

Aus dem Zentrum für Psychische Erkrankungen
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br.

Effekte des Ginkgo-Extraktes EGb 761[®] auf die Aktivierung von Mikroglia

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg i.Br.

Vorgelegt 2014

von Johanna Carstensen

geboren in Heide

Dekanin: Prof. Dr. Kerstin Krieglstein
1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Hüll
2. Gutachter: PD Dr. Roman Huber
Jahr der Promotion: 2015

Kurzzusammenfassung

Neuroinflammatorische Vorgänge stehen in engem Zusammenhang mit Hirnschädigungen im Rahmen neurodegenerativer, ischämischer oder infektiöser Erkrankungen. Dabei nimmt die Aktivierung von Mikrogliazellen eine Schlüsselrolle ein.

Verschiedene Prozesse charakterisieren die Partizipation der Mikroglia am Entzündungsgeschehen. Als Antwort auf inflammatorische Stimuli synthetisieren sie vermehrt Prostaglandin E₂ (PGE₂), ein Endprodukt der Arachidonsäurekaskade. Maßgeblich an der PGE₂-Bildung beteiligte Enzyme sind die Cyclooxygenase-2 (COX-2) und die mikrosomale Prostaglandin E₂ Synthase 1 (mPGES-1). Außerdem wird die Expression der induzierbaren Stickstoff Synthase (iNOS) gesteigert und im Zuge dessen mehr Stickstoff (NO) synthetisiert. Zusätzlich kommt es zur vermehrten Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, wie z.B. Interleukin 1 β (IL-1 β), Interleukin 6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor α (TNF- α). Die Eindämmung dieser Vorgänge könnte in die Pathomechanismen neurodegenerativer Erkrankungen eingreifen und zur Prävention und Therapie der selbigen genutzt werden.

Seit einiger Zeit werden Ginkgo-Extrakte zur Therapie von Demenzerkrankungen angewandt. Die Wirkung wird zum Teil noch kontrovers diskutiert. Einige Studien sprechen aber für eine Wirksamkeit in der Prävention vor allem von milden bis moderaten Demenzformen.

Über die genauen Mechanismen, welcher Inhaltsstoff von Ginkgo wie im Körper wirkt, weiß man bislang noch wenig, jedoch sprechen viele Studien für eine antiinflammatorische und antioxidative Wirkkomponente.

In dieser Arbeit wurden die Effekte des *Ginkgo biloba* Extraktes EGb 761® (EGb 761) und zwei seiner Inhaltsstoffe, FLA 269/Quercetin und FLA 270/Kaempferol, auf die Aktivierung von Mikroglia untersucht. Dabei konnten verschiedene Auswirkungen beobachtet werden: Die PGE₂-Produktion in aktivierten Mikroglia wurde ab einer Konzentration von 100 μ g/ml signifikant durch EGb 761 gehemmt. Dem zu Grunde lag die verminderte Expression von mPGES-1 und Hemmung der Phosphorylierung und somit Verminderung der aktiven Form der cytosolischen Phospholipase A₂. Interessant war, dass die COX-2-Expression nach Stimulation mit EGb 761 stieg. Dies unterstützt Forschungsarbeiten, deren Ergebnisse – entgegen der bisherigen Auffassung einer gekoppelten Regulierung- auf eine ungekoppelte Modulierung von mPGES-1 und COX-2 hinweist. Auch die NO-Produktion unterlag einer Hemmung durch EGb 761, welche auf die inhibierte iNOS-Expression zurückgeführt werden konnte.

Zudem wurde die Synthese der Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α vermindert. Verschiedene Signaltransduktionswege, die diese Vorgänge begründen könnten, wurden in dieser Arbeit untersucht, ohne jedoch diese Effekte von EGb 761 klären zu können. Mit Hilfe der Messung von 8-Isoprostan sollte eine Aussage über die antioxidative Wirkung des Ginkgo-Extraktes EGb 761 in Mikroglia gemacht werden. Hier ließ sich kein deutlicher Trend erkennen.

Die Experimente zu den Flavonoiden zeigten keine Effekte auf aktivierte Mikroglia.

Insgesamt konnten pleiotrope antiinflammatorische Wirkungen von EGb 761 in Mikroglia nachgewiesen werden. Damit wurden weitere Ergebnisse geliefert, die die Wirkung von EGb 761 bei neurodegenerativen Erkrankungen unterstützen. Weiterführende Forschung auf diesem Gebiet ist zu empfehlen, um so Fortschritte in der Therapie und Prävention schwerwiegender Krankheiten zu ermöglichen.

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Abkürzungsverzeichnis.....	IV
III.	Abbildungsverzeichnis.....	VI
IV.	Tabellenverzeichnis.....	VII
1	Einleitung.....	1
1.1	Demografischer Wandel und Demenzerkrankungen	1
1.2	Neuroinflammation	2
1.3	Die Arachidonsäurekaskade.....	2
1.4	Zytokine und ihre Rolle bei der Inflammation	4
1.5	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und Stickstoff (NO)–Produktion ..	5
1.6	Mikroglia	6
1.7	<i>Ginkgo biloba</i> Extrakt 761® (EGb 761).....	7
2	Zielsetzung der Arbeit.....	10
3	Materialien und Methoden.....	11
3.1	Materialien	11
3.1.1	Chemikalien und Biochemikalien	11
3.1.2	Geräte und Materialien.....	12
3.1.3	Stimulanzen.....	14
3.1.4	Antikörper	14
3.1.5	Nachweissysteme/Kits	15
3.1.6	Primer	15
3.1.7	Zellen.....	17
3.2	Methoden	18
3.2.1	Zellkultivierung.....	18
3.2.2	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	20
3.2.3	Enzymimmunoassay (EIA)	21

3.2.4	Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay	22
3.2.5	Western-Blot-Analyse: Probenvorbereitung	23
3.2.6	Western-Blot-Analyse: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	24
3.2.7	Western-Blot Analyse: Durchführung des Western Blots	27
3.2.8	Membran-Stripping	29
3.2.9	Densitometrische Quantifizierung.....	30
3.2.10	RNA-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi und cDNA-Synthese.....	30
3.2.11	Real-Time quantitative Polymerase-Chain-Reaction (q-PCR)	31
3.2.12	Statistische Analyse.....	32
4	Ergebnisse	33
4.1	Effekte von EGb 761, FLA 269 und FLA 270 auf die Synthese von Entzündungsmediatoren in Mikroglia	33
4.1.1	Effekte von EGb 761, FLA 269 und FLA 270 auf die PGE ₂ -Freisetzung	33
4.1.2	Effekte von EGb 761, FLA 269 und FLA 270 auf die NO-Produktion in Mikroglia.....	35
4.1.3	Effekte von EGb 761, FLA 269 und FLA 270 auf die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α	37
4.2	Effekte von EGb 761, FLA 269 und FLA 270 auf die 8-Isoprostan-Freisetzung.....	41
4.3	Effekte von EGb 761 auf die Proteinsynthese und Aktivierung der Enzyme der Arachidonsäurekaskade: COX-1, COX-2, mPGES-1 und cPLA2	43
4.4	Effekte von EGb 761 auf die Proteinexpression von iNOS.....	46
4.5	Effekte von EGb 761, FLA 269 und FLA 270 auf die Signaltransduktionskaskaden in primären Mikroglia	47
4.5.1	Auswirkungen auf mitogenaktivierte Kinasen (MAP-Kinasen): p38, p42/44 und JNK	47
4.5.2	Auswirkungen auf Akt	49
4.5.3	Auswirkung von EGb 761 auf I κ B- α	50
4.6	Effekte von EGb 761 auf die mRNA-Expression.....	51
4.6.1	Effekte von EGb 761 auf die mRNA-Expression der Proteine der	

	Arachidonsäurekaskade: COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2, cPGES und cPLA2	51
4.6.2	Effekte von EGb 761 auf die mRNA-Expression von iNOS	54
4.6.3	Effekte von EGb 761 auf die mRNA-Expression von Entzündungsmediatoren in Mikroglia.....	55
5	Diskussion.....	57
5.1	Effekte von EGb 761 auf die Arachidonsäurekaskade in Mikroglia: Hemmung der PGE ₂ -Produktion durch EGb 761	58
5.2	Unterdrückung der NO-Produktion durch Hemmung von iNOS	60
5.3	EGb 761 hemmt die Freisetzung von IL-1 β , IL-6 und TNF- α	61
5.4	Effekte von EGb 761, FLA 269 und FLA 270 auf die 8-Isoprostan-Synthese	63
5.5	Effekte von EGb 761, FLA 269 und FLA 270 auf die Signaltransduktion in aktivierten Mikroglia	64
5.5.1	Effekte auf MAP-Kinasen: p38, p42/44 und JNK	64
5.5.2	Effekte auf den Akt-Signalweg	66
5.5.3	Effekte auf I κ B- α	67
6	Zusammenfassung und Ausblick	69
7	Literaturverzeichnis	71
8	Danksagung	79

II. Abkürzungsverzeichnis

$\mu\text{g}/\mu\text{l}/\mu\text{M}$	Mikrogramm/ Mikroliter/ Mikromol
AA	Arachidonsäure
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninic acid
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
COX-1/-2	Cyclooxygenase 1/2
cPGES	zytosolische Prostaglandin E ₂ Synthase
cPLA2	zytosolische Phospholipase A 2
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Earle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemolumineszenz
EGb 761	<i>Ginkgo biloba</i> Extrakt 761®
EIA	Enzyme Immuno Assay
ELISA	Enzyme-linked Immuno Assay
FCS	fetales Kälberserum
FLA 269	Flavonoid 269, Quercetin
FLA 270	Flavonoid 270, Kaempferol
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HRP	Horseradish-Peroxidase, Meerrettichperoxidase
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IL-1 β /6/8	Interleukin-1 β /6/8
JNK/SAPK	c-jun N-terminale Kinase/stress-aktivierte Protein Kinase
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid

M	molar
mA	Milliampere
MAP-Kinase	mitogenaktivierte Proteinkinase
MEM	minimal essential medium
MHC	Major Histocompatibility Complex
ml/mL	Milliliter
mM	Millimol
MMP	Matrix-Metalloprotease
mPGES-1/2	mikrosomale Prostaglandin E ₂ Synthase 1/2
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphate buffered saline salt
PCB	polychlorierte Biphenyle
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
pg	Pikogramm
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PKC	Proteinkinase C
PVDF	Polyvinylidendifluorid
q-PCR	Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBS	Tris-buffered-saline
TBS-T	Tris-buffered-saline Tween
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzen-Sulfonsäure
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
W	Watt
ZNS	Zentrales Nervensystem

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Die Arachidonsäurekaskade	3
Abbildung 4.1: Hemmung der PGE ₂ -Synthese durch EGb 761, kein Effekt durch FLA 269 und FLA 270	34
Abbildung 4.2: Inhibition der NO-Freisetzung durch EGb 761, kein Effekt durch FLA 269 und FLA 270	36
Abbildung 4.3: Konzentrationsabhängige Hemmung der Zytokinproduktion	
durch EGb 761	38
Abbildung 4.4: Keine Hemmung der Zytokinproduktion durch FLA 269	39
Abbildung 4.5: Keine Hemmung der Zytokinproduktion durch FLA 270	40
Abbildung 4.6: 8-Isoprostan-Synthese nach Stimulation mit EGb 761, FLA 269	
und FLA 270	42
Abbildung 4.7: Proteinsynthese von COX-1, COX-2 und mPGES-1 nach Stimulation mit EGb 761	44
Abbildung 4.8: Hemmung der p-cPLA2-Expression durch EGb 761	45
Abbildung 4.9: Hemmung der iNOS-Expression durch EGb 761	46
Abbildung 4.10: Effekte von EGb 761, FLA 269 und FLA 270 auf die Signaltransduktion: p38, p42/44 und JNK	48
Abbildung 4.11: Effekte von EGb 761, FLA 269 und FLA 270 auf Signaltransduktionskaskaden: p-Akt	49
Abbildung 4.12: Effekte von EGb 761, FLA 269 und FLA 270 auf Signaltransduktionskaskaden: IκB-α	50
Abbildung 4.13: Effekte von EGb 761 auf die mRNA-Expression von COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2 und cPGES	52
Abbildung 4.14: Effekte von EGb 761 auf die mRNA-Expression von cPLA2.....	53
Abbildung 4.15: Effekte von EGb 761 auf die mRNA-Expression von iNOS	54
Abbildung 4.16: Effekte von EGb 761 auf die mRNA-Expression der Zytokine IL-1β, IL-6 und TNF-α.....	56

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: verwendete Chemikalien und Biochemikalien.....	11
Tabelle 3.2: verwendete Geräte und Materialien.....	12
Tabelle 3.3: verwendete Stimulanzen	14
Tabelle 3.4: verwendete Antikörper	14
Tabelle 3.5: verwendete kommerzielle Nachweissysteme/Kits	15
Tabelle 3.6: verwendete Primer.....	15

1 Einleitung

1.1 Demografischer Wandel und Demenzerkrankungen

Die Bevölkerung in Deutschland altert zunehmend. Ursächlich dafür sind die sinkende Geburtenrate und eine dank fortschreitender Technik und Wissenschaft steigende Lebenserwartung.

Laut dem Statistischem Bundesamt lag die Lebenserwartung bei Geburt im Jahre 2009 für Frauen bei 82,7 und für Männer bei 77,7 Jahren, Tendenz steigend. So ist der Anteil der über 65-Jährigen in der Bevölkerung im letzten Jahrhundert um das Vierfache auf 21% gestiegen. Die Prognose sagt einen weiteren Anstieg auf 32% bis zum Jahre 2040 voraus (Statistisches Bundesamt, 2009).

Durch den demografischen Wandel in Kombination mit hoch technologisiertem Lebensstil, mangelnder Bewegung, einseitiger Ernährung und anderen Faktoren treten bestimmte Krankheiten zunehmend in den Vordergrund. Hierzu gehören unter anderem Übergewicht, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, psychische Störungen und Demenzerkrankungen. Diese Erkrankungen werden auch als die neuen Volkskrankheiten bezeichnet. Sie ziehen durch ihr häufiges Auftreten und ihre Auswirkungen, wie z.B. Therapiekosten oder Arbeitsunfähigkeit, große sozioökonomische Folgen nach sich.

Unter diesen Volkskrankheiten ist die Demenz besonders hervorzuheben, da ihr Anteil mit der zunehmend älter werdenden Bevölkerung steigt und zu den häufigsten und folgenreichsten Erkrankungen im höheren Alter zählt. Zurzeit leiden in Deutschland etwa 1,3 Million Menschen an Demenz. Im Jahre 2050 wird sich diese Zahl den Prognosen nach mehr als verdoppelt haben (Berlin Institut für Bevölkerung und Entwicklung, 2011). Die Häufigkeit der Erkrankung nimmt mit dem Alter zu, so sind weniger als 2 % der 65-69-Jährigen, aber über 30 % der 90-Jährigen betroffen (Robert-Koch-Institut, 2005). Über zwei Drittel der Erkrankten sind Frauen, sie haben eine höhere Lebenserwartung. Auch bei den Pflegebedürftigen spielt die Demenz eine wichtige Rolle. Etwa die Hälfte der Pflegebedürftigen leiden an Demenz. Zudem stellt die Erkrankung den Hauptaufnahmegrund in ein Pflegeheim dar (Bickel H, 2005).

So entwickelt sich die Demenz zu einem wichtigen Krankheitsbild in der Gesellschaft und rückt damit zunehmend in den Fokus der Forschung.

1.2 Neuroinflammation

Die Demenz gehört zu den neurodegenerativen Krankheiten. Sie ist nach der International Statistical Classification of Diseases (ICD-10) definiert als ein Syndrom, welches Folge einer meist chronischen oder fortschreitenden Krankheit des Gehirns mit Störung vieler höherer kortikaler Funktionen ist.

Es gibt verschiedene Formen der Demenz. So werden die vaskuläre Demenz, neurodegenerative Demenzen, wie z.B. bei Morbus Alzheimer oder die frontotemporale Demenz und sekundäre Demenz bei sonstigen Erkrankungen unterschieden.

Eine zentrale Rolle in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen spielt die chronische Entzündung im zentralen Nervensystem (ZNS), auch Neuroinflammation genannt. Es konnte gezeigt werden, dass Neuroinflammation chronisch degenerative Erkrankungen des Gehirns verursacht, die Progredienz dieser fördert und insbesondere im frühen Stadium der Krankheitsentwicklung eine wichtige Rolle spielt (Lyman et al., 2013).

Die Neuroinflammation ist durch komplexe Vorgänge charakterisiert, die teils den Entzündungsreaktionen im restlichen Körper gleichen, teils davon abweichen. So ist die Migration von Immunzellen aus dem Blut über die Blut-Hirn-Schranke erschwert, jedoch kommt es auch im ZNS zur gesteigerten Synthese von Entzündungsmediatoren und zum vermehrten Ablauf der Arachidonsäurekaskade. Diese spielt eine zentrale Rolle bei Entzündungsvorgängen. Sie findet im ZNS hauptsächlich in aktivierten Mikrogliazellen statt.

1.3 Die Arachidonsäurekaskade

Ganz am Anfang der Reaktionen steht die Herstellung von Arachidonsäure durch die cytosolische Phospholipase A₂ (cPLA₂). Bindet Calcium an die cPLA₂ so transloziert sie vom Zytosol zur Zellmembran, wo sie die Bildung von Arachidonsäure aus Phospholipiden katalysiert. Sie liegt in diesem aktivierten Zustand phosphoryliert vor. So wird das Substrat für die Cyclooxygenasen (COX) 1 und 2 gestellt, welche aus der Arachidonsäure durch Zyklierung und Oxygenierung Prostaglandin G₂ (PGG₂) und dann Prostaglandin H₂ (PGH₂) synthetisieren (Hamberg & Samuelsson, 1973). Die COX-1 wird konstitutiv in vielen Geweben des Körpers exprimiert und produziert zytoprotektive Prostaglandine, während die COX-2 vor allem durch Stimuli wie Entzündungsmediatoren oder Reize, z.B. Lipopolysaccharid (LPS), induziert wird (Smith et al., 2000). PGH₂ wird dann durch verschiedene spezifische Synthasen weiter verstoffwechselt. Dabei entsteht unter anderem das

Prostaglandin E₂ (PGE₂), Prostaglandin D₂, Prostaglandin F_{2α}, Prostaglandin I₂ und Thromboxan.

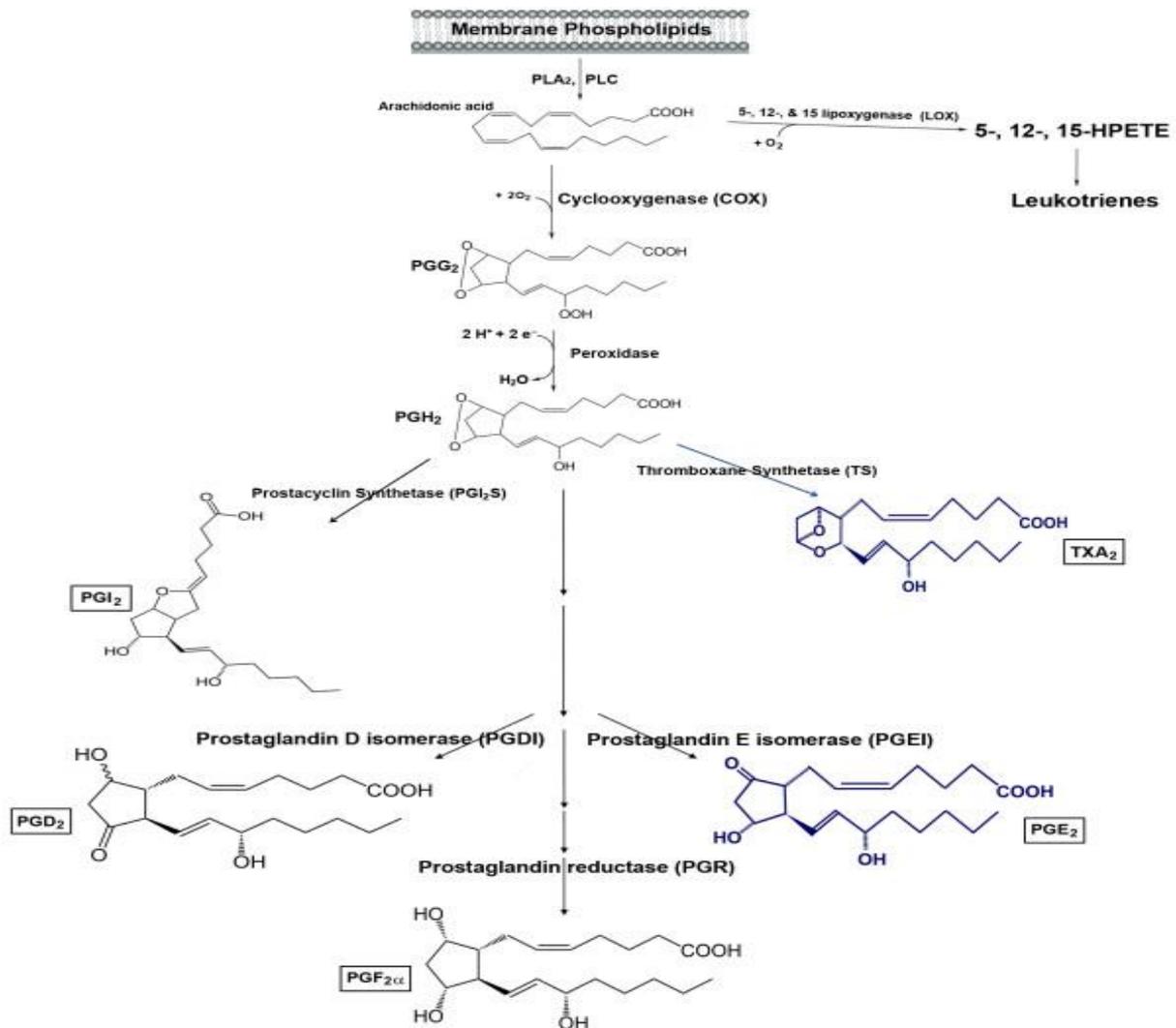


Abbildung 1.1: Die Arachidonsäurekaskade

Quelle: Harold J Ting and Fadi T Khasawneh

Die Prostaglandinsynthese spielt bei inflammatorischen Vorgängen eine große Rolle. Besonders unter den Prostaglandinen hervorzuheben ist das PGE₂. Es wird durch Prostaglandin E₂ Synthase (PGES) gebildet, von denen drei Isoformen identifiziert sind: die mikrosomale Prostaglandin Synthase 1 (mPGES-1) (Jakobsson et al., 1999), die mikrosomale Prostaglandin Synthase 2 (mPGES-2) (Tanikawa et al., 2002) und die cytosolische Prostaglandin Synthase (cPGES) (Tanioka et al., 2000).

Das PGE₂ gilt als das für die Symptome einer Entzündung hauptsächlich verantwortliche Prostaglandin. Seine Wirkung wird über die Bindung an einen von vier PGE₂-Rezeptoren

(EP1, EP2, EP3, EP4) vermittelt. Es moduliert die Expression verschiedener Entzündungsmediatoren und nimmt so Einfluss auf Inflamationsprozesse, z.B. findet eine Inflamationsunterdrückung in Makrophagen und Mikroglia statt, in denen der EP2-Rezeptor deletiert wurde (Johansson et al., 2013).

Unter den drei PGES ist die mPGES-1 von besonderer Bedeutung, da ihre Expression durch proinflammatorische Stimuli induziert wird (Murakami et al., 2000), während sowohl die mPGES-2 als auch die cPGES konstitutiv exprimiert sind. Im Gehirn stellt insbesondere diejenige mPGES-1, die in den Mikroglia lokalisiert ist, die Hauptquelle für die PGE₂-Synthese dar (Ikeda-Matsuo et al., 2005). Die mPGES-1-induzierte PGE₂-Produktion ist unter anderem verantwortlich für Fieber (Engblom et al., 2003), Schmerzwahrnehmung (Ferreira, 1972) und gesteigerte Gefäßpermeabilität. Bislang wurde angenommen, dass mPGES-1 und COX-2 gekoppelt reguliert werden (Catley et al., 2003; Murakami et al., 2000). Allerdings ließen sich Hinweise finden, dass es auch zu einer entgegengesetzten Regulation der Enzymexpression von mPGES-1 und COX-2 kommen kann (de Oliveira et al., 2008).

Die COX-2 stellt einen wichtigen Ansatzpunkt zur Therapie inflammatorischer Prozesse dar. Die nichtsteroidalen Antirheumatika (NSARs) hemmen die COX-1 und COX-2, verhindern die Bildung von PGE₂ und dämpfen so Entzündungsreaktionen ein. Aufgrund der unselektiven Hemmung beider COX-Isoformen wird jedoch auch die PGE₂-Produktion durch die COX-1 in der Magenschleimhaut gehemmt, die hier protektiv wirkt. So kann es bei Langzeitbehandlung mit NSARs zu gastrointestinalen Blutungen oder Ulzera kommen. Auch die selektiven COX-2-Inhibitoren weisen ein unerwünschtes Nebenwirkungsprofil vor allem kardiovaskulärer Art auf (Couzin, 2004). Daher könnten die selektive Beeinflussung der mPGES-1 und der damit verbundene Eingriff in die PGE₂-Synthese eine neue Therapieoption für Erkrankungen, an deren Pathophysiologie die akute oder chronische Inflammation beteiligt ist, darstellen.

1.4 Zytokine und ihre Rolle bei der Inflammation

Eine wichtige Gruppe von Entzündungsmediatoren sind Zytokine. Zytokine sind Peptide, die vor allem Wachstum und Differenzierung anderer Zellen regulieren. Hierunter fallen beispielsweise Interleukin 1 β (IL-1 β), Interleukin 6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor α (TNF- α).

IL-1 β gehört zur Interleukin-1 Familie. Es wird durch die Caspase-1 proteolytisch vom

Vorläuferprotein abgespalten, aktiviert und anschließend sezerniert (Dinarello, 1996). Normalerweise wird IL-1 β nur sehr schwach exprimiert, bei Entzündungsreaktionen jedoch erfolgt eine starke Hochregulation, so auch bei chronisch degenerativen Erkrankungen (Rothwell and Luheshi, 2000). Während geringe Konzentrationen eine neuroprotektive Wirkung haben, führen erhöhte IL-1 β -Spiegel zu Zelltod und Neurodegeneration (Rothwell and Strijbos, 1995).

Ähnlich verhält es sich mit IL-6 und TNF- α . Auch die Expression dieser beiden Zytokine wird durch Stimuli wie Schlaganfall, Trauma (Hariri et al., 1994) oder Inflammation erhöht. Die Mechanismen der Regulation dieser Zytokine sind oft gekoppelt. So kann IL-1 β beispielsweise IL-6 und TNF- α induzieren und TNF- α wiederum induziert die Synthese von IL-1 β (Dinarello et al., 1986) und IL-6. IL-6 erhöht die Gefäßpermeabilität und ist ein zentral wirksames Pyrogen (Rothwell et al., 1991).

