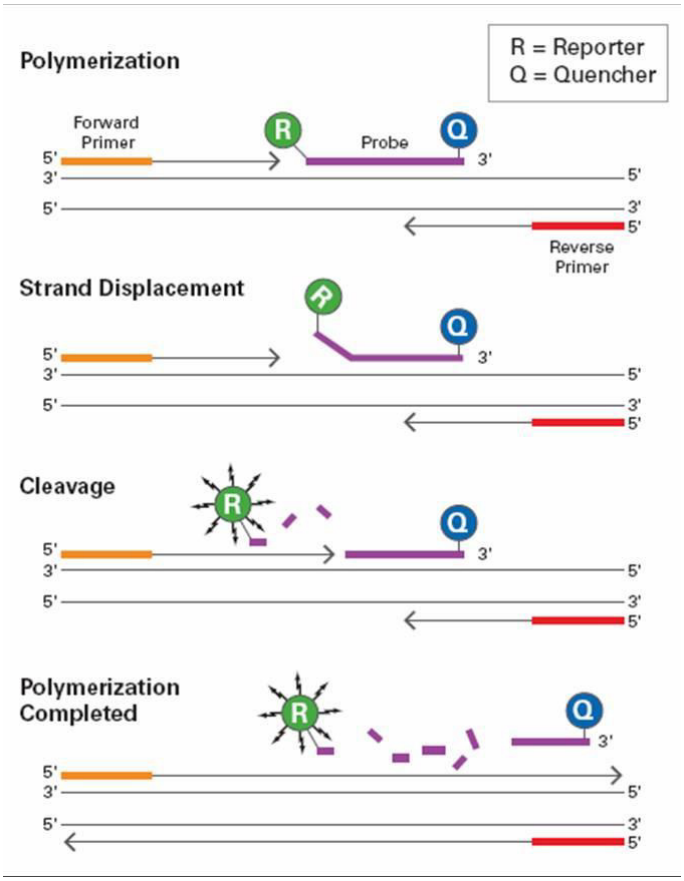

Abbildung 5: Funktionsprinzip des Fluorescence resonance energy transfer (FRET)

(Quelle: www.mta-dialog.de)

Die Auswertung der Messergebnisse wurde mit der ΔΔCt-Methode durchgeführt. Hierbei ist das Ziel eine relative Quantifizierung: Der normalisierte Signalwert der jeweiligen Probe wird relativ zu dem normalisierten Signalwert der dazugehörigen Kalibratorprobe angegeben. Folgende Rechenschritte werden durchlaufen:
Ct-Mittelwert der in Triplikaten gemessenen Proben:
Ct1
Ct2 } Avg Ct
Ct3
Normalisierung auf die endogene Kontrolle (bzw. Housekeeper-Gen, hier: ATPase):
Avg Ct Probe – Avg Ct endogene Kontrolle = ΔCt
Normalisierung auf eine Kalibratorprobe (hier: die jeweils unstimulierte Probe):
ΔCt Probe – ΔCt Kalibratorprobe = ΔΔCt
Änderung der Expression bezogen auf die Kalibratorprobe, die den Wert 1 erhält:
$2^{-\Delta\Delta Ct}$ = Relative Quantifizierung
Ein Ct von < 35 wurde als Schwelle für die Signifikanz gemessener Genexpression festgelegt, d.h. war das Durchlaufen von mehr als 35 PCR-Zyklen notwendig bis ein Fluoreszenzsignal detektiert wurde, war die Ausgangsmenge an DNA zu gering um auf eine signifikant erhöhte Expressionsaktivität hinzuweisen.

4.9 Statistische Datenauswertung

Für die weiterführende statistische Auswertung der Daten und deren graphische Darstellung wurde MS Excel (Microsoft Corporation, USA) verwendet.
Die ΔΔCt-Daten wurden auf die endogene Kontrolle, hier Atp5b, sowie die Kalibratorprobe, hier die jeweils unstimulierte Probe normalisiert und sind im Diagramm als mittlere ± Standardabweichung dargestellt. Dabei wurde auf statistische Signifikanz mit dem Student'schen t-Test geprüft. Ein P-Wert $\leq 0{,}05$ galt als statistisch signifikant.

5 Durchführung und Ergebnisse

5.1 Genomweiter Effekt des Curcumin auf BV-2 Mikroglia

5.1.1 Bestimmung der Genexpression durch Microarray-Analyse

Der Einfluss des Curcumin auf das Genexpressionsprofil von BV-2 Mikroglia wurde durch einen DNA-Microarray bestimmt.
Die RNA-Proben der BV-2 Mikroglia, die einer Breitspektrum-Genexpressionsanalyse mittels DNA-Array unterzogen wurden, stammten aus drei separaten Versuchsdurchläufen, jeweils mit unstimulierten Zellen, sowie Zellen die für 6 Stunden mit 20µM Curcumin, 100ng/ml LPS oder 20µM Curcumin + 100ng/ml LPS stimuliert wurden.

5.1.2 Biostatistische Auswertung der Microarray-Daten (via SAM)

Um aus dem gewonnenen Microarray-Datensatz die Gene zu identifizieren, welche eine signifikante Änderung der Transkriptionsrate nach Einwirkung von Curcumin zeigten, wurde der Significance Analysis of Microarray (SAM) Algorithmus des Genomatix ChipInspector Programms angewendet. Unterschiede nach Curcumin-Stimulation wurden als fold-change bezogen auf die Kontrolle angegeben. Als Kontrolle diente der jeweilige Ansatz ohne Curcumin-Stimulation.

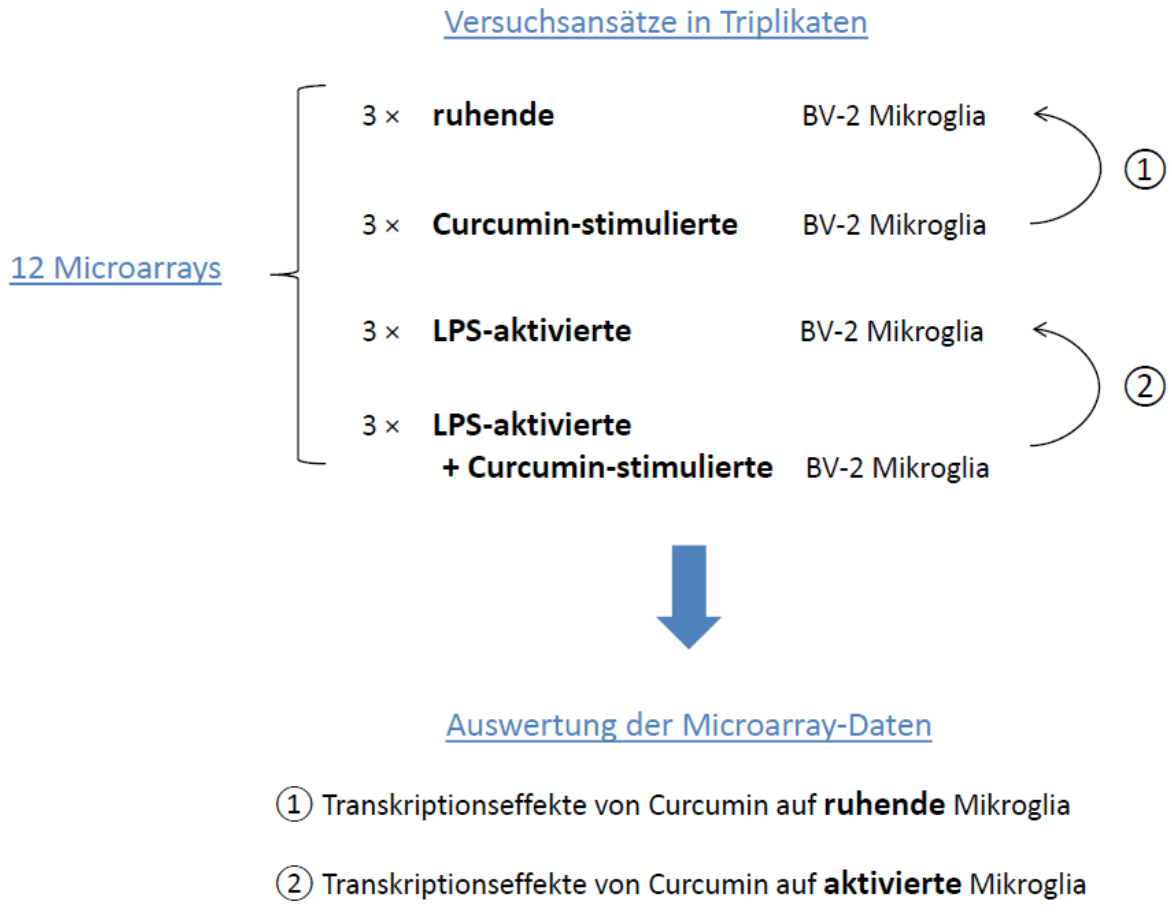

Abbildung 6: Microarray-Analyse und Auswertung der gewonnenen Daten via SAM

Die False Discovery Rate (FDR), die den Anteil der Gene angibt die fälschlicherweise als signifikant erkannt wurden, lag bei 0,1%. Ein minimaler fold-change (FC) des Transkript-Levels von 2,0 wurde als Grenze zur Signifikanz festgelegt.

5.1.3 Genomweite Änderung der Genexpression nach Stimulation mit Curcumin

Die DNA-Microarray Ergebnisse weisen auf eine weithin differentielle Regulation der Transkription nach Curcumin-Einwirkung bei beiden, ruhenden und LPS-aktivierten BV-2 Mikroglia hin. In Curcumin-stimulierten ruhenden Zellen waren im Vergleich zu unstimulierten Zellen 35 Transkripte signifikant (hoch- oder herunter-) reguliert. Bei LPS-aktivierten Zellen wurde durch Curcumin-Stimulation eine signifikante Veränderung in der Regulation von 30 Transkripten festgestellt. Zusammenfassend kann man aus der ähnlichen Anzahl differentiell regulierter Transkripte (30 und 35) und den weitgehend übereinstimmenden transkribierten Genen herleiten, dass Curcumin Effekte zeitigt auf beide, ruhende und aktivierte Mikroglia (siehe Tabelle 1).

Differentielle Genexpression in BV-2 Mikroglia nach 6h Stimulation mit 20µM Curcumin versus Kontrolle (unstimuliert)

Nr.	ID	Symbol	Name	FC
Hochreguliert				
1	80883	Ntng1	Netrin G1	313,0
2	18613	Pecam1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1	42,8
3	13388	Dll1	Delta-like 1	35,5
4	12824	Col2a1	Collagen, type II, alpha 1	21,6
5	14103	Fasl	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	12,8
6	12653	Chgb	Chromogranin B	11,9
7	66184	Rps4y2	Ribosomal protein S4, Y-linked 2	9,7
8	69816	Perp1	RIKEN cDNA 2010001M09 gene	9,7
9	16992	Lta	Lymphotoxin A	9,4
10	19206	Ptch1	Patched homolog 1	5,9
11	19013	Ppara	Peroxisome proliferator activated receptor alpha	4,6
12	109685	Hyal3	Hyaluronoglucosaminidase 3	4,5
13	20997	T	Brachyuri	4,2
14	17246	Mdm2	Transformed mouse 3T3 cell double minute 2	3,1
15	14102	Fas	Fas	2,8
16	14183	Fgfr2	Fibroblast growth factor receptor 2	2,7
17	13645	Egf	Epidermal growth factor	2,2
18	14179	Fgf8	Fibroblast growth factor 8	2,1
19	20655	Sod1	Superoxide dismutase 1	2,1
20	14526	Gcg	Glucagon	2,0

Differentielle Genexpression in BV-2 Mikroglia nach 6h Stimulation mit 100ng/ml LPS + 20µM Curcumin versus 100ng/ml LPS

Nr.	ID	Symbol	Name	FC
Hochreguliert				
1	80883	Ntng1	Netrin G1	86,2
2	18613	Pecam1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1	11,7
3	12824	Col2a1	Collagen, type II, alpha 1	9,0
4	12653	Chgb	Chromogranin B	8,1
5	14103	Fasl	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	6,9
6	19206	Ptch1	Patched homolog 1	6,5
7	69816	Perp1	RIKEN cDNA 2010001M09 gene	5,4
8	14526	Gcg	Glucagon	5,0
9	109685	Hyal3	Hyaluronoglucosaminidase 3	4,1
10	16189	Il4	Interleukin 4	3,8
11	20655	Sod1	Superoxide dismutase 1	3,5
12	19013	Ppara	Peroxisome proliferator activated receptor alpha	3,1
13	20997	T	Brachyuri	2,6
14	640627	Gm9789	ENSMUSG 00000044227	2,6
15	16147	Ihh	Indian hedgehog homolog	2,6
16	17246	Mdm2	Transformed mouse 3T3 cell double minute 2	2,5
17	99439	Duox1	Dual oxidase 1	2,3
18	257956	Olfr1307	Olfactory receptor 1307	2,3
19	14179	Fgf8	Fibroblast growth factor 8	2,1

Herunterreguliert					Herunterreguliert				
1	24088	Tlr2	Toll-like receptor 2	-6,9	1	16193	Il6	Interleukin 6	-93,1
2	18505	Pax3	Paired box gene 3	-6,6	2	18126	Nos2	Nitric oxide synthase 2	-55,7
3	14281	Fos	FBJ osteosarcoma oncogene	-4,4	3	19225	Ptgs2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	-17,6
4	11622	Ahr	Aryl-hydrocarbon receptor	-4,1	4	20296	Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	-14,7
5	16835	Ldlr	Low densitiy lipoprotein receptor	-3,8	5	12266	C3	Complement C3	-9,1
6	13654	Egr2	Early growth response 2	-3,5	6	20846	Stat1	Signal transducer and activator of transcription 1	-7,4
7	68010	Bambi	BMP and activin membrane-bound inhibitor	-3,3	7	12048	Bcl2l1	BCL2-like1	-5,4
8	12048	Bcl2l1	BCL 2-like 1	-3,3	8	14281	Fos	FBJ osteosarcoma oncogene	-4,6
9	19225	Ptgs2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	-3,0	9	16835	Ldlr	Low densitiy lipoprotein receptor	-4,1
10	20296	Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	-2,8	10	16992	Lta	Lymphotoxin A	-3,5
11	12393	Runx2	Runt related Transcription factor 2	-2,8	11	17395	Mmp9	Matrix metallopeptidase 9	-2,2
12	17311	Kitl	Kit ligand	-2,4					
13	16869	Lhx1	LIM homebox protein 1	-2,4					
14	12977	Csf1	Colony stimulating factor 1	-2,4					
15	20528	Slc2a4	Solute carrier family 2, member 4	-2,2					

Tabelle 1: Auswahl der signifikant regulierten Gene des Microarray-Datensatzes. Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt. Für die Signifikanz-Analyse wurde eine FDR von 0,1% festgelegt. Grenze zur Signifikanz ist ein minimaler FC von 2,0. ID: Entrez Gene ID; FC: Fold change.

5.2 Differentielle Expression ausgewählter Zielgene des Curcumin

5.2.1 Validierung signifikant regulierter Gene durch real-time qRT-PCR

Die nach Curcumin-Stimulation signifikant veränderten Expressionsraten des Microarray-Datensatzes sollten verifiziert werden. Hierzu wurde eine Auswahl von Genen durch TaqMan®-PCR weiter untersucht. Diese Auswahl beinhaltet Gene, deren Beeinflussbarkeit durch Curcumin und deren Funktion innerhalb von inflammatorischen Prozessen bekannt ist (TLR2, PTGS2, iNOS, EGR2, STAT1, IL-4 und PPARα). Darüber hinaus sind Gene ausgewählt worden, die im Rahmen der Microarray-Expressionsanalyse als bisher unentdeckte Zielgene des Curcumin erkannt wurden (NTNG1, DLL1, PECAM1).
Die Validierung durch qRT-PCR ergab eine Einteilung der untersuchten Gene in eine Gruppe die nach Einwirkung von Curcumin auf ruhende und/oder LPS-aktivierte BV-2 Zellen vermehrt und eine Gruppe die vermindert transkribiert wurde.

5.2.2 Hochregulierung der Genexpression nach Stimulation mit Curcumin

Nach Curcumin-Einwirkung konnte eine Vermehrung der Transkripte von NetrinG1 (NTNG1), Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM1), Delta-like 1 (DLL1), Peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARα) und Interleukin 4 (IL-4) nachgewiesen werden, bei Genen also, die involviert sind in Zellmigration bzw. -adhäsion

und Entzündungshemmung. Ntng1 zeigte hierbei die deutlichste Steigerung der Expression (1800fach). Dieser Effekt auf die genannten Gene ist sowohl bei ruhenden, als auch bei LPS-aktivierten Zellen zu sehen. Eine Erhöhung der Transkriptionsaktivität durch Curcumin in signifikanter Ausprägung zeigen NTNG1, PECAM1 und DLL1 in ruhenden Zellen (siehe Abb. 7).

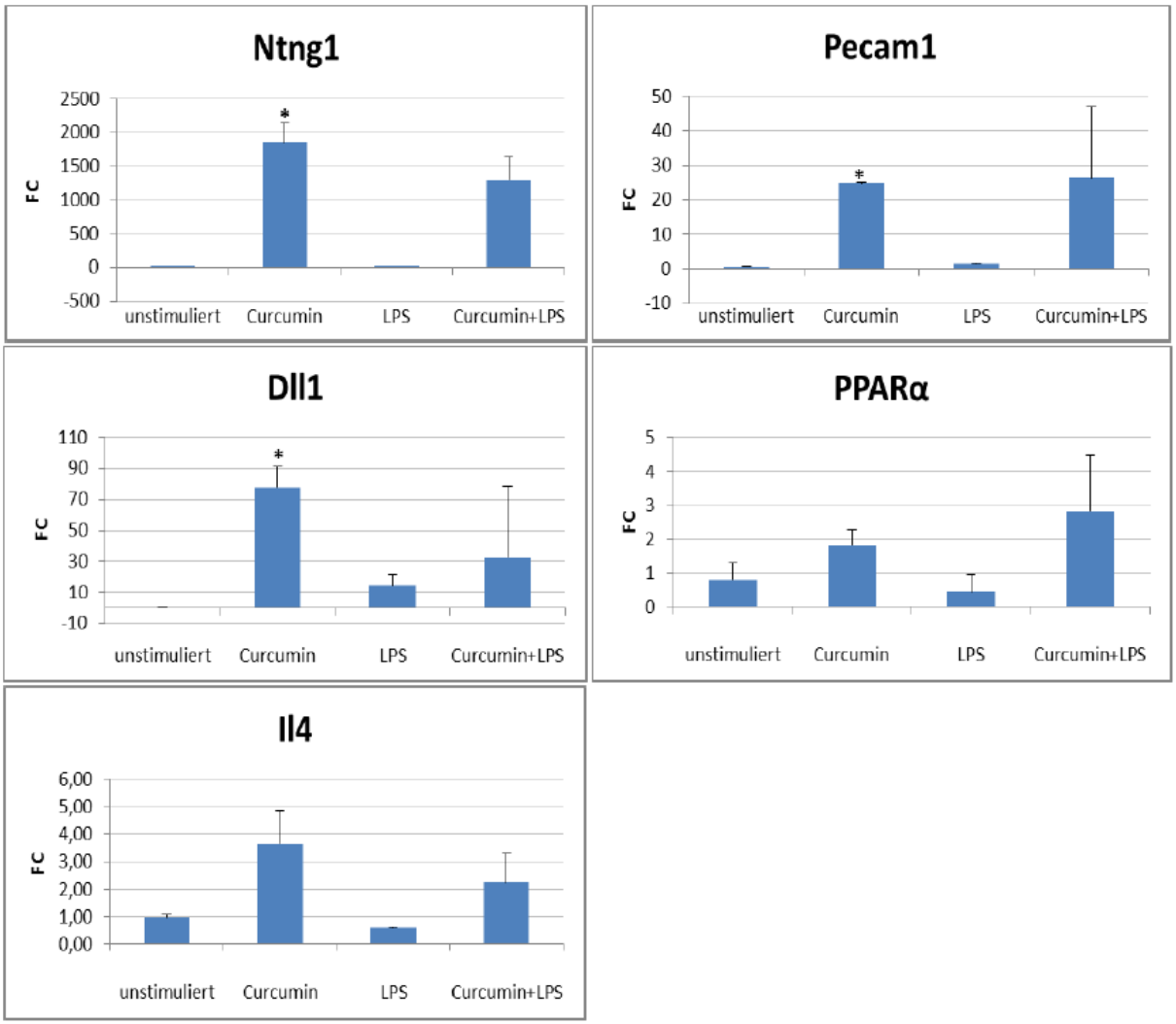

Abbildung 7: Relative real-time qRT-PCR Expressionsanalysen der Gene NTNG1, PECAM1, DLL1, PPARα und IL-4 in BV-2 Mikroglia nach Stimulation mit 20µM Curcumin, 100ng/ml LPS und 100ng/ml LPS + 20µM Curcumin für 6h. Die Werte entstammen drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchsdurchgängen und anschließender dreifacher Messung. Die Genexpression wurde auf das Housekeeping-Gen Atp5b normalisiert und im Diagramm als mittlere Standardabweichung (SD) relativ zur Kontrolle (unstimulierte Probe) dargestellt. * $p \leq 0{,}001$ für Curcumin vs. Kontrolle, Student'scher t-Test. FC: Fold change.