Auch TNF- α ist ein zentraler Entzündungsmediator, der seine Wirkung durch Bindung an die TNF-Rezeptoren 1 und 2 vermittelt. Das Zytokin ist an der vielseitigen Pathogenese von Entzündungsreaktionen beteiligt, z.B. bei der Pyrogenese. Es wurde herausgefunden, dass die Fiebertemperatur in Versuchstieren durch Injektion von anti-TNF- α -Antikörpern sank (Nagai et al., 1988). Außerdem regelt es die Aktivität und Kommunikation verschiedener Immunzellen (Ware, 2005) und regt Apoptose, Zelldifferenzierung und die Ausschüttung anderer Zytokine an. Durch die Regulation von TNF- α bei entzündlichen Prozessen bietet sich ein vielversprechender therapeutischer Ansatz für chronisch neurodegenerative Erkrankungen, wie z.B. Alzheimer oder Parkinson (A. Frankola et al., 2011).

1.5 Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und Stickstoff (NO)–Produktion

Freie Radikale können die DNA, Lipide und Proteine schädigen und so Gewebeschäden hervorrufen. NO ist eines dieser reaktiven Sauerstoffspezies. Es wird aus L-Arginin durch NO-Synthasen (NOS) synthetisiert, von denen drei Isoformen identifiziert wurden: die endotheliale NOS (eNOS) in Endothelzellen, die induzierbare NOS (iNOS) in Makrophagen und Mikroglia (Moncada and Higgs, 2006) und die neuronale NOS (nNOS).

Die iNOS ist im Gegensatz zu den beiden anderen Isoformen durch proinflammatorische Stimuli induzierbar und produziert nach Aktivierung große Mengen an NO (Koprowski et al., 1993). Potente Induktoren der iNOS sind Interferon γ (IFN- γ), TNF- α , IL-1 β und LPS. Die

Wirkung von NO kann protektiver Art sein, so wirkt sich das durch die eNOS synthetisierte NO durch Vermittlung von Vasodilatation positiv auf ischämiegeschädigtes Hirngewebe aus (Wei et al., 1999). Bei Entzündungsprozessen allerdings produziert die iNOS große Mengen an NO, welches dann zytotoxisch wirkt. Es wurde gezeigt, dass durch Hemmung der durch Stress induzierten iNOS durch den selektiven iNOS-Inhibitor Aminoguanidin die Akkumulation von toxischen NO-Radikalen in Ratten verhindert wurde (Olivenza et al., 2000).

1.6 Mikroglia

Mikroglia gehören zu den Gliazellen im Gehirn und machen etwa 10 % aller Gliazellen aus. Sie gelten als ortständige Immunzellen, auch Histozyten genannt. Pathogene Substanzen werden von ihnen erkannt und durch Phagozytose beseitigt.

Heutzutage wird angenommen, dass Mikroglia mesodermalen Ursprungs sind und zur myeloisch-monozytären Reihe gehören (Tambuyzer et al., 2009).

Normalerweise befinden sich die Mikroglia in einem inaktiven Zustand. Sie können jedoch durch verschiedene Stimuli wie z.B. Nervenläsionen (Hanisch and Kettenmann, 2007), Insult (Davalos et al., 2005), Virusinfektionen (Olson et al., 2001) oder auch in vitro durch LPS (Buttini et al., 1996) aktiviert werden. Die aktive Form unterscheidet sich von der inaktiven durch ein amöboides Aussehen durch stärkere Verästelung der Zellfortsätze, mit denen die Mikroglia Änderungen im Mikromilieu registrieren (Nimmerjahn et al., 2005; Suzumura et al., 1991).

Die Mikrogliaaktivierung spielt eine zentrale Rolle bei der Neuroinflammation. Aktivierte Mikroglia setzen sowohl proinflammatorische Zytokine wie z.B. IL-1 β , IL-6 und TNF- α als auch freie Radikale wie NO frei (Giulian, 1987; Neumann et al., 2009). So können sie sekundär neurotoxisch wirken (Boje and Arora, 1992). Zudem sind die Mikroglia die Hauptproduzenten von PGE₂ durch die mPGES-1 und COX-2 im ZNS (Ikeda-Matsuo et al., 2005).

Zu Chemotaxis fähig können sie sich zu Entzündungsherden fortbewegen und an jeglichen Inflammationsprozessen mitwirken (Yao et al., 1990). Außerdem können sie mit dem Major Histocompatibility Complex (MHC) II als Antigen-präsentierende Zellen fungieren. So ist die Immunantwort der Mikroglia mit hoher Diversität und Heterogenität ausgezeichnet (Harry and Kraft, 2008) und bietet somit einen möglichen Ansatz in der Therapie neurodegenerativer

Erkrankungen.

1.7 *Ginkgo biloba* Extrakt 761® (EGb 761)

Ginkgo biloba ist eine heutzutage weltweit angebaute Baumart. Ursprünglich stammt sie aus China. Der Ginkgo gehört zu den Samenpflanzen und ist der letzte lebende Vertreter der Ginkgoales. Daher wird er auch als „lebendes Fossil“ bezeichnet.

Schon im alten China setzte man auf die Heilkräfte dieses Baumes. Über die Jahrhunderte verbreitete sich die traditionelle asiatische Heilmedizin nach Europa. Für die medizinische Verwendung wird ein Trocken-Extrakt aus Ginkgoblättern hergestellt (35-67:1) und dieser in Aceton 60% gelöst. Die wirksamen Inhaltsstoffe bestehen aus zwei Gruppen: den Flavonglykosiden, insbesondere Quercetin, Kaempferol und Isorhamnetin, und den Terpenlactonen (Drieu, 1986). Die Terpenlactone im Ginkgo-Extrakt werden auch Ginkgolide und Bilobalide genannt. Sie machen ca. 6% des Extraktes aus, während die Flavonglykoside einen Anteil von 22-27% aufweisen (Vasseur et al., 1994). Der Anteil von Ginkgolsäure liegt unter 5 ppm.

Die Wirkung von Ginkgo wird kontrovers diskutiert. Jedoch ist der *Ginkgo biloba* Extrakt 761® nach dem Arzneimittelgesetz als Phytotherapeutikum in Deutschland und anderen Ländern zugelassen. Durch sein vielfältiges Wirkungsspektrum erschließen sich verschiedene Anwendungsgebiete. EGb 761 hat positive Wirkungen auf die vaskuläre Mikrozirkulation durch seine durchblutungsfördernden und antioxidativen Eigenschaften (Suter et al., 2011; Költringer et al., 1995) und wird daher zur Vorbeugung und als adjuvante Therapie bei kardiovaskulärer Erkrankungen verwendet. Studien zur Wirksamkeit von EGb 761 bei Tinnitus zeigten eine Überlegenheit des Ginkgo-Extraktes gegenüber Placebo (von Boetticher, 2011). Des Weiteren konnten insbesondere durch die Bilobalide des Ginkgo-Extraktes positive Effekte bei der Regeneration von Nervenzellen gezeigt werden (Bruno et al., 1993; Chen et al., 2004).

EGb 761 wird nach der ATC-Klassifikation der WHO zu den pflanzlichen Antidementiva gezählt. Seit vielen Jahren wird Ginkgo als natürliches Heilmittel bei Demenzerkrankungen und gegen altersbedingten Abbau kognitiver Fähigkeiten verwendet. Als pflanzliches Präparat wird ihm eine hohe Sicherheit zugeschrieben und über relativ geringe Nebenwirkungen berichtet. Im Jahr 2002 kam die Cochrane Collaboration, der weltweit wissenschaftlich angesehenste Reviewer für medizinisch klinische Studien, zu dem Schluss, dass die bisher

veröffentlichte Literatur den potentiellen Nutzen von Ginkgo bei Gedächtnisverlust und kognitiven Störungen unterstützt und weitere größere Studien mit modernen Methoden veranlasst werden sollten (Birks et al., 2002).

Erst kürzlich konnte in einer 20-Jahres Follow-up Studie gezeigt werden, dass der Abbau kognitiver Fähigkeiten in nicht dementen Patienten nach Einnahme von EGb 761 langsamer auftrat als nach Einnahme keines Medikaments oder nach Einnahme von Piracetam, einem weiteren Vertreter der Antidementiva (Amieva et al., 2013). Verschiedene Studien belegen eine Wirksamkeit besonders bei beginnender und milder bis moderater Demenz. Man nimmt an, dass die positive Wirkung auf Gedächtnisfunktionen unter anderem an der Verbesserung der Neuroplastizität liegt (Müller et al., 2012). Unter Therapie mit EGb 761 verbesserten sich kognitive Fähigkeiten, Aufmerksamkeit und Vigilanz. Auch die Ergebnisse vier weiterer randomisierter Studien unterstützen die Wirksamkeit von EGb 761 bei altersbedingter vaskulärer Demenz und Alzheimer (Ihl, 2013).

Insbesondere den Flavonoiden wird unterstellt, die wirksame Komponente verschiedener Wirkmechanismen des EGb 761 darzustellen. Im Allgemeinen gelten sie als antioxidativ und antiinflammatorisch.

Quercetin (FLA 269) wirkt neuroprotektiv, indem es beispielsweise die Morphologie von neurodegenerativen Zellen nach Cadmiumexposition verbessert (Kanter et al., 2013). Bei der rheumatoiden Arthritis hemmt FLA 269 die Expression von Cyclooxygenasen (Lee and Kim, 2010) und in der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 vermindert es die Expression verschiedener inflammatorischer Gene, wie z.B. TNF- α , IL-1 β und IL-6 (Boesch-Saadatmandi et al., 2011).

Auch Kaempferol (FLA 270) hat antioxidative Wirkungen gegen den „respiratory burst“ von Neutrophilen in vitro (Zielińska et al., 2000). Zudem besitzt es ebenfalls antiinflammatorische Eigenschaften. So unterdrückt FLA 270 die Expression verschiedener LPS-induzierter Entzündungsparameter wie PGE₂, TNF- α , iNOS und COX-2 durch Herunterregulierung von TLR4, NF- κ B, p38 MAP Kinase, JNK und Akt in mikroglialen BV2 Zellen (Park et al., 2011).

Somit birgt der Ginkgo-Extrakt EGb 761 mit seinen Inhaltsstoffen Potential als ein mögliches Therapeutikum inflammatorischer Erkrankungen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Therapie der Demenzerkrankungen angesichts der alternden Bevölkerung eine zunehmend wichtigere Rolle in der Psychogeriatric spielt.

Bislang orientieren sich die meisten therapeutischen Ansätze von Demenzerkrankungen kausal

an der Neurotransmission (Hensler et al., 2013) oder an der Pathogenese von β -Amyloid-Plaques bei Morbus Alzheimer (Kamynina et al., 2013) im ZNS. Bis dato wurde jedoch noch keine kurative Therapie gefunden. Es ist heute lediglich möglich, die Symptome der Demenzerkrankungen zu mindern.

Ein weiterer wichtiger Ansatz ist daher, der Demenz präventiv zu begegnen, um den Ausbruch der Krankheit zu verhindern oder zumindest zu verzögern und somit sozioökonomische und gesundheitswirtschaftliche Konsequenzen sowie Auswirkungen für den einzelnen abzumildern.

Die Wirkung von EGb 761 auf die Mikrogliaaktivierung als ein wichtiger Faktor bei der Neuroinflammation ist bis heute noch unzureichend erforscht. Interessant ist dabei auch, welcher der verschiedenen Inhaltsstoffe für seine Wirkung verantwortlich ist.

Ginkgo als Extrakt EGb 761 zeigte bislang vielversprechende Auswirkungen auf die Verminderung des Abbaus kognitiver Fähigkeiten von Studienteilnehmern und ist daher einer der Hoffnungsträger der aktuellen Forschung im Bereich der Demenzerkrankungen.

2 Zielsetzung der Arbeit

Entzündungsreaktionen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung neurodegenerativer Demenzerkrankungen. Ganz besonderes Augenmerk liegt dabei auf der Arachidonsäurekaskade und ihrem Endprodukt PGE₂. Das Schrittmacherenzym COX-2 sowie die mPGES-1 oder auch die cPLA2 stellen verschiedene Möglichkeiten von Therapieansätzen dar. Auch die iNOS und ihre NO-Produktion sind bedeutsame Vorgänge bei Entzündungsgeschehen im Körper.

Die Neuroinflammation im ZNS gilt als wichtiges Geschehen in der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen. Im Zentrum steht die Aktivierung von Mikroglia, den ortsständigen Makrophagen im Gehirn. Sie sind die Hauptproduzenten von PGE₂ im ZNS und steuern weitere Entzündungsreaktionen.

Schon seit Langem wird *Ginkgo biloba* in Form von Extrakten, wie z.B. EGb 761, zur Behandlung von Demenzerkrankungen eingesetzt. Die Wirkung von EGb 761 wird kontrovers diskutiert, konnte jedoch in neueren klinischen Studien mit großen Patientenkollektiven für die altersbedingte milde bis moderate Demenz belegt werden. EGb 761 besteht aus mehreren Inhaltsstoffen, von denen vor allem die Flavonglykosiden und Bilobalide für die eigentliche Wirkung des Extraktes verantwortlich gemacht werden. Die Effekte von EGb 761 auf die Mikrogliaaktivierung sind bislang aber noch unzureichend erforscht.

In dieser Arbeit werden die Effekte des Ginkgo-Extraktes EGb 761 und der zwei im Extrakt enthaltenen speziellen Flavonoide FLA 269 und FLA 270 auf die Aktivierung von Rattenmikroglia untersucht.

Dabei wird zunächst getestet, ob sich die Freisetzung von Entzündungsmediatoren (PGE₂, IL-1 β , IL-6, TNF- α , 8-Isoprostan) durch Zugabe von EGb 761, FLA 269 und FLA 270 beeinflussen lässt. Dann werden Auswirkungen auf die Enzyme der Arachidonsäurekaskade (COX-1, COX-2, cPLA2) sowohl auf Protein-, als auch auf mRNA-Ebene untersucht. Auch die NO-Produktion, Proteinsynthese und mRNA-Expression von iNOS wird erforscht. Zu guter Letzt sollen die beteiligten Signaltransduktionswege (p-p38 MAP-Kinase, p-p42/44 MAP-Kinase, p-JNK, p-Akt, I κ B- α) ermittelt werden.

So soll gezeigt werden, ob und in welcher Weise EGb 761 auf die Mikrogliaaktivierung im ZNS und somit auf die Entstehung und das Fortschreiten von neurodegenerativen Erkrankungen Einfluss nehmen kann.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Biochemikalien

Tabelle 3.1: verwendete Chemikalien und Biochemikalien

Substanz	Hersteller	Sitz
Aceton	Merck KGaA	Darmstadt
Ammoniumperoxosulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
Blotting-Grade Blocker	Bio Rad Laboratories	Hercules, CA ,USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe
Dichlor-diphenyl-trichloräthan (DTT)	Bio Rad Laboratories	Hercules, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka Chemie GmbH	Buchs, Schweiz
dNTP	Invitak	Hayward, CA, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco Life Technologies	Erlangen
Essigsäure(100%ig)	Merck KGaA	Darmstadt
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
Glycerin	GE Healthcare	Buckinghamshire, UK
Glycin	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe
HCl	Merck KGaA	Darmstadt
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
Methylenamidbisacrylamid	Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA, USA
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
NaCl	VWR International bvba	Leuven, Belgien
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen

Natrium Orthovanadate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe
Orthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
Penicillin G potassium salt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
PeqGold Protein Marker IV	Peqlab Biotechnologies GmbH	Erlangen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe
Phosphatpuffer w/o Ca ²⁺ und Mg; w/o sodium bicarbonat (PBS)	Gibco Life Technologies	Erlangen
Ponceau S Pulver	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe
Random Primer	Biomers.net	Ulm
Reverse Transkriptase	Promega Corporation	Madison, WI, USA
RNAse Inhibitor	Promega Corporation	Madison, WI, USA
Roti-Block	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe
RT-Puffer	Promega Corporation	Madison, WI, USA
Streptomycin sulfate salt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
Tris/Trizma Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
Trizol Reagenz	Life Technologies	Carlsbad, CA, USA
TWEEN 20	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg
Ultra-Pure Water	Biochrom AG	Berlin
ϵ -Amino-n-Caprone Säure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen

3.1.2 Geräte und Materialien

Tabelle 3.2: verwendete Geräte und Materialien

Gerät/Material	Hersteller	Sitz
96-well Mikrotiterplatte	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim
Biosphere Filter Tips	Sarstedt	Nümbrecht
Blotting-Apparatur	Biometra	Göttingen
Brutschrank	Forma Scientific, Inc.	Marietta, OH, USA
Cell Strainer 70 μ m Nylon	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA

Centrifuge 5415 D/R	Eppendorf	Hamburg
Elektrophoresekammer	Biometra	Göttingen
ELISA-Reader	Dynex Technologies	Chantilly, VA, USA
Feinwaage BP 8100	Sartorius AG	Göttingen
Filterpapier	Schleicher & Schuell	Dassel
Immobilion PVDF-Membran	Millipore	Bedford, USA
Kamera/Entwickler	Vilber Lourmat	Eberhardzell
Lichtmikroskop	Olympus	Hamburg
MicroWin Software Version 3.0	Microtec Laborsysteme GmbH	Overath
Multiwell 24-well Zellkulturplatte	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
Multiwell 6-well Zellkulturplatte	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA
PCR-Cycler	Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA, USA
Pipetten	Eppendorf	Hamburg
Pipetten	Gilson, Inc.	Middleton, GI, USA
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
Primaria Zellkulturschale	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA
Reaktionsgefäße	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen
SDS-PAGE Glasplatten, Kamm	Biometra	Göttingen
Spectrophotometer NanoDrop	Thermo Fisher Scientific Inc.	Langenselbold
Thermoblock	Biometra	Göttingen
Thermomixer	IKA GmbH & Co. KG	Staufen
Tubes	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA
Tumbler	Biometra	Göttingen
Vortexer	IKA GmbH & Co. KG	Staufen
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
Zellkulturflow Hera Safe KS 18	Thermo Fisher Scientific Inc.	Langenselbold

3.1.3 Stimulanzen

Tabelle 3.3: verwendete Stimulanzen

Substanz	Hersteller	Sitz
Arachidonsäure A 8798	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
Flavonoid 269	Schwabe GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Flavonoid 270	Schwabe GmbH & Co. KG	Karlsruhe
<i>Ginkgo biloba</i> Extrakt EGb 761®	Schwabe GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Lipopolysaccharid (LPS) von <i>Salmonella typhimurium</i> SL 1181	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen

3.1.4 Antikörper

Tabelle 3.4: verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller	Sitz
Anti-Akt	Cell Signaling Technology, Inc.	Danvers, MA, USA
Anti-COX-1 (M-20)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Dallas, TX, USA
Anti-COX-2 (M-19)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Dallas, TX, USA
Anti-cPLA2 (N-216)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Dallas, TX, USA
Anti-goat-IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Dallas, TX, USA
Anti-iNOS	Cell Signaling Technology, Inc.	Danvers, MA, USA
Anti- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (C-21)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Dallas, TX, USA
Anti-JNK	Cell Signaling Technology, Inc.	Danvers, MA, USA
Anti-mPGES-1	Agrisera AB	Vännäs, Schweden
Anti-p-38 MAP-Kinase	Cell Signaling Technology, Inc.	Danvers, MA, USA
Anti-p42/44 MAP-Kinase	Cell Signaling Technology, Inc.	Danvers, MA, USA
Anti-p-Akt (Ser473)	Cell Signaling Technology, Inc.	Danvers, MA, USA
Anti-p-JNK (T183/Y185)	Cell Signaling Technology, Inc.	Danvers, MA, USA
Anti-p-p38 MAP-Kinase (T180/Y182)	Cell Signaling Technology, Inc.	Danvers, MA, USA
Anti-p-p42/44 MAP-Kinase (T202/Y204)	Cell Signaling Technology, Inc.	Danvers, MA, USA

Anti-rabbit-IgG-HRP	GE Healthcare UK Limited	Buckinghamshire, UK
Anti- β -actin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen

.....

3.1.5 Nachweissysteme/Kits

Tabelle 3.5: verwendete kommerzielle Nachweissysteme/Kits

Nachweissystem	Hersteller	Sitz
8-Isoprostane EIA Kit	Cayman Chemical	Ann Arbor, USA
BCA Protein Assay Kit	Pierce	Rockford, USA
ECL-Detection Reagent Kit	GE Healthcare	Buckinghamshire, UK
IL-6 Rat ELISA Kit	Invitrogen Corp.	Carlsbad, CA, USA
Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit	Cayman Chemical	Ann Arbor, USA
Prostaglandin E ₂ Enzyme Immunoassay	BIOTREND Chemikalien GmbH	Köln
Rat IL-1 beta Tissue Culture ELISA Ready-SET-Go!	BIOSCIENCE Inc.	Allentown, PA, USA
Rat TNF- α ELISA Kit Ready-SET-Go!	BIOSCIENCE Inc.	Allentown, PA, USA

3.1.6 Primer

Tabelle 3.6: verwendete Primer

Gen	Sequenz	Hersteller	Sitz
Rat-COX-1 (forward)	5'-GCTCTTCAAGGATGGGAAACT-3'	biomers.net GmbH	Ulm
Rat-COX-1 (reverse)	5'-TTCTACGGAAGGTGGGTACAA-3'	biomers.net GmbH	Ulm
Rat-COX-2 (forward)	5'-GGCTTACAAGACGCCACATCACCT-3'	biomers.net GmbH	Ulm

Rat-COX-2 (reverse)	5'-TGGTTTAGGCCGGCCGGGGAT-3'	biomers.net GmbH	Ulm
Rat-cPGES (forward)	5'-TGTCTAATTTTGACCGTTTCTCTG-3'	biomers.net GmbH	Ulm
Rat-cPGES (reverse)	5'-TCATCTGCTCCGTCTACTTCTG-3'	biomers.net GmbH	Ulm
Rat-cPLA2 (forward)	5'-TCTCATTTAACTCTGGGAAGTGC-3'	biomers.net GmbH	Ulm
Rat-cPLA2 (reverse)	5'-CAGCTGCAGGAATTCTCACAC-3'	biomers.net GmbH	Ulm
Rat-GAPDH (forward)	5'-TGGGAAGCTGGTCATCAA-3'	biomers.net GmbH	Ulm
Rat-GAPDH (reverse)	5'-GCATCACCCCATTTTCATCTT-3'	biomers.net GmbH	Ulm
Rat-iNOS (forward)	5'-ACCATGGAGCATCCCAAGT-3'	biomers.net GmbH	Ulm
Rat-iNOS (reverse)	5'-CAGCGCATACCACTTCAGC-3'	biomers.net GmbH	Ulm
Rat-IL-1 β (forward)	5'-TGTGATGAAAGACGGCACAC-3'	biomers.net GmbH	Ulm
Rat IL-1 β (reverse)	5'-CTTCTTCTTTGGGTATTGTTTGG-3'	biomers.net GmbH	Ulm
Rat-IL-6 (forward)	5'-CCTGGAGTTTGTGAAGAACAAC-3'	biomers.net GmbH	Ulm
Rat-IL-6 (reverse)	5'-GGAAGTTGGGGTAGGAAGGA-3'	biomers.net GmbH	Ulm
Rat-mPGES- 1 (forward)	5'-TGCAGCACGCTGCTGGTCAT-3'	biomers.net GmbH	Ulm
Rat-mPGES- 1 (reverse)	5'-GGCAAAGGCCTTCTTCCGCAG-3'	biomers.net GmbH	Ulm

Rat-mPGES- 2 (forward)	5'-AGGAAGGTACCCATCCTGGT-3'	biomers.net GmbH	Ulm
Rat-mPGES- 2 (reverse)	5'-GAGGAGTCATTGAGCTGTTGC-3'	biomers.net GmbH	Ulm
Rat-TNF- α (forward)	5'-TGAACTTCGGGGTGATCG-3'	biomers.net GmbH	Ulm
Rat-TNF- α (reverse)	5'-GGGCTTGTCACCTCGAGTTTT-3'	biomers.net GmbH	Ulm

3.1.7 Zellen

Für die folgenden Experimente wurden primäre kortikale Mikroglia verwendet, die aus Sprague Dawley® Rattengehirnen isoliert wurden. Die Ratten waren maximal 24 Stunden alt und wurden von Charles River Laboratories, Sulzfeld bezogen.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultivierung

3.2.1.1 Medium

Für die Zellkultivierung wurde Dulbecco's modified Earle's Medium (DMEM) von Gibco verwendet. Dieses wurde in 10 L H₂O bidest gelöst und 20 g NaHCO₃, 1 g Penicillin und 1 g Streptomycin zugegeben. Mit etwa 4 ml 37 %-iger Salzsäure wurde anschließend der pH-Wert eingestellt. Die genaue Regulierung übernahm dann der CO₂-Inkubator. Dann wurde das Medium mit Hilfe einer Membranpumpe und eines Druckbehälters über einen autoklavierten Hochdruckfilter steril filtriert und in autoklavierte Flaschen abgefüllt.

Unmittelbar vor Gebrauch wurde 50 ml 10 % fetales Kälberserum (FCS) Gold zum Medium gegeben.

3.2.1.2 Präparation

Alle Präparationsschritte wurden unter der Flow durchgeführt und die Besteckteile nach jedem Schritt in Ethanol gereinigt.

Zuerst wurden die Rattenembryos mit einer großen Schere dekapitiert. Der Schneideweg verlief dabei hinter den Ohren über die Augen hinweg in Richtung Schnauzenspitze. Anschließend wurde die Schädeldecke beginnend vom Foramen magnum seitlich aufgeschnitten und hochgeklappt, sodass das Gehirn frei lag. Dieses wurde dann mit einem Löffelspatel in ein dish mit kalter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) auf Eis gelegt.

Danach wurde sowohl das Mittel- als auch das Stammhirn mit der kleinen Schere durch zwei Schnitte abgetrennt und die übrig gebliebenen Großhirnhemisphären mit dem Löffelspatel in eine neue Schale mit PBS gelegt. Mit einer Dumont-Pinzette wurden die Meningen durch leichte Schüttelbewegungen entfernt und die nun verbleibenden Gehirnteile in eine neue Schale mit PBS gelegt. Im Anschluss daran wurden die Gehirnteile mit dem Skalpell zerkleinert, mit einer blauen Pipettenspitze durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert und durch einen Zellstrainer mit einer Porengröße von 70 µm in ein neues Falcon tube überführt.

Dann erfolgte ein Reinigungsvorgang, der insgesamt drei Mal durchgeführt wurde. Dabei wurde die Suspension mit kaltem Medium ohne FCS aufgefüllt und bei 4 °C und 1000 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, es erfolgte eine erneute Zellresuspension und Zentrifugation, nach der der Überstand verworfen wurde.

Nach dem letzten Verwerfen des Überstandes wurde die gefilterte Zellsuspension in Medium mit FCS resuspendiert. Das Volumen Medium ergibt sich aus der Anzahl der Rattengehirne und liegt bei etwa 60 ml pro Gehirn. Anschließend wurde die Suspension auf dishes verteilt (6 ml/dish). Diese wurden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Nach 2-3 Tagen erfolgte der erste Nährmediumwechsel, danach ungefähr wöchentlich. Nach ca. zwei Wochen befanden sich die Zellen in einem Stadium, welches die Nutzung der Zellen für die Experimente ermöglichte. So wurden die Zellen „geerntet“ und je nach Versuch auf 6-, 24-well Zellkulturplatten oder 10 ml-Kulturflaschen verteilt. Am darauffolgenden Tag erfolgte noch ein letzter Kulturmediumswechsel, wonach die Zellen dann ca. eine Stunde später bereit für eine Stimulation waren.

Mit der angewandten Technik lässt sich eine Mikroglia-Reinheit von etwa 98 % erzielen.

3.2.1.3 Zellstimulation

Die Stimulation wurde mit drei unterschiedlichen Substanzen durchgeführt, um die vermuteten Auswirkungen auf Entzündungsvorgänge in Mikroglia zu untersuchen.

Bei jeder Stimulation wurden sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle angelegt.

Als Negativkontrolle diente ein well, zu dem keine Stimulantien hinzugegeben wurden. So sollten der Nativzustand der Zellen und eventuelle Kontaminationen aufgedeckt werden. Als Positivkontrolle wurde ein well verwendet, dessen Zellen mit LPS stimuliert wurde. Zu beiden Kontrollen wurde jeweils zusätzlich die in den Stimulantien maximal enthaltene Menge an dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) gegeben, um eventuelle Interaktionen oder Viabilitätsminderungen durch das selbige auszuschließen.

Als Stimulanzien wurden der *Ginkgo biloba* Extrakt 761 und die beiden Flavonoide 269 und 270, die unter anderem im *Ginkgo biloba* Extrakt enthalten sind, verwendet. Diese wurden in aufsteigenden Konzentrationen (1 µg/ml bis 500 µg/ml) eine halbe Stunde mit den Zellen inkubiert. Dabei wurde EGb 761 in Konzentrationen von 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml und 500 µg/ml und die beiden Flavonoide jeweils in Konzentrationen von 1 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml verwendet. Die Substanzen waren in DMSO gelöst.

Nach einer halben Stunde Inkubation wurde LPS in einer Konzentration von 10 ng/ml pro well hinzugegeben, um Entzündungsreaktionen in den Zellen zu induzieren. Die Negativkontrolle wurde hierbei ausgespart.

Je nach Versuch lag die Inkubationszeit nach der Zugabe von LPS im Bereich von 15 Minuten

bis 24 Stunden.

Nach der Inkubationszeit wurden die Überstände aus 6- oder 24-well Platten für die Enzymimmuno-Assays und den kolorimetrischen Test in Eppendorf Cups gesammelt und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Für einen nachfolgenden Western Blot oder eine q-PCR-Analyse wurde das Medium abgesaugt und die 6-well-Platten oder Flaschen mit kaltem, sterilen PBS gewaschen, um die Stimulation zu beenden. Das PBS wurde dann wiederum entfernt und die Zellen bis zur weiteren Nutzung bei -80 °C gelagert.

3.2.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist ein sehr präzises, zum quantitativen Nachweis von Proteinen geeignetes, immuntechnisches Verfahren. Dabei wird eine Antigen-Antikörper-Wechselwirkung mit einer enzymatischen Farbreaktion nachgewiesen. In dieser Arbeit wird der sogenannte Sandwich-ELISA durchgeführt, mit dem IL-1 β , IL-6 und TNF- α nachgewiesen werden. Die verschiedenen Testreihen wurden jeweils mit unterschiedlichen Kits (s. 3.1.6 Nachweissysteme/Kits) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Der Sandwich-ELISA, auch two-antibody-test genannt, wird verwendet, wenn man aus einem umfangreichen Proteingemisch nur ein ganz bestimmtes Protein detektieren möchte. Hierzu werden zwei Antikörper benutzt, die gegen dasselbe Antigen gerichtet sind, jedoch unterschiedliche Epitope besitzen. Ein Antikörper ist mit einem Enzym markiert, in diesem Fall mit Meerrettichperoxidase. Zu Beginn des Versuches wurden die Proben vorbereitet und ggf. verdünnt. Dann wurden die Proben mit dem nachzuweisenden Antigen neben einer Standardreihe auf eine mit dem ersten Antikörper vorgecoateten 96-well Mikrotiterplatte pipettiert. Die Inkubationszeit betrug ca. zwei Stunden bei 37 °C. Während dieser Zeit binden die Antikörper an das nachzuweisende Antigen. Durch anschließendes mehrmaliges Waschen wurden alle ungebundenen Antigene entfernt. Im nächsten Schritt wurde der zweite Antikörper hinzugegeben, der an das Reporterenzym Meerrettichperoxidase (HRP, von engl.: horseradish peroxidase) gekoppelt ist. Auch dieser bindet während einer Inkubationsphase an das gesuchte Antigen und es bildet sich ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Durch erneutes Waschen wurde überschüssiger Detektionsantikörper entfernt. Dann folgte die Zugabe des Substrates für die HRP, hier Tetramethylbenzidin (TMB). Dieses wird von der HRP unter Verbrauch von Wasserstoffperoxid zu einem blauen Endprodukt umgewandelt. Um

die Reaktion zu stoppen, wurde Stopp-lösung (enthält Schwefelsäure) hinzugegeben. Hierdurch bildet sich ein stabiler gelber Farbkomplex. Die Konzentration des Farbkomplexes in den Proben kann nach dem Lambert-Beer-Gesetz photometrisch bei 450 nm nach Ermitteln der Standardkurve gemessen werden und verhält sich linear zur Antigenkonzentration.

3.2.3 Enzymimmunoassay (EIA)

Die quantitative Messung von PGE₂ und 8-Isoprostan erfolgte mittels EIA mit verschiedenen Kits (s. 3.1.6), den Herstellerangaben wurde Folge geleistet. Generell funktioniert dieser Test nach dem kompetitiven Prinzip mit anschließender enzymatischer Farbreaktion und Extinktionsmessung. Beispielhaft soll hier der Test für PGE₂ beschrieben werden.

Verwendet wurde eine 96-well Mikrotiterplatte, die bereits durch den Kit-Hersteller mit Antikörpern gegen den Fc-Teil von Maus IgG gecoatet war.

Die Proben wurden abhängig von Zellmenge und -art verschieden stark verdünnt. Außerdem wurde mittels Proben mit bereits bekannten Konzentrationen von PGE₂ eine Standardreihe im Duplikat angelegt, an deren Standardkurve später die Proben gemessen wurden.

Nachdem die Proben und der Standard pipettiert worden waren, wurde in alle wells ein PGE₂-Peroxidase-Konjugat hinzugegeben, welches mit dem vorhandenen PGE₂ in den Proben um die Bindung des Antikörpers konkurriert. Je mehr PGE₂ in den Proben vorhanden ist, desto mehr Antikörper kann auch gebunden werden. Die Bindungsreaktion wurde durch Zugabe von monoklonalem PGE₂-Antikörper initiiert. Dieser Antigen-Antikörper-Komplex wird nun wiederum von den auf der Platte gecoateten Antikörpern gebunden und somit auf der Platte gehalten.

Nach zwei Stunden Inkubation auf dem Schüttler bei Raumtemperatur wurde die Platte vier Mal mit Puffer gewaschen und ein Substrat hinzugegeben, welches mit der PGE₂-Peroxidase reagiert und in ein farbiges Produkt umgesetzt wird. Es folgten weitere 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und anschließend das Beenden der Reaktion mit Stopp-lösung.

In einem ELISA-Reader wurde dann die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und mit Hilfe von der Software MicroWin Version 3.0 und der Standardkurve die PGE₂-Menge in den Proben bestimmt.

Normalerweise ist die gemessene Enzymaktivität umgekehrt proportional zur Menge des zu bestimmenden Antigens in der Probe, hier PGE₂. Das bedeutet, dass je mehr PGE₂ in der

Probe vorhanden ist, desto weniger PGE₂-Peroxidase an den Antikörper binden kann und damit während des Waschens von der Platte entfernt wird. Somit kann auch weniger Substrat umgesetzt werden und die Farbreaktion fällt geringer aus.

Die Sensitivität des Tests wurde vom Hersteller mit 29,1 pg/ml, das Detektionslimit mit 9,86 pg/ml angegeben.

3.2.4 Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay

Die Bestimmung von NO erfolgte kolorimetrisch mit dem Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit des Herstellers Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan.

Die gesamte Konzentration von NO lässt sich aus der Bestimmung von Nitrat oder Nitrit ermitteln. Der Ansatz dieses Tests beruht auf zwei Schritten. Als erstes wird Nitrat durch Nitratreduktase zu Nitrit reduziert. Anschließend wird durch Zugabe eines Reagenz die Umwandlung von Nitrit in ein lila gefärbtes Gemisch erreicht, dessen Absorption dann in einem plate reader gemessen wird.

Die Proben wurden auf eine 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert.

Als erstes wurden die Proben vorbereitet. In jedes well der Platte wurde erst Wasser/Assay Buffer und dann je 80 µl Probe pipettiert. Eine Probenreihe wurde jeweils im Triplikat angelegt. Außerdem wurde eine Standardreihe pipettiert. Als nächstes wurde ein Enzym-Cofaktor- und Nitrat-Reduktase-Mix hinzugegeben, um die Konversion von Nitrat zu Nitrit zu starten. Die Platte wurde abgedeckt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurde im Kit mit geliefertes Griess Reagenz 1 und 2 hinzugegeben, welche mit Nitrit zu einem lila Azo-Produkt reagieren. Die Griess Reagenzien enthalten N-(1-Naphthyl)ethylenediamine, NADPH und ein enzymatisches Recyclingsystem, das zu NADP⁺ verbrauchtes NADPH wiederherstellt. Dieses System ist nötig, da ein zu hoher Anteil von NADPH mit dem Griess Reagenz interferiert. Durch das Recyclen von NADP⁺ kann so der Anteil von NADPH, der für die chemische Reaktion notwendig ist, gering gehalten werden.

Nach zehn Minuten Farbentwicklung bei Raumtemperatur wurde die Absorption der Proben in einem plate reader je nach Gerät bei 540 oder 550 nm gemessen und mit Hilfe der Standardkurve die Konzentration von NO in den Proben bestimmt. Größere Absorption bedeutet auch eine höhere NO-Konzentration.

Bei Nutzung der maximalen Probenmenge (80 µl) wurde das Detektionslimit vom Hersteller bei 2,5 µM angegeben.

3.2.5 Western-Blot-Analyse: Probenvorbereitung

3.2.5.1 Lyse der Zellen

Die Proben für anschließende Western Blot Analysen wurden aus den nach der Zellstimulation eingefrorenen 6-well-Platten/Flaschen gewonnen. Die Freisetzung von Zellbestandteilen wurde bereits durch das Einfrieren auf -80 °C herbeigeführt. Die Zugabe von Lysispuffer nach dem Auftauen verstärkte dies noch einmal.

Lysispuffer (für 40 ml):

- 3,36 ml 42 mM Tris-HCl
- 5,2 ml 10 % SDS

- 40 µl 100 mM Orthovanadat
- 28,8 ml H₂O dest.

Direkt vor der Verwendung wurde dem Lysispuffer Phosphataseinhibitor im Verhältnis 100:1 und Proteaseinhibitor (PMSF) im Verhältnis 1000:1 zugesetzt. Der Lysispuffer wurde mit einem Zellschaber gleichmäßig auf jedem well verteilt und der Zellrasen mehrere Minuten abgekratzt.

Die entstandene Suspension wurde dann in ein beschriftetes 1,5 ml Eppendorf Cup überführt und durch Auf- und Abziehen mit der Pipettenspitze homogenisiert. Schließlich wurden die Proben ca. 5 Minuten auf 90 °C im Heizblock erwärmt.

3.2.5.2 Proteinbestimmung

In den gewonnenen Proben muss die Proteinkonzentration bekannt sein, um die Gelelektrophorese mit jeweils äquivalenten Mengen an Protein durchführen zu können und den Intensitätsvergleich zwischen den einzelnen Banden beim Western Blot zu ermöglichen.

Dazu wurde das BCA Assay Kit verwendet; den Herstellerangaben wurde Folge geleistet.

Das Prinzip des Kits beruht auf der Biuretreaktion, mit der man Peptidbindungen nachweist. Nach Zugabe von alkalischer Lösung bilden Peptidbindungen mit Cu²⁺ einen Komplex. Dabei kann ein blauer Farbumschlag beobachtet werden (Biuretreaktion). Im zweiten Schritt reagiert die BCA-Lösung mit dem reduzierten Kupferion, sodass je zwei BCA-Moleküle mit einem Kupferion einen Komplex bilden, was durch einen lila Farbumschlag sichtbar wird.

Zur Versuchsdurchführung wurde zunächst 200 µl BCA-Lösung in die benötigten wells einer 96-well Mikrotiterplatte je vorgelegt. Dann wurden zwei Standardreihen pipettiert, um eine Referenzkurve zu erstellen. Hierfür wurde im Kit enthaltenes Bovine Serum Albumine (BSA) verwendet und 10 µl Lysispuffer in jedes well mit Standard hinzugefügt.

In die restlichen wells wurden je 10 µl der zu bestimmenden Probe gegeben.

Anschließend wurde die Platte mit Parafilm abgedeckt und 30 Minuten unter leichtem Schütteln bei 95 °C auf einem Heizblock inkubiert. Danach konnte die Extinktion bei 560 nm in einem ELISA-Reader gemessen und der Proteingehalt der Proben anhand der Standardkurve bestimmt werden.

3.2.6 Western-Blot-Analyse: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

3.2.6.1 Gießen des Acrylamid-Gels

Das Gießen eines Acrylamid-Gels gehört zur Vorbereitung der Gelelektrophorese für den anschließenden Western-Blot. Es wurden je nach Molekulargewicht der zu detektierenden Proteine Gele mit 10 oder 12 % Methylenbisacrylamid-Anteil verwendet.

Zunächst wurde das Trenngel hergestellt, welches sich zusammenstellt aus:

Trenngel 10 %:	1,83 ml 30 % Acrylamid-0,8 %-Bisacrylamid
	2,2 ml 2,5 x Trenngel-Puffer
	1,47 ml H ₂ O dest.
	5 µl TEMED
	25 µl 10 % APS

Trenngel 12 %:	2,2 ml 30 % Acrylamid-0,8 %-Bisacrylamid
	2,2 ml 2,5 x Trenngel-Puffer
	1,1 ml H ₂ O dest.
	5 µl TEMED
	25 µl 10 % APS

4 x Trenngelpuffer (1 L):	181,65 g 1,5 M Tris/TRIZMA
	4 g 0,4 % SDS

3.2.7 Western-Blot Analyse: Durchführung des Western Blots

3.2.7.1 Blotting

Der Western Blot ermöglicht einen Transfer von Proteinen in einem Gelelektrophorese-Gel auf eine Membran, auf der diese dann später durch immunochemische Verfahren nachgewiesen werden können.

Für das Blotting wurden 15 Filterpapiere (9 cm x 6 cm) benötigt, ebenso wie eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran derselben Größe. Die hydrophobe Membran wurde vor Verwendung für 1 Minute in Methanol und anschließend in destilliertes Wasser gelegt, um sie zu äquilibrieren.

Mit Hilfe des Semi-Dry-Verfahrens wurden sechs Filterpapiere, die in Anodenpuffer I getränkt worden waren, und danach drei in Anodenpuffer II getränkte Filterpapiere auf die Anodenplatte der Blotting-Apparatur geschichtet.

Anodenpuffer I pH 10,4: 1,5 M Tris/TRIZMA
 6 M HCl zur pH-Einstellung
 H₂O dest.

Anodenpuffer II pH 10,4: 0,25 M Tris/TRIZMA
 6 M HCl zur pH-Einstellung
 H₂O dest.

Kathodenpuffer pH 9,4: 0,4 M Amino-n-caproic acid
 H₂O dest.
 10 x Anodenpuffer I zur pH-Einstellung

Dann wurden die Glasplatten mit einem Spatel vorsichtig voneinander getrennt und das Gel herausgenommen. Das Sammelgel wurde abgetrennt und verworfen und das Trenngel mit der Membran auf die geschichteten Filterpapiere gelegt. Darüber wurden noch einmal sechs in Kathodenpuffer I getränkte Filterpapiere geschichtet. Mit einem Plastikroller wurden einzeln vorhandene Luftblasen entfernt, um ein Artefakt-freies Blotting zu ermöglichen. Die Blottingapparatur wurde mit der Kathodenplatte verschlossen und der Blot 1 h bei 7 W und 130 mA durchgeführt.

Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist, für 1 h bei langsamem Schütteln mit der Membran inkubiert. Auch der zweite Antikörper wurde mit 1 % BSA in TBS-T gelöst. Darauf folgten wiederum 3 Waschvorgänge von jeweils 10 Minuten, um überschüssigen, nicht gebundenen Antikörper zu entfernen.

Die nun folgende Detektion der Proteine wurde mit einem Elektrochemolumineszenz (ECL)-Mix der Firma Amersham durchgeführt. Hierzu wurde zunächst die Detektionslösung aus dem Reagenz 1 und 2 im Verhältnis 1:1 hergestellt.

Die Membran wurde für etwa 1 Minute mit der Detektionslösung benetzt und in Klarsichtfolie gelegt. In einer Dunkelkammer konnte dann die Entwicklung der Membran stattfinden. Dazu wurde die Belichtungszeit an die jeweilige Signalintensität angepasst.

Die Lagerung der Membran nach allen Detektionsvorgängen erfolgte eingeschweißt in 1 x TBS im Kühlschrank bei -20 °C.

3.2.8 Membran-Stripping

Das Stripping stellt eine Möglichkeit dar, die Membranen für die Detektion mehrerer Proteine wiederzuverwenden. Hierbei werden die gebundenen Antikörper entfernt, sodass der Versuchshergang ab dem Blockvorgang neu begonnen werden kann.

Verwendet wurde ein Glycin-Stripping-Puffer, mit dem die Membran für 25 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler gewaschen wurde.

Glycin-Stripping-Puffer:	30 g Glycin 0,2 M
(0,2 M für 2 L)	H ₂ O dest. auf 1,6 L aufgefüllt
	6 M HCl zur pH-Einstellung
	ad 2 L H ₂ O dest.
	2 g SDS

Im Anschluss folgten wiederum drei 10-minütige Waschvorgänge mit TBS-T, bevor die Membran dann geblockt und wiederverwendet werden konnte.

3.2.9 Densitometrische Quantifizierung

Die Auswertung der entwickelten Membranbanden erfolgte mittels densitometrischer Quantifizierung mit Hilfe des Software Image J am Computer. Die ermittelten Werte wurden mit einer Kontrolle, hier β -actin (42 kDa), standardisiert, um Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

3.2.10 RNA-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi und cDNA-Synthese

Die RNA-Isolation ist ein wichtiger Vorbereitungsschritt für eine anschließende Synthese der komplementären DNA (cDNA) und quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (q-PCR) Analyse. Mit diesen Methoden lässt sich die aktuelle Stoffwechselsituation einer Zelle sehr genau rekonstruieren, da nur die Gene, die gerade transkribiert werden auch in der Zelle als RNA vorliegen und nur diese dann später mit der PCR nachgewiesen werden können.

Für die Isolation wurde das spezielle Reagenz Trizol verwendet, welches Guanidiniumthiozyanat enthält. Dieses lysiert die Zellen und inaktiviert gleichzeitig RNAsen und andere Enzyme. Auf dieser Tatsache beruht die hier angewandte sogenannte „single-step“-Methode nach Chomczynski und Sacchi.

Die Zellen wurden mit 500 μ l Trizol Reagenz pro well für 5 Minuten inkubiert und nach leichtem Abkratzen in 1,5 ml Eppendorf Cups überführt. Dann wurden 100 μ l Chloroform in jeden Cup gegeben, diese geschüttelt und für 15 Minuten bei höchster Geschwindigkeit und 4 °C zentrifugiert. Hiernach waren drei Phasen sichtbar: eine untere rosa Phase mit Proteinen, eine mittlere weißliche mit DNA und eine obere wässrige mit RNA. Die obere Phase wurde vorsichtig abpipettiert und etwa die gleiche Menge an Isopropanol hinzugegeben (etwa 250 μ l). Dann wurde erneut für 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, um die RNA auszufällen.

Der entstandene Überstand wurde abgegossen und 250 μ l 70 %-iges Ethanol übergeschichtet. Die Eppendorf Cups wurden gevortext, um das RNA-Pellet erneut in Ethanol zu lösen. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt, hier jedoch der Rest des Überstandes abpipettiert und das Pellet im Speed Vac ca. 5 Minuten getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 30 μ l Ultra-Pure Water gelöst und die Eppendorf Cups für 5 Minuten bei 65 °C auf den Heizblock gestellt.

Anschließend wurde die RNA-Konzentration der Proben mit Hilfe des Spectrophotometers

NANO Drop gemessen und dann festgelegt, wie hoch die cDNA-Konzentration sein sollte. Anhand dieser wurden dann die benötigten Volumina an Wasser und RNA für die cDNA-Synthese berechnet. Jede Probe wurde mindestens zwei Mal gemessen, um Fehler zu minimieren.

Für die Synthese der cDNA wurde die berechneten Volumina an H₂O dest, RNA und Random Primer zusammenpipettiert, durchmischt und zentrifugiert. Dann wurden die Proben für 10 Minuten bei 70 °C und 5 Minuten bei 4 °C auf den Heizblock gestellt.

In der Zwischenzeit wurde der Master-Mix zusammenpipettiert, der sich wie folgt zusammenstellte:

Master-Mix (für 1 Sample):

- 5 µl RT-Puffer
- 1 µl dNTP
- 1 µl Reverse Transkriptase
- 0,7 µl RNase Inhibitor
- 2,3 µl H₂O dest.

Das Hinzufügen von Reverse Transkriptase und RNase Inhibitor erfolgte direkt am Gefrierfach, der Rest wurde auf Eis pipettiert. Der Mix wurde durchmischt und jeweils 10 µl zu den Proben hinzugegeben. Anschließend erfolgten verschiedene Zyklen auf dem Heizblock:

- 10 Minuten bei 22 °C
- 60 Minuten bei 37 °C
- 5 Minuten bei 95 °C
- 4 Minuten oder über Nacht bei 4 °C.

Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA dann bei -20 °C im Kühlschrank gelagert.

3.2.11 Real-Time quantitative Polymerase-Chain-Reaction (q-PCR)

Die q-PCR ist eine auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Ketten-Reaktion basierende Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die darüber hinaus eine quantitative

Analyse erlaubt. Diese wird ermöglicht durch Fluoreszenzmessung eines in die DNA interkalierenden Farbstoffes, in diesem Fall sogenanntes SYBR Green. Die Bindung an die doppelsträngige DNA verstärkt die Fluoreszenz, sodass die Zunahme der Ziel-DNA mit dem Anstieg an Fluoreszenz korreliert.

Zunächst wurde der Master-Mix für die einzelnen nachzuweisenden Gene angefertigt:

Master Mix (für 1 Sample):	7,5 µl SYBR Green
	0,225 µl Forward Primer
	0,225 µl Reverse Primer
	4,05 µl H ₂ O

Dann wurden auf einer 96-well Mikrotiterplatte die Reihen für die unterschiedlichen Gene jeweils im Duplikat angelegt, in jedes well wurden 12 µl Master-Mix vorgelegt.

Die cDNA wurde im Verhältnis 1:3 mit Ultra-Pure Water verdünnt und je 3 µl in die wells der Platte zum Master-Mix pipettiert. Die Platte wurde mit einer Wachsfolie versiegelt und vor dem Start der q-PCR 1 Minute bei 1000 rpm zentrifugiert. Die q-PCR wurde dann mit einem Reader von BIORad und der dazugehörigen Software durchgeführt.

3.2.12 Statistische Analyse

Jedes Experiment wurde mindestens drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Zellen stammten von jeweils unterschiedlichen Kulturen. Die Daten wurden in Prozent der Positivkontrolle (Stimulation mit LPS 10 ng/ml) angegeben und die Mittelwerte berechnet. Mit Hilfe der Software GraphPad Prism® Version 5.01 wurden sowohl Standardabweichung und Varianz, als auch das statistische Signifikanzniveau mittels One-way-ANOVA und Tukey-Test ermittelt. Dieses wurde je nach Experiment zwischen $p > 0,05$ und $p < 0,001$ angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Effekte von EGb 761, FLA 269 und FLA 270 auf die Synthese von Entzündungsmediatoren in Mikroglia

4.1.1 Effekte von EGb 761, FLA 269 und FLA 270 auf die PGE₂-Freisetzung

Da PGE₂ ein wichtiger Entzündungsmediator in Zellen ist, wurde mittels EIA untersucht, ob EGb 761 und seine beiden Inhaltsstoffe FLA 269 und FLA 270 Einfluss auf die Freisetzung desselbigen haben. Hierzu wurden primäre Mikroglia auf 6-well Platten kultiviert und 24h mit aufsteigenden Konzentrationen von EGb 761 (10, 100, 250, 500 µg/ml), FLA 269 und FLA 270 (je 1, 10, 50, 100 µg/ml) stimuliert. Ein well blieb dabei stets unstimuliert und diente als Negativkontrolle, ein weiteres well wurde mit LPS (10 ng/ml) behandelt und diente als Positivkontrolle. Da die Stimulanzen in 100% DMSO gelöst waren, wurde sowohl zur Positiv- als auch zur Negativkontrolle die maximale jeweils in den Stimulanzen enthaltene Menge an 100% DMSO hinzugegeben (EGb 761: 10 µl DMSO, FLA 269 und FLA 270: 2µl DMSO). So konnte ausgeschlossen werden, dass das Lösungsmittel zusätzliche Effekte auf die Mikrogliazellen hatte. Nach Ende der Stimulationszeit wurde der Zellüberstand abpipettiert und das freigesetzte PGE₂ mittels EIA bestimmt. Die Experimente wurden mehrmals unabhängig voneinander wiederholt (EGb 761 n=6, FLA 269 und FLA 270 je n=2). Die Positivkontrolle zeigte jeweils eine starke Induktion der PGE₂-Synthese durch LPS. EGb 761 hemmte die PGE₂-Freisetzung (Abb. 4.1 A). Es schien so, als ob ab einer Konzentration von 100 µg/ml Dosissteigerungen von EGb 761 zu keiner weiteren Hemmung der PGE₂-Freisetzung führten. Das Signifikanzniveau wurde durch einen One-way-ANOVA und Tukey-Test ermittelt und lag bei p<0.001.

Eine Stimulation mit FLA 269 und FLA 270 hingegen führte zu keinem Effekt (Abb. 4.1 B und 4.1 C).