5.2.3 Reduzierung der Genexpression nach Stimulation mit Curcumin

Eine gegenteilige Wirkung übt Curcumin auf die Expression von Genen aus, die für ihre Funktion in proinflammatorischer Aktivierung bekannt sind: Die Transkription von Toll-like-receptor 2 (TLR2), Early growth response 2 (EGR2), Prostaglandin endoperoxide synthase 2 (PTGS2, alias COX-2), Chemokine (C-C-motif) ligand 2 (CCL2, alias MCP1), Interleukin 6 (IL-6), Nitric oxide synthase 2 (NOS-2, alias iNOS), Signal transducer and activator of transcription1 (STAT1) und Complement factor C3 (C3) wurde durch Curcumin-Stimulation verringert.

Eine signifikante Minderung der Transkription in ruhenden BV-2 Zellen zeigten EGR2, PTGS2, CCL2, IL-6, NOS-2 und STAT1. In LPS-aktivierten Zellen war dieser Effekt zwar auch nachweisbar, jedoch nur für CCL2 und STAT1 in signifikanter Weise.
Im Gegensatz hierzu wurden TLR2 und C3 insbesondere in aktivierten Zellen vermehrt transkribiert, im Falle von C3 nachgewiesen signifikant (siehe Abb. 8).

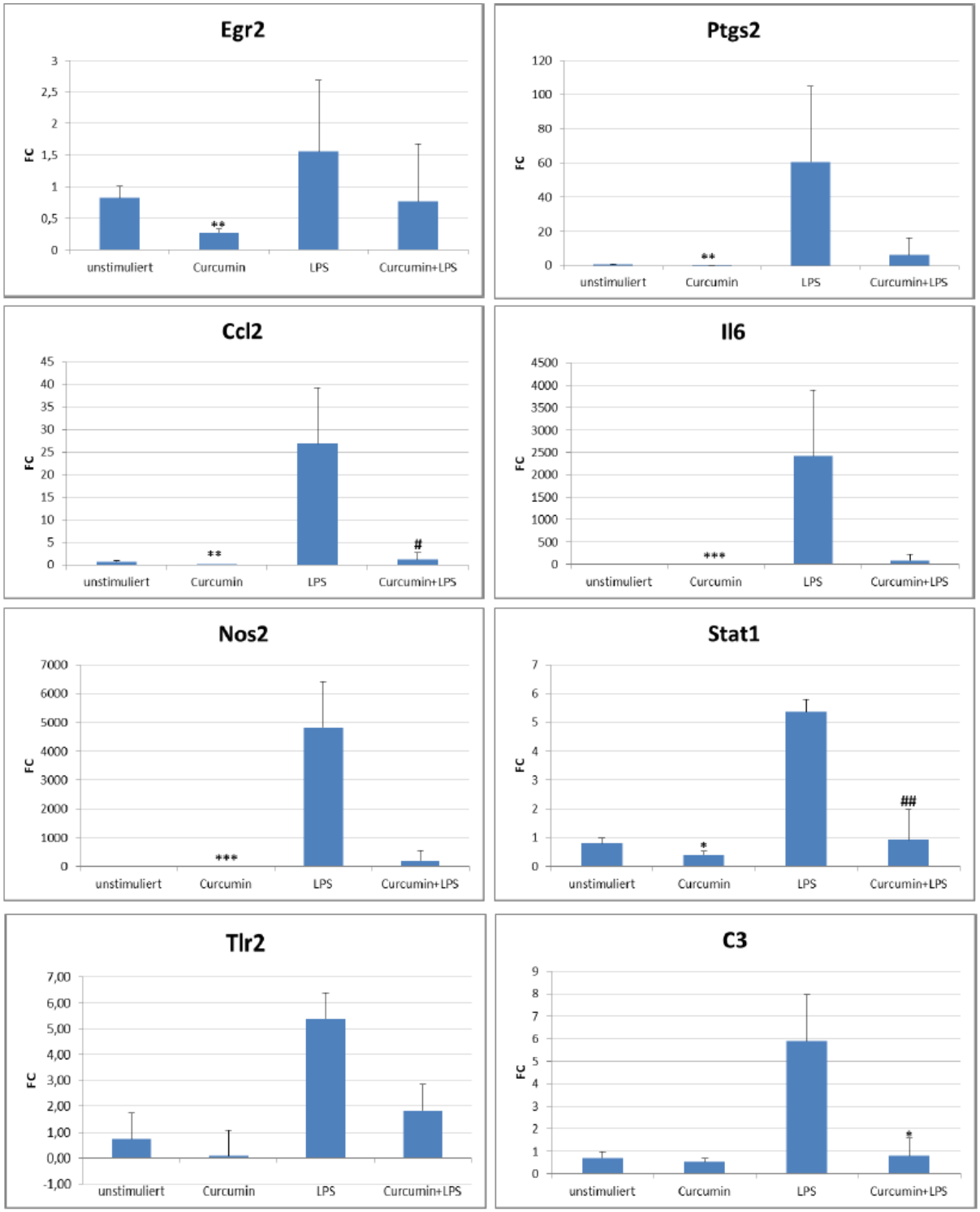

Abbildung 8: Relative real-time qRT-PCR Expressionsanalysen der Gene EGR2, PTGS2, CCL2, IL-6, NOS-2, STAT1, TLR2 und C3 in BV-2 Mikroglia nach Stimulation mit 20µM Curcumin, 100ng/ml LPS und 100ng/ml LPS + 20µM Curcumin für 6h. Die Werte entstammen drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchsdurchgängen und anschließender dreifacher Messung. Die Genexpression wurde auf das Housekeeping-Gen Atp5b normalisiert und im Diagramm als mittlere Standardabweichung (SD) relativ zur Kontrolle (unstimulierte Probe) dargestellt. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ für Curcumin vs. Kontrolle und # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ für Curcumin + LPS vs. LPS, Student‘scher t-Test. FC: Fold change.

5.3 Einfluss von Curcumin auf Zellmorphologie aktivierter RAW-Makrophagen

In der Morphologie von RAW-Makrophagen prägt sich die LPS-Aktivierung sowie die dämpfende Wirkung des Curcumin besonders stark aus. Nachdem Kulturen dieser Zelllinie mit Curcumin, LPS oder beiden Substanzen für 24h stimuliert worden waren, wurden per Phasenkontrast-Mikroskopie Fotografien angefertigt.
Im Vergleich zu der als Kontrolle unstimuliert gebliebenen Kultur, kann an den mit Curcumin stimulierten Zellen eine geringe Zunahme der Zellfortsätze und ihrer Verzweigungen gesehen werden. Diese hier angedeuteten morphologischen Veränderungen, sind in der mit LPS stimulierten Kultur in starker Ausprägung vorhanden. Darüber hinaus zeigen die Zellen eine auffallende Vakuolen-Bildung ihrer Somata. Folgte auf die Aktivierung durch LPS eine Stimulation mit Curcumin, ist eine deutliche Abmilderung der im aktivierten Zustand feststellbaren Morphologie zu sehen.