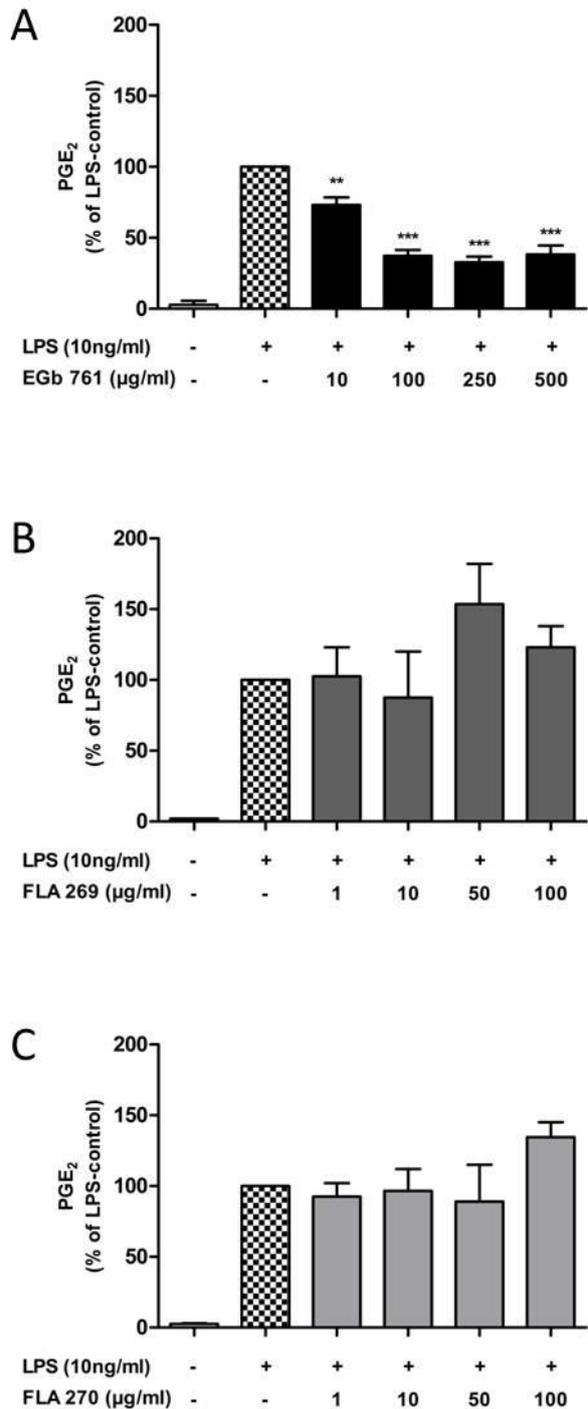


Abbildung 4.1: Hemmung der PGE₂-Synthese durch EGb 761, kein Effekt durch FLA 269 und FLA 270

PGE₂-Messungen mittels EIA nach 24h Stimulation ohne (Negativkontrolle, jeweils 1. Balken von links) oder mit LPS (10 ng/ml, Positivkontrolle, jeweils 2. Balken von links) und (A) LPS und EGb 761 (10, 100, 250, 500 µg/ml) n=6, (B) LPS und FLA 269 (1, 10, 50, 100 µg/ml) n=2, (C) LPS und FLA 270 (1, 10, 50, 100 µg/ml) n=2.

Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen. Werte in % der LPS-Kontrolle. Statistische Signifikanz nach One-way-ANOVA und Tukey-Post-hoc-Test mit **: p<0,01 und ***: p<0,001 gegen die mit LPS stimulierte Positivkontrolle.

4.1.2 Effekte von EGb 761, FLA 269 und FLA 270 auf die NO-Produktion in Mikroglia

Wie auch PGE₂ stellt NO einen wichtigen Faktor für Inflammationsprozesse dar. Es vermittelt Vasodilatation und führt in erhöhter Konzentration durch Radikalbildung zu einer Schädigung von DNA.

Daher wurde untersucht, ob sich die NO-Produktion durch die Stoffe EGb 761, FLA 269 oder FLA 270 beeinflussen lässt.

Hierzu wurden ebenfalls primäre Mikroglia auf 6-well Platten kultiviert und 24h mit aufsteigenden Konzentrationen von EGb 761 (10, 100, 250, 500 µg/ml), FLA 269 und FLA 270 (je 1, 10, 50, 100 µg/ml) stimuliert. Ein well blieb dabei stets unstimuliert und diente als Negativkontrolle, ein weiteres well wurde mit LPS (10 ng/ml) behandelt und diente als Positivkontrolle. Wieder wurde DMSO zu beiden Kontrollen hinzugegeben. Anschließend wurde die NO-Konzentration mit Hilfe eines kolorimetrischen Tests der Firma Cayman ermittelt. Die Experimente wurden mindesten drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt. LPS-Zugabe bewirkte in allen drei Versuchsreihen eine starke Induktion der basalen NO-Produktionsrate. Es zeigte sich, dass die Zugabe von EGb 761 eine dosisabhängige Senkung des NO-Spiegels bewirkte. Dieser Effekt war mit $p < 0.001$ statistisch hoch signifikant (Abb. 4.2 A).

Eine Stimulation mit FLA 269 und FLA 270 zeigte keine Veränderung der LPS-induzierten NO-Freisetzung (Abb. 4.2 B, C).

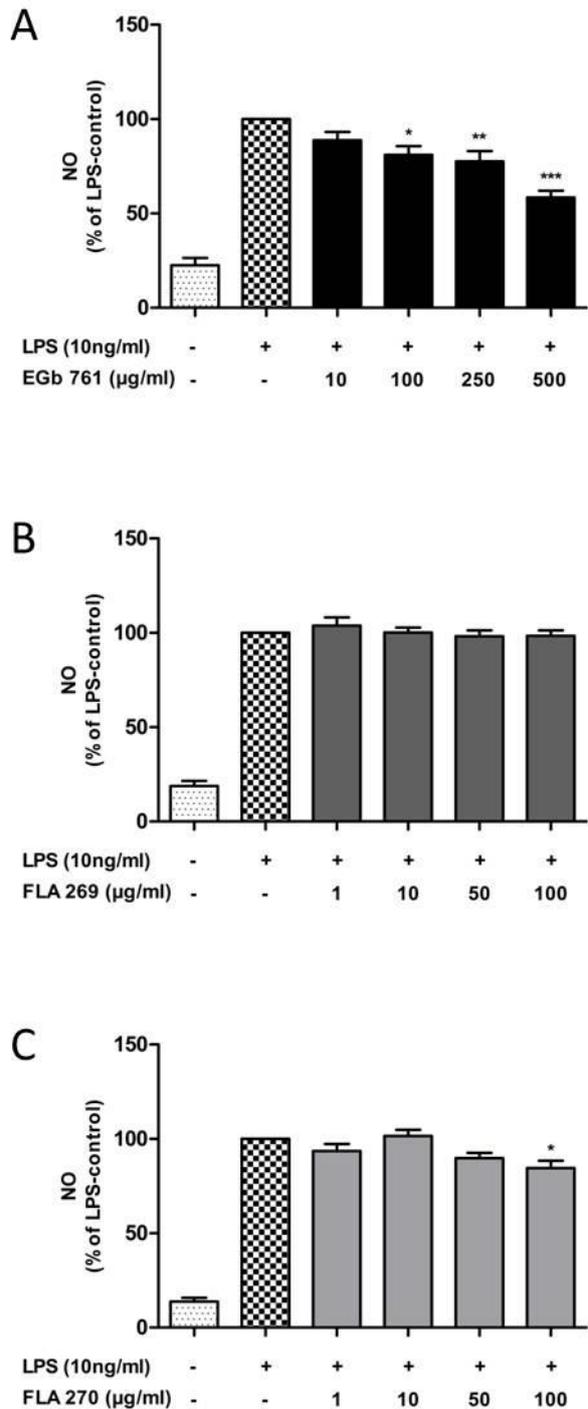


Abbildung 4.2: Inhibition der NO-Freisetzung durch EGb 761, kein Effekt durch FLA 269 und FLA 270

NO-Freisetzung ermittelt durch kolorimetrischen Test nach 24h Stimulation ohne (Negativkontrolle, jeweils 1. Balken von links) oder mit LPS (10 ng/ml, Positivkontrolle, jeweils 2. Balken von links) und (A) LPS und EGb 761 (10, 100, 250, 500 µg/ml) n=8, (B) LPS und FLA 269 (1, 10, 50, 100 µg/ml) n=5, (C) LPS und FLA 270 (1, 10, 50, 100 µg/ml) n=3.

Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen. Werte in % der LPS-Kontrolle. Statistische Signifikanz nach One-way-ANOVA und Tukey-Post-hoc-Test mit *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001 gegen die mit LPS stimulierte Positivkontrolle.

4.1.3 Effekte von EGb 761, FLA 269 und FLA 270 auf die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α

4.1.3.1 Effekte von EGb 761

Um die Zytokinkonzentrationen zu ermitteln, wurden die Mikroglia wie bei den Messungen von PGE₂ und NO stimuliert (s. 4.1 und 4.2). Nach Gewinnung der Überstände wurden dann ELISAs für IL-1 β , IL-6 und TNF- α durchgeführt.

Es stellte sich heraus, dass EGb 761 die LPS-induzierte Produktion von allen drei untersuchten Zytokinen dosisabhängig hemmte (Abb. 4.3). Bei der Produktion von IL-1 β war dies am deutlichsten zu sehen. Hier konnte eine Hemmung auf unter 40 % verglichen mit der Positivkontrolle verzeichnet werden, aber auch die Reduktion von IL-6 und TNF- α um mindestens ein Drittel der Positivkontrolle konnte nachgewiesen werden. Die statistische Analyse nach One-way-ANOVA und Tukey-Test zeigte statistische Signifikanz mit $p < 0,05$, $p < 0,01$ und $p < 0,001$.

4.1.3.2 Effekte von FLA 269 und FLA 270

Als nächstes war von Interesse, ob die gefundenen Auswirkungen des EGb 761 auch mit den Einzelstoffen FLA 269 und FLA 270 zu finden und eventuell sogar auf diese zurückzuführen waren.

Dazu wurde die Experimente analog dem Protokoll des Versuches mit EGb 761 durchgeführt, allerdings mit veränderten Stimulationskonzentrationen: FLA 269 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ und FLA 270 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$.

Die Abbildungen 4.4 und 4.5 zeigen die Ergebnisse. Weder FLA 269 noch FLA 270 hatte Auswirkungen auf die LPS-induzierte Synthese von IL-1 β , IL-6 und TNF- α .

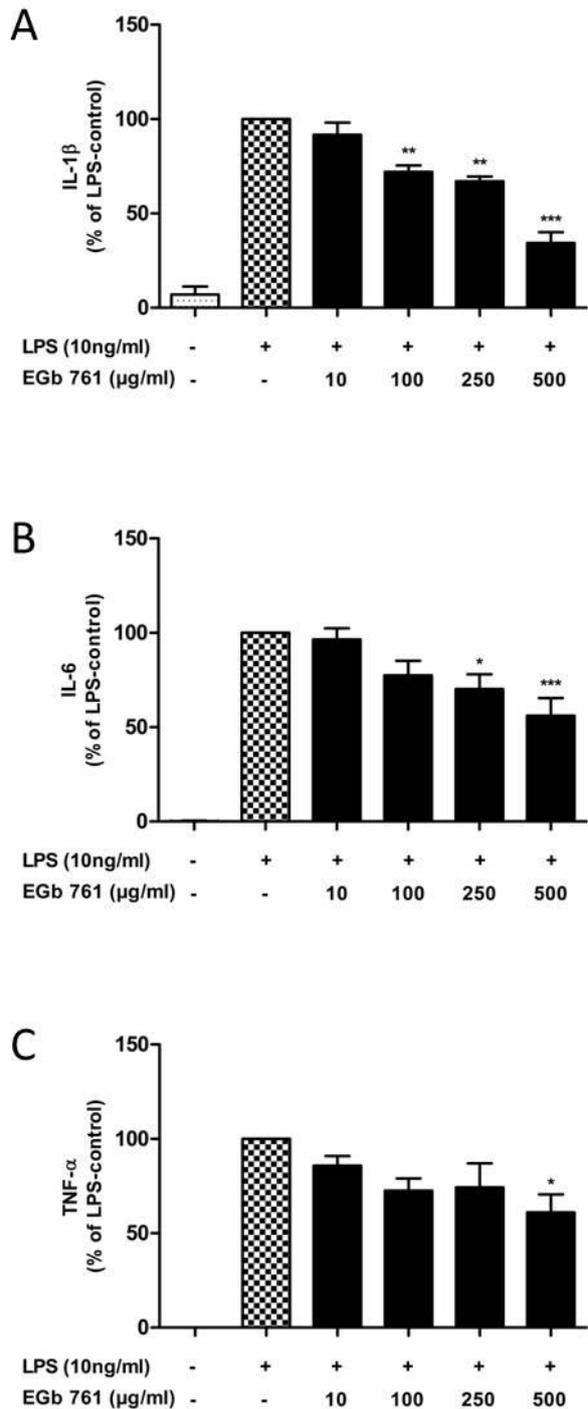


Abbildung 4.3: Konzentrationsabhängige Hemmung der Zytokinproduktion durch EGb 761

(A) IL-1 β -Konzentration ermittelt durch ELISA nach 24h Stimulation ohne (Negativkontrolle, jeweils 1. Balken von links) oder mit LPS (10 ng/ml, Positivkontrolle, jeweils 2. Balken von links) und LPS und EGb 761 (10, 100, 250, 500 µg/ml) n=3, (B) IL-6-Konzentration ermittelt durch ELISA nach 24h-Stimulation (s. Abb. 4.3 A) n=5, (C) TNF- α -Konzentration ermittelt durch ELISA nach 24h-Stimulation (s. Abb. 4.3. A) n=4.

Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen. Werte in % der LPS-Kontrolle. Statistische Signifikanz nach One-way-ANOVA und Tukey-Post-hoc-Test mit *: p<0,05, **: p<0,01 und ***: p<0,001 gegen die mit LPS stimulierte Positivkontrolle.

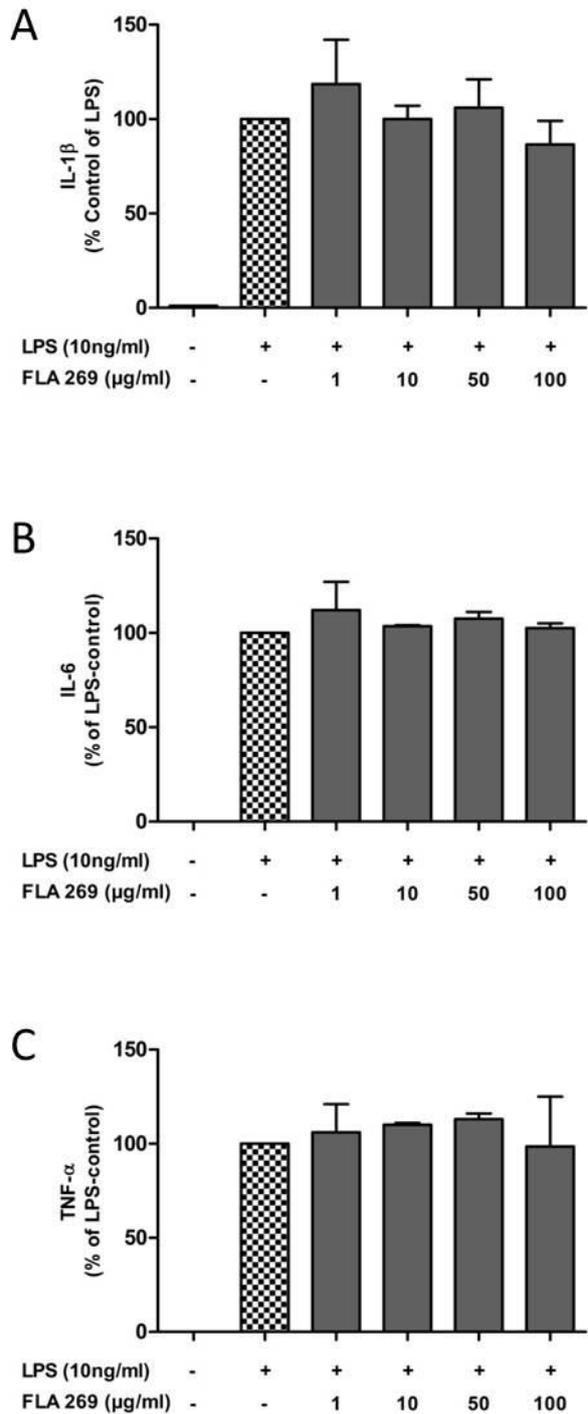


Abbildung 4.4: Keine Hemmung der Zytokinproduktion durch FLA 269

(A) IL-1 β -Konzentration ermittelt durch ELISA nach 24h Stimulation ohne (Negativkontrolle, jeweils 1. Balken von links) oder mit LPS (10 ng/ml, Positivkontrolle, jeweils 2. Balken von links) und LPS und FLA 269 (1, 10, 50, 100 μ g/ml) $n=2$, (B) IL-6-Konzentration ermittelt durch ELISA nach 24h-Stimulation (s. Abb. 4.4 A) $n=2$, (C) TNF- α -Konzentration ermittelt durch ELISA nach 24h-Stimulation (s. Abb. 4.4. A) $n=2$.

Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen. Werte in % der LPS-Kontrolle.

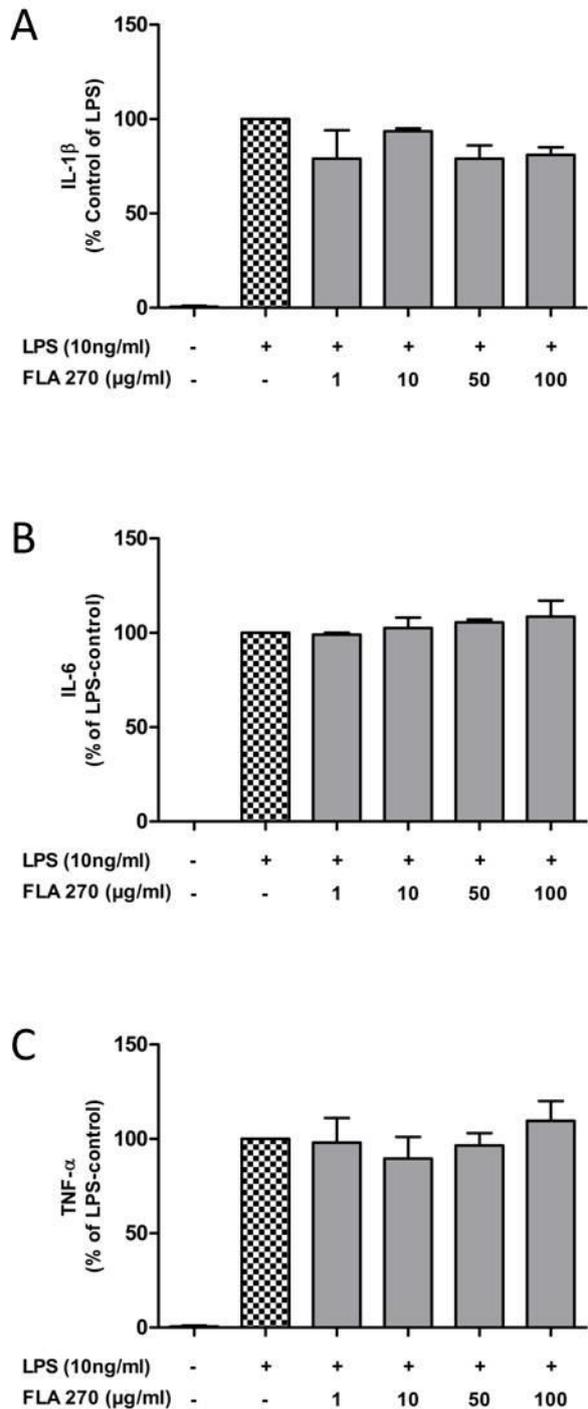


Abbildung 4.5: Keine Hemmung der Zytokinproduktion durch FLA 270

(A) IL-1 β -Konzentration ermittelt durch ELISA nach 24h Stimulation ohne (Negativkontrolle, jeweils 1. Balken von links) oder mit LPS (10 ng/ml, Positivkontrolle, jeweils 2. Balken von links) und LPS und FLA 270 (1, 10, 50, 100 μ g/ml) n=4, (B) IL-6-Konzentration ermittelt durch ELISA nach 24h-Stimulation (s. Abb. 4.5 A) n=2, (C) TNF- α -Konzentration ermittelt durch ELISA nach 24h-Stimulation (s. Abb. 4.5. A) n=2.

Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen. Werte in % der LPS-Kontrolle.

4.2 Effekte von EGb 761, FLA 269 und FLA 270 auf die 8-Isoprostan-Freisetzung

Im Folgenden wurde die 8-Isoprostan-Synthese untersucht. Damit sollte untersucht werden, ob Nebenreaktionen der Arachidonsäurekaskade verstärkt ablaufen.

Mikroglia wurden für 24 Stunden mit EGb (10, 100, 250, 500 µg/ml), FLA 269 (1, 10, 50, 100 µg/ml) und FLA (1, 10, 50, 100 µg/ml) 30 Minuten vorstimuliert. Eine Positiv- und Negativkontrolle wurde angelegt und anstatt der Stimulantien 10 µl DMSO 100 % bei der Ginkgo-Versuchsreihe und 2 µl DMSO 100 % bei den Versuchsreihen mit Flavonoiden hinzugegeben. Dies geschah, damit der maximale Anteil Lösungsmittel der Proben auch in den Kontrollen enthalten war und somit gleiche Experimentbedingungen geschaffen wurden. Nach LPS-Zugabe wurde weitere 24 h inkubiert. Mit den Überständen wurden Enzymimmuno-Assays durchgeführt und der 8-Isoprostan-Gehalt in den Mikroglia ermittelt. Die Auswertung zeigt Abb. 4.6: Die Negativkontrolle zeigte eine vermehrte Isoprostan-Synthese durch LPS in allen drei Versuchsreihen. Eine Stimulation mit EGb 761 ließ keinen klaren Trend in Bezug auf die 8-Isoprostan-Produktion erkennen (Abb. 4.6 A). Nach Zugabe von FLA 269 und FLA 270 kam es mit zunehmender Konzentration zu einer Steigerung von ca. 40 % im Vergleich zur LPS-Kontrolle (Abb. 4.6 B und C).

In den unter 4.1-4.3 beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass EGb 761 hemmenden Einfluss auf die Synthese von PGE₂ und NO besitzt. Auch die Freisetzung der Zytokine IL-1β, IL-6 und TNF-α wurde mit zunehmender Konzentration von EGb 761 vermindert.

Nun war es interessant, zu wissen, welche Vorgänge hierfür verantwortlich waren.

Da eine besondere Wirkung der Flavonoide bis hierhin nicht erwiesen werden konnte, wurden die nächsten Versuche nur mit dem Vollextrakt EGb 761 durchgeführt.

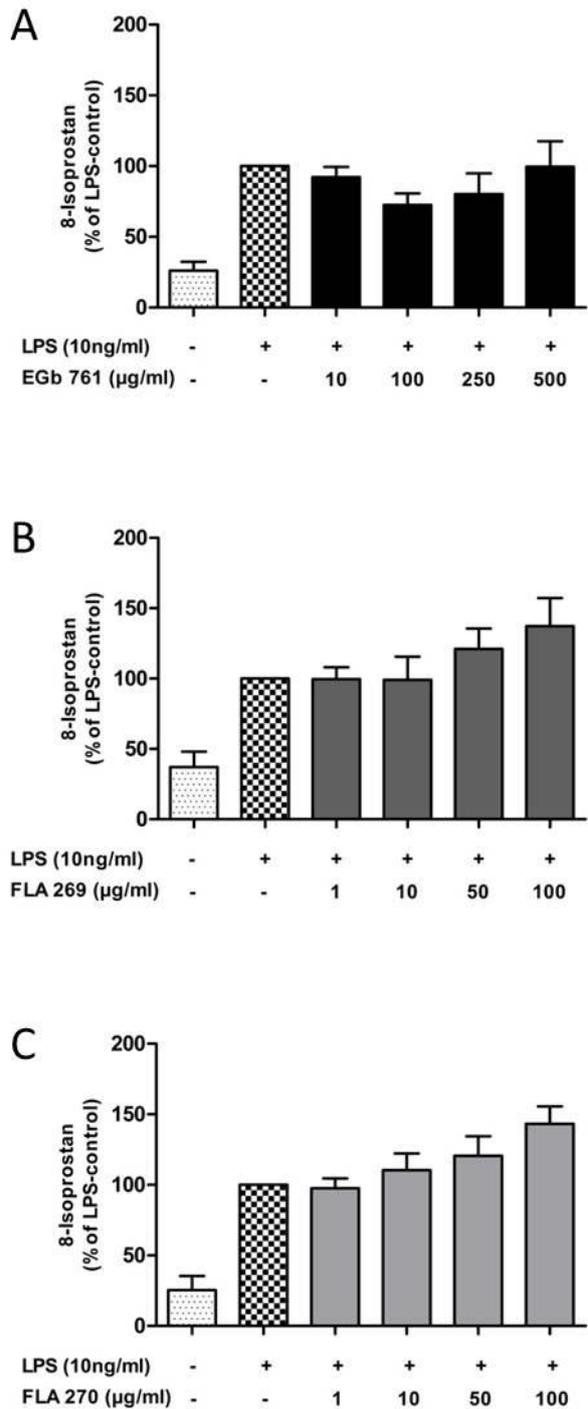


Abbildung 4.6: 8-Isoprostan-Synthese nach Stimulation mit EGb 761, FLA 269 und FLA 270

8-Isoprostan-Synthese ermittelt mittels EIA nach 24h Stimulation ohne (Negativkontrolle, jeweils 1. Balken von links) oder mit LPS (10 ng/ml, Positivkontrolle, jeweils 2. Balken von links) und (A) LPS und EGb 761 (10, 100, 250, 500 µg/ml) n=3, (B) LPS und FLA 269 (1, 10, 50, 100 µg/ml) n=3, (C) LPS und FLA 270 (1, 10, 50, 100 µg/ml) n=3.

Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen. Werte in % der LPS-Kontrolle. Statistische Signifikanz nach One-way-ANOVA und Tukey-Post-hoc-Test mit $p > 0,5$ nicht gegeben.

4.3 Effekte von EGb 761 auf die Proteinsynthese und Aktivierung der Enzyme der Arachidonsäurekaskade: COX-1, COX-2, mPGES-1 und cPLA2

Zunächst stellte sich die Frage, was der Hemmung der PGE₂-Synthese zu Grunde lag. Hierzu wurden Mikroglia auf 6-well Platten kultiviert und für 24 h mit EGb 761 in aufsteigenden Konzentrationen (10, 100, 250, 500 µg/ml) stimuliert. Wieder wurde eine Positiv- und eine Negativkontrolle angelegt und je 10 µl DMSO 100% zu beiden pipettiert, um eine toxische Wirkung des Lösungsmittels auszuschließen. Anschließend wurde die Proteinsynthese der Enzyme COX-1, COX-2 und mPGES-1 mittels Western-Blot-Analyse untersucht.

Dabei ergab sich, dass die COX-1-Synthese nicht durch EGb 761 beeinflusst wurde. Dies ist sowohl in der densitometrischen Auswertung als auch im Immunoblot zu erkennen. Auch Positiv- und Negativkontrolle haben etwa den gleichen Wert. Lediglich bei einer Konzentration von 500 µg/ml war eine Steigerung sichtbar. Da die ermittelten Werte der densitometrischen Auswertung (Abb. 4.7 A) hohen Standardabweichungen unterlagen, waren diese Ergebnisse mit $p > 0,05$ nicht statistisch signifikant.