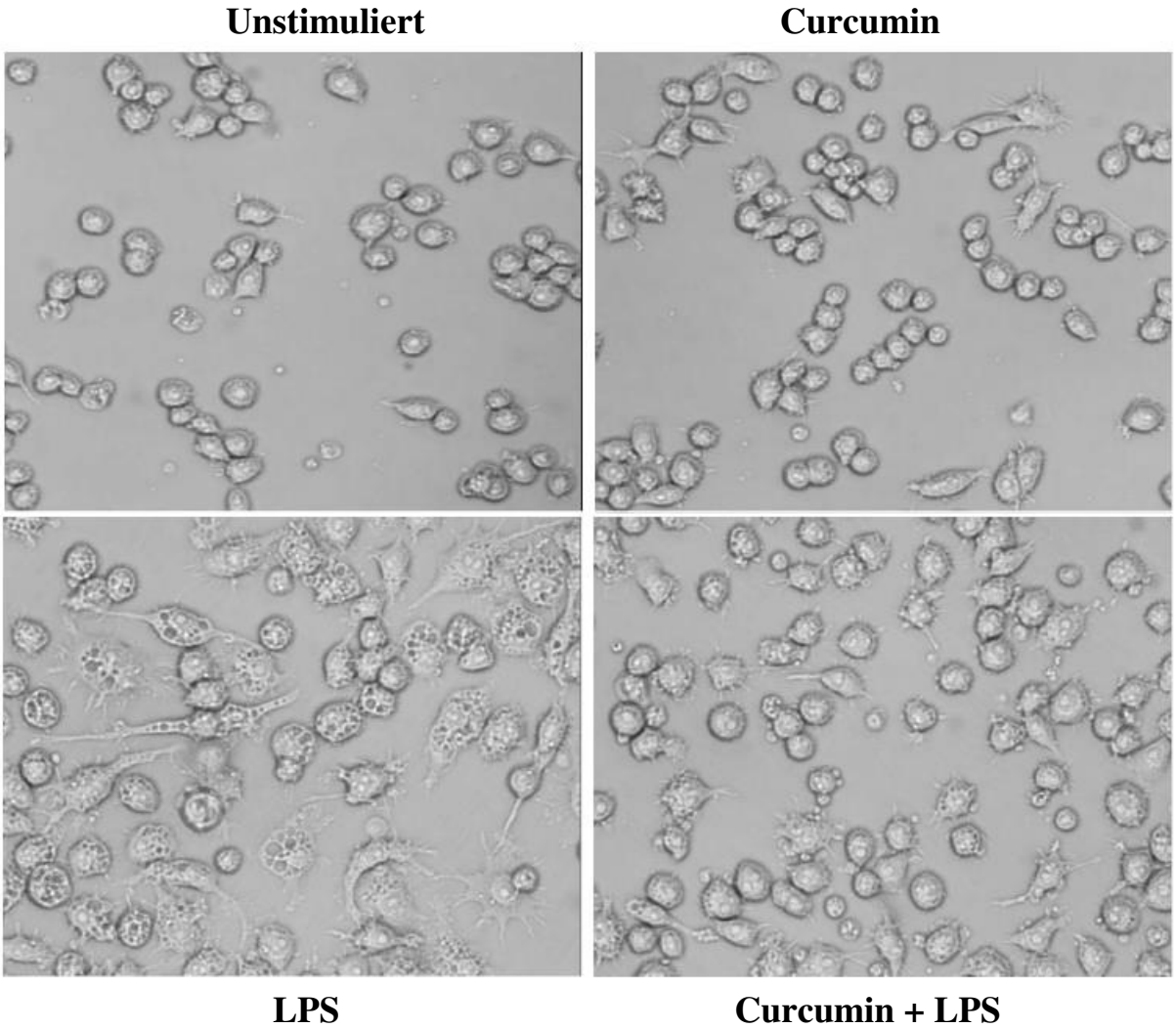

Abbildung 9: Phasenkontrastmikroskop-Bilder von RAW-Makrophagen nach Stimulation mit 20µM Curcumin, 100 ng/ml LPS, 20µM Curcumin + 100 ng/ml LPS für jeweils 24h. Eine Kultur blieb als Kontrolle unstimuliert.

5.4 Wirkung des Curcumin auf funktionelle Eigenschaften aktivierter RAW-Makrophagen

In aktiviertem Zustand ändern sich die funktionellen Eigenschaften von Mikroglia: Sie sezernieren pro-apoptotische Faktoren und direkt zytotoxisch wirkende Stoffe (wie NO), die mitverantwortlich sind für ihre neurotoxische Wirkung im Rahmen einer chronischen inflammatorischen Reaktion.

5.4.1 Einfluss von Curcumin auf Stickstoffmonoxid-Freisetzung aktivierter RAW-Makrophagen

Die Freisetzung des zytotoxisch wirkenden NO durch RAW-Makrophagen und der Einfluss von Curcumin hierauf, wurde anhand von vier Stimulationsansätzen untersucht: Für die Dauer von 24h wurden RAW-Zellkulturen unstimuliert gelassen, sowie mit 20µM Curcumin, 100 ng/ml LPS und 20µM Curcumin + 100 ng/ml LPS stimuliert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Überstände des Zellkulturmediums entnommen und durch den Einsatz von Griess-Reagenz auf ihren Nitrit-Gehalt untersucht.
Die in den Zellkultur-Überständen der RAW-Makrophagen gemessene Nitrit-Konzentration, lag in den Versuchsansätzen von Zellen ohne Stimulation und mit alleiniger Curcumin-Stimulation unterhalb der Nachweisgrenze von 2,5µM. Nach Aktivierung der RAW-Zellen durch LPS stieg der Nitrit-Gehalt erwartungsgemäß auf einen Wert von über 30µM. Sobald LPS-aktivierte Zellen jedoch mit Curcumin stimuliert wurden, sank die Nitrit-Konzentration wieder unter die Nachweisgrenze. In der Kontrollprobe die reines Zellkultur-Medium enthielt war ebenfalls kein Nitrit nachweisbar (siehe Abb. 10).

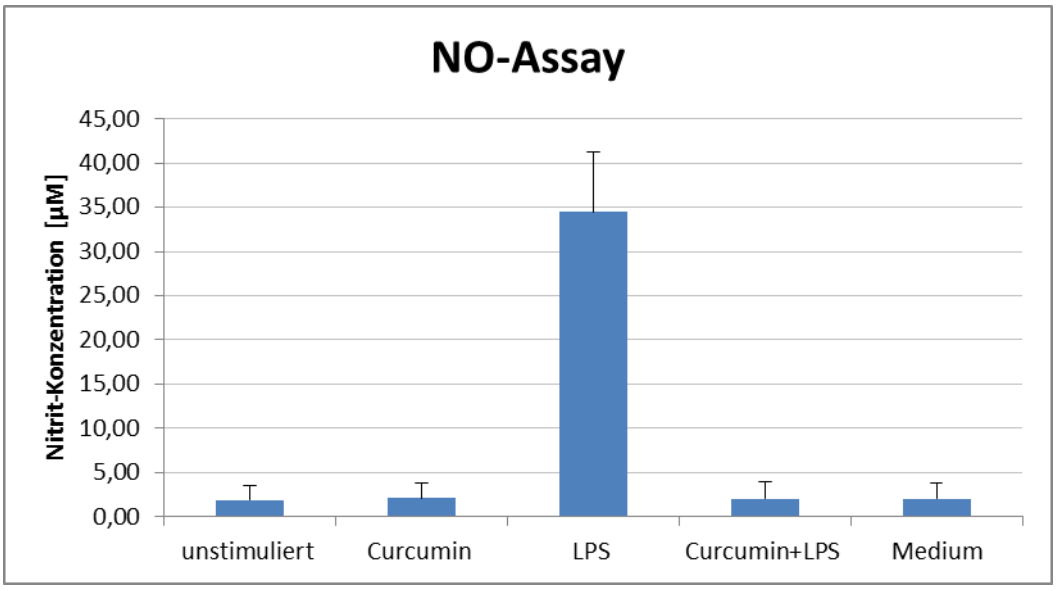

Abbildung 10: Stickstoffmonoxid (NO)-Freisetzung durch RAW-Makrophagen, nach Stimulation mit 20µM Curcumin, 100 ng/ml LPS und 20µM Curcumin + 100 ng/ml LPS für 24h. Die Werte entstammen drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchsdurchgängen und anschließender dreifacher Messung. Die Nitrit-Konzentrationen wurden im Diagramm als mittlere Standardabweichung (SD) relativ zur Kontrolle (unstimulierte Probe) dargestellt.

5.4.2 Inkubation von 661W Photorezeptorzellen mit MKM

Um zu überprüfen, ob die Veränderungen des glialen Transkriptoms nach Curcumin-Stimulation eine Verminderung der Neurotoxizität aktivierter Makrophagen/Mikroglia gegenüber körpereigenen Zellen nach sich zieht, wurden 661W Photorezeptor-Zellen für 24h mit Zellkultur-Medium von ruhenden und aktivierten RAW-Zellen mit und ohne Curcumin-Stimulation inkubiert. Das Medium, in dem LPS-aktivierte Makrophagen kultiviert wurden, sollte neurotoxische Substanzen (wie NO) enthalten und damit inkubierte 661W Photorezeptorzellen schädigen. Ziel war, eine verminderte Schädigung/Apoptose der 661W-Zellen nachzuweisen, wenn das zugefügte Medium von LPS-aktivierten RAW-Makrophagen stammte, die zuvor mit Curcumin stimuliert worden waren. Die Wirkung des MKM auf die 661W Photorezeptorzellen wurde anhand ihrer Morphologie und Laktat-Dehydrogenase-Aktivität bestimmt.
Die Auswahl der 661W-Zelllinie geschah aufgrund ihrer Erprobtheit als Modell für die Untersuchung glialer Neurotoxizität im Rahmen degenerativer Erkrankungen der Retina (Dirscherl & al., 2010) (Ebert & al., 2008) (al-Ubaidi, Font, & al., 1992).

5.4.3 Effekt des MKM auf die Morphologie von 661W Zellen

An die Inkubation der 661W Photorezeptor-Zellen für 24h mit Zellkultur-Medium von ruhenden und aktivierten RAW-Zellen mit und ohne Curcumin-Stimulation, schloss sich die Untersuchung ihrer Morphologie durch Phasenkontrast-Mikroskopie an.
Unter Zellkultur-Standardbedingungen zeigten 661W Zellen einen spindelförmigen Wuchs mit nur vereinzelten abgerundeten, apoptotischen Zellen. Konditioniertes Medium das von ruhenden RAW-Zellen ohne und mit Curcumin-Stimulation stammte, veränderte diese Zellmorphologie nicht. Nach Zugabe von konditioniertem Medium von aktivierten RAW-Zellen, zeigten die 661W Zellen vermehrt Apoptose, sich äußernd in abgerundeten, sich ablösenden Zellen, in der Kultur zu größeren zellfreien Arealen führend. Stammte das konditionierte Medium von aktivierten RAW-Zellen, die mit Curcumin stimuliert worden waren, blieb die Morphologie der 661W Zellen nahezu normal (siehe Abb. 11).