Abb. 4.7 C zeigt die densitometrische Auswertung mehrerer Immunoblots, die COX-2 detektierten. Zu sehen ist eine deutliche Induktion der COX-2-Synthese durch LPS. Auch zu erkennen ist eine klare dosisabhängige Steigerung der LPS-induzierten COX-2-Synthese, die sich auch in der Signalstärke der Banden im Immunoblot-Bild wiederfinden ließ (Abb. 4.7 D). Auch hier waren die Standardabweichungen zu groß, um statistisch signifikante Werte zu erzielen.

In den beiden letzten Grafiken E und F der Abb. 4.7 sind die Ergebnisse der Beeinflussung der mPGES-1-Synthese abgebildet. Diese wurde dosisabhängig schon ab einer Konzentration von 100 µg/ml EGb 761 auf Werte von ca. 45 % gegenüber der LPS-Kontrolle gehemmt, die einen ausgeprägten LPS-Effekt zeigte. Wie auch schon bei der Hemmung der PGE₂-Synthese wurde der Eindruck erweckt, dass eine Sättigung ab einer Konzentration von 100 µg/ml EGb 761 eintrat und eine weitere Erhöhung der Konzentration von EGb 761 keine weitere Hemmung der mPGES-1-Synthese erreichte.

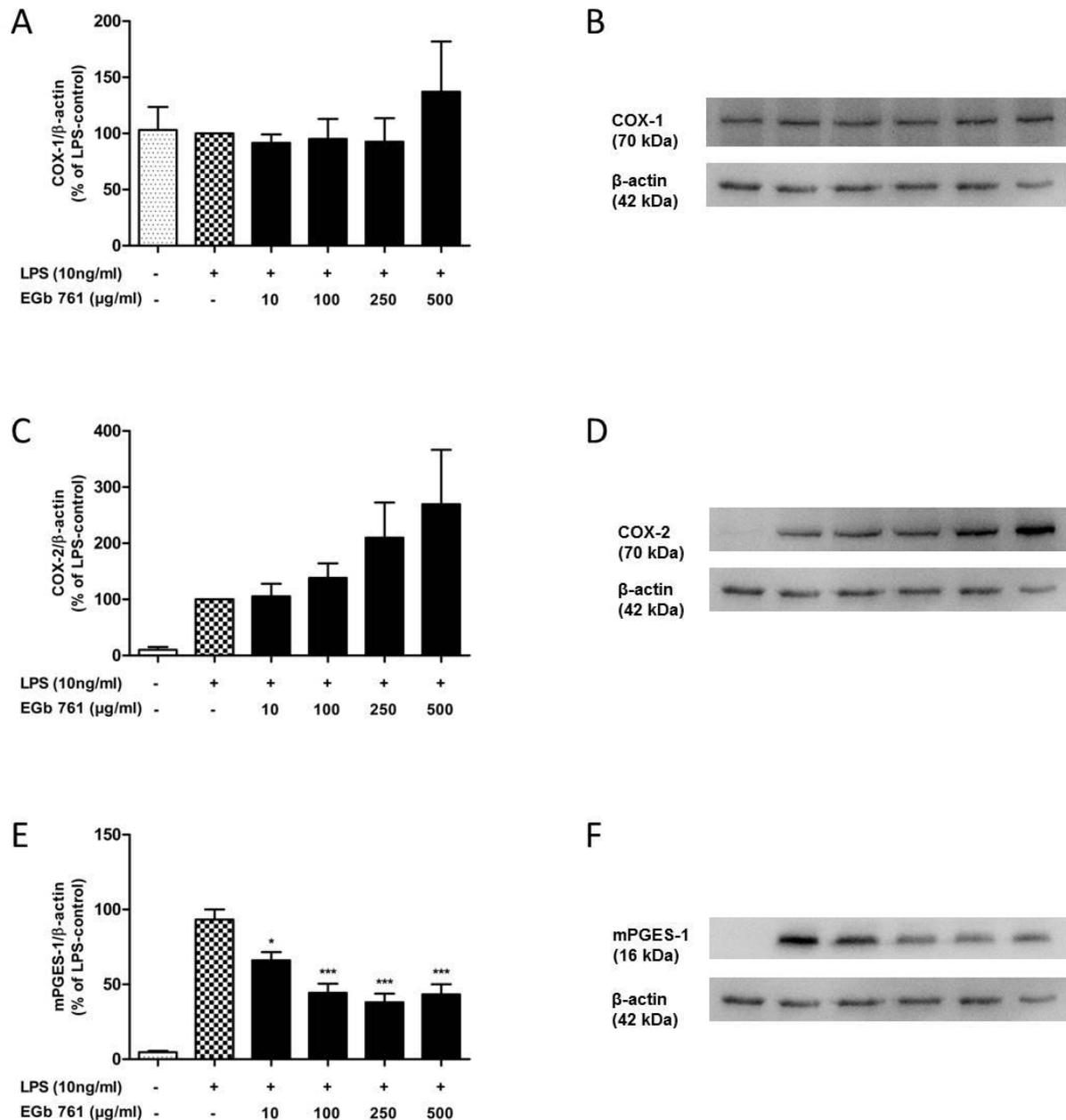


Abbildung 4.7: Proteinsynthese von COX-1, COX-2 und mPGES-1 nach Stimulation mit EGb 761

(A) densitometrische Auswertung der Banden von COX-1 aus Western Blots im Verhältnis zu β -actin nach 24h Stimulation ohne (Negativkontrolle, jeweils 1. Balken von links) oder mit LPS (10 ng/ml, Positivkontrolle, jeweils 2. Balken von links) und LPS und EGb 761 (10, 100, 250, 500 μ g/ml) $n=3$, (B) Immunoblot mit Banden der COX-1-Detektion sowie β -actin als Referenz. (C) densitometrische Auswertung der Banden von COX-2 aus Western Blots im Verhältnis zu β -actin. Ergebnisse nach 24h-Stimulation (s. Abb. 4.7 A). $n=3$. (D) Immunoblot mit Banden der COX-2-Detektion sowie β -actin als Referenz. (E) densitometrische Auswertung der Banden von mPGES-1 aus Western Blots im Verhältnis zu β -actin. Ergebnisse nach 24h-Stimulation (s. Abb. 4.7 A). $n=3$. (F) Immunoblot mit Banden der mPGES-1-Detektion sowie β -actin als Referenz.

Dargestellt in A, C und E sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen, Werte in % der LPS-Kontrolle. Statistische Signifikanz nach One-way-ANOVA und Tukey-Post-hoc-Test mit *: $p<0,05$ und ***: $p<0,001$ gegen die mit LPS stimulierte Positivkontrolle.

Da das Enzym cPLA2 ganz am Anfang der Arachidonsäurekaskade steht und für die Arachidonsäuresynthese aus Phospholipiden verantwortlich ist, sollte ergründet werden ob EGb 761 auch hier Effekte auf die Phosphorylierung und damit Aktivierung der Proteinsynthese hat.

Dazu wurden wieder auf 6-well Platten kultivierte Mikroglia mit EGb 761 in aufsteigenden Konzentrationen (10, 100, 250, 500 µg/ml) mit EGb 761 stimuliert. Eine Positiv- und Negativkontrolle wurde wie oben beschrieben angelegt und DMSO hinzupipettiert.

Es zeigte sich eine Abnahme der phospho-cPLA2 mit zunehmender EGb 761-Konzentration im Vergleich zur LPS-Kontrolle. Diese zeigte eine starke Induktion der p-cPLA2 nach LPS-Zugabe (Abb. 4.8 A). Die totale cPLA2-Synthese normalisiert mit Aktin blieb gleich (Abb. 4.8 B, C).

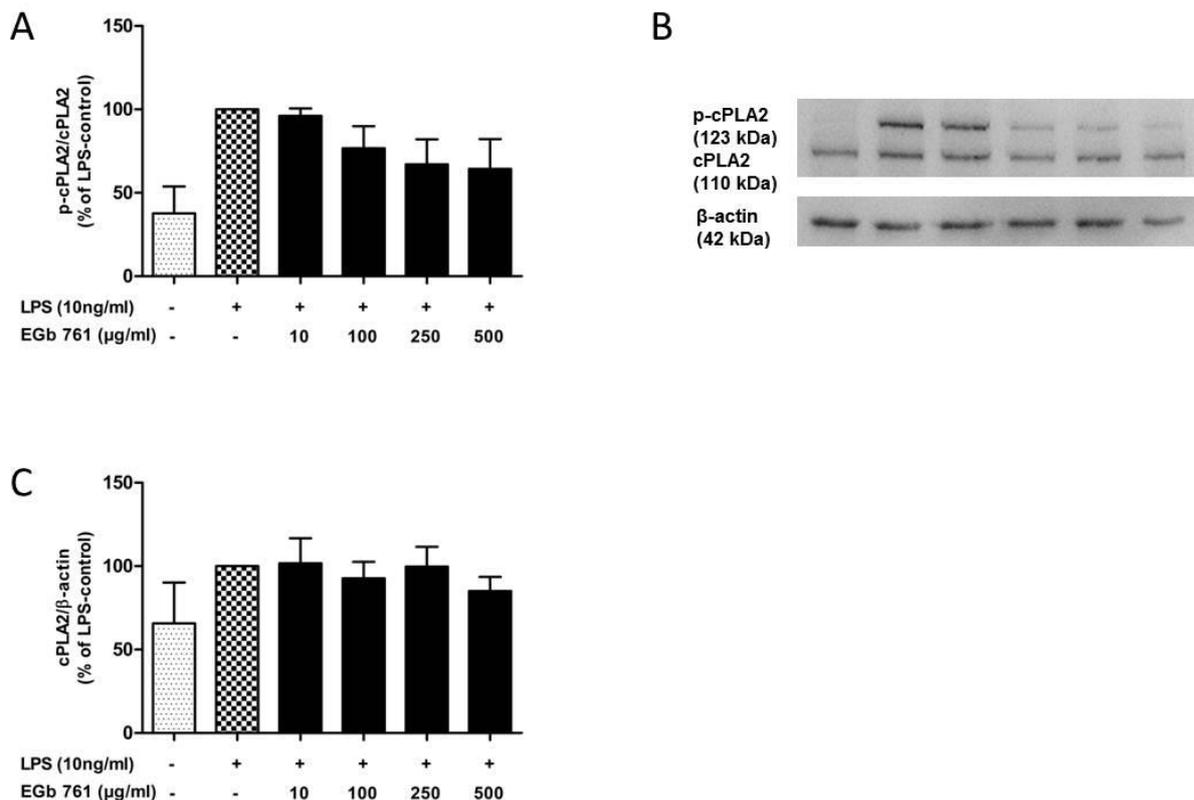


Abbildung 4.8: Hemmung der p-cPLA2-Expression durch EGb 761

(A) densitometrische Auswertung des Bandensignals von p-cPLA2 aus Western Blots im Verhältnis zu cPLA2. Ergebnisse nach 24h-Stimulation mit EGb 761 (10, 100, 250, 500 µg/ml) sowie einer unstimulierten Negativ- und einer allein mit LPS (10 ng/ml) stimulierten Positivkontrolle. n=3. (B) Immunoblot mit Banden der p-cPLA2/cPLA2-Detektion sowie β-actin als Referenz. (C) densitometrische Auswertung des Bandensignals von cPLA2 aus Western Blots im Verhältnis zu β-actin. Ergebnisse nach 24h-Stimulation (s. Abb. 4.8 A). n=3.

Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen, Werte in % der LPS-Kontrolle. Statistische Signifikanz nach One-way-ANOVA und Tukey-Post-hoc-Test mit $p > 0,05$ nicht gegeben.

4.4 Effekte von EGb 761 auf die Proteinexpression von iNOS

Während des ersten Versuchsteils konnte im kolorimetrischen Test eine Abnahme der NO-Synthese bei Stimulation mit EGb 761 nachgewiesen werden. Die NO-Synthese in der Zelle erfolgt unter anderem durch die durch Inflammation induzierbare NO-Synthase (iNOS). So stellte sich die Frage, ob EGb 761 auch herunterregulierende Wirkung auf die iNOS hatte.

Um dies zu herauszufinden, wurden analog den vorigen Experimenten Mikroglia mit aufsteigenden Konzentrationen von EGb 761 (10, 100, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$) 30 Minuten inkubiert und dann LPS (10ng/ml) in jedes well hinzugefügt. Zur Kontrolle blieb ein well unbehandelt, ein weiteres wurde nur mit LPS behandelt. Positiv- und Negativkontrolle wurden jeweils mit 10 μl DMSO 100% 30 Minuten vorbehandelt. 24 Stunden später konnten dann die Probengewinnung und ein Western Blot stattfinden.

LPS-Zugabe bewirkte eine starke Induktion der iNOS-Proteinsynthese. Die Auswertung der mit EGb 761-behandelten Proben zeigte eine deutliche dosisabhängige Abnahme dieser (Abb. 4.9 A, B). Das Ergebnis war mit $p < 0,05$ nach One-way-ANOVA und Tukey-Test gegen die LPS-Kontrolle statistisch signifikant.

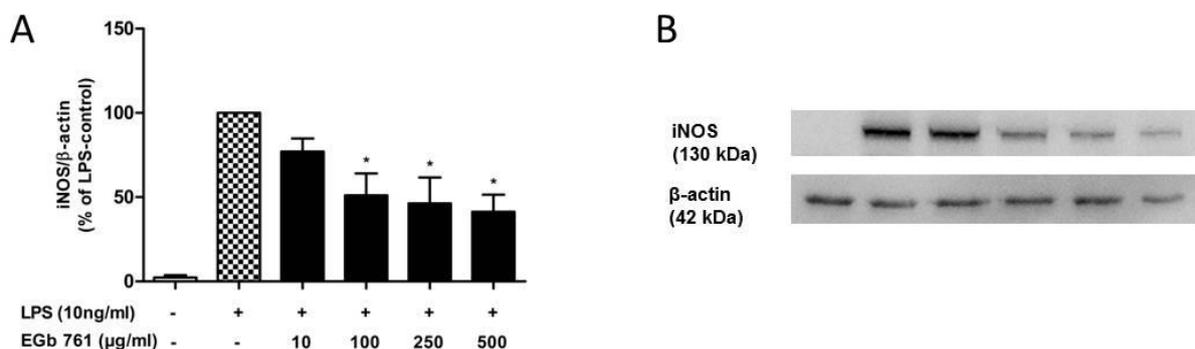


Abbildung 4.9: Hemmung der iNOS-Expression durch EGb 761

(A) densitometrische Auswertung des Bandensignals von iNOS aus Western Blots im Verhältnis zu β -actin. Ergebnisse nach 24h-Stimulation mit EGb 761 (10, 100, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$) sowie einer unstimulierten Negativ- und einer allein mit LPS (10 ng/ml) stimulierten Positivkontrolle. $n=3$. (B) Immunoblot mit Banden der iNOS-Detektion und β -actin als Referenz.

Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen, Werte in % der LPS-Kontrolle. Statistische Signifikanz nach One-way-ANOVA und Tukey-Post-hoc-Test mit *: $p < 0,05$ gegen die mit LPS stimulierte Positivkontrolle.

4.5 Effekte von EGb 761, FLA 269 und FLA 270 auf die Signaltransduktionskaskaden in primären Mikroglia

4.5.1 Auswirkungen auf mitogenaktivierte Kinasen (MAP-Kinasen): p38, p42/44 und JNK

Aufgrund der ermittelten Ergebnisse in der Proteinexpression war nun zu klären, auf welche Signaltransduktionswege EGb 761 wirkt und somit die unterschiedlichen Entzündungsparameter hemmt. Untersucht wurden zunächst die MAP-Kinasen, die an der Expression verschiedener Entzündungsparameter beteiligt sind (Kim and Choi, 2010). Dabei wurden die phosphorylierten MAP-Kinasen analysiert, die jeweils die aktiven Formen der MAP-Kinasen darstellen.

Auch hierfür wurde ein Western Blot durchgeführt. Die Mikroglia wurden vorher auf 6-well Platten kultiviert und mit EGb 761 (100, 500 µg/ml), FLA 269 und FLA 270 (je 100 µg/ml) für 30 Minuten stimuliert. Ein well wurde unstimuliert belassen, eins wurde nur mit LPS (10 ng/ml) stimuliert, wobei in beide Kontrollen 10 µl DMSO 100% pipettiert wurden. Dann erfolgte die LPS-Zugabe (10 ng/ml) und eine Inkubation für weitere 30 Minuten. Nach Probengewinnung, Blotting und Detektion verschiedener Antikörper ließen sich folgende Ergebnisse, dargestellt in Abb. 4.10, ermitteln.

In Abb. 4.10 A und B ist zu erkennen, dass sich weder nach Stimulation mit EGb 761 noch mit den beiden Flavonoiden eine Veränderung der Expression von p-p38 MAP-Kinasen zeigte. Die ermittelten Werte lagen allesamt auf dem Level der LPS-Kontrolle. Diese zeigte eine starke Induktion durch LPS.

Ähnlich sah es auch bei der Expression der p-p42/44 MAP-Kinasen aus. Auch hier bewegte sich die Expression auf dem Level der Positivkontrolle. Diese lag jedoch nur etwa 40 % über der Negativkontrolle. Nach Stimulation mit EGb 761 war ein leichter Anstieg zu beobachten (Abb. 4.10 C, D).

Auch die Expression von p-JNK nach Stimulation mit EGb 761 und den beiden Flavonoiden stieg leicht an, jedoch war kein bestimmter Trend erkennbar. Wahrscheinlich durch die hohen Standardabweichungen bedingt, waren die Ergebnisse mit $p > 0,05$ nach One-way-ANOVA und Tukey-Test gegen die LPS-Kontrolle statistisch nicht signifikant (Abb. 4.10 E, F). Ebenso wie bei der Analyse von p-p42/44 fiel die LPS-Induktion der Positivkontrolle im Vergleich zur Negativkontrolle weniger stark aus als bei der p-p38 MAP-Kinasen.

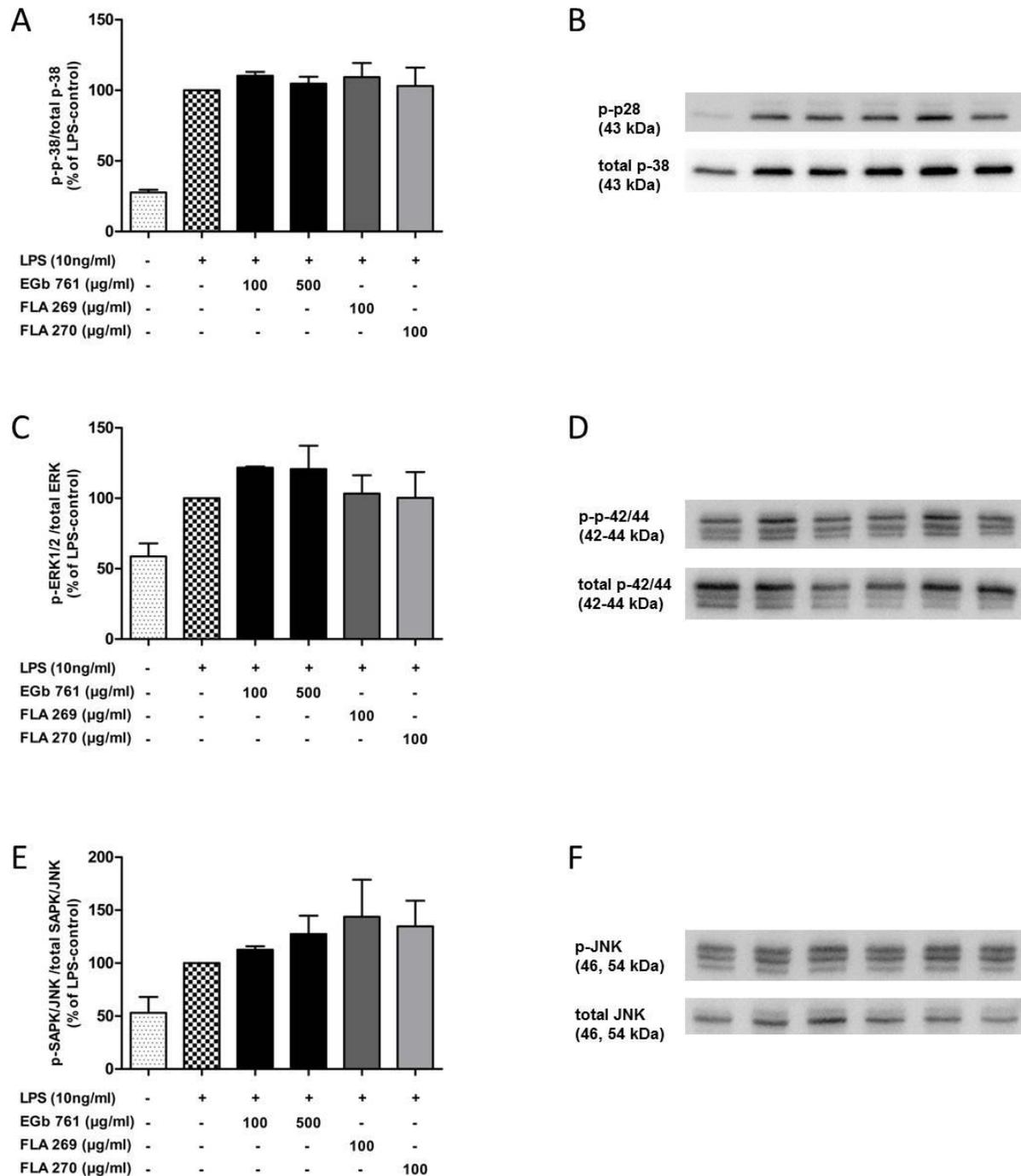


Abbildung 4.10: Effekte von EGb 761, FLA 269 und FLA 270 auf die Signaltransduktion: p38, p42/44 und JNK

(A) densitometrische Auswertung des Bandensignals von p-p38 aus Western Blots im Verhältnis zu total p38. Ergebnisse nach 30 Minuten-Stimulation mit EGb 761 (100, 500 µg/ml), FLA 269 und FLA 270 (je 100µg/ml) und LPS (10 ng/ml) sowie einer unstimulierten Negativ- und einer allein mit LPS (10ng/ml) stimulierten Positivkontrolle. n=3. (B) Immunoblot mit p-p38-Detektion sowie total p38 als Referenz. (C) densitometrische Auswertung des Bandensignals von p-p42/44 aus Western Blots im Verhältnis zu total p42/44. Ergebnisse nach 30 Minuten Stimulation (s. Abb. 4.10 A). n=3. (D) Immunoblot mit p-p42/44-Detektion sowie total p42/44 als Referenz. (E) densitometrische Auswertung des Bandensignals von p-JNK aus Western Blots im Verhältnis zu total JNK. Ergebnisse nach 24h-Stimulation (s. Abb. 4.10 A). n=3. (F) Immunoblot mit p-JNK-Detektion sowie

total JNK als Referenz.

Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen, Werte in % der LPS-Kontrolle. Statistische Signifikanz nach One-way-ANOVA und Tukey-Post-hoc-Test mit $p > 0,05$ nicht gegeben.

4.5.2 Auswirkungen auf Akt

Die Ergebnisse, die in Bezug auf die COX-2 und mPGES-1 ermittelt wurden, lassen auf eine eventuelle Beteiligung des Akt-Signalweges schließen, da Akt an der Vermittlung der gegensätzlichen Expression von COX-2 und mPGEs-1 beteiligt ist (de Oliveira et al., 2008).

So wurde die Zellstimulation analog den Experimenten aus 4.5.1 durchgeführt und im Western Blot p-Akt detektiert.

Entgegen der Vermutung, dass p-Akt die Veränderungen einiger Proteinexpressionen vermittelt, ergab sich keine Änderung von p-Akt nach Stimulation mit EGb 761. Nach Stimulation mit FLA 269 und FLA 270 konnte eine leichte Steigerung beobachtet werden, es zeigte sich jedoch kein deutlicher Trend ab. Positiv- und Negativkontrolle weisen etwa 30% Unterschied auf, der LPS-Effekt ist hier fraglich (Abb. 4.12).

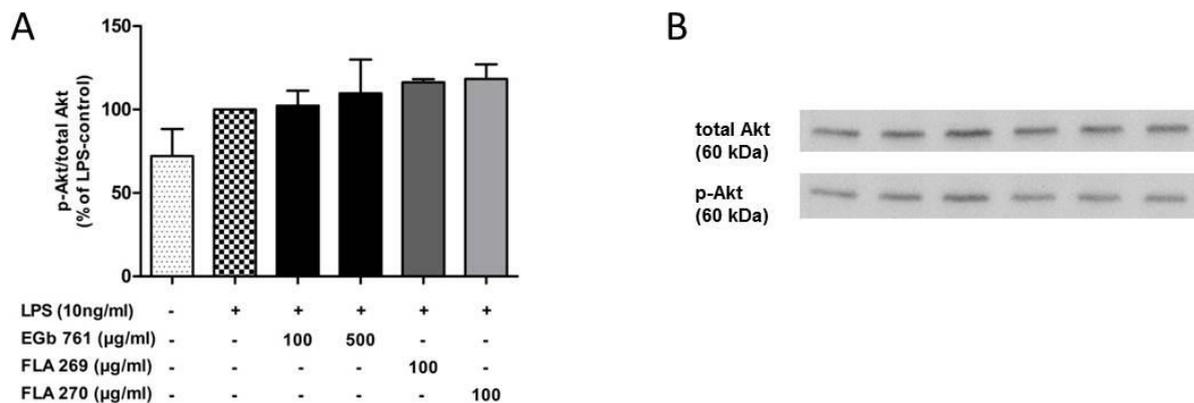


Abbildung 4.11: Effekte von EGb 761, FLA 269 und FLA 270 auf Signaltransduktionskaskaden: p-Akt

A: densitometrische Auswertung des Bandensignals von p-Akt aus Western Blots im Verhältnis zu total p38. Ergebnisse nach 30 Minuten-Stimulation mit EGb 761 (100, 500 µg/ml), FLA 269 und FLA 270 (je 100 µg/ml) und LPS (10 ng/ml) sowie einer unstimulierten Negativ- und einer allein mit LPS (10 ng/ml) stimulierten Positivkontrolle. $n=3$. **B:** Immunoblot mit p-Akt-Detektion sowie total Akt als Referenz.

Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen, Werte in % der LPS-Kontrolle. Statistische Signifikanz nach One-way-ANOVA und Tukey-Post-hoc-Test mit $p > 0,05$ nicht gegeben.

4.5.3 Auswirkung von EGb 761 auf I κ B- α

Ein weiterer interessanter Signalweg, der NF- κ B Signalweg, läuft über I κ B- α . Um zu ermitteln, ob sich Veränderungen in den I κ B- α -Spiegeln zeigten, wurde wie in den beiden Vorversuchen 4.5.1 und 4.5.2 verfahren.

In Abbildung 4.12 erkennt man die –im Gegensatz zu den bereits untersuchten MAP-Kinasen und Akt- für I κ B- α typische LPS-induzierte Abnahme des Proteins durch Degradation im Gegensatz zur Negativkontrolle. Bei erhöhter EGb 761 Konzentration (500 μ g/ml) sowie bei FLA 269 und FLA 270 (100 μ g/ml) war eine leichte Abnahme der Proteinspiegel zu beobachten. Der LPS-Effekt wurde durch Stimulation mit EGb 761, FLA 269 oder FLA 270 nicht aufgehoben.

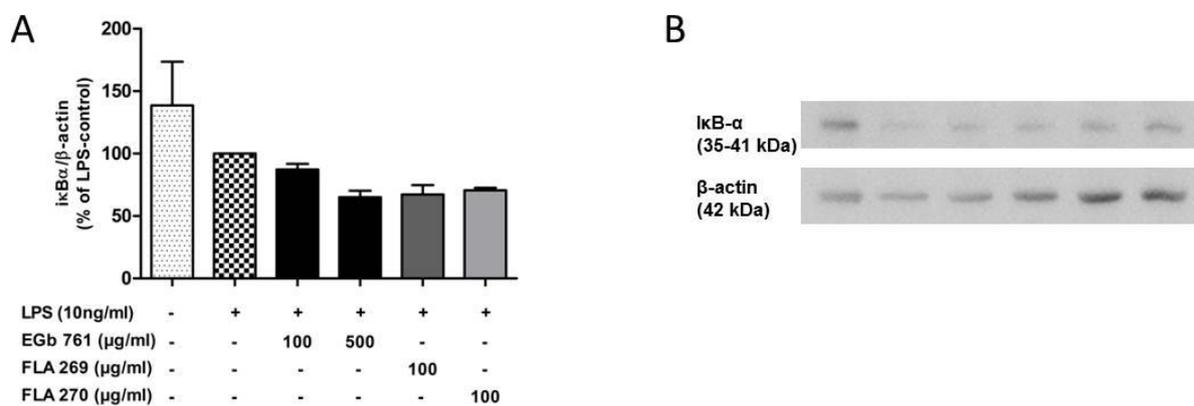


Abbildung 4.12: Effekte von EGb 761, FLA 269 und FLA 270 auf Signaltransduktionskaskaden: I κ B- α

(A) densitometrische Auswertung des Bandensignals von I κ B- α aus Western Blots im Verhältnis zu β -actin. Ergebnisse nach 15 Minuten-Stimulation mit EGb 761 (100, 500 μ g/ml), FLA 269 und FLA 270 (je 100 μ g/ml) und LPS (10 ng/ml) sowie einer unstimulierten Negativ- und einer allein mit LPS (10 ng/ml) stimulierten Positivkontrolle. n=3. (B) Immunoblot mit I κ B- α -Detektion sowie β -actin als Referenz.

Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen, Werte in % der LPS-Kontrolle. Statistische Signifikanz nach One-way-ANOVA und Tukey-Post-hoc-Test mit $p > 0,05$ nicht gegeben.

4.6 Effekte von EGb 761 auf die mRNA-Expression

4.6.1 Effekte von EGb 761 auf die mRNA-Expression der Proteine der Arachidonsäurekaskade: COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2, cPGES und cPLA2

Nachdem die Ergebnisse aus ELISA, EIA, kolorimetrischem Test und Western Blot erhoben waren, stellte sich nun die Frage, ob diese auch auf mRNA-Ebene bestätigt werden konnten. Um diesen Nachweis zu erbringen, wurden verschiedene real time quantitative PCRs durchgeführt.

Zunächst wurde die mRNA-Expression der Proteine der Arachidonsäurekaskade untersucht. Die Mikrogliazellen wurden 30 Minuten mit EGb 761 (10, 100, 250, 500 µg/ml) vorstimuliert und dann mit LPS (10 ng/ml) drei Stunden inkubiert. Dann wurden die Zellen gestoppt und die RNA aus den Zellen isoliert. Aus dieser wurde im nächsten Schritt die cDNA hergestellt, mit der dann die q-PCR erfolgte. Abgesehen von mPGES-1 wurde auch noch die mRNA-Expression der Isoformen mPGES-2 und cPGES untersucht. Abbildung 4.13 zeigt die Ergebnisse der Messungen für COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2 und cPGES.

Wie auch in den Ergebnissen der Western Blots zeigte COX-1 eine Basalexpression in der Negativkontrolle. Der LPS-Effekt in der Positivkontrolle wirkte sich dahingegen schwächer aus. Entgegen den Ergebnissen aus dem Western Blot mit Detektion von COX-1 nahm die mRNA-Expression von COX-1 mit einer statistischen Signifikanz von $p < 0,01$ nach One-way-ANOVA und Tukey-Test ab (Abb. 4.13 A).

Im Gegensatz dazu nahm die COX-2-mRNA-Expression mit erhöhter EGb 761-Konzentration zu, was die Ergebnisse aus der Western-Blot-Analyse bestätigte. Die LPS-Kontrolle zeigte eine starke Induktion (Abb. 4.13 B).

Auch die LPS-Induktion im Versuch zu mPGES-1 war deutlich im Vergleich zur Negativkontrolle. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus dem Western Blot, waren bei mPGES-1 jedoch keine Trends absehbar. Die mRNA-Expressionslevel bewegten sich etwa auf dem der LPS-Kontrolle (Abb. 4.13 C).

Auch die mRNA-Expression von mPGES-2 zeigte keine deutliche Tendenz, hier traten hohe Standardabweichungen auf. Die LPS-Induktion zeigte sich schwach (Abb. 4.13 D).

Die Auswertung der mRNA-Expression von cPGES unter ansteigender Stimulation von EGb 761 zeigte, dass EGb 761 keine Auswirkungen auf die mRNA-Expression des Proteins hatte. Positiv- und Negativkontrolle bewegten sich auf dem gleichen Niveau (Abb. 4.13 E).

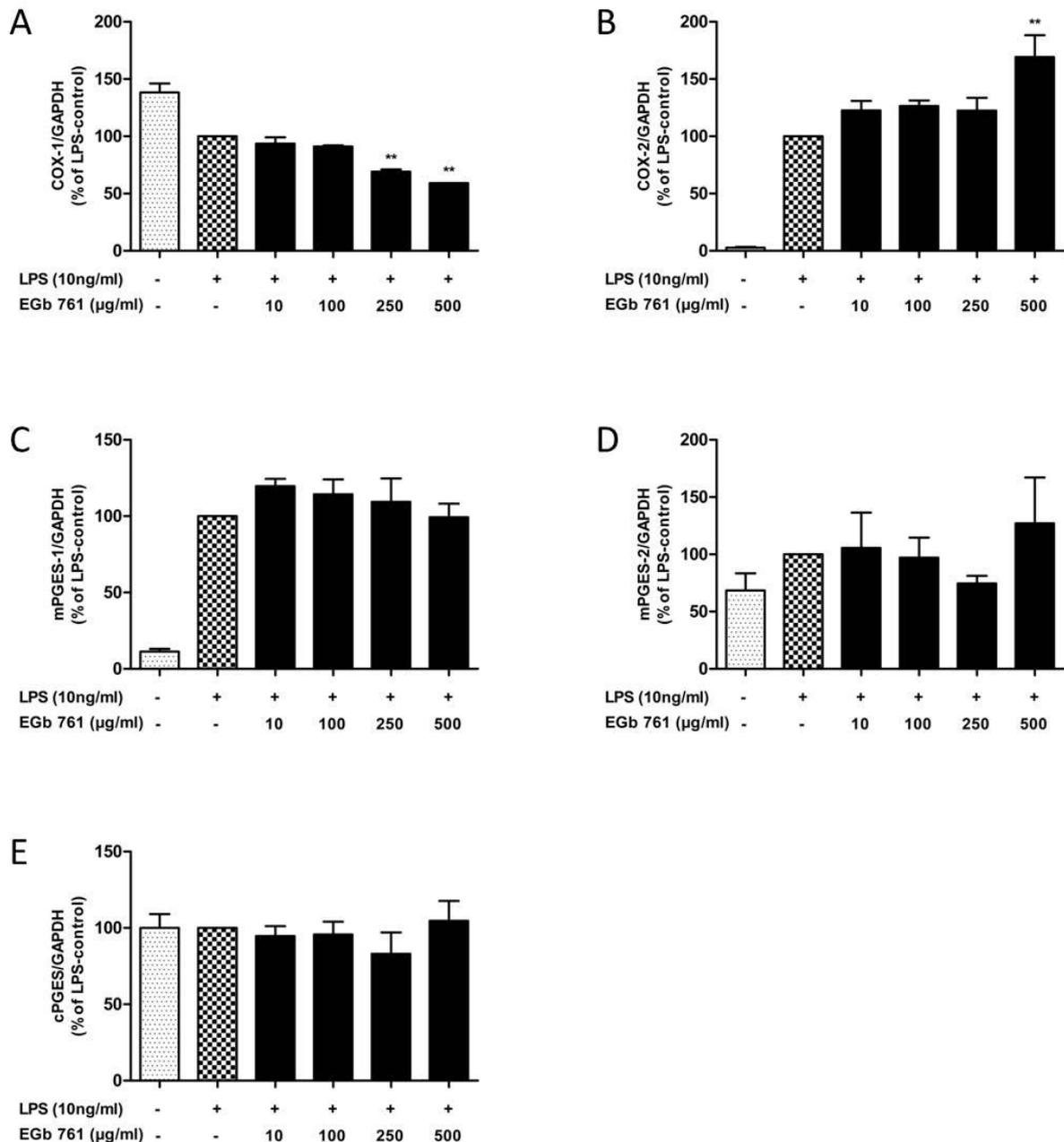


Abbildung 4.13: Effekte von EGb 761 auf die mRNA-Expression von COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2 und cPGES

(A) mRNA-Expression von COX-1 nach 30 Minuten Vorstimulation mit EGb 761 (10, 100, 250, 500 µg/ml) LPS-Zugabe (10 ng/ml) und 3 h Inkubation, unstimuliertes well als Negativ- und nur mit LPS stimuliertes well als Positivkontrolle, qPCR mit COX-1-spezifischen Primern. n=3. (B) mRNA-Expression von COX-2, Stimulation wie unter 4.13 A, qPCR mit COX-2-spezifischen Primern. n=3. (C) mRNA-Expression von mPGES-1, Stimulation wie unter 4.13 A, qPCR mit mPGES-1-spezifischen Primern. n=3. (D) mRNA-Expression von mPGES-2, Stimulation wie unter A, qPCR mit mPGES-2-spezifischen Primern. n=3. (E) mRNA-Expression von cPGES, Stimulation wie unter 4.13. A, qPCR mit cPGES-spezifischen Primern. n=3.

Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen, Werte in % der LPS-Kontrolle. Statistische Signifikanz One-way-ANOVA und Tukey-Post-hoc-Test mit **:p<0,01 gegen die mit LPS stimulierte Positivkontrolle.

Die Western-Blot-Analyse des cPLA2 und seiner aktiven Form p-cPLA2 hatte ergeben, dass die Proteinphosphorylierung der cPLA2 dosisabhängig durch EGb 761 gehemmt werden konnte, während die totale inaktive Form cPLA2 unbeeinflusst blieb. Ob dies auch auf mRNA-Ebene gezeigt werden konnte, sollte die qPCR-Analyse zeigen. Für die Stimulation wurde wie oben unter 4.6.1 beschrieben vorgegangen.

Dabei ergab sich, dass die mRNA-Expression von cPLA2 keiner, bzw. einer leichten Herunterregulierung durch EGb 761 unterliegt. Das Niveau der Negativkontrolle lag über der mit LPS stimulierten Positivkontrolle. Das Signifikanzniveau wurde nach One-way-ANOVA und Tukey-Test mit $p < 0,01$ angegeben (Abb. 4.15).

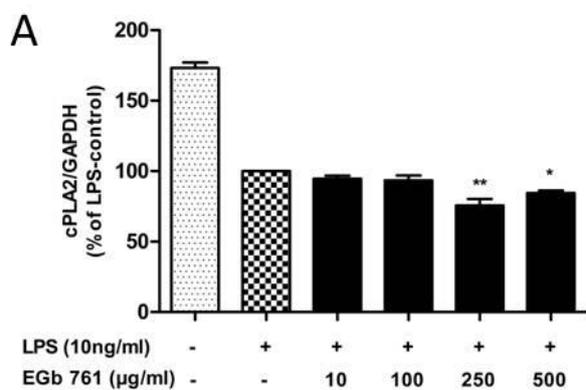


Abbildung 4.14: Effekte von EGb 761 auf die mRNA-Expression von cPLA2

(A) mRNA-Expression von cPLA2 nach 30 Minuten Vorstimulation mit EGb 761 (10, 100, 250, 500 µg/ml), LPS-Zugabe (10 ng/ml) und 3 h Inkubation, unstimuliertes well als Negativ- und nur mit LPS stimuliertes well als Positivkontrolle, anschließend qPCR mit cPLA2-spezifischen Primern. n=3

Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen, Werte in % der LPS-Kontrolle. Statistische Signifikanz nach One-way-ANOVA und Tukey-Post-hoc-Test mit *: $p < 0,05$ und **: $p < 0,01$ gegen die mit LPS stimulierte Positivkontrolle.

4.6.2 Effekte von EGb 761 auf die mRNA-Expression von iNOS

Wie schon bei den vorigen Experimenten, war es interessant, zu erfahren, ob sich auch die im Western Blot ermittelte Hemmung der iNOS-Proteinsynthese auf mRNA-Ebene widerspiegelte. Das Versuchsdesign entsprach dabei den Angaben unter 4.6.1. Nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese erfolgte dann eine q-PCR.

Zu beobachten war eine starke Induktion der iNOS-mRNA-Expression durch LPS. Mit zunehmender EGb 761-Dosis wurde diese auf etwa 60% des Niveaus der LPS-Positivkontrolle gehemmt. Die Hemmung war mit $p < 0,001$ nach One-way-ANOVA und Tukey-Test gegen die LPS-Kontrolle statistisch hoch signifikant (Abb. 4.15).

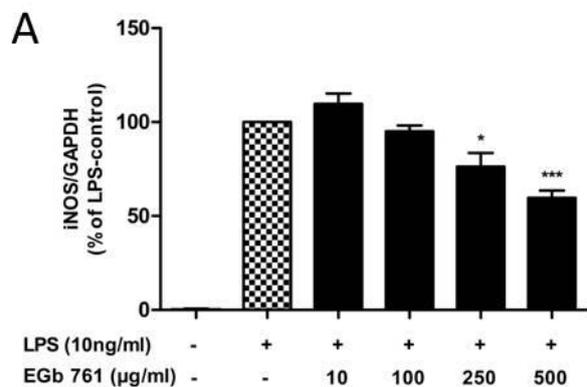


Abbildung 4.15: Effekte von EGb 761 auf die mRNA-Expression von iNOS

(A) mRNA-Expression von iNOS nach 30 Minuten Vorstimulation mit EGb 761 (10, 100, 250, 500 µg/ml), LPS-Zugabe (10 ng/ml) und 3 h Inkubation, unstimuliertes well als Negativ- und nur mit LPS stimuliertes well als Positivkontrolle, anschließend qPCR mit iNOS-spezifischen Primern. n=3

Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen, Werte in % der LPS-Kontrolle. Statistische Signifikanz nach One-way-ANOVA und Tukey-Post-hoc-Test mit *: $p < 0,05$ und ***: $p < 0,001$ gegen die mit LPS stimulierte Positivkontrolle.

4.6.3 Effekte von EGb 761 auf die mRNA-Expression von Entzündungsmediatoren in Mikroglia

Die zuvor untersuchte Synthese verschiedener Entzündungsmediatoren unter dem Einfluss von EGb 761 sollte nun auch auf mRNA-Ebene erforscht werden. Daher wurden Mikroglia für 30 Minuten mit EGb 761 stimuliert, mit LPS (10 ng/ml) versetzt und für 3 Stunden inkubiert. Wie bei jedem Experiment wurde wiederum eine Positivkontrolle als unbehandeltes well sowie eine Negativkontrolle mit LPS (10 ng/ml) erstellt. Zu diesen beiden wurde 10 µl DMSO 100 % pipettiert, um eventuelle Lösungsmittelinteraktionen auszuschließen. Nach RNA-Isolation erfolgte eine cDNA-Synthese und qPCR.

In Abb. 4.16 A ist die mRNA-Expression von IL-1 β dargestellt. LPS-Zugabe bewirkte eine starke Induktion. Es zeigte sich eine stark signifikante, dosisabhängige Hemmung der Expression unter EGb 761 auf etwa 70% des Ausgangsniveaus.

Auch bei IL-6 waren ähnliche Auswirkungen zu betrachten: unter LPS war eine deutliche Induktion zu verzeichnen. Mit zunehmender EGb 761-Konzentration trat eine Abnahme der mRNA-Expression ein (Abb. 4.16 B).

Wie auch bei den IL-1 und IL-6-Messungen zeigte sich in den Versuchen zur mRNA-Expression von TNF- α eine starke Induktion der Positivkontrolle durch Zugabe von LPS. In Bezug auf die mRNA-Expression von Zytokinen zeigte EGb 761 hier die größte Wirkung. So konnte nach einem leichten Anstieg eine starke Hemmung auf 40% (EGb 761 500 µg/ml) der LPS-Kontrolle beobachtet werden. Dieser Effekt war mit $p < 0,05$ statistisch signifikant (Abb. 4.16 C).

Die Signifikanzanalysen erfolgten mit One-way-ANOVA und Tukey-Test. Die in den qPCRs ermittelten Werte wurden mit GAPDH, einem housekeeping-gene, standardisiert und Mittelwerte und Standardabweichungen abgebildet. Die Werte wurden in % der LPS-Kontrolle angegeben.

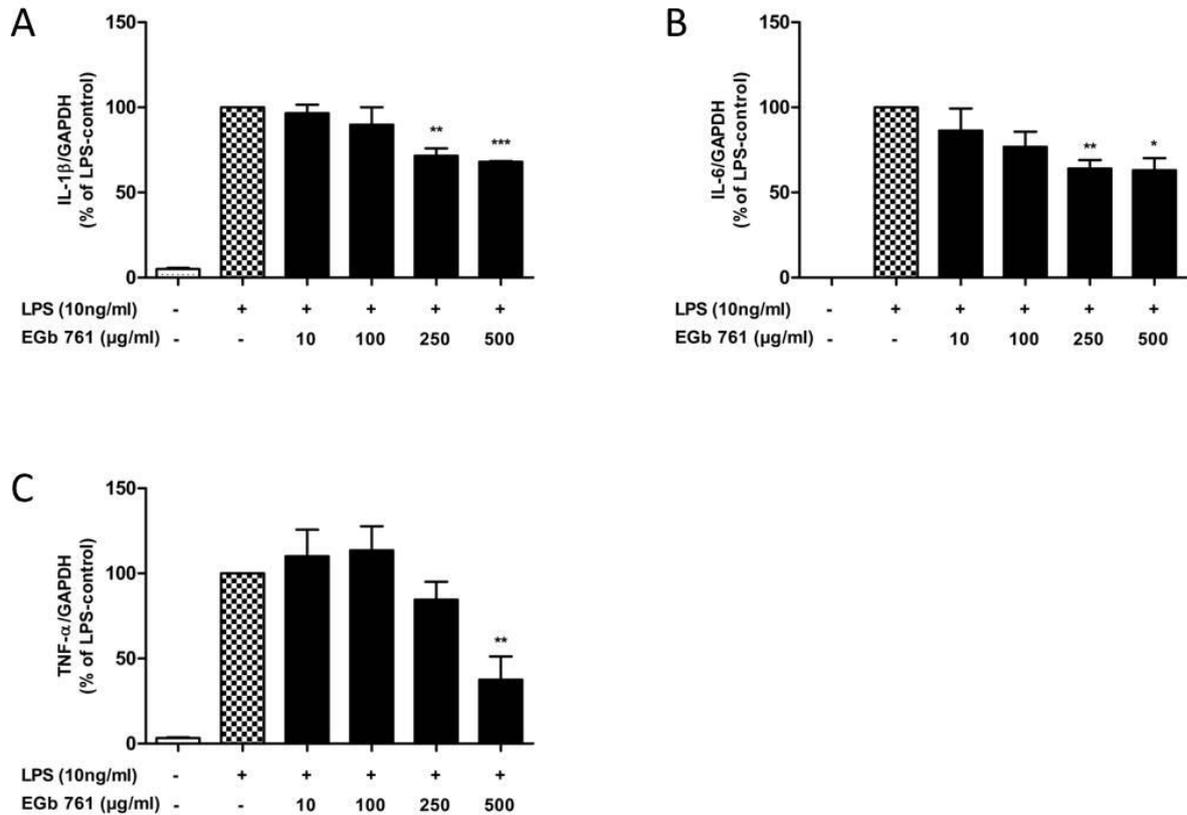


Abbildung 4.16: Effekte von EGb 761 auf die mRNA-Expression der Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α

(A) mRNA-Expression von IL-1 β nach 30 Minuten Vorstimulation mit EGb 761 (10, 100, 250, 500 μ g/ml), LPS-Zugabe (10 ng/ml) und 3 h Inkubation, unstimuliertes well als Negativ- und nur mit LPS stimuliertes well als Positivkontrolle, anschließend qPCR mit IL-1 β -spezifischen Primern. n=3. (B) mRNA-Expression von IL-6 nach Stimulation mit EGb 761 (s. Abb. 4.17 A), unstimuliertes well als Negativ- und nur mit LPS stimuliertes well als Positivkontrolle, anschließend qPCR mit IL-6-spezifischen Primern. n=3. (C) mRNA-Expression von TNF- α nach Stimulation mit EGb 761 (s. Abb. 4.17 A), unstimuliertes well als Negativ- und nur mit LPS stimuliertes well als Positivkontrolle, anschließend qPCR mit TNF- α -spezifischen Primern. n=3.

Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen, standardisiert mit dem housekeeping gene GAPDH. Werte in % der LPS-Kontrolle. Statistische Signifikanz nach One-way-ANOVA und Tukey-Post-hoc-Test mit *: p<0,05, **: p<0,01 und ***: p<0,001 gegen die mit LPS stimulierte Positivkontrolle.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollten die Effekte des Ginkgo-Extraktes EGb 761 auf die Aktivierung von Mikroglia untersucht werden. Die Mikrogliaaktivierung beeinflusst maßgeblich die Entzündungsreaktionen im ZNS und spielt daher eine wichtige Rolle in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen.

Die Wirkung von EGb 761 bei Demenzerkrankungen wird kontrovers diskutiert, jedoch belegen verschiedene Studien positive Effekte vor allem bei milder und moderater Demenz. Die Effekte von EGb 761 auf die Aktivierung von Mikroglia sind dabei bislang noch unzureichend erforscht.

Interessant sind hier besonders mögliche Effekte auf die Expression der Enzyme der Arachidonsäurekaskade sowie der wichtigsten Entzündungsmediatoren, die das Inflammationsgeschehen entscheidend beeinflussen. Eine genaue Untersuchung dieser könnte weitere Belege für bzw. gegen die Wirksamkeit von EGb 761 bei Demenzerkrankungen liefern und den Wirkmechanismus genauer charakterisieren.

Zu diesem Zweck wurden Rattenmikroglia mit unterschiedlichen Konzentrationen von EGb 761 stimuliert und zunächst die Synthese von den Entzündungsmediatoren PGE₂, NO, IL-1 β , IL-6, TNF- α und 8-Isoprostan in EIAs und ELISAs untersucht. Anschließend wurde mittels Western Blot Analyse die Proteinsynthese der Enzyme der Arachidonsäurekaskade ermittelt. Zur Bestätigung schloss sich durch q-PCR eine Analyse der mRNA-Expression an. So wurde auch die iNOS-Expression untersucht, die NO-Produktion wurde mit einem kolorimetrischen Test ermittelt. Nicht zuletzt erfolgte eine Untersuchung der möglicherweise beteiligten Signaltransduktionsmechanismen mittels Western Blot und q-PCR.

5.1 Effekte von EGb 761 auf die Arachidonsäurekaskade in Mikroglia: Hemmung der PGE₂-Produktion durch EGb 761

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die PGE₂-Synthese in primären Rattenmikroglia nach Stimulation mit EGb 761 um mehr als die Hälfte gehemmt wurde. Dieser Effekt trat schon bei einer Konzentration von 100 µg/ml auf (Abb. 4.1 A).

Nach Stimulation mit FLA 269 und FLA 270, bzw. mit Quercetin und Kaempferol, konnte kein Effekt auf die PGE₂-Synthese nachgewiesen werden (Abb. 4.1 B und C). Damit kann man sagen, dass die beiden untersuchten Flavonoide als Einzelsubstanzen nicht an der Vermittlung dieses Effekts beteiligt sind, sondern andere Inhaltsstoffe von EGb 761 hierfür verantwortlich sein müssen. Da die Flavonoide in den ersten Experimenten keine Wirkung zeigten, fokussierten sich die anderen Experimente auf den Vollextrakt EGb 761.

Es stellt sich nun die Frage, warum die PGE₂-Produktion abnimmt. Um diese Frage zu beantworten, muss man sich dessen Syntheseweg genauer anschauen (s. Abb. 1.1). Wie bereits beschrieben, ist PGE₂ das Endprodukt der Arachidonsäurekaskade. Ursache der Synthesehemmung könnte eine verminderte Expression eines der vorgeschalteten Enzyme sein.

Eine Möglichkeit wäre, dass die PGE₂-Synthese aufgrund einer gehemmten mPGES-1 abnimmt. Diese Vermutung deckt sich mit den in Abb. 4.7 erhobenen Ergebnissen. Die mPGES-1-Proteinsynthese zeigte eine Hemmung auf unter 50% verglichen mit der Positivkontrolle nach Stimulation mit EGb 761. Die mRNA-Expression in Abb. 4.14 zeigte wider Erwarten keine Abnahme. Eine posttranslationale Modifikation könnte dies erklären.

Die anderen beiden Isoformen der PGES, die mPGES-2 und die cPGES, wurden nur auf mRNA-Ebene untersucht. Es zeigte sich, dass beide durch LPS induziert wurden, EGb 761 aber keinen Effekt auf die mRNA-Expression hatte. Diese beiden Isoformen sind funktionell an die COX-1 gekoppelt (Tanioka et al., 2000). Eine Änderung der COX-1-Expression hätte demnach auch Auswirkungen auf die Expression von mPGES-1 und cPGES. Diese Beobachtungen passen zu den Ergebnissen, die zu COX-1 erhoben wurden (s.u.), und unterstützen die Hypothese, dass die Hemmung der induzierbaren mPGES-1 für die verminderte PGE₂-Produktion verantwortlich ist.

Eine andere nahe liegende Vermutung wäre, dass PGE₂ aufgrund einer verminderten Expression von COX-2 abnimmt. Die Ergebnisse aus Abb. 4.7 zeigten jedoch überraschenderweise eher eine dosisabhängige Zunahme der COX-2-Proteinexpression. Dieses

Ergebnis wurde durch die Messung der mRNA-Expression in der q-PCR bestätigt (Abb. 4.13).