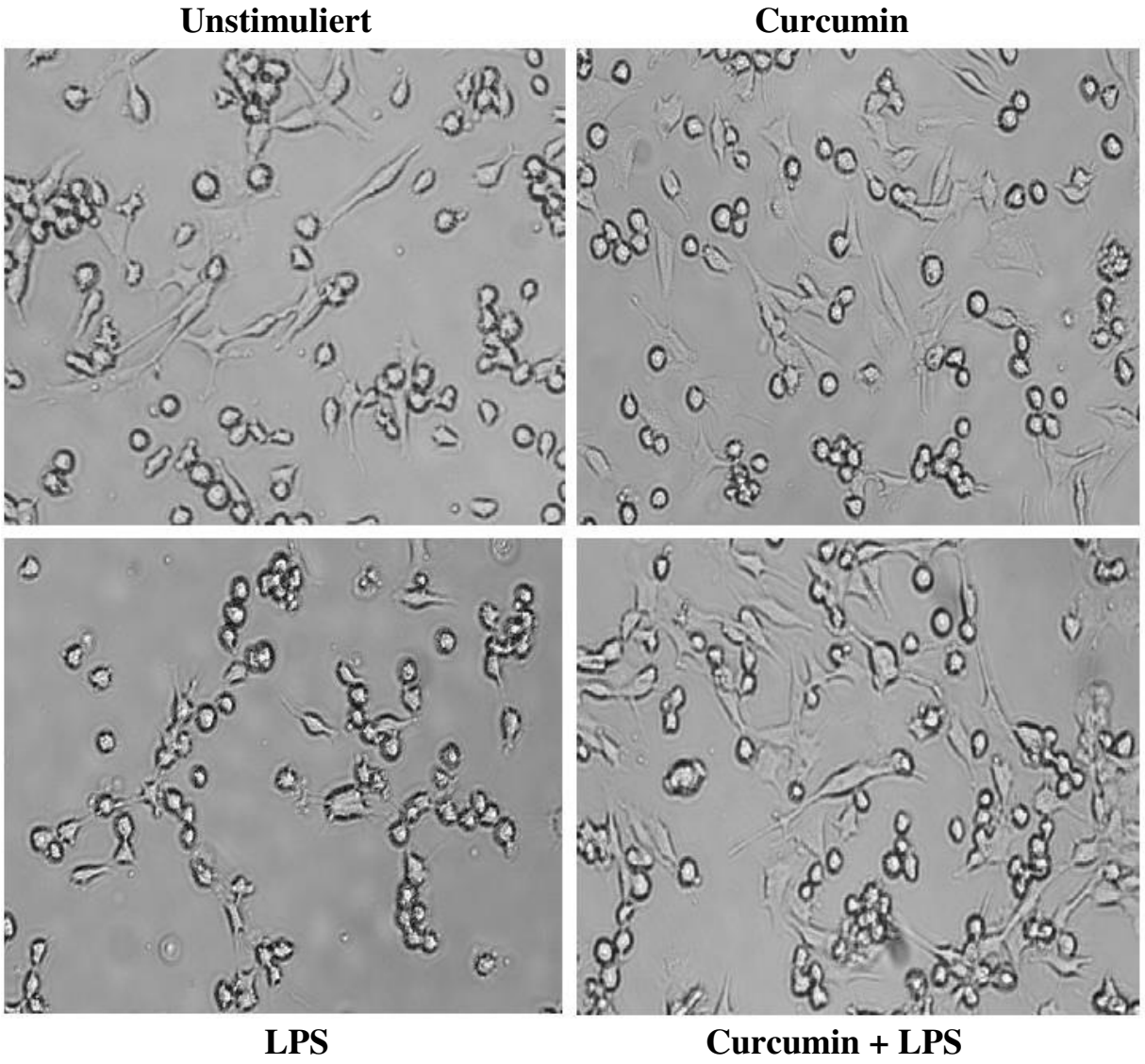

Abbildung 11: Phasenkontrastmikroskop-Bilder von 661W Photorezeptorzellen, nachdem diese für jeweils 24h mit MKM von RAW-Makrophagen inkubiert wurden. Die RAW-Makrophagen waren zuvor für die Dauer von 24h unstimuliert geblieben oder wurden mit 20µM Curcumin, 100 ng/ml LPS, 20µM Curcumin + 100 ng/ml LPS stimuliert.

5.4.4 Effekt des MKM auf die Laktat-Dehydrogenase-Freisetzung durch 661W Photorezeptorzellen

Das Ausmaß der Zytotoxizität aktivierter Immunzellen lässt sich, neben der direkten Messung von ihnen sezernierter zytotoxischer Faktoren (wie NO), auch anhand der Quantifizierung ihrer schädigenden Wirkung feststellen. Die unspezifische Folge von Zellschädigung ist eine Freisetzung von Laktat-Dehydrogenase, die durch die fehlende Integrität der Zellmembran ermöglicht wird. In das Zellkultur-Medium freigesetzt, ist es möglich die Aktivität der LDH zu quantifizieren, die proportional zu dem Ausmaß der Zellschädigung ist.
Exemplarisch wurde hier die Quantifizierung der Zytotoxizität von RAW-Makrophagen gegenüber 661W Photorezeptorzellen durchgeführt. Dies geschah anhand einer LDH-Aktivitätsmessung in dem Zellkultur-Medium dieser der Retina entstammenden Zellen. 661W-Zellen wurden zu diesem Zweck über eine Dauer von 24h mit dem MKM von RAW-

Zellen der vier Stimulationsansätze inkubiert, an denen zuvor die NO-Messung durchgeführt worden war (Unstimuliert und mit 20µM Curcumin, 100 ng/ml LPS, 20µM + 100ng/ml LPS für eine Dauer von 24h stimuliert).
Bei Betrachtung der Messergebnisse kann man feststellen, dass die Reaktion der 661W Photorezeptorzellen auf funktioneller Ebene sowohl zu den Veränderungen in deren Morphologie, als auch zu der NO-Freisetzung in das MKM durch RAW-Makrophagen korreliert: Während die LDH-Aktivität in Überständen von 661W-Zellen, die mit MKM von RAW-Zellen ohne Stimulation inkubiert worden waren, jene der Kontrollprobe (661W-Zellen ohne jede MKM-Zugabe) kaum überstieg, stieg sie bei 661W-Zellen, welche mit MKM von LPS-aktivierten RAW-Zellen stimuliert worden waren über den 6fachen Wert der Kontrollprobe. In Überständen von 661W-Zellen, welche mit MKM von LPS-aktivierten RAW-Zellen mit Curcumin-Stimulation inkubiert worden waren, war eine LDH-Aktivität nicht nachweisbar (siehe Abb. 12).

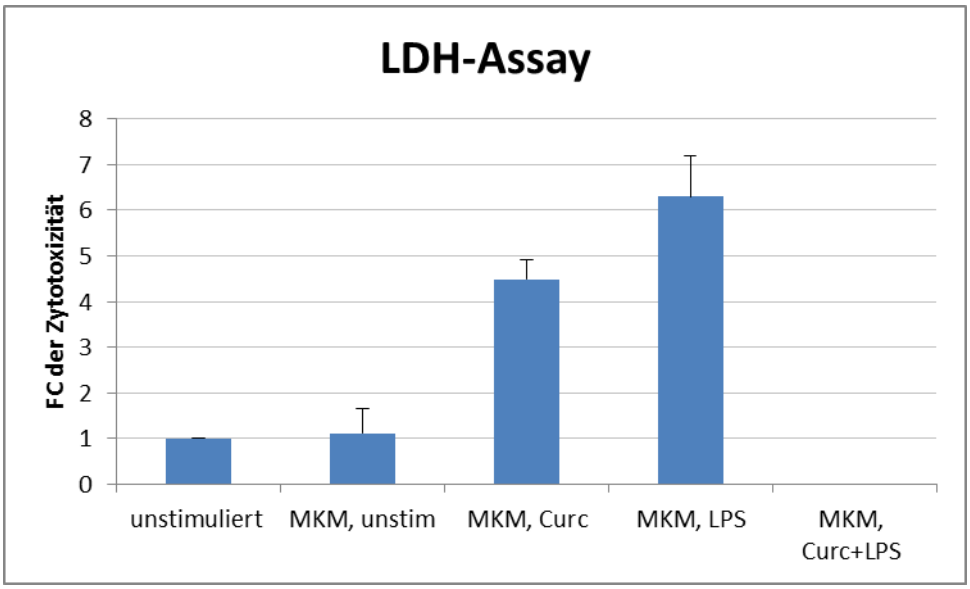

Abbildung 12: Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Aktivität in Zellkultur-Medium von 661W Photorezeptorzellen, welche über 24h mit MKM von für 24h mit 20µM Curcumin, 100 ng/ml LPS, 20µM Curcumin + 100 ng/ml LPS stimulierten RAW-Makrophagen bzw. mit MKM von unstimulierten RAW-Makrophagen inkubiert wurden. Die Werte entstammen drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchsdurchgängen und anschließender dreifacher Messung. Die LDH-Aktivität wurde auf die Kontrollprobe (unstimulierte 661W ohne MKM-Inkubation) normalisiert und im Diagramm als mittlere Standardabweichung (SD) relativ zu dieser dargestellt. FC: Fold change.

6 Diskussion

Sekundäre Pflanzenstoffe, wie die Polyphenole, sind aufgrund der pleiotropen Effekte welche auf sie zurückzuführen sind, wie ihre antiinflammatorische, antioxidative, antimikrobielle und antikanzerogene Wirkung (Maheshwari & al., 2006), von wachsendem Interesse. Zu den besonders gut untersuchten Polyphenolen gehört die Familie der Curcuminoide und insbesondere deren wichtigster Vertreter, Curcumin. Da oxidativer Stress und Inflammation maßgebliche Faktoren in der Pathogenese diverser Krankheiten, wie neurodegenerativen Erkrankungen sind, könnte Curcumin als antioxidativ und antiinflammatorisch wirkende Substanz in deren Behandlung eingesetzt werden.
Trotz wachsenden Wissens über diesen Wirkstoff, liegen bislang wenige wissenschaftliche Daten, die genaue Wirkungsweise des Curcumin auf molekularer Ebene betreffend vor. So ist die Datenlage über die Beeinflussung der Signaltransduktion und Transkription in Mikroglia durch Curcumin eher dürftig.
Die in der vorliegenden Arbeit geleistete globale Analyse des Transkriptoms von BV-2 Mikroglia, ergab Hinweise auf potentiell durch Curcumin beeinflusste Signalwege und neu entdeckte Curcumin-Zielgene. Desweiteren konnte über die funktionelle Analyse MKM-konditionierter 661W Photorezeptorzellen, die neuroprotektive Wirkung von Curcumin nachgewiesen werden.

6.1 Immunmodulierende Wirkung von Curcumin auf das Transkriptom aktivierter BV-2 Mikroglia

Die pleiotropen Effekte des Curcumin sind zurückzuführen auf seine Fähigkeit zahlreiche Moleküle unterschiedlicher Signalwege zu beeinflussen. Dies kann auf direktem oder indirektem Wege geschehen. Signalproteine, mit denen Curcumin direkt interagiert sind beispielsweise Protein-Kinasen oder Entzündungsmediatoren, wohingegen es seine Wirkung auf Transkriptionsfaktoren und Chemokine ausschließlich auf indirekte Weise ausübt (Lin, 2007) (Kunnumakkara & al., 2008) (Gupta & al., 2011). Insbesondere seine Interaktion mit diversen Transkriptionsfaktoren erklärt die enorme Breitenwirkung dieses Wirkstoffs auf die Genexpression.
Die im Rahmen dieser Arbeit geleisteten Genexpressionsanalysen zeigen, dass Curcumin Einfluss auf die Transkriptionsrate sowohl ruhender, als auch LPS-aktivierter BV-2 Mikroglia ausübt. In beiden glialen Phänotypen konnten zwei gesonderte Gen-Cluster identifiziert werden: Das eine zeigt Hochregulierung, das andere Suppression der Transkription nach Curcumin-Stimulation.