In anderen Forschungsprojekten kam es durch Inkubation mit EGb 761 dagegen zu einer Hemmung der LPS-induzierten COX-2-Expression, wie zum Beispiel in der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 (Jang et al., 2012). Auch in ANA-1-Zellen von Mäusen wurde gezeigt, dass EGb 761 die COX-2-Expression hemmt (Kotakadi et al., 2008). Resultate von Experimenten mit Mikroglia liegen bislang noch nicht vor, sodass man vermuten kann, dass die Unterschiede der Expressionsmuster auf die unterschiedlichen Zelltypen zurückzuführen sein könnten, auch wenn alle der myeloisch-monozytären Reihe entstammen. Ein weiterer Grund könnte in den Speziesunterschieden von Maus und Ratte liegen.

Überraschend ist dieses Ergebnis auch, da von einer gekoppelten Regulation von COX-2 und mPGES-1 ausgegangen wird (Matsumoto et al., 1997). Die in dieser Arbeit ermittelten entgegengesetzten Expressionsmuster von mPGES-1 und COX-2 sprechen jedoch für eine ungekoppelte Regulierung dieser beiden Enzyme, wie von de Oliveira et. al. beschrieben (de Oliveira et al., 2008).

Das Bandensignal der COX-1-Proteinexpression im Western-Blot stellte sich für alle Proben gleichmäßig dar. Auch die densitometrische Auswertung zeigte keine Beeinflussung durch EGb 761 (Abb. 4.7). Die Ergebnisse der statistischen Auswertung der qPCR decken sich mit dieser Beobachtung. Hier ließ sich eine leichte, aber statistisch signifikante Minderung der mRNA-Expression feststellen (Abb. 4.13).

Zu einem ähnlichen Ergebnis kam auch eine Studie über die Wirkung von bestimmten pflanzlichen Nahrungsergänzungsmitteln auf die COX-Aktivität im Magenmilieu. Ein aus Ginkgo hergestellter Extrakt hatte keinen Einfluss auf die COX-1, jedoch trat eine selektive COX-2-Hemmung auf (Raman et al., 2008).

Somit lässt sich folgern, dass die PGE₂-Verminderung sehr wahrscheinlich nicht oder nur zu einem kleinen Teil auf Veränderungen der COX-1-Proteinexpression in Mikroglia durch EGb 761 zurückzuführen ist.

Auch denkbar wäre ein Vorhandensein von regulatorischen Feedback-Schleifen. Das verminderte PGE₂ könnte durch einen Feedback-Mechanismus die COX-2-Expression erhöhen und so für die gesteigerte COX-2-Proteinexpression verantwortlich sein. Es wurde jedoch gezeigt, dass eher das Gegenteil der Fall ist. In Makrophagen der Zelllinie RAW 264.7 potenzierte PGE₂ die COX-2-Expression über eine autokrine Feed-forward-Schleife (Hinz et al., 2000).

Interessant ist aber auch, dass PGE₂ in Podozyten der Niere über einen cAMP/PKA-abhängigen Regulationsmechanismus die PMA-induzierte Arachidonsäurefreisetzung hemmt (Lemieux et al., 2003). Dies wiederum lässt vermuten, dass die cPLA2, die die Arachidonsäurefreisetzung katalysiert, eine Rolle spielen könnte. In dieser Arbeit wurde sowohl die Expression der totalen als auch der Anteil der phosphorylierten Form der cPLA2 untersucht. Die Abbildung 4.8 zeigt, dass die phosphorylierte aktivierte Form der cPLA2, die p-cPLA2, EGb 761-dosisabhängig um ein Drittel im Maximum abnimmt. Die Expression der totalen cPLA2 blieb insgesamt ungefähr gleich, was auch die qPCR-Ergebnisse in Abbildung 4.14 bestätigen. Somit konnten die Ergebnisse eine verminderte Aktivierung der cPLA2 durch EGb 761 zeigen.

Auch im Rückenmark inhibiert EGb 761 die Aktivierung von cPLA2 und verhindert so Glutamattoxizität und stressinduzierten Zelltod (Zhao et al., 2011). Für Einzelsubstanzen des EGb 761 konnte eine Hemmung der NMDA-induzierten cPLA2-Aktivierung und eine hierdurch verminderte Prostaglandinsynthese beobachtet werden (Weichel et al., 1999)

Insgesamt lassen die vorliegenden Ergebnisse vermuten, dass die Inhibition der PGE₂-Synthese hauptsächlich an einer durch EGb 761 verminderten mPGES-1-Expression liegt. Einen kleineren Beitrag hierzu liefert noch die gehemmte p-cPLA2-Expression. COX-2 und COX-1 sind nicht ursächlich.

5.2 Unterdrückung der NO-Produktion durch Hemmung von iNOS

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass EGb 761 die LPS-induzierte NO-Freisetzung in primären Mikroglia hemmt (Abb. 4.2 A). In Korrelation dazu wurde sowohl die Proteinsynthese als auch die mRNA-Expression des produzierenden Enzyms iNOS durch EGb 761 vermindert, sodass hier von einer verminderten NO-Synthese aufgrund der Hemmung von iNOS auszugehen ist (Abb. 4.9, Abb. 4.15). Wie bereits beschrieben, wird NO durch NO-Synthasen gebildet, in aktivierten Mikroglia insbesondere durch die iNOS. Schon früh wurde entdeckt, dass EGb 761 unter physiologischen Bedingungen in vitro über verschiedene Mechanismen zu einer verminderten NO-Freisetzung beiträgt (Marcocci et al., 1994).

Auch in der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 wirkt EGb 761 als NO-Radikalfänger, vermindert die Enzymaktivität von iNOS und hemmt ihre mRNA-Expression (Kobuchi et al., 1997). In derselben Zelllinie wurde ebenfalls eine Hemmung der iNOS und iNOS-induzierten

NO-Synthese festgestellt. Die Wirkung von EGb 762 entsprach hierbei der von Prednisolon (Ilieva et al., 2004).

Für die Flavonoide 269 und 270 konnte in dieser Arbeit kein Effekt auf den NO-Metabolismus gezeigt werden (Abb. 4.2 B, C). Augenscheinlich sind sie somit nicht die wirkungsvermittelnde Komponente des EGb 761.

Wadsworth und Koop konnten hingegen für FLA 269 eine Hemmung der iNOS Protein- und mRNA-Expression in RAW 264.7 Makrophagen zeigen. Jedoch zeigten ihre Untersuchungen auf Signaltransduktionsebene auch, dass FLA 269 nicht als alleinige Substanz für diesen Effekt verantwortlich gemacht werden konnte (Wadsworth and Koop, 2001). Andere Experimente ergaben, dass sowohl FLA 269 als auch FLA 270 die iNOS mRNA- und Proteinexpression und die NO-Synthese in Mausmakrophagen dosisabhängig unterdrückten. Dieser Effekt wurde über die Hemmung der Aktivierung von NF-kappaB und STAT-1 vermittelt (Hämäläinen et al., 2007). Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten wiederum auf den verschiedenen Zelltypen, Speziesunterschieden zwischen Maus und Ratte oder aber auf Wechselwirkungen zwischen den Einzelsubstanzen im Extrakt beruhen.

Insgesamt sprechen die erhobenen Ergebnisse dieser Arbeit und anderer Studien dafür, dass EGb 761 im gewebeschädigenden Entzündungsmilieu als NO-Inhibitor in Mikroglia wirkt, indem die iNOS-vermittelte NO-Produktion gehemmt wird. FLA 269 und FLA 270 scheinen nicht aktiv an der Wirkvermittlung teilzunehmen.

5.3 EGb 761 hemmt die Freisetzung von IL-1 β , IL-6 und TNF- α

Die IL-1 β -Freisetzung in aktivierten Mikroglia wurde durch Stimulation mit EGb 761 dosisabhängig gehemmt (Abb. 4.3 A). Bei einer eingesetzten Konzentration von 100-250 $\mu\text{g/ml}$ trat eine Hemmung von etwa 20-25 % verglichen mit der LPA-Kontrolle auf, 500 $\mu\text{g/ml}$ reduzierten die IL-1 β -Freisetzung sogar um 70 %. Übereinstimmend hiermit zeigte auch die mRNA-Expression unter EGb 761 eine dosisabhängige Inhibition (Abb. 4.16 A).

Dies passt auch zu den Ergebnissen anderer Studien. Auch in U937 Schaumzellen wurde der Effekt von EGb 761 auf die Zytokinproduktion untersucht. EGb 761 führte zu einer Abnahme der induzierten IL-1 β -Produktion (Jiao et al., 2007). In atherosklerotischen Rattengehirnen reduzierte EGb 761 die Protein- und mRNA-Expression von IL-1 β (Jiao et al., 2005). Die IL-1 β -mRNA-Expression im Hippocampus von Ratten wurde nach EGb 761-Zufuhr ebenfalls vermindert (He et al., 2012). Da IL-1 β als proinflammatorisches Zytokin bei

Entzündungsvorgängen in erhöhten Konzentrationen vorliegt, nimmt man an, dass eine Hemmung der IL-1 β -Freisetzung Krankheiten, die mit Entzündungsreaktionen einhergehen, günstig beeinflussen kann. Bislang ist die Beeinflussung IL-1 β -Freisetzung durch EGb 761 in aktivierten Mikroglia noch unzureichend erforscht, jedoch lassen die angeführten Ergebnisse ähnlicher Studien und die in dieser Arbeit erhobenen Daten darauf schließen, dass EGb 761 die durch verschiedene Stimuli induzierte IL-1 β -Produktion vermindert und so positive Auswirkungen beispielsweise auf neurodegenerative Erkrankungen hat.

Neben IL-1 β wurde in dieser Arbeit auch die IL-6-Freisetzung untersucht. Dabei ergab sich, dass EGb 761 auch die IL-6-Synthese und IL-6 mRNA-Expression dosisabhängig hemmte (Abb. 4.3 B und Abb. 4.16 B). Dieser Effekt entsprach bei EGb 761 Konzentrationen von 100-150 μ g/ml etwa dem von IL-1 β .

Da IL-6 unter anderem bei der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen mitzuwirken scheint (McGeer and McGeer, 2010), ist der Einfluss vielversprechender Therapeutika auf die IL-6-Freisetzung interessant.

Kontinuierliche EGb 761-Gabe über 8 Wochen führte zu einer Verminderung der IL-6-Spiegel im Serum von Patienten mit neurologischen Krankheiten (Ching-Hsiang et al., 2012). Auch in der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 wurde die LPS-induzierte IL-6-Expression durch einen aus Ginkgoblättern hergestellten Extrakt signifikant gehemmt (Jang et al., 2012). In TNBS-induzierter Colitis im Rattenmodell hemmte ein *Ginkgo biloba* Extrakt die Proteinsynthese und mRNA-Expression von IL-6 (Zhou et al., 2006) und verminderte so die Inflamationsreaktion.

Die Literaturangaben und die erhobenen Ergebnisse sprechen also dafür, dass EGb 761 die IL-6-Synthese unterdrückt und so positive Effekte auf Inflamationsreaktionen hat.

Zuletzt wurde auch für TNF- α die mRNA-Expression und Proteinsynthese nach Vorstimulation mit EGb 761 bestimmt. Analog zu den vorigen Ergebnissen zeigte sich auch hier eine statistisch signifikante Inhibition der TNF- α Expressionen (Abb. 4.3 C, Abb. 4.16 C).

Zum gleichen Ergebnis kamen auch Ilieva et al. in RAW 264.7 Makrophagen. Vorbehandlung mit Ginkgo-Extrakt führte zu verminderter LPS-induzierter Freisetzung von TNF- α in derselben Zelllinie (Ilieva et al., 2004). Dies konnte auch für U937 Schaumzellen beobachtet werden (Jiao et al., 2007). EGb 761 inhibierte die p42/44-Phosphorylierung und p38 MAP-Kinase-Aktivität, welche wichtig sind für die posttranskriptionelle Regulierung von TNF- α -mRNA (Wadsworth et al., 2001). Ebenso konnten Park et al eine verminderte TNF- α -Freisetzung in Makrophagen zeigen. Allerdings zeigten sich hier stärkere Effekte durch

Vorstimulation mit dem *Ginkgo biloba* Extrakt GBB, der im Vergleich zu EGb 761 höhere Mengen an den aktiven Terpenen und Biflavonoiden besitzt (Park et al., 2006).

Insgesamt sprechen die Ergebnisse für eine hemmende Wirkung von EGb 761 auf die LPS-induzierte Freisetzung von TNF- α in aktivierten Mikroglia. Die in der Literatur angeklungenen Wirkunterschiede der verschiedenen Ginkgo-Extrakte sind sehr wahrscheinlich auf die unterschiedlich Zusammensetzung und Herstellungsweise der einzelnen Extrakte zurückzuführen.

5.4 Effekte von EGb 761, FLA 269 und FLA 270 auf die 8-Isoprostan-Synthese

In den Experimenten zur Auswirkung von EGb 761 auf die 8-Isoprostan-Synthese ließ sich für EGb 761 kein deutlicher Trend erkennen. Durch Stimulation mit den Flavonoiden 269 und 270 ergab sich bei höheren Konzentrationen eine leichte Steigerung der 8-Isoprostan-Synthese (Abb. 4.6).

Die Synthese von 8-Isoprostan kann aus Arachidonsäure durch Cyclooxygenasen oder Lipidperoxidation stattfinden. Die Messung von 8-Isoprostan gilt als Goldstandard für die Quantifizierung von oxidativem Stress in vivo (Wiswedel, 2009). Tritt oxidativer Stress im Gewebe auf, wird 8-Isoprostan vermehrt gebildet. Dies konnte für verschiedene inflammatorische Prozesse gezeigt werden, beispielsweise für Arthritis oder kardiovaskuläre Erkrankungen (Basu et al., 2001; LeLeiko et al., 2009; Young, 2005). Oxidativer Stress ist ebenfalls beteiligt an der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen.

Viele Studien belegen die antioxidative Wirkung von Ginkgo. So dämpft *Ginkgo biloba* den oxidativen Stress in Makrophagen und Endothelzellen (Y Rong, 1996). Sowohl in vitro als auch in vivo kann EGb 761 als Radikalfänger die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies unterdrücken (Smith and Luo, 2003). Des Weiteren schützt EGb 761 Nervenzellen vor Zelltod, indem es die reaktive Sauerstoffspezies Hydrogenperoxid vermindert (Oyama et al., 1996).

Insbesondere den Flavonoiden als Einzelsubstanzen werden antioxidative Wirkungen zugesprochen. FLA 269 beugt Oxaliplatin-induziertem neuropathischem Schmerz vor, indem es die Lipidperoxidation und Protein-Nitrosylierung hemmt (Azevedo et al., 2013). In einem Tiermodell mit PCB-induzierter hippocampaler Neurodegeneration führte FLA 269 zu einer

Unterdrückung von oxidativem Stress und einer Zunahme enzymatischer Antioxidantien (Selvakumar et al., 2013).

FLA 270 hemmte ebenfalls die LPS-induzierte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in RAW 264.7 Makrophagen. Die Vorbehandlung mit FLA 270 wirkte vorbeugend auf die Entstehung von Kaliumchlorid- und Protaminsulfat-induziertem oxidativen Stress in der Blase von Ratten (Huang et al., 2013b).

Bei einer Untersuchung der verschiedenen Inhaltsstoffe von EGb 761 erzielten FLA 269 und FLA 270 unter allen die stärkste antioxidative Wirkung in vivo und in vitro (Smith and Luo, 2003).

EGb 761 in seiner Gesamtheit scheint keinen deutlichen Effekt auf die 8-Isoprostan-Produktion in Mikroglia zu haben, obwohl man dies den Ergebnissen aus der Literatur zu Folge erwarten würde. Die leichte Induktion der Synthese nach Stimulation mit den Einzelsubstanzen FLA 269 und FLA 270 steht ebenfalls im Widerspruch zur Literatur, nach der sie als Antioxidantien deklariert werden. Damit sprechen die Ergebnisse entgegen anderen Studien gegen eine antioxidative Wirkung von EGb 761 und den Flavonoiden 269 und 270 zumindest was den Zelltyp der Mikroglia angeht.

5.5 Effekte von EGb 761, FLA 269 und FLA 270 auf die Signaltransduktion in aktivierten Mikroglia

5.5.1 Effekte auf MAP-Kinasen: p38, p42/44 und JNK

p-38 gehört zur Klasse der mitogenaktivierten Kinasen, die auf Stress wie Zytokine oder UV-Licht reagieren, indem sie Zelldifferenzierung, Zellwachstum und Apoptose regeln. MAP-Kinasen werden durch Phosphorylierung aktiviert, worauf sich dann weitere Phosphorylierungskaskaden anschließen.

p38 ist an der Vermittlung einiger Veränderungen in der Zelle beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass die LPS-induzierte COX-2 Expression in Mikroglia zu einer p38-Aktivierung führte, die wiederum die Synthese und Freisetzung von PGE₂ zur Folge hatte (Akundi et al., 2005). Daher wurde der p38-Signalweg untersucht, um ihn als eventuelles Target von EGb 761 zu identifizieren.

In der Western Blot Analyse für die Detektion von p-p38 konnten sowohl für EGb 761 als auch für FLA 269 und 270 keine Effekte festgestellt werden (Abb. 4.10 A, B).

Andere Studien konnten dahingegen einige Effekte für EGb 761 aufzeigen. Die Phosphorylierung von p38 in mit LPS-stimulierten RAW 264.7 Makrophagen wurde durch einen Extrakt aus Ginkgoblättern um mehr als 60% gehemmt (Jang et al., 2012). In derselben Zelllinie konnten auch Wadsworth & Koop die Hemmung der p38 Aktivität sowohl durch EGb 761 als auch durch FLA 269 feststellen. In diesen Zellen ist die Aktivierung von p38 unter anderem notwendig für die iNOS Expression oder die posttranskriptionelle Regulierung von TNF- α (Wadsworth and Koop, 2001; Wadsworth et al., 2001).

Anhand dieser Beispiele und der gezeigten Auswirkungen von EGb 761 z.B. auf die PGE₂-Synthese und Expression von iNOS und TNF- α liegt die Vermutung nahe, dass EGb 761 und die beiden untersuchten Einzelsubstanzen Einfluss auf die Phosphorylierung von p38 haben. Dies konnte jedoch in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Somit müssen andere Signalwege an der Wirkvermittlung von EGb 761 in Mikroglia beteiligt sein.

Als zweiter Signalweg wurde p42/44 MAPK, auch ERK-1/2 genannt, getestet.

Bei p42/44 verhält es sich wie bei p38. Die Kinase liegt phosphoryliert im aktiven Zustand vor. Wie auch p38 vermittelt p42/44 Signale verschiedener Regulationsmechanismen. Beispielsweise spielt die p42/44-Aktivierung eine Rolle bei Regulierung der iNOS Expression in mit LPS behandelten primären Mikroglia (Fiebich et al., 2002).

In den o.g. Studien wurde herausgefunden, dass Ginkgo-Extrakt auch die Phosphorylierung von p42/44 reduziert (Jang et al., 2012; Wadsworth et al., 2001). EGb 761 besitzt zudem die Eigenschaft β -Amyloid-induzierte Neurotoxizität, die durch oxidativen Stress vermittelt wird, zu vermindern. Dies geschieht durch die Hemmung der durch β -Amyloid aktivierten Signalwege, unter anderem p42/44 (Longpré et al., 2006). In der Arbeit von Akundi RS et. al. konnte in Bezug auf die LPS-induzierte COX-2 Expression in Mikroglia keine Aktivierung von p42/44 festgestellt werden (Akundi et al., 2005).

Auch in der vorliegenden Arbeit ergaben sich keine Veränderungen der p42/44-Aktivierung durch EGb 761, FLA 269 oder FLA270 (Abb. 4.10 C, D). Dieser Signalweg scheint nicht an der Wirkvermittlung beteiligt zu sein.

Auch die dritte mitogenaktivierte Kinase JNK, auch SAPK genannt, wurde untersucht. Ebenso wie bei p38 und p42/44 zeigte sich weder durch EGb 761 noch durch FLA 269 oder FLA 270 eine Aktivierung des Signalweges (Abb. 4.10 E, F).

JNK wird wie p38 und p42/44 gleichermaßen durch Phosphorylierung aktiviert. In Experimenten zur Untersuchung der involvierten Signalwege bei der LPS-induzierten mPGES-1 Expression in Mikroglia, stellte sich JNK als einer der beteiligten Mechanismen heraus (de Oliveira et al., 2008).

Einige Auswirkungen von EGb 761 und seinen Einzelsubstanzen auf die JNK-Aktivierung sind beschrieben. EGb 761 kann die Aktivität von JNK in Neuroblastomzellen vermindern und so den β -Amyloid-induzierten Zelltod verhindern (Longpré et al., 2006). FLA 269 hemmt in LPS-aktivierten RAW 264.7 Makrophagen die Aktivierung von JNK und inhibierte so die Transkription von TNF- α (Wadsworth et al., 2001). Auch FLA 270 zeigte Auswirkungen auf JNK: In primären striatalen Mausneuronen inhibierte es die oxLDL-induzierte Aktivierung von JNK und wirkte so der Stress-induzierten Zellantwort entgegen (Schroeter et al., 2001).

In dieser Arbeit wurde unter anderem eine starke Hemmung der mPGES-1 durch EGb 761 gezeigt. Daher würde man vermuten, dass EGb 761 Auswirkungen auf die JNK-Phosphorylierung besitzen könnte. Dies bestätigte sich jedoch anhand der erhobenen Daten nicht.

Sowohl bei den Experimenten zu p-p42/44 als auch zu p-JNK ist anhand der Positiv- und Negativkontrolle als fraglich zu betrachten, ob die gewünschten LPS-Effekte erreicht wurden.

5.5.2 Effekte auf den Akt-Signalweg

Es wurde gezeigt, dass Akt und seine downstream-Signalwege eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Proteinexpression von COX-2 und mPGES-1 spielt.

De Oliveira et al. zeigten, dass die Inhibition von PI-3K, welche Akt vorgeschaltet ist und die Aktivierung von Akt vermittelt, zu einer verminderten Proteinexpression von mPGES-1 und einer erhöhten Proteinexpression von COX-2 in LPS-aktivierten Mikroglia führt (de Oliveira et al., 2008). Auch der Akt Inhibitor X bewirkt eine Hochregulierung der COX-2 Expression in Mikroglia, während die mPGES-1-Expression abnimmt (de Oliveira et al., 2012).

Die Experimente zur Beteiligung des Akt Signalweges an der Wirkvermittlung von EGb 761, FLA 269 und FLA 270 ergaben jedoch keine Effekte (Abb. 4.11), obwohl dies anhand der ungekoppelten Regulierung von mPGES-1 und COX-2 zu vermuten wäre.

Effekte von EGb 761 oder anderen Ginkgo-Extrakten auf Akt in Mikroglia sind bislang noch unzureichend untersucht. Es lassen sich jedoch ein paar Hinweise auf eventuelle Einflüsse finden.

EGb 761 führte in menschlichen Endothelzellen über den Akt-Signalweg zu einer Induzierung von HO-1, welches bei hohen Blutglukosespiegeln protektiv auf das Endothel wirkt (Tsai et al., 2013). In RAW 264.7 Makrophagen hemmt FLA 269 die PI-3K Phosphorylierung und damit auch die downstream-Mechanismen wie die Aktivierung von Akt und limitiert so die

LPS-induzierten Entzündungsreaktionen (Endale et al., 2013).

Dier Ergebnisse von Oliveira et al. sprechen für eine Beteiligung des Akt-Signalweges bei der Wirkung von EGb 761 auf Mikroglia, da die Ergebnisse ebenfalls eine Induktion der COX-2-Expression neben einer Inhibition der mPGES-1-Expression zeigten.

Überraschenderweise zeigte sich dieser Signalweg aber nicht beeinflusst. Auch hier sollte analog den Versuchen zu p-JNK und p-p42/44 eine Wiederholung des Experiments in Erwägung gezogen werden, da der LPS-Effekt im Vergleich zur Negativkontrolle sehr gering ist und daher nur eine Aussage über eine eventuelle Tendenz gemacht werden kann.

5.5.3 Effekte auf I κ B- α

Als letzter Signalweg wurde I κ B- α untersucht. Die Auswertung der Experimente zeigte auch hier wieder keine Auswirkungen von EGb 761, FLA 269 und FLA 270 auf die I κ B- α -Expression (Abb. 4.12).

I κ B- α gehört zu einer Familie intrazellulärer Proteine, deren Funktion es ist, den Transkriptionsfaktor NF- κ B zu hemmen. Dieser ist an der Zellantwort auf verschiedene Stimuli wie Stress, Zytokine, freie Radikale beteiligt. Zudem regelt er unter anderem die Immunantwort.

Es wurde gezeigt, dass die Homocystein-induzierte iNOS-Expression und NO-Synthese in Makrophagen durch Ginkgo-Extrakt gehemmt wird. Dieser Effekt ist assoziiert mit gehemmter NF- κ B-Aktivität, die durch vermehrte Expression von I κ B- α zustande kommt (Woo et al., 2003).

In Experimenten zu Lungengewebsverletzungen im Mausmodell stellte sich heraus, dass EGb 761 nicht nur die Aktivierung von NF- κ B hemmt, sondern auch den Abbau von I κ B- α unterdrückt und damit z.B. die MMP-9-Expression verhinderte (Huang et al., 2013a). Des Weiteren wurde auch in RAW 264.7 Makrophagen die I κ B-Phosphorylierung gehemmt und daraus resultierend NF- κ B nicht aktiviert (Jang et al., 2012).

EGb 761 zeigte in der Auswertung der Experimente eher das Gegenteil der erwarteten Wirkung. Der Abbau von I κ B- α wurde durch EGb 761 nicht verhindert, das I κ B- α -Level lag sogar eher etwas unter dem der LPS-Kontrolle. Auch dieser Signalweg scheint also nicht für die Vermittlung der Wirkung von EGb 761 in primären Mikroglia verantwortlich zu sein.

Insgesamt konnte keiner der untersuchten Signalwege einen Hinweis liefern, über welche

Mechanismen die in dieser Arbeit gezeigten Effekte in Mikroglia durch EGb 761 vermittelt werden. Daher müssen sich zukünftige Untersuchungen mit anderen möglichen Signaltransduktionswegen, wie z.B. der Proteinkinase C (PKC), beschäftigen. Darüber hinaus sollten einige Experimente aufgrund fraglicher Effektstärke der Positivkontrolle wiederholt werden, darunter die Versuche zu Akt, JNK und p42/44.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Die Aktivierung von Mikroglia spielt eine Schlüsselrolle bei der Neuroinflammation im ZNS. Als ortsständige Immunzellen vermitteln sie hier die Antwort auf Entzündungsstimuli und sind die Hauptproduzenten von PGE₂, ein Endprodukt der Arachidonsäurekaskade. An seiner Entstehung sind unter anderem die Enzyme cPLA₂, COX-2 und mPGES-1 maßgeblich beteiligt. Des Weiteren setzen Mikroglia Zytokine, die als Entzündungsmediatoren weitere Inflamationsprozesse vermitteln, und durch iNOS-generiertes NO frei, welches oxidativen Stress auslösen kann. Diese neuroinflammatorischen Vorgänge sind entscheidend an der Pathogenese verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen beteiligt und bieten einen Angriffspunkt für zukünftige Therapeutika.