6.1.1 Curcumin induziert die Expression antiinflammatorischer und neuroprotektiver Gen-Cluster in aktivierter BV-2 Mikroglia

Im Rahmen dieser Arbeit konnten fünf Gene identifiziert und validiert werden, die sowohl in ruhenden, als auch in aktivierten BV-2 Mikroglia nach Einwirkung von Curcumin induziert wurden und welche zuvor noch nie als Curcumin-Zielgene beschrieben worden sind. Drei davon -NTNG1, PECAM1, DLL1- stehen in Bezug zu Zellmigration und -adhäsion, die restlichen zwei Gene -PPARA und IL-4- sind direkt involviert in Entzündungshemmung.
Netrin G1 (Ntng1) ist einer Klasse von Proteinen zugehörig, die involviert ist in die Wegfindung aussprossender Axone, der Netrin-Familie. Die Netrine wirken hierbei

chemotrop, d.h. Axone werden in ihrem Wachstum in Richtung höherer Konzentrationen dieser Moleküle hin oder davon weg navigiert, abhängig davon an welche Art Rezeptor (DCC oder UNC-5) der Axon-Membran sie binden (Moore & al., 2007). G-Netrine sind, wie alle Mitglieder der Netrin-Familie sezernierte Proteine, welche jedoch an die Außenseite der Zellmembran von Axonen gebunden bleiben und den Zelladhäsionsmolekülen (Cell adhesion molecules, CAMs) zuzurechnen sind. Ein weiterer Unterschied zu den übrigen Netrin-Typen besteht darin, dass Netrin G1, Mitglied der G-Netrin-Familie (Nakashiba & al, 2000), nicht mit den Rezeptoren DCC oder UNC-5 interagiert, sondern selektiv an den postsynaptisch lokalisierten, transmembranösen Netrin G-Liganden (NGL-1) bindet (Lin & al., 2003), der ebenfalls zu den Zelladhäsionsmolekülen gehört. Die NGL-1–Netrin-G1-Interaktion reguliert mutmaßlich Axonen-Aussprossung und -Migration während der Embryonalentwicklung und Bildung, sowie Funktion von Synapsen (Woo & al., 2009). Über den Einfluss von Netrinen auf Zellmigration und -Adhäsion außerhalb des sich entwickelnden Gehirns, gibt es jedoch bislang wenig gesichertes Wissen. Für das mit Netrin G1 verwandte Netrin 1, konnte aber sowohl in vitro, als auch in vivo eine Inhibierung von Leukozyten-Chemotaxis nachgewiesen werden (Ly & al., 2005). Es bleibt zu bestimmen, ob Netrin G1 in ähnlicher Weise auf Mikroglia wirkt.

Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (Pecam1, CD31) ist ein transmembranöses Glykoprotein, welches der Immunglobulin-Superfamilie zugeordnet wird und auf der Oberfläche von Immunzellen (u.a. Monozyten/Makrophagen), sowie im Bereich der endothelialen Zell-Zell-Kontakte exprimiert wird. Es ist involviert in leukozytäre Adhäsion, endotheliale Transmigration und Migration innerhalb der Extrazellulärmatrix. (Jackson, 2003). Pecam1 stellt ein multi-funktionelles Adhäsions- und Signalmolekül dar, das sowohl anti-, als auch proinflammatorische Effekte zeitigt. Antiinflammatorisch wirkt Pecam1, indem es einer Aktivierung der Leukozyten, sowie Produktion entzündungsfördernder Zytokine entgegenwirkt. Die Mechanismen, durch die es seine konträren Funktionen ausübt und deren Wechselwirkungen, sind größtenteils noch ungeklärt (Privratsky & al., 2010). Die gegensätzliche Rolle von Pecam1 in Inflammation, wurde über die vergangenen Jahre anhand des Tiermodells der Pecam1-defizienten Maus untersucht. Eine verstärkte Entzündungsreaktion konnte in Pecam1-defizienten Mäusen mit experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE), einem Mausmodell für Multiple Sklerose, festgestellt werden, die sich in einer früheren Manifestation von Krankheitssymptomen, sowie in einer gesteigerten Leukozyten-Infiltration und Gefäßpermeabilität des Gehirns äußerte (Graesser & al., 2002).

Delta-like 1 (Dll1) ist als Notch-Ligand involviert in den Notch1-Signalweg (Artavanis-Tsakonas & al., 1995), welcher eine Reihe von biologischen Funktionen in verschiedenen Geweben, insbesondere im Rahmen der Embryonalentwicklung reguliert, darunter Apoptose, Determinierung der Zellidentität, Zelldifferenzierung, -proliferation und -migration (Borggrefe & Oswald, 2009). Die Funktion von Notch1 in Mikroglia ist bisher nicht ausreichend geklärt. An BV-2 Mikroglia, sowie primären Mikroglia von Ratten, konnte jüngst demonstriert werden, dass der Notch1-Signalweg eine wichtige Rolle in proinflammatorischer Mikroglia-Aktivierung spielt, indem er die Freisetzung verschiedener Faktoren, wie Zytokine und NO reguliert. So scheint über ihn die TNF-Expression in aktivierten Zellen negativ reguliert zu werden (Cao & al., 2008). Die in dieser Arbeit erhobenen Daten, denen zufolge Curcumin eine erhöhte basale Expression von Dll1und somit vermehrte Aktivierung des Notch1-Signalweges in ruhenden BV-2 Zellen bewirkt, weisen auf eine möglicherweise präventive Wirkung des sekundären Pflanzenstoffes gegenüber, durch proinflammatorische Stimuli getriggerter Migration von Mikroglia hin.

Zusammenfassend belegen die Expressionsmusters der Gene NTNG1, PECAM1 und DLL1 also, dass Curcumin, der im Zuge proinflammatorischer Aktivierung stattfindenden glialen Produktion entzündungsfördernder Zytokine, sowie Migration von Mikroglia entgegenwirkt. Da migrierende Zellen kennzeichnend für proinflammatorische und chronische Aktivierung in

frühen Stadien neurodegenerativer Prozesse sind, könnte Curcumin hier der Prävention dienen. Diese Erkenntnisse auf Transkriptom-Ebene stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen verschiedener Arbeiten, die von einer verminderten Migration endothelialer Zellen, dendritischer Zellen und Tumor-Zellen nach Einwirkung vergleichbarer Dosen von Curcumin berichten (Sameermahmood & al., 2008) (Shirley & al., 2008) (Senft & al., 2010). In der Publikation, in deren Rahmen Daten dieser Arbeit veröffentlicht sind, wurden die direkten Effekte des Curcumin auf die mikrogliale Motilität anhand von Wundheilungsassays und Transwell-Migrationsexperimenten untersucht. Auch die hier erlangten Resultate stützen die obige Annahme: 20µM Curcumin reduzierte die Migration von BV-2 Zellen nach einer Zeitspanne von 12 und 24 Stunden in erheblichem Maß (Karlstetter & al., 2011).
Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha, NR1C1) und Interleukin 4 (IL-4), die ebenfalls unter Curcumin-Stimulation induziert wurden, sind beides bekannte antiinflammatorisch wirkende Moleküle. In zwei neueren Arbeiten konnte durch In-vitro-Versuche gezeigt werden, dass unterschiedliche Agonisten des nukleären Rezeptors und Transkriptionsfaktors PPAR-alpha, der in Entzündungsreaktionen eine zentrale Rolle einnimmt, ihren neuroprotektiven Effekt zumindest teilweise über die Dämpfung aktivierter Mikroglia ausüben. Unter Einwirkung von PPAR-alpha-Agonisten wurde in LPS-stimulierten Zellkulturen ein reduzierter Gehalt proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1β, TNF-α, IL-6 und eine verminderte Produktion von NO gemessen (Xu & al, 2005) (Gray & al, 2011). Auch für das antiinflammatorische Zytokin IL-4 konnte, durch In-vitro- und In-vivo-Analyse ein Nachweis seiner dämpfenden Wirkung gegenüber aktivierter Mikroglia geführt werden (Lyons & al., 2009).

6.1.2 Curcumin supprimiert die Expression proinflammatorischer Gene in aktivierten BV-2 Mikroglia

Curcumin schwächt die Expression proinflammatorischer Gene über die Beeinflussung multipler Signalwege und Transkriptionsfaktoren, wie NF-κB, AP1, EGR1 und die Mitglieder der STAT-Familie ab. Insbesondere NF-κB, AP1, sowie STAT3 stellen wichtige Curcumin-Ziele dar, weil sie zentrale Regulatoren der Immunantwort sind und Curcumin über ihre Beeinflussung einen solch breiten Einfluss auf die Genexpression ausüben kann. Es konnte gezeigt werden, dass Curcumin diese Transkriptionsfaktoren negativ reguliert (Shishodia & al., 2007) (Reuter & al., 2011).
Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Expressionsdaten bestätigen dies, indem besonders in ruhenden BV-2 Mikroglia eine Curcumin-getriggerte Suppression der NF-κB-, AP1-, sowie STAT3-Zielgene PTGS2, CCL2, IL-6 und NOS2 (Maheshwari & al., 2006) festgestellt werden konnte. Die negative Regulation der Transkription dieser Gene durch Curcumin und seine hierdurch erzielte entzündungsdämpfende Wirkung ist zuvor in zahlreichen Publikationen beschrieben worden und ausreichend bekannt. Ihre Expression hat maßgeblichen Anteil an der Ausprägung des inflammatorischen Phänotyps aktivierter Mikroglia. So sind das Enzym Ptgs2 (auch Cox-2) als Quelle von Prostaglandinen, das proinflammatorische Zytokin Il6, das Enzym Nos2 (auch iNos) als Ursprung des Radikals NO, an der Entstehung, sowie dem Verlauf degenerativer Erkrankungen des ZNS beteiligt und Curcumin wirkt dem, durch negative Regulation dieser wichtigen Effektoren neuroinflammatorischer Prozesse entgegen (Kang & al., 2004) (Jin & al., 2007) (Jung & al., 2006).
Desweiteren konnte nach Curcumin-Stimulation eine verminderte Genexpression von TLR2 und C3, insbesondere in aktivierten BV-2 Zellen nachgewiesen werden. Der in die Erkennung von bakteriellen Zellwandbestandteilen involvierte Tlr2-Rezeptor (Lin & al., 2010) und das am Ablauf der unspezifischen Immunantwort beteiligte Komplementprotein C3 (Fan & al.,

2007), diese beiden Faktoren wirken mit an der Transformation des Mikroglia-Phänotyps hin zu einem proinflammatorischen Zustand. Curcumin wirkt hier durch seine Suppression der Tlr2- und C3-Expression gegensinnig.
Außerdem zeigte sich die Transkription der Gene EGR2 und STAT1, welche beide für Transkriptionsfaktoren kodieren, nach Einwirkung von Curcumin supprimiert. Über die negative Regulation dieser zwei, in aktivierter Mikroglia vermehrt exprimierten Transkriptionsfaktoren, mag Curcumin eine Umwandlung hin zum proinflammatorischen Phänotyp weiter dämpfen.

6.2 Curcumin reduziert Neurotoxizität aktivierter RAW-Makrophagen

Im Zuge dieser Arbeit durchgeführte Zellkultur-Experimente mit 661W Photorezeptorzellen, denen von LPS-aktivierten RAW-Makrophagen konditionierte Medien beigefügt wurden, ergaben dass Curcumin die MKM-vermittelte Toxizität gegenüber Kulturen der retinalen Zelllinie vermindert. Dies konnte festgestellt werden anhand der geringeren LDH-Freisetzung durch 661W Zellen ins Zellkulturmedium, sowie deren unauffälliger Morphologie nach Zugabe des MKM von zuvor mit Curcumin stimulierten, aktivierten RAW-Makrophagen. Vermutlich lässt sich dieser protektive Effekt des Curcumin, in erster Linie durch die von ihm verursachte Suppression LPS-getriggerter Nos2-Transkription erklären. Mittels eines Nachweises für Stickstoffmonoxid konnte gezeigt werden, dass die NO-Freisetzung in Zellkulturen von LPS-aktivierten RAW-Makrophagen unter Stimulation mit Curcumin deutlich zurückging.
In diesem Zusammenhang ist eine neuere wissenschaftliche Arbeit erwähnenswert, in der sowohl in vitro, als auch in vivo, der antiinflammatorische und antioxidative Effekt von Curcumin auf retinale Zellen demonstriert werden konnte, welche Licht- und Wasserstoffperoxid-induziertem oxidativem Stress ausgesetzt worden waren (Mandal & al., 2009).

6.3 Ausblick

Ein Großteil des Wissens über die Wirkungsweise von Curcumin basiert bislang lediglich auf In-vitro- und In-vivo-Experimenten. Um die Eignung dieser Substanz für die Behandlung von Erkrankungen des Menschen zuverlässiger bestimmen zu können, um zusätzliches Wissen über seine Wirksamkeit und gefahrlose Anwendung zu erlangen, müssen zukünftig weitere klinische Studien durchgeführt werden. Diese sollten qualitative Standards, wie Randomisierung und doppelte Verblindung erfüllen, sowie Plazebo-Kontrollen aufweisen. Zuvorderst ist es notwendig, sich mit Problemen der Pharmakokinetik von Curcumin zu befassen: Die schlechte Bioverfügbarkeit von oral verabreichtem Curcumin muss verbessert (Anand & al., 2007) und Interaktionen dieses Wirkstoffes mit Arzneimittel-metabolisierenden Enzymen, für dessen therapeutischen Gebrauch berücksichtigt werden (Hayeshi & al., 2007) (Appiah-Opong & al., 2007) (Volak & al., 2008).

7 Zusammenfassung

Proinflammatorischer Mikroglia-Aktivierung kommt eine zentrale Rolle für die Entstehung und den Verlauf von neurodegenerativen Erkrankungen zu. Die Beeinflussung der immunmodulierenden Aktivität von Mikroglia stellt somit einen breiten Ansatz für die Therapie diverser Krankheiten dar.
Bioaktive sekundäre Pflanzenstoffe, wie das zur Gruppe der Polyphenole gehörige Curcumin, stehen aufgrund ihrer entzündungshemmenden und antioxidativen Effekte seit einiger Zeit im Fokus wissenschaftlicher Forschung. Curcumin übt seine immunregulatorische Wirkung innerhalb des ZNS maßgeblich über die Beeinflussung der Mikroglia aus, was es zu einem vielversprechenden Wirkstoff für die Behandlung von Erkrankungen macht, denen Neuroinflammation zugrunde liegt.
Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Curcumin-Wirkung auf aktivierte Mikroglia durch genomweite Transkriptprofilierung untersucht. Anhand dieses Überblicks, konnte die globale Beeinflussung des Transkriptoms der Mikrogliazelle durch Curcumin gezeigt werden. Im Einzelnen führte die Behandlung mit dem sekundären Pflanzenstoff zur Induktion antiinflammatorischer und zugleich zur potenten Suppression proinflammatorischer Gene. Unter diesen befinden sich hier erstmals als solche beschriebene Zielgene des Curcumin. Durch funktionelle Analyse konnten für Curcumin, in Zellkulturexperimenten mit Photorezeptorzellen, neuroprotektive Eigenschaften nachgewiesen werden.

8 Literaturverzeichnis

Akiyama, H., & al., e. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. Neurobiol Aging , 21, S. 383–421.

Aloisi, F. (2001). Immune function of microglia. Glia , 36 (2), S. 165-79.

al-Ubaidi, M., Font, R., & al., e. (1992). 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. , 119 (6), S. 1681-7.

Ammon, H., & Wahl, M. (1991). Pharmacology of Curcuma longa. Planta Med , 57 (1), S. 1-7.

Anand, P., & al., e. (2007). Bioavailability of curcumin: Problems and promises. Mol. Pharm. , 4, S. 807–18.

Appiah-Opong, R., & al., e. (2007). Inhibition of human recombinant cytochrome P450 s by curcumin and curcumin decomposition products. Toxicology , 235, S. 83–91.

Artavanis-Tsakonas, S., & al., e. (1995). Notch Signaling. Science , 268, S. 225-232.

Blasi, E., & al., e. (1990). Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc. Journal of Neuroimmunology , 27, S. 229-237.

Block, M. L., & Hong, J. S. (2007). Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity. Biochemical Society Transactions , 35 (5), S. 1127–1132.

Borggrefe, T., & Oswald, F. (2009). The Notch signaling pathway: Transcriptional regulation at Notch target genes. Cell. Mol. Life Sci. , 66, S. 1631 – 1646.

Cao, Q., & al., e. (2008). Expression of Notch-1 Receptor and Its Ligands Jagged-1 and Delta-1 in Amoeboid Microglia in Postnatal Rat Brain and Murine BV-2 Cells. Glia , 56, S. 1224-1237.

Cardona, A., & al., e. (2006). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. Nature Neuroscience , 9 (7), S. 917–924.

Chainani-Wu, N. (2003). Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (Curcuma longa). J Altern Complement Med , 9, S. 161–168.

Chen, Y., & al., e. (2012). Preparation of Curcumin-Loaded Liposomes and Evaluation of Their Skin Permeation and Pharmacodynamics. Molecules , 17 (5), S. 5972-5987.

Dirscherl, K., & al., e. (2010). Luteolin triggers global changes in the microglial transcriptome leading to a unique anti-inflammatory and neuroprotective phenotype. J Neuroinflammation , 7, S. 3.

Doggui, S., & al., e. (2012). Neuronal uptake and neuroprotective effect of curcumin-loaded PLGA nanoparticles on the human SK-N-SH cell line. J Alzheimers Dis. , 30 (2), S. 377-92.

Ebert, S., & al., e. (2008). Chondroitin sulfate disaccharide stimulates microglia to adopt a novel regulatory phenotype. J Leukoc Biol. , 84 (3), S. 736-40.

Fan, R., & al., e. (2007). Induction of complement proteins in a mouse model for cerebral microvascular Aβ deposition. Journal of Neuroinflammation , 4, S. 22.

Gao, H.-M., & al., e. (2011). HMGB1 acts on microglia Mac1 to mediate chronic neuroinflammation that drives progressive neurodegeneration. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience , 31 (3), S. 1081–1092.

Ghosh, A., & al., e. (2007). Selective inhibition of NF-κB activation prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America , 104 (47), S. 18754–18759.

Ginhoux, F., & al., e. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. Science , 330 (6005), S. 841–845.

Graesser, D., & al., e. (2002). Altered vascular permeability and early onset of experimental autoimmune encephalomyelitis in PECAM-1-deficient mice. J. Clin. Invest. , 109, S. 383–392.

Gray, E., & al, e. (2011). Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonists protect cortical neurons from inflammatory mediators and improve peroxisomal function. European Journal of Neuroscience , 33, S. 1421–1432.

Gupta, N., & Dixit, V. (2011). Bioavailability enhancement of curcumin by complexation with phosphatidyl choline. J Pharm Sc. , 100 (5), S. 1987-95.

Gupta, S., & al., e. (2011). Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. Nat. Prod. Rep. , 28, S. 1937–55.

Hanisch, U.-K., & Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nature Neuroscience , 10 (11), S. 1387–1394.

Hayeshi, R., & al., e. (2007). The inhibition of human glutathione S-transferases activity by plant polyphenolic compounds ellagic acid and curcumin. 45, S. 286–295.

Haynes, S. E., & al., e. (2006). The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. NatNeurosci. , 9, S. 1512-1519.

Hebert, L., Beckett, L., & al., e. (2001). Annual Incidence of Alzheimer Disease in the United States Projected to the Years 2000 Through 2050. Alzheimer Dis. Assoc. Disord. , 15, S. 169–73.

Hebert, L., Scherr, P., & al., e. (2003). Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. Arch. Neurol. , 60, S. 1119–22.

Heneka, M., & al., e. (2010). Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. J Neural Transm , 117, S. 919–947.

Hoek, R., & al., e. (2000). Down-Regulation of the Macrophage Lineage Through Interaction with OX2 (CD200). Science , 290 (5497), S. 1768–1771.

Jackson, D. (2003). The unfolding tale of PECAM-1. FEBS Letters , 540, S. 7-14.

Jackson-Lewis, V., & Smeyne, R. J. (2005). MPTP and SNpc DA neuronal vulnerability: role of dopamine, superoxide and nitric oxide in neurotoxicity. Minireview. Neurotoxicity Research , 7 (3), S. 193–201.

Jagetia, G., & Aggarwal, B. (2007). "Spicing up" of the immune system by curcumin. J Clin Immunol , 27, S. 19-35.

Jellinger, K. A. (2005). Neurodegenerative Erkrankungen (ZNS) – Eine aktuelle Übersicht. J Neurol Neurochir Psychiatr , 6 (1), S. 9-18.

Jin, C., & al., e. (2007). Curcumin attenuates the release of pro-imflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglia. Acta Pharmacol Sin , 28 (10), S. 1645-51.

Jung, K., & al., e. (2006). Inhibitory effect of curcumin on nitric oxide production from lipopolysaccharide-activated primary microglia. Life Sci , 79, S. 2022-2031.

Kaltschmidt, B., Widera, D., & Kaltschmidt, C. (2005). Signaling via NFkappaB in the nervous system. Biochim Biophys Acta , 1745 (3), S. 287–99.

Kang, G., & al., e. (2004). Curcumin suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression by inhibiting activator protein 1 and nuclear factor kappab bindings in BV2 microglial cells. J Pharmacol Sci , 94, S. 325-328.

Karlstetter, M., & al., e. (2011). Curcumin is a potent modulator of microglial gene expression and migration. Journal of Neuroinflammation , 8, S. 125.

Krishnamoorthy, R. R., & al., e. (1999). Photo-oxidative Stress Down-modulates the Activity of Nuclear Factor-kB via Involvement of Caspase-1, Leading to Apoptosis of Photoreceptor Cells. The Journal of Biological Chemistry , 274 (6), S. 3734–3743.

Kunnumakkara, A., & al., e. (2008). Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. Cancer Lett. , 269, S. 199–225.

Langmann, T. (2007). Microglia activation in retinal degeneration. JLeukocBiol , 81, S. 1345-1351.

Lin, H., & al., e. (2010). Peptidoglycan enhances proinflammatory cytokine expression through the TLR2 receptor, MyD88, phosphatidylinositol 3-kinase/AKT and NF-kappaB pathways in BV-2 microglia. International Immunopharmacology , 10, S. 883–891.

Lin, J. (2007). Molecular targets of curcumin. Adv. Exp. Med. Biol. , 595, S. 227–43.

Lin, J., & al., e. (2003). The netrin-G1 ligand NGL-1 promotes the outgrowth of thalamocortical axons. Nat. Neurosci. , 6, S. 1270-1276.

Ly, N., & al., e. (2005). Netrin-1 inhibits leukocyte migration in vitro and in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 102, S. 14729-14734.

Lyons, A., & al., e. (2009). Decreased neuronal CD200 expression in IL-4-deficient mice results in increased neuroinflammation in response to lipopolysaccharide. Brain, Behavior, and Immunity , 23, S. 1020–1027.

Maheshwari, R., & al., e. (2006). Multiple biological activities of curcumin: a short review. Life Sci , 78, S. 2081-2087.

Mandal, N., & al., e. (2009). Curcumin Protects Retinal Cells from Light- and Oxidant Stress-induced Cell Death. Free Radic. Biol. Med. , 46 (5), S. 672–679.

McGeer, E., & McGeer, P. (1999). Brain inflammation in Alzheimer disease and the therapeutic implications. Curr Pharm Des , 5, S. 821–836.

McGeer, P., & McGeer, E. (2002). Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. Muscle Nerve , 26, S. 459–470.

Moore, S., & al., e. (2007). Netrins and their receptors. Adv.Exp. Med. Biol. , 621, S. 17–31.

Nakashiba, T., & al, e. (2000). Netrin-G1: a novel glycosyl phosphatidylinositol-linked mammalian netrin that is functionally divergent from classical netrins. J. Neurosci. , 20, S. 6540–6550.

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science , 308 (5726), S. 1314–1318.

Philips, T., & Robberecht, W. (2011). Neuroinfl ammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. Lancet Neurol , 10, S. 253–63.

Podaralla, S., & al., e. (2012). Synthesis of Novel Biodegradable Methoxy Poly(ethylene glycol)–Zein Micelles for Effective Delivery of Curcumin. Mol. Pharmaceutics , 9 (9), S. 2778–2786.

Privratsky, J., & al., e. (2010). PECAM-1: Conflicts of interest in inflammation. Life Sciences , 87, S. 69-82.

Raivich, G., & Banati, R. (2004). Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. Brain Research Reviews , 46, S. 261– 281.

Ransohoff, R., & Perry, V. (2009). Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. Annu Rev Immunol , 27, S. 119-145.

Reuter, S., & al., e. (2011). Epigenetic changes induced by curcumin and other natural compounds. Genes & nutrition , 6 (2), S. 93–108.

Sameermahmood, Z., & al., e. (2008). Curcumin Modulates SDF-1alpha/CXCR4–Induced Migration of Human Retinal Endothelial Cells (HRECs). Invest Ophthalmol Vis Sci. , 49, S. 3305–3311.

Schubert, P., & al., e. (2000). Cascading glia reactions: a common pathomechanism and its differentiated control by cyclic nucleotide signaling. Ann N Y Acad Sci , 903, S. 24-33.

Senft, C., & al., e. (2010). The nontoxic natural compound Curcumin exerts anti-proliferative, anti-migratory, and anti-invasive properties against malignant gliomas. BMC Cancer , 10, S. 491.

Sharma, R., & al., e. (2004). Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. Clin Cancer Res , 10, S. 6847–6854.

Shirley, S., & al., e. (2008). Curcumin prevents human dendritic cell response to immune stimulants. Biochem Biophys Res Commun. , 374 (3), S. 431–436.

Shishodia, S., & al., e. (2007). Modulation of transcription factors by curcumin. Adv. Exp. Med. Biol. , 595, S. 127-148.

Shoba, G., & al., e. (1998). Influence of Piperine on the Pharmacokinetics of Curcumin in Animals and Human Volunteers. Planta Med , 64 (4), S. 353-356.

Skovronsky, D., & al., e. (2006). Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. , 1, S. 151-70.

Streit, W. (2002). Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. Glia , 40 (2), S. 133–139.

Tan, E., & al., e. (2004). Expression of Cone-Photoreceptor–Specific Antigens in a Cell Line Derived from Retinal Tumors in Transgenic Mice. IOVS , 45 (3), S. 764-768.

Volak, L., & al., e. (2008). Curcuminoids inhibit multiple human cytochromes P450, UDP-glucuronosyltransferase, and sulfotransferase enzymes, whereas piperine is a relatively selective CYP3A4 inhibitor. Drug Metab. Dispos. , 36, S. 1594–1605.

Wake, H., & al., e. (2009). Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience , 29 (13), S. 3974–3980.

Woo, J., & al., e. (2009). The NGL family of leucine-rich repeat-containing synaptic adhesion molecules. Mol. Cell. Neurosci. , 42, S. 1-10.

www.clinicaltrials.gov. (kein Datum).

Xu, J., & al, e. (2005). Agonists for the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-alpha and the Retinoid X Receptor Inhibit Inflammatory Responses of Microglia. Journal of Neuroscience Research , 81, S. 403–411.

Zielasek, J., & Hartung, H.-P. (1996). Molecular mechanisms of microglial activation. Adv Neuroimmunol , 6, S. 191–202.

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gewinnung von Curcumin 7
Abbildung 2: Diagramm des experimentellen Aufbaus 14
Abbildung 3: NO-Nachweis mittels Griess-Reagenz 17
Abbildung 4: Chemische Reaktionen, die dem CytoTox 96® Assay zugrunde liegen 18
Abbildung 5: Funktionsprinzip des Fluorescence resonance energy transfer (FRET) 23
Abbildung 6: Microarray-Analyse und Auswertung der gewonnenen Daten via SAM 25
Abbildung 7: Expressionsanalysen der Gene Ntng1, Pecam1, Dll1, PPARα, Il4 28
Abbildung 8: Expressionsanalysen der Gene Egr2, Ptgs2, Ccl2, Il6, Nos2, Stat1, Tlr2, C3.. 29
Abbildung 9: Phasenkontrastmikroskop-Bilder von RAW-Makrophagen 30
Abbildung 10: NO-Freisetzung durch RAW-Makrophagen 31
Abbildung 11: Phasenkontrastmikroskop-Bilder von 661W Photorezeptorzellen 33
Abbildung 12: LDH-Aktivität in Zellkultur-Medium von 661W Photorezeptorzellen 34

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswahl der signifikant regulierten Gene des Microarray-Datensatzes 27

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Langmann, der diese Arbeit grundlegend ermöglicht hat. Ihm verdanke ich die Vermittlung des interessanten Projektes, an welchem ich in seiner Arbeitsgruppe tätig sein durfte.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Herbert Jägle für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Weber danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Humangenetik.

Ein großer Dank gilt Stefanie Ebert für die engagierte Betreuung meiner Doktorarbeit.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik, die mir bei der Beantwortung von Fragen und Lösung von Problemen eine Hilfe waren.

Meinen Eltern, die mir letztlich alles ermöglichten ist diese Arbeit in Dankbarkeit gewidmet.

Schließlich danke ich Theo, er gab mir den entscheidenden Rat.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Maria Elena Lippe
Geburtsdaten	11.05.1984 in Düsseldorf
Mutter:	Maria Lippe, geb. Chávez Banzer, * 23.02.1951
Vater:	Josef Rudolf Lippe, * 31.01.1947

Schule

1990 - 1994	Fleher Grundschule, Düsseldorf
1994 - 2003	Görres-Gymnasium, Düsseldorf

Medizinstudium

09/2004 - 08/2006	Karls-Universität, Prag, CZ
04/2007 - 03/2013	Universität Regensburg
04/2009 – 09/2009	**Promotion** Arbeit am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg, in der AG Prof. Dr.rer.nat. Thomas Langmann für die Dauer eines Freisemesters. Thema: Effekte von Curcumin auf Genexpression und Funktion proinflammatorisch aktivierter Mikroglia.
01/2013	Approbation als Ärztin

Publikationen

2011	´Curcumin is a potent modulator of microglial gene expression and migration´ (Karlstetter M, Lippe E, Walczak Y, Moehle C, Aslanidis A, Mirza M, Langmann T); erschienen im Journal of Neuroinflammation

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

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

Frankfurt am Main, 14. November 2013

_____

M. Elena Lippe