Der Ginkgo-Extrakt EGb 761 zeigte bereits in mehreren klinischen Studien Wirksamkeit bei der Therapie milder bis moderater Demenzen, insbesondere als präventive Maßnahme. Die Wirkmechanismen sind teilweise jedoch noch unklar. So wird diskutiert, ob es der Extrakt im Gesamten ist oder Einzelsubstanzen -wie z.B. Flavonoide- sind, die die Wirkung vermitteln. Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Effekten von EGb 761 und seiner zwei Einzelsubstanzen FLA 269 und FLA 270 auf die Aktivierung von Mikroglia.

Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Abnahme der PGE₂-Freisetzung durch EGb 761, die aus einer verminderten Generierung durch gehemmte Expressionen von p-cPLA₂ und mPGES-1 resultierte. Die COX-2-Proteinsynthese wurde überraschenderweise gesteigert, welches als erneuten Hinweis für eine ungekoppelte Regulation von mPGES-1 und COX-2 gedeutet werden kann. Außerdem wurde die NO-Synthese durch EGb 761 signifikant gesenkt. Dies konnte auf eine Inhibition der iNOS-Expression zurückgeführt werden. Nicht zuletzt hatte EGb 761 hemmende Wirkung auf die Produktion verschiedener Entzündungsmediatoren, wie IL-1 β , TNF- α und IL-6.

Die Flavonoide 269 und 270 zeigten keinerlei Effekte.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass EGb 761 die Aktivierung von Mikroglia hemmen kann und pleiotrope antiinflammatorische Effekte auf Mikroglia besitzt. Damit konnten weitere Ergebnisse erhoben werden, die die Wirksamkeit in der kontroversen Diskussion zu Ginkgo-Präparaten unterstützen.

Dennoch sind einige Fragen ungeklärt geblieben. So konnte diese Arbeit nicht zeigen, welche Signalwege für die antiinflammatorische Wirkvermittlung von EGb 761 verantwortlich sind.

Hier sind in der Zukunft noch weiterführende Experimente erforderlich, beispielsweise zu einer eventuellen Beteiligung des PKC-Signalweges. Weiterhin unklar bleibt auch, welche Einzelsubstanz die Wirkung von EGb 761 vermittelt oder ob sich diese aus einem komplexen Zusammenspiel der Einzelsubstanzen ergibt. Auch dies ist in ergänzenden Untersuchungen zu ergründen. Da Mikroglia die ortsständigen Makrophagen des ZNS sind, könnten weitere Experimente zudem zeigen, wie sich EGb 761 auf die Phagozytosefähigkeit auswirkt, um schließlich die komplexe Wirkung auf die Aktivierung von Mikroglia besser zu verstehen.

7 Literaturverzeichnis

Akundi, R.S., Candelario-Jalil, E., Hess, S., Hüll, M., Lieb, K., Gebicke-Haerter, P.J., and Fiebich, B.L. (2005). Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-activated primary rat microglia. *Glia* 51, 199–208.

Amieva, H., Meillon, C., Helmer, C., Barberger-Gateau, P., and Dartigues, J.F. (2013). Ginkgo biloba extract and long-term cognitive decline: a 20-year follow-up population-based study. *PloS One* 8, e52755.

Azevedo, M.I., Pereira, A.F., Nogueira, R.B., Rolim, F.E., Brito, G.A., Wong, D.V., Lima-Júnior, R.C., de Albuquerque Ribeiro, R., and Vale, M.L. (2013). The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy. *Mol. Pain* 9, 53.

Basu, S., Whiteman, M., Matthey, D., and Halliwell, B. (2001). Raised levels of F2-isoprostanes and prostaglandin F2 α in different rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 60, 627–631.

Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung: Demenz-Report, Erste Auflage, Stand Februar 2011, S.6, ISBN 978-3-9812473-4-3.

Bickel, H (2005). Epidemiologie und Gesundheitsökonomie. In: Wallesch, C.-W. & Förstl, H. (Hrsg.) Demenzen. Referenzreihe Neurologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York S. 1-15.

Birks, J., Grimley, E.V., and Van Dongen, M. (2002). Ginkgo biloba for cognitive impairment and dementia. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD003120.

Boesch-Saadatmandi, C., Loboda, A., Wagner, A.E., Stachurska, A., Jozkowicz, A., Dulak, J., Döring, F., Wolffram, S., and Rimbach, G. (2011). Effect of quercetin and its metabolites isorhamnetin and quercetin-3-glucuronide on inflammatory gene expression: role of miR-155. *J. Nutr. Biochem.* 22, 293–299.

Von Boetticher, A. (2011). Ginkgo biloba extract in the treatment of tinnitus: a systematic review. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 7, 441–447.

Boje, K.M., and Arora, P.K. (1992). Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res.* 587, 250–256.

Bruno, C., Cuppini, R., Sartini, S., Cecchini, T., Ambrogini, P., and Bombardelli, E. (1993). Regeneration of motor nerves in bilobalide-treated rats. *Planta Med.* 59, 302–307.

Buttini, M., Limonta, S., and Boddeke H.W.G.M. (1996). Peripheral administration of lipopolysaccharide induces activation of microglial cells in rat brain. *Neurochem. Int.* 29, 25–35.

Catley, M.C., Chivers, J.E., Cambridge, L.M., Holden, N., Slater, D.M., Staples, K.J., Bergmann, M.W., Loser, P., Barnes, P.J., and Newton, R. (2003). IL-1 β -dependent activation of NF- κ B mediates PGE2 release via the expression of cyclooxygenase-2 and microsomal

prostaglandin E synthase. *FEBS Lett.* 547, 75–79.

Chen, Y.-S., Liu, C.-J., Cheng, C.-Y., and Yao, C.-H. (2004). Effect of bilobalide on peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 25, 509–514.

Ching-Hsiang, L., Chiao-Wen, H., Nan-Fu, C., Wen-Sheng, L., Ya-Fen, H., and Wen-Tung, W. (2012). In vivo effects of Ginkgo biloba extract on interleukin-6 cytokine levels in patients with neurological disorders. *Indian J. Pharmacol.* 44, 118–121.

Couzin, J. (2004). Clinical trials. Nail-biting time for trials of COX-2 drugs. *Science* 306, 1673–1675.

Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., and Gan, W.-B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* 8, 752–758.

Dinarello, C.A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87, 2095–2147.

Dinarello, C.A., Cannon, J.G., Wolff, S.M., Bernheim, H.A., and Beutler, B. (1986). Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J. Exp. Med.* 163, 1433–1450.

Drieu, K. (1986). [Preparation and definition of Ginkgo biloba extract]. *Presse Médicale Paris Fr.* 1983 15, 1455–1457.

Endale, M., Park, S.-C., Kim, S., Kim, S.-H., Yang, Y., Cho, J.Y., and Rhee, M.H. (2013). Quercetin disrupts tyrosine-phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase and myeloid differentiation factor-88 association, and inhibits MAPK/AP-1 and IKK/NF- κ B-induced inflammatory mediators production in RAW 264.7 cells. *Immunobiology* 218, 1452–1467.

Engblom, D., Saha, S., Engström, L., Westman, M., Audoly, L.P., Jakobsson, P.-J., and Blomqvist, A. (2003). Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis. *Nat. Neurosci.* 6, 1137–1138.

Ferreira, S.H. (1972). Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nature. New Biol.* 240, 200–203.

Fiebich, B.L., Lieb, K., Engels, S., and Heinrich, M. (2002). Inhibition of LPS-induced p42/44 MAP kinase activation and iNOS/NO synthesis by parthenolide in rat primary microglial cells. *J. Neuroimmunol.* 132, 18–24.

A. Frankola, K., H. Greig, N., Luo, W., and Tweedie, D. (2011). Targeting TNF-Alpha to Elucidate and Ameliorate Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets* 10, 391–403.

Giulian, D. (1987). Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 18, 155–171, 132–133.

Hämäläinen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M., and Moilanen, E. (2007). Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators Inflamm.* 2007, 45673.

- Hanisch, U.-K., and Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* *10*, 1387–1394.
- Hariri, R.J., Chang, V.A., Barie, P.S., Wang, R.S., Sharif, S.F., and Ghajar, J.B.G. (1994). Traumatic injury induces interleukin-6 production by human astrocytes. *Brain Res.* *636*, 139–142.
- Harry, G.J., and Kraft, A.D. (2008). Neuroinflammation and microglia: considerations and approaches for neurotoxicity assessment. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* *4*, 1265–1277.
- He, G., Xu, Y., Wu, L., and Zhang, Z. (2012). [Regulating effect of Ginkgo biloba extract 50 on hippocampal inflammation-related cytokines in senile rats]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi Zhongguo Zhongyao Zazhi China J. Chin. Mater. Medica* *37*, 2130–2134.
- Hensler, J.G., Artigas, F., Bortolozzi, A., Daws, L.C., De Deurwaerdère, P., Milan, L., Navailles, S., and Koek, W. (2013). Catecholamine/Serotonin interactions: systems thinking for brain function and disease. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* *68*, 167–197.
- Hinz, B., Brune, K., and Pahl, A. (2000). Prostaglandin E(2) upregulates cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *272*, 744–748.
- Huang, C.-H., Yang, M.-L., Tsai, C.-H., Li, Y.-C., Lin, Y.-J., and Kuan, Y.-H. (2013a). Ginkgo biloba leaves extract (EGb 761) attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibition of oxidative stress and NF- κ B-dependent matrix metalloproteinase-9 pathway. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* *20*, 303–309.
- Huang, Y.-B., Lin, M.-W., Chao, Y., Huang, C.-T., Tsai, Y.-H., and Wu, P.-C. (2013b). Antioxidant activity and attenuation of bladder hyperactivity by the flavonoid compound kaempferol. *Int. J. Urol. Off. J. Jpn. Urol. Assoc.*
- Ihl, R. (2013). Effects of Ginkgo biloba extract EGb 761(®) in dementia with neuropsychiatric features: review of recently completed randomised, controlled trials. *Int. J. Psychiatry Clin. Pract.* *17 Suppl 1*, 8–14.
- Ikeda-Matsuo, Y., Ikegaya, Y., Matsuki, N., Uematsu, S., Akira, S., and Sasaki, Y. (2005). Microglia-specific expression of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 contributes to lipopolysaccharide-induced prostaglandin E2 production. *J. Neurochem.* *94*, 1546–1558.
- Ilieva, I., Ohgami, K., Shiratori, K., Koyama, Y., Yoshida, K., Kase, S., Kitamei, H., Takemoto, Y., Yazawa, K., and Ohno, S. (2004). The effects of Ginkgo biloba extract on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. *Exp. Eye Res.* *79*, 181–187.
- Jakobsson, P.-J., Thorén, S., Morgenstern, R., and Samuelsson, B. (1999). Identification of human prostaglandin E synthase: A microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 7220–7225.
- Jang, S.-H., Lee, E.K., Lim, M.J., Hong, N.J., Oh, I.S., Jin, Y.W., Jeong, H.-S., Jeong, Y.-S., Lee, J.-C., and Jang, Y.-S. (2012). Suppression of lipopolysaccharide-induced expression of inflammatory indicators in RAW 264.7 macrophage cells by extract prepared from Ginkgo biloba cambial meristematic cells. *Pharm. Biol.* *50*, 420–428.
- Jiao, Y.-B., Rui, Y.-C., Li, T.-J., Yang, P.-Y., and Qiu, Y. (2005). Expression of pro-

inflammatory and anti-inflammatory cytokines in brain of atherosclerotic rats and effects of Ginkgo biloba extract. *Acta Pharmacol. Sin.* 26, 835–839.

Jiao, Y.-B., Rui, Y.-C., Yang, P.-Y., Li, T.-J., and Qiu, Y. (2007). Effects of Ginkgo biloba extract on expressions of IL-1beta, TNF-alpha, and IL-10 in U937 foam cells. *Yao Xue Xue Bao* 42, 930–934.

Johansson, J.U., Pradhan, S., Lokteva, L.A., Woodling, N.S., Ko, N., Brown, H.D., Wang, Q., Loh, C., Cekanaviciute, E., Buckwalter, M., et al. (2013). Suppression of Inflammation with Conditional Deletion of the Prostaglandin E2 EP2 Receptor in Macrophages and Brain Microglia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 16016–16032.

Kamynina, A.V., Filatova, M.P., Koroev, D.O., Abramov, A.I., and Vol'pina, O.M. (2013). [Antibodies to synthetic fragment 95-123 of the prion protein protect neurons and astrocytes from beta-amyloid toxicity]. *Bioorg. Khim.* 39, 131–140.

Kanter, M., Unsal, C., Aktas, C., and Erboga, M. (2013). Neuroprotective effect of quercetin against oxidative damage and neuronal apoptosis caused by cadmium in hippocampus. *Toxicol. Ind. Health.*

Kim, E.K., and Choi, E.-J. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1802, 396–405.

Kobuchi, H., Droy-Lefaix, M.T., Christen, Y., and Packer, L. (1997). Ginkgo biloba extract (EGb 761): inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7. *Biochem. Pharmacol.* 53, 897–903.

Koprowski, H., Zheng, Y.M., Heber-Katz, E., Fraser, N., Rorke, L., Fu, Z.F., Hanlon, C., and Dietzschold, B. (1993). In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 3024–3027.

Kotakadi, V.S., Jin, Y., Hofseth, A.B., Ying, L., Cui, X., Volate, S., Chumanevich, A., Wood, P.A., Price, R.L., McNeal, A., et al. (2008). Ginkgo biloba extract EGb 761 has anti-inflammatory properties and ameliorates colitis in mice by driving effector T cell apoptosis. *Carcinogenesis* 29, 1799–1806.

Kuller, L.H., Ives, D.G., Fitzpatrick, A.L., Carlson, M.C., Mercado, C., Lopez, O.L., Burke, G.L., Furberg, C.D., DeKosky, S.T., and Ginkgo Evaluation of Memory Study Investigators (2010). Does Ginkgo biloba reduce the risk of cardiovascular events? *Circ. Cardiovasc. Qual. Outcomes* 3, 41–47.

Lee, J.-H., and Kim, G.-H. (2010). Evaluation of antioxidant and inhibitory activities for different subclasses flavonoids on enzymes for rheumatoid arthritis. *J. Food Sci.* 75, H212–217.

LeLeiko, R.M., Vaccari, C.S., Sola, S., Merchant, N., Nagamia, S.H., Thoenes, M., and Khan, B.V. (2009). Usefulness of elevations in serum choline and free F2)-isoprostane to predict 30-day cardiovascular outcomes in patients with acute coronary syndrome. *Am. J. Cardiol.* 104, 638–643.

Lemieux, L.I., Rahal, S.S., and Kennedy, C.R.J. (2003). PGE2 reduces arachidonic acid release in murine podocytes: evidence for an autocrine feedback loop. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284, C302–309.

- Longpré, F., Garneau, P., Christen, Y., and Ramassamy, C. (2006). Protection by EGb 761 against beta-amyloid-induced neurotoxicity: involvement of NF-kappaB, SIRT1, and MAPKs pathways and inhibition of amyloid fibril formation. *Free Radic. Biol. Med.* *41*, 1781–1794.
- Lyman, M., Lloyd, D.G., Ji, X., Vizcaychipi, M.P., and Ma, D. (2013). Neuroinflammation: The role and consequences. *Neurosci. Res.*
- Marcocci, L., Maguire, J.J., Droy-Lefaix, M.T., and Packer, L. (1994). The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb 761. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *201*, 748–755.
- Matsumoto, H., Naraba, H., Murakami, M., Kudo, I., Yamaki, K., Ueno, A., and Oh-ishi, S. (1997). Concordant induction of prostaglandin E2 synthase with cyclooxygenase-2 leads to preferred production of prostaglandin E2 over thromboxane and prostaglandin D2 in lipopolysaccharide-stimulated rat peritoneal macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *230*, 110–114.
- McGeer, E.G., and McGeer, P.L. (2010). Neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a field in its infancy. *J. Alzheimers Dis. JAD* *19*, 355–361.
- Moncada, S., and Higgs, E.A. (2006). Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb. Exp. Pharmacol.* 213–254.
- Müller, W.E., Heiser, J., and Leuner, K. (2012). Effects of the standardized Ginkgo biloba extract EGb 761® on neuroplasticity. *Int. Psychogeriatr. IPA* *24 Suppl 1*, S21–24.
- Murakami, M., Naraba, H., Tanioka, T., Semmyo, N., Nakatani, Y., Kojima, F., Ikeda, T., Fueki, M., Ueno, A., Oh-ishi, S., et al. (2000). Regulation of Prostaglandin E2 Biosynthesis by Inducible Membrane-associated Prostaglandin E2 Synthase That Acts in Concert with Cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* *275*, 32783–32792.
- Nagai, M., Saigusa, T., Shimada, Y., Inagawa, H., Oshima, H., and Iriki, M. (1988). Antibody to tumor necrosis factor (TNF) reduces endotoxin fever. *Experientia* *44*, 606–607.
- Neumann, H., Kotter, M.R., and Franklin, R.J.M. (2009). Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain J. Neurol.* *132*, 288–295.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* *308*, 1314–1318.
- De Oliveira, A.C.P., Candelario-Jalil, E., Bhatia, H.S., Lieb, K., Hüll, M., and Fiebich, B.L. (2008). Regulation of prostaglandin E2 synthase expression in activated primary rat microglia: evidence for uncoupled regulation of mPGES-1 and COX-2. *Glia* *56*, 844–855.
- De Oliveira, A.C.P., Candelario-Jalil, E., Langbein, J., Wendeburg, L., Bhatia, H.S., Schlachetzki, J.C.M., Biber, K., and Fiebich, B.L. (2012). Pharmacological inhibition of Akt and downstream pathways modulates the expression of COX-2 and mPGES-1 in activated microglia. *J. Neuroinflammation* *9*, 2.
- Olivenza, R., Moro, M.A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Fernández, A.P., Rodrigo, J., Boscá, L., and Leza, J.C. (2000). Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide synthase in rat brain cortex. *J. Neurochem.* *74*, 785–791.

- Olson, J.K., Girvin, A.M., and Miller, S.D. (2001). Direct activation of innate and antigen-presenting functions of microglia following infection with Theiler's virus. *J. Virol.* 75, 9780–9789.
- Oyama, Y., Chikahisa, L., Ueha, T., Kanemaru, K., and Noda, K. (1996). Ginkgo biloba extract protects brain neurons against oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Brain Res.* 712, 349–352.
- Park, S.E., Sapkota, K., Kim, S., Kim, H., and Kim, S.J. (2011). Kaempferol acts through mitogen-activated protein kinases and protein kinase B/AKT to elicit protection in a model of neuroinflammation in BV2 microglial cells. *Br. J. Pharmacol.* 164, 1008–1025.
- Park, Y.-M., Won, J.-H., Yun, K.-J., Ryu, J.-H., Han, Y.-N., Choi, S.-K., and Lee, K.-T. (2006). Preventive effect of Ginkgo biloba extract (GBB) on the lipopolysaccharide-induced expressions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 via suppression of nuclear factor-kappaB in RAW 264.7 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 985–990.
- Raman, P., DeWitt, D.L., and Nair, M.G. (2008). Lipid peroxidation and cyclooxygenase enzyme inhibitory activities of acidic aqueous extracts of some dietary supplements. *Phytother. Res.* 22, 204–212.
- Robert-Koch-Institut, Statistisches Bundesamt: Heft 28 - Altersdemenz, aus der Reihe: Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Stand 2005, S.7, ISBN 3-89606-162-3.
- Rothwell, N.J., and Luheshi, G.N. (2000). Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci.* 23, 618–625.
- Rothwell, N.J., and Strijbos, P.J. (1995). Cytokines in neurodegeneration and repair. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 13, 179–185.
- Rothwell, N.J., Busbridge, N.J., Lefevre, R.A., Hardwick, A.J., Gauldie, J., and Hopkins, S.J. (1991). Interleukin-6 is a centrally acting endogenous pyrogen in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69, 1465–1469.
- Schroeter, H., Spencer, J.P., Rice-Evans, C., and Williams, R.J. (2001). Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *Biochem. J.* 358, 547–557.
- Selvakumar, K., Bavithra, S., Ganesh, L., Krishnamoorthy, G., Venkataraman, P., and Arunakaran, J. (2013). Polychlorinated biphenyls induced oxidative stress mediated neurodegeneration in hippocampus and behavioral changes of adult rats: Anxiolytic-like effects of quercetin. *Toxicol. Lett.* 222, 45–54.
- Smith, J.V., and Luo, Y. (2003). Elevation of oxidative free radicals in Alzheimer's disease models can be attenuated by Ginkgo biloba extract EGb 761. *J. Alzheimers Dis. JAD* 5, 287–300.
- Smith, W.L., DeWitt, D.L., and Garavito, R.M. (2000). CYCLOOXYGENASES: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 145–182.
- Suter, A., Niemer, W., and Klopp, R. (2011). A new ginkgo fresh plant extract increases microcirculation and radical scavenging activity in elderly patients. *Adv. Ther.* 28, 1078–1088.

- Suzumura, A., Marunouchi, T., and Yamamoto, H. (1991). Morphological transformation of microglia in vitro. *Brain Res.* 545, 301–306.
- Tambuyzer, B.R., Ponsaerts, P., and Nouwen, E.J. (2009). Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. *J. Leukoc. Biol.* 85, 352–370.
- Tanikawa, N., Ohmiya, Y., Ohkubo, H., Hashimoto, K., Kangawa, K., Kojima, M., Ito, S., and Watanabe, K. (2002). Identification and Characterization of a Novel Type of Membrane-Associated Prostaglandin E Synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 884–889.
- Tanioka, T., Nakatani, Y., Semmyo, N., Murakami, M., and Kudo, I. (2000). Molecular Identification of Cytosolic Prostaglandin E2 Synthase That Is Functionally Coupled with Cyclooxygenase-1 in Immediate Prostaglandin E2 Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 275, 32775–32782.
- Tsai, H.-Y., Huang, P.-H., Lin, F.-Y., Chen, J.-S., Lin, S.-J., and Chen, J.-W. (2013). Ginkgo biloba extract reduces high-glucose-induced endothelial reactive oxygen species generation and cell adhesion molecule expression by enhancing HO-1 expression via Akt/eNOS and p38 MAP kinase pathways. *Eur. J. Pharm. Sci.* 48, 803–811.
- Vasseur, M., Jean, T., DeFeudis, F.V., and Drieu, K. (1994). Effects of repeated treatments with an extract of Ginkgo biloba (EGb 761), bilobalide and ginkgolide B on the electrical activity of pancreatic beta cells of normal or alloxan-diabetic mice: an ex vivo study with intracellular microelectrodes. *Gen. Pharmacol.* 25, 31–46.
- Wadsworth, T.L., and Koop, D.R. (2001). Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide. *Chem. Biol. Interact.* 137, 43–58.
- Wadsworth, T.L., McDonald, T.L., and Koop, D.R. (2001). Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced signaling pathways involved in the release of tumor necrosis factor-alpha. *Biochem. Pharmacol.* 62, 963–974.
- Ware, C.F. (2005). Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 787–819.
- Wei, G., Dawson, V.L., and Zweier, J.L. (1999). Role of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in nitric oxide generation in the brain following cerebral ischemia. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1455, 23–34.
- Weichel, O., Hilgert, M., Chatterjee, S.S., Lehr, M., and Klein, J. (1999). Bilobalide, a constituent of Ginkgo biloba, inhibits NMDA-induced phospholipase A2 activation and phospholipid breakdown in rat hippocampus. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 360, 609–615.
- Wiswedel, I. (2009). F(2)-isoprostanes: sensitive biomarkers of oxidative stress in vitro and in vivo: a gas chromatography-mass spectrometric approach. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 580, 3–16.
- Woo, C.W.H., Cheung, F., Chan, V.W.H., Siow, Y.L., and O, K. (2003). Homocysteine stimulates inducible nitric oxide synthase expression in macrophages: antagonizing effect of ginkgolides and bilobalide. *Mol. Cell. Biochem.* 243, 37–47.

- Y Rong, Z.G. (1996). Ginkgo biloba attenuates oxidative stress in macrophages and endothelial cells. *Free Radic. Biol. Amp Med.* 20, 121–127.
- Yao, J., Harvath, L., Gilbert, D.L., and Colton, C.A. (1990). Chemotaxis by a CNS macrophage, the microglia. *J. Neurosci. Res.* 27, 36–42.
- Young, I.S. (2005). Oxidative stress and vascular disease: insights from isoprostane measurement. *Clin. Chem.* 51, 14–15.
- Zhao, Z., Liu, N., Huang, J., Lu, P.-H., and Xu, X.-M. (2011). Inhibition of cPLA2 activation by Ginkgo biloba extract protects spinal cord neurons from glutamate excitotoxicity and oxidative stress-induced cell death. *J. Neurochem.* 116, 1057–1065.
- Zhou, Y.-H., Yu, J.-P., Liu, Y.-F., Teng, X.-J., Ming, M., Lv, P., An, P., Liu, S.-Q., and Yu, H.-G. (2006). Effects of Ginkgo biloba Extract on Inflammatory Mediators (SOD, MDA, TNF- α , NF- κ Bp65, IL-6) in TNBS-Induced Colitis in Rats. *Mediators Inflamm.* 2006.
- Zielińska, M., Kostrzewa, A., and Ignatowicz, E. (2000). Antioxidative activity of flavonoids in stimulated human neutrophils. *Folia Histochem. Cytobiol. Pol. Acad. Sci. Pol. Histochem. Cytochem. Soc.* 38, 25–30.

8 Danksagung

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich für die gute Betreuung durch meinen Doktorvater und Erstkorrektor Prof. Dr. Michael Hüll und meinen Betreuer Dr. Bernd Fiebich bedanken. Auf ihre professionelle und wegweisende Begleitung meiner Arbeit war stets Verlass.

Auch bei PD Dr. Roman Huber, der sich freundlicherweise bereit erklärt hat, das Zweitgutachten meiner Arbeit zu übernehmen, möchte ich mich herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Ulrike Götzinger-Berger für ihre sachkundige und wertvolle Hilfe bei der Kultivierung der Zellkulturen, sowie Brigitte Günter für die tatkräftige Unterstützung und Erfahrung bei ELISAs und EIAs.

Ein lieber Dank geht auch an Harsharan Bhatia, der mit stets bei Fragen oder Problemen zur Seite stand, und Valentin Wegner für die geduldige Einweisung in die Labormethoden.

Außerdem bin ich allen Mitlaboranten für die freundliche Aufnahme in das Team dankbar. Es war eine tolle, lehrreiche Zeit für mich, an die ich immer wieder gern zurückdenke!

Liebe Julia und Steffi, lieber Julian, vielen Dank für eure Unterstützung im Laboralltag.

Liebe Lisa, dir möchte ich ganz besonders für die aufheiternden Momente und Freundschaft danken.

Darüber hinaus geht ein herzliches Dankeschön an meine Freunde, die mich immer wieder motiviert und ermutigt haben, wenn es mit der Wissenschaft einmal nicht ganz so rund lief. Ihr hattet immer ein offenes Ohr für mich und habt mich zum Durchhalten angespornt.

Und nicht zuletzt gilt besonderer Dank meinen lieben Eltern und meinen Schwestern Carmen und Birthe. Ihr wart immer für mich da und habt in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt.