

Universitätsklinik für Neurologie

Ulm

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. A.C. Ludolph

Veränderungen der Immunantwort
mitochondrial geschädigter Mikrogliazellen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Ulm

vorgelegt von

Annette Isabel Ferger

aus

Burghausen

2012

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Th. Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A.C. Ludolph

2. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Brettschneider

Tag der Promotion: 16.05.2013

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Mikrogliazellen.....	1
1.2 Morbus Huntington.....	4
1.3 Morbus Parkinson.....	6
1.4 Mitochondrien und Neurodegeneration.....	8
1.5 Nicht zell-autonome Effekte.....	10
1.6 Mikrogliale Aktivierung	11
1.7 Fragestellung	13
2. Material und Methoden	14
2.1. Material.....	14
2.2 Methoden	18
2.2.1 Zellkultur	18
2.2.1.1 Präparation der Mikrogliazellkulturen.....	18
2.2.1.2 Stimulation der Mikrogliazellen.....	18
2.2.2 Molekularbiologie	19
2.2.2.1 Bestimmung der Zytotoxizität	19
2.2.2.2 Bestimmung der Proteinmenge	20
2.2.2.3 Messung der Stickstoffmonoxid (NO) – Freisetzung.....	21
2.2.2.4 Messung der Zytokin – und IGF-1 - Freisetzung.....	21
2.2.2.5 Messung der Arginase – Aktivität	22
2.2.2.6 Messung des Hypoxia inducible factor-1alpha Gehalts	22
2.2.2.7 Datenanalyse.....	23
3. Ergebnisse	24
3.1 Zytotoxizität der verwendeten mitochondrialen Toxine	24
3.2 Argininstoffwechsel: NO - Freisetzung und Arginase - Aktivität.....	26
3.2.1 Die LPS-induzierte NO-Freisetzung wird durch mitochondriale Toxine inhibiert	26
3.2.2 Die IL4-induzierte Arginase-Aktivität wird durch mitochondriale Toxine inhibiert	28
.....	28

3.3 Effekte der mitochondrialen Toxine auf die Ausschüttung von IL6, TNF-alpha und IGF-1	29
3.3.1 Die klassische Aktivierung für IL6 und TNF-alpha.....	29
3.3.2 Die alternative Aktivierung: IL6 und TNF-alpha.....	31
3.3.3 Die alternative Aktivierung für IGF-1	33
3.4 HIF-1alpha Bestimmung	35
4. Diskussion	36
4.1 Mitochondriale Toxine	36
4.2 Argininstoffwechsel: NO Freisetzung und Arginase – Aktivität	38
4.2.1 NO-Freisetzung: Die mitochondrialen Toxine Malonat und Rotenon bewirkten einen Verlust der LPS-induzierten NO-Freisetzung.....	38
4.2.2 Arginaseaktivität: Die mitochondrialen Toxine 3-NP bzw. Rotenone bewirkten einen Verlust der IL4-abhängigen Erhöhung der Arginaseaktivität.....	39
4.3 Auswirkungen der mitochondrialen Toxine auf die Ausschüttung von IL6, TNF-alpha und IGF-1	40
4.4 HIF-1alpha Bestimmung und ihre Grenzen.....	42
5. Zusammenfassung	44
6. Literaturverzeichnis.....	45
7. Danksagung	51
8. Curriculum Vitae.....	52

Abkürzungsverzeichnis

3-NP	3-Nitropropionsäure
ATP	Adenosintri-phosphat
BSA	bovines Serumalbumin
COCl ₂	Cobaltchlorid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(-2-nitrobenzoesäure)
ELISA	Enzyme linked immunosorbant assay
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIF-1alpha	Hypoxia-Inducible Factor 1alpha
IGF-1	Insulin-like Growth Factor - 1
IL4	Interleukin-4
IL6	Interleukin-6
IL13	Interleukin-13
iNOS	induzierbare NO-Synthase
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysacharid
M.	Morbus
MG	Mikrogliazellen
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
NO	Stickstoffmonoxid
PBR	Peripherer Benzodiazepinrezeptor
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PET	Positronen-Emissionen-Tomographie
PGC-1alpha	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma Coactivator 1alpha: Ein Coactivator der Transkription; beteiligt an der Regulation des Energiehaushaltes der Zelle
SEM	Standard error of the mean
TNF-alpha	Tumor-necrosis-factor-alpha
WST-1	Water soluble tetrazolium
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Neurodegenerative Erkrankungen sind durch einen selektiven Untergang jeweils umschriebener Neuronenpopulationen innerhalb des ZNS gekennzeichnet. Dies trifft sowohl auf Morbus Huntington als auch auf Morbus Parkinson zu, ebenso wie auf den Morbus Alzheimer oder auf die Amyotrophe Lateralsklerose. Eine weitere Gemeinsamkeit der neurodegenerativen Erkrankungen ist eine mitochondriale Dysfunktion und Neuroinflammation. Hierbei ist noch nicht abschliessend geklärt, ob die Störungen des mitochondrialen Stoffwechsels und der Neuroinflammation ursächlich mit der Neurodegeneration in Zusammenhang stehen oder nur Folge der selbigen sind (Petrozzi et al., 2007; Frank-Cannon et al., 2009).

1.1 Mikrogliazellen

Mikrogliazellen sind die Immunzellen des zentralen Nervensystems. Sie sind myeloiden Ursprungs und somit die einzigen nicht neuroektodermalen Zellen des Gehirns. Innerhalb des zentralen Nervensystems hat jede Mikrogliazelle ihr eigenes Areal, welches sie kontrolliert. Dadurch kann sie auf Störungen ihres Umfeldes schnell reagieren. Diese Störungen können hervorgerufen werden durch Infektionen, Traumata oder auch einen Gewebsschaden, wie er beispielsweise beim Schlaganfall oder bei neurodegenerativen Erkrankungen auftritt. Mikrogliazellen in unbeschädigtem Gehirngewebe werden allgemein als „ruhende“ oder auch ihrer Morphologie entsprechend als „ramifizierte“ Mikrogliazellen bezeichnet. Ausgerüstet mit einer Reihe von Rezeptoren können Mikrogliazellen die unterschiedlichsten Signale der Umgebung empfangen und an den Ort des pathologischen Geschehens wandern. Die Aktivierung der Mikrogliazellen bringt auch eine Veränderung des Phänotypen mit sich. Sobald die Mikrogliazelle mit Hilfe ihrer langen Zellfortsätze eine Störung in Funktion oder Struktur des umliegenden Milieus detektiert hat, kommt es zu einer Aktivierung.

Die Immunantwort der Mikrogliazellen kann über zwei unterschiedliche Signalwege aktiviert werden:

Einerseits löst die Anwesenheit von Strukturen, die unter physiologischen Bedingungen nicht (Pathogene) bzw. nicht in der Konzentration (zelluläre Bestandteile) bzw. nicht in der Formation vorhanden sind (Proteinaggregate) eine Aktivierung der Mikrogliazellen aus.

Andererseits führt der Wegfall immunsuppressiver Signale zu einer Aktivierung der Mikrogliazellen. Diese immunsuppressiven Signale werden physiologischerweise ständig von Neuronen ausgesendet.

Die Art und Ausprägung der Immunantwort ist stimulusabhängig und zeigt somit eine große Variabilität. Die Bandbreite der möglichen Immunantworten reicht von der Neurotoxizität durch Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale über die Inflammation und die Phagozytose bis hin zur Neuroprotektion und zur Beeinflussung der Neurogenese und der Geweberegeneration (Hanisch and Kettenmann, 2007).

Mikrogliazellen sind in Herkunft und Funktion den Makrophagen sehr ähnlich und die bei den Makrophagen beschriebenen Immunantworten können daher wahrscheinlich auch auf die Mikrogliazellen übertragen werden. Die Immunantwort wird hierbei grob in 2 Reaktionsschemata eingeteilt:

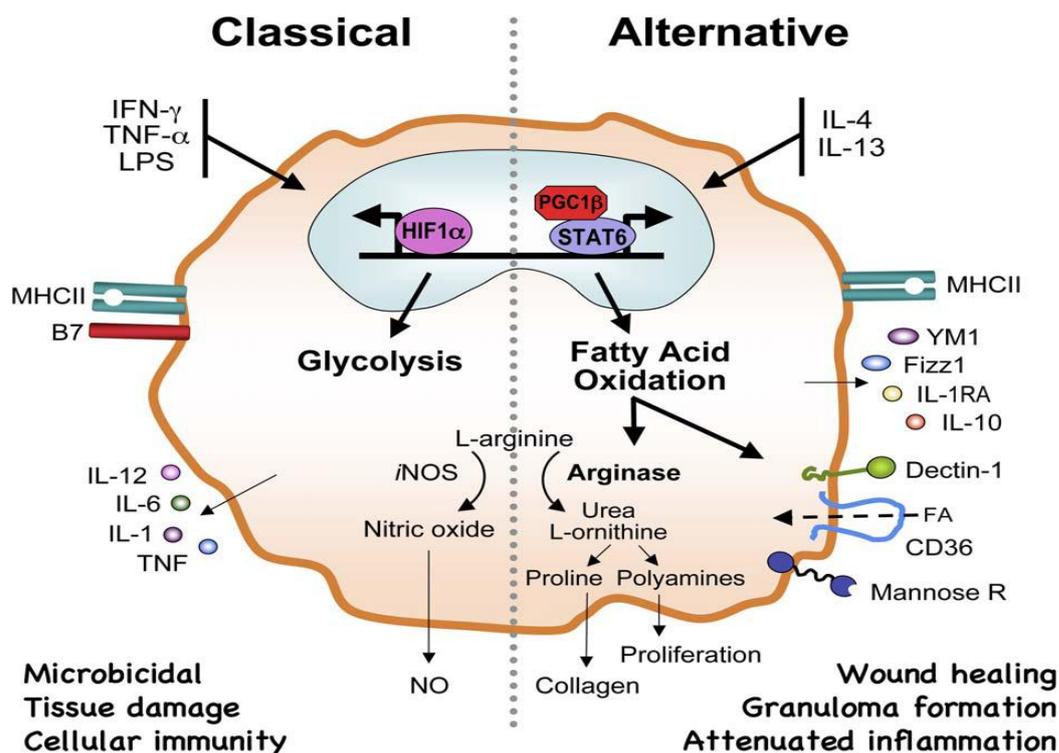


Abbildung 1. Klassische und alternative Aktivierung sind von unterschiedlichen Stoffwechselforgängen abhängig (Lacy-Hulbert and Moore, 2006).

Die klassische Aktivierung

Eine Stimulation mit Interferon-gamma, Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha) oder Lipopolysaccharid (LPS) befähigt die Mikrogliazellen / Makrophagen zur Abwehrreaktion.

Hierfür produzieren die Immunzellen proinflammatorische Zytokine wie IL6, TNF-alpha oder auch freie Sauerstoffradikale, die zur Abwehr von Pathogenen dienen. Besonders die Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), die zur Produktion von dem zytotoxischen NO führt, ist hierfür charakteristisch (Lacy-Hulbert and Moore, 2006). Die klassische proinflammatorische Antwort ist auch verbunden mit einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors Hypoxia inducible factor 1alpha (HIF-1alpha).

Dies ist ein Adaptionsmechanismus der Zelle bei hypoxischem Stress, um das Überleben zu sichern. HIF-1alpha reguliert zahlreiche Gene, die sowohl für die anaerobe Glykolyse als auch für die proinflammatorische Immunantwort wichtig sind (Cramer et al., 2003; Seppet et al., 2009; Walmsley et al., 2009). Die klassische Aktivierung ist assoziiert mit der Glykolyse und kann somit auch unter anaeroben Bedingungen stattfinden (Lacy-Hulbert and Moore, 2006).

Die alternative Aktivierung

Zur Begrenzung von Entzündungsreaktionen sowie zur Wundheilung sind die Mikrogliazellen / Makrophagen im Rahmen der alternativen Aktivierung fähig. Diese wird unter anderem über das Zytokin IL4 der T-Helferzellen vermittelt und vermindert die Freisetzung inflammatorischer Botenstoffe. Gleichzeitig kann die Synthese von Substraten der Wundheilung erhöht werden. Weiterhin wird bei der alternativen Aktivierung das Enzym Arginase aktiviert und setzt hierbei Arginin zu Prolin um (Lacy-Hulbert and Moore, 2006).

Sowohl bei der klassischen als auch bei der alternativen Aktivierung nehmen daher die Reaktionen, die das Substrat Arginin als Substrat benutzen, eine wesentliche Rolle ein. Entweder wird Arginin im Rahmen der klassischen Aktivierung weitestgehend über die induzierbare NO-Synthase zu NO metabolisiert und steht der Abwehr zur Verfügung oder es wird im Rahmen der alternativen Aktivierung weitestgehend von Arginase zu Prolin umgesetzt, einer Vorstufe der Kollagenfasern und somit der Wundheilung dienlich.

Weiterhin ist die alternative Aktivierung an die Fettsäure – Oxidation gebunden und somit von Mitochondrien und von Sauerstoff abhängig (Vats et al., 2006). Diese Immunantwort ist also eng an den zellulären Metabolismus gekoppelt. Da die Fettsäure – Oxidation in den Mitochondrien stattfindet, könnte sich auf diesem Weg eine mitochondriale Dysfunktion nachteilig auf das Immunprofil auswirken: Eine Einschränkung der alternativen Aktivierung würde den Verlust der konstruktiven/reparativen Eigenschaften bedeuten und sekundär die destruktiven/ zytotoxischen Eigenschaften der Mikrogliazellen betonen.

1.2 Morbus Huntington

M. Huntington ist eine autosomal – dominant vererbte neurodegenerative Erkrankung, bei der es zu einem selektiven Untergang der striatalen Neurone kommt. M. Huntington ist klinisch durch folgende Symptome charakterisiert: Eine positive Familienanamnese, progressive choreatische oder rigide motorische Störungen und psychiatrische Auffälligkeiten, einhergehend mit einer progressiven Demenz. Der Verlauf der Erkrankung ist progredient und endet typischerweise nach ca. 15 – 20 Jahren tödlich (Gil and Rego, 2008).

Der zugrunde liegende Gendefekt der Huntington-Erkrankung ist eine instabile Expansion des CAG – Trinukleotid – Repeats auf dem kurzen Arm von Chromosom 4 (4p16.3). Diese Mutation führt zu einer Verlängerung des PolyQ-Traktes im entsprechenden Genprodukt, dem Protein Huntingtin. Beim gesunden Menschen wiederholt sich das CAG – Basentriplett 8- bis 35-mal, zum Krankheitsausbruch kommt es ab 39 Wiederholungen (Weydt et al., 2010). Obwohl das mutierte Huntingtin von Geburt an exprimiert wird, treten die ersten Symptome typischerweise erst im mittleren Lebensalter auf (ca. 35. – 50. Lebensjahr). (Gil and Rego, 2008). Dabei zeigt sich einen Antizipationseffekt, d.h. die Krankheitsmanifestation ist umso früher, je mehr CAG – Repeats vorliegen (Weydt et al., 2010). Ausserdem tragen Menschen mit einer Länge des CAG-Triplets zwischen 27 und 35 Wiederholungen ein erhöhtes Risiko, an M. Huntington zu erkranken (Ha and Jankovic, 2011).

Der pathogene Mechanismus bei M. Huntington ist noch nicht abschliessend geklärt. Aktuell existieren zwei Hypothesen, die sich nicht gegenseitig ausschliessen: Entweder ist der Verlust des normalen Huntingtin krankheitsauslösend oder das mutierte Huntingtin besitzt toxische Eigenschaften.

Hypothese 1: Der Verlust des normalen Huntingtins

Die Mutation bei M. Huntington führt zu einer verminderten Aktivität des physiologischen Huntingtins. Normales Huntingtin scheint lebenswichtig zu sein, da knock – out Mäuse während der Embryogenese versterben. Im Rahmen der Neurogenese wird Huntingtin ebenso benötigt, da es bei einem Mangel zu Fehlbildungen des ZNS kommt. Des Weiteren wurden neuroprotektive Eigenschaften des Huntingtin nachgewiesen, da Huntingtin eine Rolle bei der Produktion des Wachstums-faktors Brain-derived neurotrophic factors spielt und die neuronale Gentranskription, der Axontransport und die Exo- und Endozytose an

den Synapsen unter dem Einfluss von Huntingtin steht. In in-vivo und in-vitro Untersuchungen zeigte das Protein einen anti-apoptischen Effekt (Cattaneo et al., 2005).

Hypothese 2: Toxische Wirkungen des normalen Huntingtin

Mutiertes Huntingtin zeigt eine untypische Lokalisation in der Zelle und akkumuliert perinukleär sowie als sog. „neuronal intranuclear inclusions“ (Gil & Rego, 2008). Diese intranukleären Proteinaggregate wurden anfangs mit als ursächlich für die Erkrankung angesehen, da man sie bereits vor dem klinischen Symptombeginn nachweisen konnte. Inzwischen ist man anhand zahlreicher weiterführender Untersuchungen dazu übergegangen, das Vorhandensein dieser Proteinaggregate differenzierter zu betrachten: Diese Proteinaggregate sind das Endprodukt eines mehrschrittigen Proteinfaltungsprozesses. Hierbei werden die löslichen, nichttoxischen mutierten Proteine mit dem verlängerten PolyQ-Trakt zu Oligomeren formiert, die toxische Eigenschaften besitzen und sowohl in einer löslichen als auch in einer nichtlöslichen Form vorliegen können. Diese toxischen Zwischenprodukte könnten zu den genannten Proteinaggregaten weiter formiert werden. Diesen Proteinaggregaten müssten daher protektive Eigenschaften zugesprochen werden, da hierdurch eine Anhäufung der toxischen Zwischenstufen verhindert wird. (Gil & Rego, 2008; (La Spada et al., 2011).

1.3 Morbus Parkinson

M. Parkinson ist durch das klinische Bild Tremor, Rigor, Akinese und posturale Instabilität gekennzeichnet. Klinisch werden drei Typen unterschieden: Der Tremordominanz-Typ, der akinetisch-rigide Typ, bei dem der Tremor fehlt oder nur geringfügig ausgeprägt ist und der Äquivalenztyp, bei dem alle drei Kardinalsymptome annähernd gleich ausgeprägt sind. Der mittlere Krankheitsbeginn des M. Parkinson ist um das 55. Lebensjahr (17. – 80. Lebensjahr). Meist gehen subtile Störungen vegetativer Funktionen wie Hyposmie, Obstipation und Seborrhoe der Bewegungsstörung voraus.

Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer Verschlechterung der Symptomatik mit Verlust von spontanen Bewegungen bis hin zu Phasen des Freezings, einem Zustand, in dem die Patienten wie „eingefroren“ verharren und zu keiner spontanen Bewegung mehr in der Lage sind. Regelmäßig wird auch eine Hypomimie beobachtet. In fortgeschrittenen Stadien stürzen die Patienten zudem oft aufgrund einer posturalen Instabilität. Häufig entwickeln die Erkrankten eine psychomotorische Verlangsamung im Sinne einer Bradyphrenie (Dauer and Przedborski, 2003).

Bei der Parkinsonerkrankung kommt es zu einem selektiven Untergang dopaminerger Neurone. Die ersten klinischen Symptome zeigen sich, wenn bereits mehr als die Hälfte der dopaminergen Neurone in der Substantia nigra zugrunde gegangen sind (Liu, 2006).

Im Gegensatz zu M. Huntington ist M. Parkinson nicht monogenetisch bedingt und die Ursache für den Tod der Neurone ist noch nicht geklärt (Liu, 2006).

Bei familiären Fällen des M. Parkinson könnten mehrere Mechanismen mit ursächlich sein: Zum einen könnten Störungen in der Proteindegradation eine Rolle spielen. Alpha-Synuclein- oder Parkin-Mutationen, die mit M. Parkinson assoziiert sind, kodieren beide für Proteine des Ubiquitin-Proteasomen-Systems. Allerdings muss man bei diesen Überlegungen miteinbeziehen, dass durch Studien an eineiigen Zwillingen dem Einfluss der genetischen Komponente bei der sporadischen Form dieser Erkrankung nicht zuviel Bedeutung beigemessen werden konnte (Dauer and Przedborski, 2003).

Ein anderen Mechanismus, der bei M. Parkinson eine Rolle spielen könnte sind Defekte in der mitochondrialen Funktion.

Der familiär bedingte M. Parkinson ist auch mit Genmutationen assoziiert, die für Proteine kodieren, die direkt mit Mitochondrien interagieren und somit auch zu einer mitochondrialen Dysfunktion beitragen. Hierbei kommt insbesondere den Genloci Parkin und Pink1 eine besondere Bedeutung zu (Sato and Hattori, 2011). Parkin und Pink1 sorgen durch einen gemeinsamen Mechanismus für die Funktionstüchtigkeit der Mitochondrien.

Dies wird auch gestützt durch jüngere Studien an transgenen Tieren, die eine mögliche Verbindung bestimmter Parkinson-assoziiierter Genmutationen an Parkin und Pink1 mit dem Stoffwechsel der Mitochondrien herleiten lassen (Koh and Chung, 2010).

Korrelierend dazu zeigten Parkin knock-out Larven der Drosophila-Fliege Parkinson-ähnliche Symptome (Vincent et al., 2012). Dabei suggerierten die Ergebnisse dieser Studie, dass die genetisch ausgelöste mitochondriale Dysfunktion vorrangig durch den damit verbundenen gestörten Energiestoffwechsel zu den Parkinson-ähnlichen Symptomen führte (Vincent et al., 2012).

1.4 Mitochondrien und Neurodegeneration

Mitochondrien sind Zellorganelle, die sauerstoffabhängig zur ATP-Synthese beitragen und daher als Energielieferant den Zellen dienen. Des Weiteren spielen sie auch noch eine Rolle im Kalziumhaushalt der Zelle sowie bei der Zellproliferation und Apoptose (Han et al., 2011). Für Neurone haben die Mitochondrien eine große Bedeutung, da die Signaltransduktion ein sehr energieaufwändiger Prozess ist und die Neurone daher auf funktionstüchtige Mitochondrien angewiesen sind (Han et al., 2011). Im alternden oder neurodegenerativ veränderten Gehirn konnten vermehrt Mutationen der mitochondrialen DNA nachgewiesen werden und mitochondriale Dysfunktionen werden mit neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Parkinson oder M. Huntington in Zusammenhang gebracht (Lin and Beal, 2006; Kim et al., 2010).

Daher macht dieser Zusammenhang zwischen mitochondrialer Dysfunktion und Neurodegeneration die Mitochondrien zu einem interessanten Ansatzpunkt für weitere Forschungen.

Mitochondriale Störung bei M. Huntington

Auf zellulärer und subzellulärer Ebene wurden eine Reihe von Störungen des mitochondrialen Stoffwechsels bei M. Huntington nachgewiesen. Besonderes Augenmerk liegt hierbei auf einer verminderten Aktivität der Komplexe II und III der Atmungskette bei M. Huntington. Die mitochondrialen Toxine Malonat oder 3-NP, die den Komplex II der Atmungskette inhibieren, führen nicht nur zu einer mitochondrialen Dysfunktion, sondern lösen im Tierversuch auch eine striatale Neurodegeneration aus, wie sie auch für M. Huntington bekannt ist (Ludolph et al., 1991; Gil and Rego, 2008; Kumar et al., 2010). Bei M. Huntington spricht einiges dafür, dass sich die mitochondriale Dysfunktion nicht nur auf Nervenzellen beschränkt, sondern den Gesamtorganismus betrifft. Ein reduzierter zerebraler Glucosestoffwechsel wurde bei Huntington Erkrankten nachgewiesen, doch Störungen des Glucosestoffwechsels zeigten sich auch in der Skelettmuskulatur Betroffener, zudem ist im Krankheitsverlauf regelhaft ein drastischer Gewichtsverlust zu beobachten. Es ist daher anzunehmen, dass das ubiquitär exprimierte mutierte Huntingtin zu einer systemischen Störung des Energiestoffwechsels führt. (Mochel and Haller, 2011).

Mitochondriale Störung bei M. Parkinson

Vieles spricht dafür, dass eine mitochondriale Dysfunktion ein Teil der Pathogenese der Parkinsonerkrankung ist. Auf molekulargenetischer Ebene kommt den Genmutationen für Parkin und Pink1 aktuell besondere Aufmerksamkeit zu, wie oben dargestellt.

Daneben gibt es auch deutliche Hinweise von Toxin-Modellen: Es ist für mehrere Inhibitoren des Komplex I der Atmungskette bekannt, dass sie eine Parkinson ähnliche Symptomatik auslösen und zu einem selektiven Untergang dopaminerger Neurone führen: Der Komplex I Inhibitor 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) führt sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen zum Parkinsonismus, indem es durch das gliale Enzym Monoaminoxidase B (MAO-B) in MPP⁺ metabolisiert wird und als solches in den neuronalen Mitochondrien die Atmungskette hemmt. Ebenso bewirkt das Pestizid Rotenon bei Ratten eine Parkinsonsymptomatik (Henchcliffe and Beal, 2008) (Petrozzi et al., 2007). Vor kurzem wurde zudem in einer prospektiven Studie nachgewiesen, dass der chronische Umgang mit Rotenon auch beim Menschen mit einem gehäuften Auftreten von Parkinson assoziiert ist (Tanner et al., 2011).

Desweiteren gibt es auch biochemische Hinweise aus post-mortem Untersuchungen von Parkinsonpatienten: Oft wurde ein Defekt des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette nachgewiesen. (Hanisch and Kettenmann, 2007; Petrozzi et al., 2007; Henchcliffe and Beal, 2008).

1.5 Nicht zell-autonome Effekte

Sogenannte „nicht-zell autonome Effekte“ werden inzwischen mit neurodegenerativen Prozessen in Zusammenhang gebracht, d.h. dass nicht die betroffenen Neurone per se die krankheitsauslösenden Bedingungen schaffen, sondern dass noch andere –nichtneuronale- Faktoren, eine entscheidende Rolle im Pathomechanismus spielen (Lobsiger and Cleveland, 2007; La Spada et al., 2011).

Dass nicht-zell autonome Effekte bei M. Huntington vorliegen könnten, stützt sich auf die Beobachtung, dass neurodegenerative Prozesse im Tierversuch nur fassbar waren, wenn nicht nur die striatalen Neurone mutiertes Huntingtin exprimierten, sondern wenn mehrere Neuronentypen und Gliazellen das mutierte Protein exprimierten (Lobsiger and Cleveland, 2007; Ilieva et al., 2009).

Nicht-zell autonome Effekte scheinen auch bei M. Parkinson eine Rolle zu spielen.

Eine Überexpression des alpha-Synucleins in den benachbarten Oligodendrozyten führt auch zum Untergang der Neurone. Weitere Argumente für das Vorliegen nicht zell-autonomer Effekte kommen aus dem MPTP-Modell, also ein toxisches Modell für Parkinson: MPTP wird erst vom Organismus zum toxischen Metaboliten MPP⁺ enzymatisch durch die Monoaminoxidase B umgewandelt. Dieses Enzym findet sich vor allem in den Astrozyten, und auch in serotonergen Neuronen, nicht jedoch in den von der Neurodegeneration betroffenen dopaminergen Neuronen. Ebenso bewirkt eine Hemmung der mikroglialen Aktivierung eine Verminderung neurodegenerativer Prozesse (Ilieva et al., 2009). Ausserdem kommt es zu verminderten Dopaminkonzentrationen in den Gehirnen von Mäusen durch eine intranigrale Applikation von LPS. Eine inflammatorische Antwort könnte daher wesentlicher Bestandteil der Parkinson Erkrankung sein.

1.6 Mikrogliale Aktivierung

Eine Mikroglia - Aktivierung ist für verschiedene neurodegenerative Erkrankungen bekannt, wie z.B. bei M. Parkinson, M. Huntington, M. Alzheimer oder der Amyotrophen Lateralsklerose (Block et al., 2007; Frank-Cannon et al., 2009; Glass et al., 2010). Dabei sind die Anzeichen einer Neuroinflammation oft noch vor dem Auftreten einer Neurodegeneration sichtbar (Tai et al., 2007; Frank-Cannon et al., 2009).

Es wird davon ausgegangen, dass diese Neuroinflammation bei neurodegenerativen Prozessen multifaktoriell ist: Eine Akkumulation mutierter Proteine, die Freisetzung bestimmter Botenstoffe von geschädigten Neuronen als auch eine Dysregulation von Immunzellen spielen eine Rolle. Die ausgelöste Immunantwort kann sich sowohl positiv als auch negativ auf die Neurodegeneration auswirken (Wyss-Coray and Mucke, 2002).

Vor allem die potentielle Neurotoxizität der Mikrogliazellen durch die Freisetzung zytotoxischer Moleküle im Verlauf einer pro-inflammatorischen Antwort könnte den Prozess der Neurodegeneration fördern.

Für M. Huntington konnte gezeigt werden, dass die neurodegenerativen Veränderungen mit einer Neuroinflammation einhergehen. Diese Entzündungsreaktion ist ein frühes Ereignis im Krankheitsverlauf und kann mittels PET-CT sogar bei noch symptomlosen Genträgern gesehen werden (Weydt et al., 2010). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die mikrogliale Aktivierung mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert (Frank-Cannon et al., 2009). Weiterhin wurde in post - mortem Gehirnen von Huntingtonpatienten sowohl eine Anhäufung von aktivierten Mikrogliazellen gefunden (Sapp et al., 2001), als auch eine erhöhte Konzentration neurotoxischer Zwischenprodukte des Tryptophanabbaus. Dieser Abbau findet im Gehirn hauptsächlich in den Mitochondrien der Astrozyten und Mikrogliazellen statt. Dies legt nahe, dass an dem neurodegenerativen Prozess bei M. Huntington Glia – Zellen beteiligt sind. Es ist möglich, dass die Expression des mutierten Huntingtin in den Mikrogliazellen eine Störung des Tryptophan – Stoffwechsels bewirkt, womit eine Akkumulation neurotoxischer Zwischenprodukte begünstigt wird (Guidetti et al., 2000; Schwarcz et al., 2010).

Auch bei Parkinson - Patienten wurden in mehreren Studien Entzündungsmediatoren wie TNF oder IL6 sowohl im Liquor als auch in post-mortem Untersuchungen des Gehirns nachgewiesen (Frank-Cannon et al., 2009). Ebenso konnte im Tiermodell für die Parkinsonerkrankung eine Erhöhung von Zytokinen beobachtet werden. Der Nachweis proinflammatorischer Zytokine gelang oft vor dem Beginn der Neurodegeneration. Diese

Beobachtungen legten den Schluss nahe, dass die von Mikrogliazellen freigesetzten Zytokine zur Entstehung der Neurodegeneration beitragen könnten (Liu, 2006). Neuere Studien mittels PET bestätigten die Annahme, dass Parkinson - Patienten eine deutlich gesteigerte mikrogliale Aktivierung zeigten im Vergleich zu gesunden Personen gleichen Alters (Frank-Cannon et al., 2009).

Analog zu M. Huntington gibt es auch bei M. Parkinson die Annahme, dass ein gestörter Tryptophan-Stoffwechsel mit einer Anhäufung neurotoxischer Produkte vorliegen könnte (Zinger et al., 2011).

Parkinsonmodelle mittels MPTP bei Mäusen und Primaten lassen zudem einen engen zeitlichen Zusammenhang zwischen einer Aktivierung von Mikrogliazellen und des MPTP-induzierten Sterbens dopaminerger Neurone nachweisen (Liu, 2006).

1.7 Fragestellung

In Zusammenschau der bisherigen Erkenntnisse ist davon auszugehen, dass eine mitochondriale Dysfunktion und Neuroinflammation sowohl bei M. Huntington als auch bei M. Parkinson vorliegt. Da die mutierten Gene ubiquitär exprimiert werden, könnten mitochondriale Schädigungen auch in Mikrogliazellen vorkommen. Da die verschiedenen Immunantworten eng an verschiedene Stoffwechselforgänge gekoppelt sind, galt es zu klären, ob eine mitochondriale Dysfunktion einen Einfluss auf die Immunantwort der Mikrogliazellen hat. Hierbei war vor allem von Interesse, ob die Immunantwort von mitochondrial geschädigten Mikrogliazellen zu Gunsten einer pro-inflammatorischen, zytotoxischen Aktivierung beeinträchtigt ist.

Um diese Frage zu beantworten, wurden primäre Mikrogliazellkulturen von neugeborenen Mäusen mit mitochondrialen Toxinen (die im Tiermodell Neurodegeneration auslösen) inkubiert und klassisch oder alternativ aktiviert (mittels LPS bzw. IL-4). Daraufhin wurde die Freisetzung bestimmter Zytokine oder Sauerstoffradikale gemessen bzw. der Gehalt eines Transkriptionsfaktor der klassischen Aktivierung und auch die Enzymaktivität eines Enzyms der alternativen Aktivierung bestimmt.

Die Rolle der Mikrogliazellen bei neurodegenerativen Veränderungen wie bei M. Parkinson oder M. Huntington zu klären, würde nicht nur ein tieferes Verständnis für den Pathomechanismus der Neurodegeneration mit sich bringen, sondern vielleicht auch potentielle Therapieansätze eröffnen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Geräte

Pipetten	Eppendorf Research Einkanal-Pipetten mit variabler Volumeneinstellung, Eppendorf Eppendorf Research Pro 8-Kanal-Pipette, Eppendorf
Pipettenspitzen	1000 ul, Artikel-Nr. 70.762, Sarstedt 200 ul, Artikel-Nr. 70.760.002, Sarstedt 10 ul, Artikel-Nr. 70.1115, Sarstedt
Pipettiergerät	Pipetboy acu, IBS Integra Biosciences
Messpipetten	5,0 / 0,1 ml, Artikel-Nr. 612-1097, VWR 10,0 / 0,1 ml, Artikel-Nr. 612-1098, VWR
Pasteurpipetten	Glas, Volumen 2ml, Länge 230 mm, Artikel-Nr. 612-1702, VWR Collection
PP-Röhrchen	steril, 15 ml, Artikel-Nr. 188271, Greiner steril, 50 ml, Artikel-Nr. 227261, Greiner
Zellkulturschale	rund, 56,7 cm ² , steril, mit Deckel, Artikel-Nr. 734-2043, VWR
Inkubator	CO ₂ - Inkubator Heraeus, Thermo Scientific
Zentrifuge	Heraeus Sepatech, Minifuge RF, Thermo Scientific
Kühlzentrifuge	Mikroliterzentrifuge, gekühlt, Heraeus Biofuge Fresco, VWR
Lichtmikroskop	Axiovert 25, Zeiss
Okular	LOMO M6C-10
Zählkammer	Neubauer, BrightLine, Optik Labor, Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm ²
Photometer	EL _x 800 UV, Universal Microplate Reader, BioTek Instruments
Zellkulturflaschen	Zellkulturflasche mit Gasaustausch, 75 cm ² , Artikel-Nr. 353110, BD Falcon
96-Wellplatten	96-Well Zellkulturplatte Primaria, Artikel-Nr. 353872, BD Falcon

6-Wellplatte	6-Well Zellkulturplatte Primaria, Artikel-Nr. 353846, BD Falcon
ELISA-Platten	F96 NUNC Microwell Plates, klar, maxi Sorp, Artikel-Nr. 735-0083, NUNC/ Thermo Fisher Scientific
<u>Chemikalien und Lösungen</u>	
Trypanblau Lösung	Artikel-Nr. T 8154, Sigma-Aldrich
Trypsin	Trypsin, 2,5%, 10x, flüssig, Artikel-Nr. 15090-046, Invitrogen/Gibco,
DNase	Desoxyribonuklease I, Artikel-Nr. LS 002138, Worthington, wurde in einer Konzentration von 10mg/ml verwendet
Poly-L-Ornithin	Poly-L-Ornithin-Hydrobromid, Artikel-Nr. P 3655, Sigma-Aldrich, 1mg/ml
Tween – 20	Artikel-Nr. P 9416, Sigma – Aldrich
Triton – X – 100	Artikel-Nr. A4975,01, AppliChem
Dimethyl – Sulphoxid	Artikel-Nr. D2650, Sigma – Aldrich
Waschpuffer	0,05% Tween-20 in PBS
Puffer zur Beschichtung	8,4g NaHCO ₃ , 3,56g Na ₂ CO ₃ , mit deionisiertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt, pH 9,5
Probenverdünner	1% BSA in PBS
Phosphatgepufferte Salz- Lösung (=PBS)	8,0g NaCl, 1,16g Na ₂ HPO ₄ , 0,2g KH ₂ PO ₄ , 0,2g KCl, mit deionisiertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt, pH 7,2
TMB Substratreagenz	TMB Substrate Reagent Set, Artikel-Nr. BLD-421101, Biozol
Stopplösung	Schwefelsäure, Artikel-Nr. 109074, Merck
BSA	Albumin Fraktion V, Artikel-Nr. 8076.2, Roth
Thioarginin Hydrobromid	Artikel-Nr. CAY-80240-1, Biozol
DTNB	Artikel-Nr. CAY-760912-1, Biozol, Zur Quantifizierung von Thiolgruppen
Reagenzienverdünner	5% Tween in 1x PBS
Aprotinin	Artikel-Nr. A 6279, Sigma-Aldrich
Leupeptin	Artikel-Nr. L 8511, Sigma-Aldrich

Pepstatin A	Artikel-Nr. P 4265, Sigma-Aldrich
Spüllösung	Ampuwa für Spülzwecke, Artikel-Nr. 1088813, Fresenius Kabi

Mitochondriale Toxine und Stimulantien

3-NP	<p>3-Nitropropionsäure, ein nicht-kompetitiver Hemmer an Komplex II der Atmungskette.</p> <p>Verwendete Konzentrationen: 0,3 mM und 1 mM. 3-NP wurde erst in DBPS in einer Konzentration von 50 mM gelöst und der pH-Wert auf 7,2 eingestellt. Anschliessend wurde in DMEM ohne FBS weiter verdünnt.</p> <p>Artikel-Nr. N5636, Sigma-Aldrich</p>
Malonat	<p>ein kompetitiver Hemmer an Komplex II der Atmungskette. Konkurriert mit Succinat um die Succinat-Dehydrogenase.</p> <p>Verwendete Konzentrationen: 3 mM und 10 mM, gelöst in DMEM ohne FBS.</p> <p>Artikel-Nr. M 1750, Sigma-Aldrich</p>
Rotenon	<p>nicht-kompetitiver Hemmer an Komplex I der Atmungskette.</p> <p>Verwendete Konzentrationen: 0,02 μM, 0,2 μM und 2 μM.</p> <p>Rotenon wurde erst in DMSO gelöst in einer Konzentration von 1 mM, daraufhin erfolgte die weitere Verdünnung in DMEM ohne FBS.</p> <p>Artikel-Nr. R 8875, Sigma-Aldrich</p>
IL-4	<p>rekombinantes Maus Interleukin-4, gelöst in DPBS in einer Konzentration von 100 μg/ml. Anschliessend erfolgte die weitere Verdünnung in DMEM ohne FBS.</p> <p>Artikel-Nr. 404-ML-010, R&D Systems,</p> <p>Die verwendete Konzentration des IL-4 war stets 10 ng/ml.</p>
LPS	<p>rekombinantes Lipopolysaccharid, gelöst in DPBS in einer Konzentration von 1mg/ml. Anschliessend erfolgte die weitere Verdünnung in DMEM ohne FBS.</p> <p>Artikel-Nr. L 4391, Sigma – Aldrich</p> <p>Die verwendete Konzentration war stets 1μg/ml.</p>

Medien Zellkultur

Das Kulturmedium DMEM/ 10% FBS/PS:

„Dulbecco´s Modified Eagle Medium“ (DMEM) einfach, flüssig, mit hohem Glukoseanteil, (Artikel-Nr. 61965.059, Invitrogen/Gibco) wurde mit 100 U/ml Penicillin und 100 ug/ml Streptomycin (PS:Penicillin – Streptomycin-Lösung, Artikel-Nr. 15140-122, Invitrogen/Gibco) und 10% Foetal Bovine Serum (FBS: hitzeinaktiviertes Foetal Bovine Serum Gold, Artikel-Nr. A15-151, PAA) versetzt.

Das Kulturmedium DMEM/GlutaMAX/PS:

„Dulbecco´s Modified Eagle Medium“ (DMEM) mit 4500 mg/l D-Glukose, ohne L-Glutamin, Natriumpyruvat, und Phenolrot (DMEM, Artikel-Nr. 31053-044, Invitrogen/Gibco) wurde mit 100 U/ml PS und 2mM GlutaMAX-I Supplement (200 mM, Artikel-Nr. 35050-038, Invitrogen) versetzt .

Der Puffer “Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline” (DPBS, Invitrogen/Gibco) einfach, flüssig, wurde zum Waschen der Mikrogliazellen verwendet. Es kam sowohl DPBS mit als auch ohne Zusatz von Magnesium und Calcium zur Anwendung.

DPBS - Artikel-Nr. 14190-169, Invitrogen/Gibco

DPBS + Artikel-Nr. 14040-174, Invitrogen/Gibco

Verwendete Kits

Protein-Assay	DC Protein Assay, Artikel-Nr. 500-0116, Bio-Rad
NO-Assay	Griess Reagent System, Artikel-Nr. G2930, Promega
Zytokin-Assay	ELISA MAX Set Standard für Maus IL-6, Artikel-Nr. 431301, Biozol Maus TNF-alpha, Artikel-Nr. 430901, Biozol DuoSet ELISA Development System für Maus IGF-1, Artikel-Nr. DY 791, R&D Systems
HIF-1alpha-Assay	DuoSet IC für Humanes/ Maus Total HIF-1alpha, Artikel-Nr. DYC 1935-2, R&D Systems
LDH-Assay	LDH-Cytotoxicity Assay Kit, Artikel-Nr. K311-400, Biovision
Proliferations-Assay	Quick Cell Proliferation Assay Kit, Artikel-Nr. K301-500, Biovision

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Präparation der Mikrogliazellkulturen

Mikrogliazellen wurden aus dem Kortex von neugeborenen Mäusen präpariert (angezeigt nach § 4 Abs. 3 Tierschutzgesetz vom 25. Mai 1998). Die Tiere wurden dekapitiert, das Gehirn entnommen und der Kortex herauspräpariert. Nach Entfernung der Hirnhäute und Blutgefäße wurden die Kortexhälften dreimal mit DPBS gewaschen, für 4 - 5 min mit 2,5% Trypsin und DNase 10mg/ml in DPBS inkubiert zur Dissoziation des Gewebes, dann nochmals dreimal mit DPBS gewaschen. Nach erneuter Zugabe von 10 mg/ml DNase zur Verhinderung einer Verklumpung durch freie DNA wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette die Suspension homogenisiert um eine Einzelzellsuspension herzustellen. Nach Zugabe von 5 ml DMEM/10% FBS/PS erfolgte eine Zentrifugation bei 800 Upm für 10 Minuten bei 4°C. Der Überstand wurde abgenommen und erneut DMEM/ 10% FBS/PS dazugegeben. Nach wiederholter Homogenisierung wurden die Zellen in Poly – Ornithin beschichteten Kulturflaschen ausplattiert. Nach 3 Tagen erfolgte eine dreimalige Waschung der Kulturen mit DPBS um nicht angeheftete Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Dann wurden die Zellen für 9 - 12 Tage im DMEM/10% FBS/PS - Medium bei 36,9 °C und 5 % Kohlendioxid kultiviert. Nach ca. 9 Tagen bestand die Vorkultur aus einem konfluenten Astrozytenmonolayer, worauf sich Mikrogliazellen befanden. Die Mikrogliazellen konnten durch leichtes Schütteln der Kulturflaschen von dem Astrozytenrasen abgelöst werden. Der Überstand wurde gesammelt, zentrifugiert und die resuspendierten Mikrogliazellen anschließend in einer Dichte von 3×10^4 Zellen/Well bzw. 5×10^4 Zellen/Well in 96-Wellplatten oder als 60×10^4 Zellen/Well in 6-Wellplatten in DMEM/GlutaMAX/PS ausplattiert.

2.2.1.2 Stimulation der Mikrogliazellen

Die mitochondrialen Toxine 3-NP, Malonat oder Rotenon finden allgemein Verwendung zur Simulation neurodegenerativer Erkrankungen, da sie im Tiermodell Symptome erzeugen, die denen von M. Parkinson bzw. M. Huntington sehr ähnlich sind (Bonsi, P. et al., 2006).

Zur Untersuchung des Einflusses mitochondrialer Toxine auf die inflammatorische Antwort von Mikrogliazellen wurden die Zellen folgendermassen behandelt:

	Kontrolle	3-NP [mM]		Mal [mM]		Rot [μ M]		
		0,3	1	3	10	0,02	0,2	2
Kontrolle								
1 μ g/ml LPS								
10 ng/ml IL-4								
IL-4 + LPS								

Abbildung 2a. Schema der Stimulation von Mikrogliazellen (MG).

Die in den Wellplatten kultivierten Mikrogliazellen wurden mit den Toxinen in DMEM/GlutaMAX/PS inkubiert. Unterschiedliche Toxinkonzentrationen sollten hierbei eine mögliche dosisabhängige Wirkung sichtbar machen. Außerdem wurden die Mikrogliazellen in der einen Hälfte der Wellplatte zusätzlich mit dem antiinflammatorischen Zytokin IL-4 inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden einige Mikrogliazellen zusätzlich noch mit dem proinflammatorisch wirkenden LPS behandelt (s. Abb.2a). Nach weiteren 18 Stunden Inkubation konnte dann die Durchführung der entsprechenden Assays erfolgen.

Die dargestellte Stimulation wurde nicht für die Arginasebestimmung verwendet, hierfür wurde ein eigenes Pipettierschema erstellt (S. Abb. 2b).

2.2.2 Molekularbiologie

2.2.2.1 Bestimmung der Zytotoxizität

Zur Bestimmung der dosisabhängigen Toxizität der verwendeten Toxine, wurden 2 voneinander unabhängige gegensätzliche Assays durchgeführt (3×10^4 Zellen/Well in 96-Wellplatten):

- a) Der Anteil an toten Zellen wurde durch die Messung des Gehalts der Laktatdehydrogenase (LDH) im Überstand bestimmt. Die LDH ist ein zytoplasmatisches stabiles Enzym, welches in allen Zellen vorkommt und bei einem Zellschaden aus der Zelle freigesetzt wird. Im durchgeführten Assay erfolgte

die Messung des LDH - Gehalts über eine katalysierte Enzymreaktion gekoppelt an eine photometrische Messung:

Dazu wurden je 100 µl des Zellüberstandes in eine neue 96-Wellplatte überführt und mit einem Reaktionsgemisch, bestehend aus einem Katalysator und einem Farbstoff, für 15 – 30 min inkubiert. Hierbei wird durch das LDH Laktat zu Pyruvat umgesetzt. Das Pyruvat reagiert mit Tetrazoliumsalz und es wurde Formazan gebildet, was sich auch als Farbumschlag zeigt. Dies wurde bei 490 nm photometrisch gemessen.

Als Positivkontrolle für den Zelltod diente eine Zellreihe, die vor der eigentlichen Versuchsdurchführung mit 1% Triton-X-100 für mindestens 30 min inkubiert wurde.

- b) Der Anteil an lebenden Zellen wurde durch die Messung der enzymatischen Umsetzung des Tetrazoliumsalzes WST-1 (water soluble tetrazolium) durch mitochondriale Dehydrogenasen zu Formazan bestimmt. Diese Reaktion geht mit einem Farbumschlag einher.

In 100 µl frisches Medium (DMEM/GlutaMAX/PS)/Well wurde 10 µl gelöstes Tetrazoliumsalz dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37 °C im Dunkeln wurde der Farbumschlag bei 450 nm gemessen. Als Negativkontrolle diente eine Zellreihe, die vor der eigentlichen Versuchsdurchführung mit 1% Triton-X-100 für mindestens 30 min. inkubiert wurde.

2.2.2.2 Bestimmung der Proteinmenge

Zur Quantifizierung des Zellgehaltes pro Well wurde ein Protein – Assay durchgeführt, der auf der Lowry – Methode beruht (Biuret-Reaktion und anschließende Kupferreduktion): Zum Proteinnachweis nach der Biuretmethode wird eine alkalische Kupfersulfatlösung zugegeben und es kommt zur Komplexbildung mit Farbumschlag. Das Kupfer wird weiter reduziert zu einwertigem Kupfer, welches wiederum das zugegebene Folinreagenz zu Molybdänblau reduziert. Die Blaufärbung kann photometrisch erfasst werden.

Hierfür wurden die Zellen zuerst für mindestens 15 min mit 1% Triton in DPBS lysiert (30 µl/Well in den 96-Wellplatten), dann wurden je 5 µl der Proben in einer neuen 96-Wellplatte erst mit einer alkalischen Kupferlösung für eine Minute inkubiert. Daraufhin wurde Folinäure dazugegeben und nach 15 Minuten die optische Dichte des entstandenen

Farbumschlags bei 750 nm gemessen. Anhand der Standardkurve erfolgte die Umrechnung in mg Protein/ml.

2.2.2.3 Messung der Stickstoffmonoxid (NO) – Freisetzung

Nitrit, ein stabiles Produkt von NO, wurde mit der Griess – Reaktion gemessen. Dabei bildete Nitrit mit den beiden Griessreagenzien Sulfanilamid und NED ein Azoprodukt, das photometrisch erfasst wurde.

NO ist ein freies Radikal und wird normalerweise von inflammatorisch aktivierten Mikrogliazellen im Rahmen der Immunabwehr freigesetzt. Um festzustellen, ob die mitochondrialen Toxine eine Veränderung der NO-Freisetzung bewirkten, wurde im Überstand der stimulierten Mikrogliazellen (3×10^4 Zellen/Well in 96-Wellplatten), der Nitritgehalt mittels des Griess Reagent Kits gemessen. Dazu wurden 50 µl des Überstandes mit 50 µl Sulfanilamid inkubiert und anschließend 50 µl NED dazugegeben. Die Inkubation erfolgte für jeweils 5 – 10 min bei Raumtemperatur und lichtgeschützt. Die optische Dichte wurde bei 570 nm gemessen. Anhand der Nitrit-Standardkurve erfolgte die Umrechnung in µM.

2.2.2.4 Messung der Zytokin – und IGF-1 - Freisetzung

Zytokine dienen der autokrinen und parakrinen Kommunikation der Immunzellen untereinander und haben regulierende Funktionen. Um festzustellen, ob die mitochondrialen Toxine die Zytokin – Freisetzung verändern, wurde im Überstand der stimulierten Mikrogliazellen (3×10^4 Zellen/Well in 96-Wellplatten) der Gehalt von TNF-alpha und IL6 mittels entsprechender ELISAs gemessen.

Der Wachstumsfaktor IGF-1 (Insulin-like Growth Factor – 1) wurde gleichermassen im Überstand der stimulierten Mikrogliazellen (3×10^4 Zellen/Well in 96-Wellplatten) mittels entsprechendem ELISA gemessen.

Hierzu wurden 96-Well ELISA – Platten zunächst mit einem entsprechenden Capture-Antikörper über Nacht beschichtet. Nach einer Waschung folgte die Absättigung unspezifischer Bindungen mit einem Blockierungspuffer. Anschließend wurden die Zellüberstände der stimulierten Mikrogliazellen in diese vorpräparierten 96-Wellplatten überführt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Platten wurden diese dann mit dem entsprechenden biotinylierten Antikörper inkubiert. Nach weiteren Waschschritten wurden die Platten mit Streptavidin – HRP („Horseradish

Peroxidase conjugated Streptavidin“) inkubiert. Das Streptavidin bindete an den biotinmarkierten Antikörper. Anschließend wurden die Platten mehrmals gewaschen und mit einer TMB Substrat – Solution, die H₂O₂ und Tetramethylbenzidin beinhaltet, inkubiert, was zur Bildung eines Farbkomplexes führt. Die Farbreaktion wurde mittels einer Stop Solution beendet und die Absorption bei 450 nm photometrisch gemessen. Anhand der jeweiligen Standardkurve erfolgte die Umrechnung des Zytokingehalts in pg /ml.

2.2.2.5 Messung der Arginase – Aktivität

Die Arginase ist ein Enzym der alternativen Aktivierung. Die Zellen wurden zur Arginase-aktivitätsbestimmung entsprechend dem folgenden Schema stimuliert:

	Kontrolle	1 mM 3-NP	3 mM Mal	0,2 µM Rot
Kontrolle				
1 µg/ml LPS				
10 ng/ml IL-4				
IL-4 + LPS				

Abbildung 2b: Schema der Stimulation von MG zur Messung der Arginase-Aktivität

Zur Messung der Enzymaktivität der Arginase wurde folgender kolorimetrisch-enzymatischer Assay etabliert: Thioarginin, ein Substrat der Arginase, wird umgesetzt und das entstandene Thiolprodukt reagiert mit dem Disulfid DTNB mittels Farbumschlag, welcher photometrisch erfasst wird.

Die stimulierten Mikrogliazellen (5×10^4 Zellen/Well in 96-Wellplatten) wurden gewaschen und daraufhin mit 0,9 mM Thioarginin und mit 0,1mM DTNB inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden wurde die Absorption bei 405 nm gemessen.

2.2.2.6 Messung des Hypoxia inducible factor-1alpha Gehalts

HIF-1alpha ist Bestandteil eines Transkriptionsfaktors, der unter anderem nach LPS-Stimulation aktiv wird. Um zu quantifizieren, ob bei den stimulierten Mikrogliazellen (60×10^4 Zellen/Well in 6-Wellplatten) eine Erhöhung des HIF-1alpha Gehalts vorliegt, wurde mit dem Zell – Lysat ein entsprechender ELISA durchgeführt.

Dazu wurden die Zellen auf Eis lysiert, das Lysat bei 2000g für 5min bei 2-8° C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und 1:1 verdünnt. Den Zelllysaten wurden ein biotinylierte Antikörper dazugegeben und für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert.

96-Well ELISA – Platten wurden mit einem Capture-Antikörper beschichtet. Nach mehrmaligem Waschen mit Waschpuffer wurde zum Absättigen unspezifischer Bindungen die Platte mit einem Blockierungspuffer vorinkubiert.

Anschließend wurden die Zelllysate in diese 96-Wellplatten überführt und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Platten mit Waschpuffer wurden die Proben mit Streptavidin – HRP („Horseradish Peroxidase conjugated Streptavidin“) für 20 min im Dunkeln inkubiert. Das Streptavidin bindete an den biotinmarkierten Antikörper. Anschließend wurden die Platten mehrmals gewaschen und mit einer TMB Substratlösung, die H₂O₂ und Tetramethylbenzidin beinhaltet, im Dunkeln inkubiert, was zur Bildung eines Farbkomplexes führte. Die Farbreaktion wurde mit Schwefelsäure gestoppt und die Absorption bei 450 nm photometrisch gemessen. Anhand der Standardkurve erfolgte die Umrechnung des HIF-1alpha Gehalts in pg/ml.

2.2.2.7 Datenanalyse

Mit Hilfe von PC – Standardsoftware (Excel) wurden die Mittelwerte und Standardfehler (\pm SEM) der Messwerte aus den einzelnen Versuchen ermittelt. Für die weitere Auswertung wurden die Daten in Prozent auf die jeweiligen Kontrolldaten bezogen. Die Messwerte aus den Kontrollversuchen entsprachen hierbei 100 %. Die aufgenommenen Daten wurden auf diese Weise normiert, um sie untereinander vergleichbar zu machen.

Zur Signifikanzanalyse wurde mit GraphPad Prism 5.0a eine Varianzanalyse („1way ANOVA“, „one-way analysis of variance“) durchgeführt. Als Post – Test wurde „Dunnett’s Multiple Comparison Test“ eingesetzt. Die Signifikanzgrenze lag bei $p = 0,05$ (95% Konfidenz-Intervall). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

3. Ergebnisse

3.1 Zytotoxizität der verwendeten mitochondrialen Toxine

Es stellte sich eine dosisabhängige Toxizität der verwendeten Toxine dar. Für 3-NP zeigte sich eine Konzentration ab 3 mM, für Malonat ab 50 mM und für Rotenon ab 10 μ M als toxisch (siehe Abb. 3).

Bei den Toxizitätsstudien war die Bestimmung der Dehydrogenasen mit Hilfe des WST-Assays wesentlich sensitiver als im LDH Assay. Beispielsweise war im WST-1 Assay eine Toxizität bereits ab 50 mM Malonat nachweisbar im Gegensatz zum LDH Assay. Zudem erreichten die Toxizitätswerte im WST-1 Assay höhere Werte als im LDH Assay. Beispielsweise wurde im WST-1 Assay bei 3 mM 3-NP eine Toxizität von 50 % bestimmt während im LDH Assay nur eine Toxizität von 20 % erreicht wurde.

Anhand der ermittelten Werte wurden für die einzelnen Toxine folgende, nicht toxische, Arbeitskonzentrationen festgelegt, die in den folgenden Experimenten verwendet wurden:

3-NP wurde in einer Konzentration von 0,3 mM und 1 mM verwendet.

Malonat wurde in einer Konzentration von 3 mM und 10 mM verwendet.

Rotenon wurde in einer Konzentration von 0,02 μ M und 0,2 μ M verwendet.

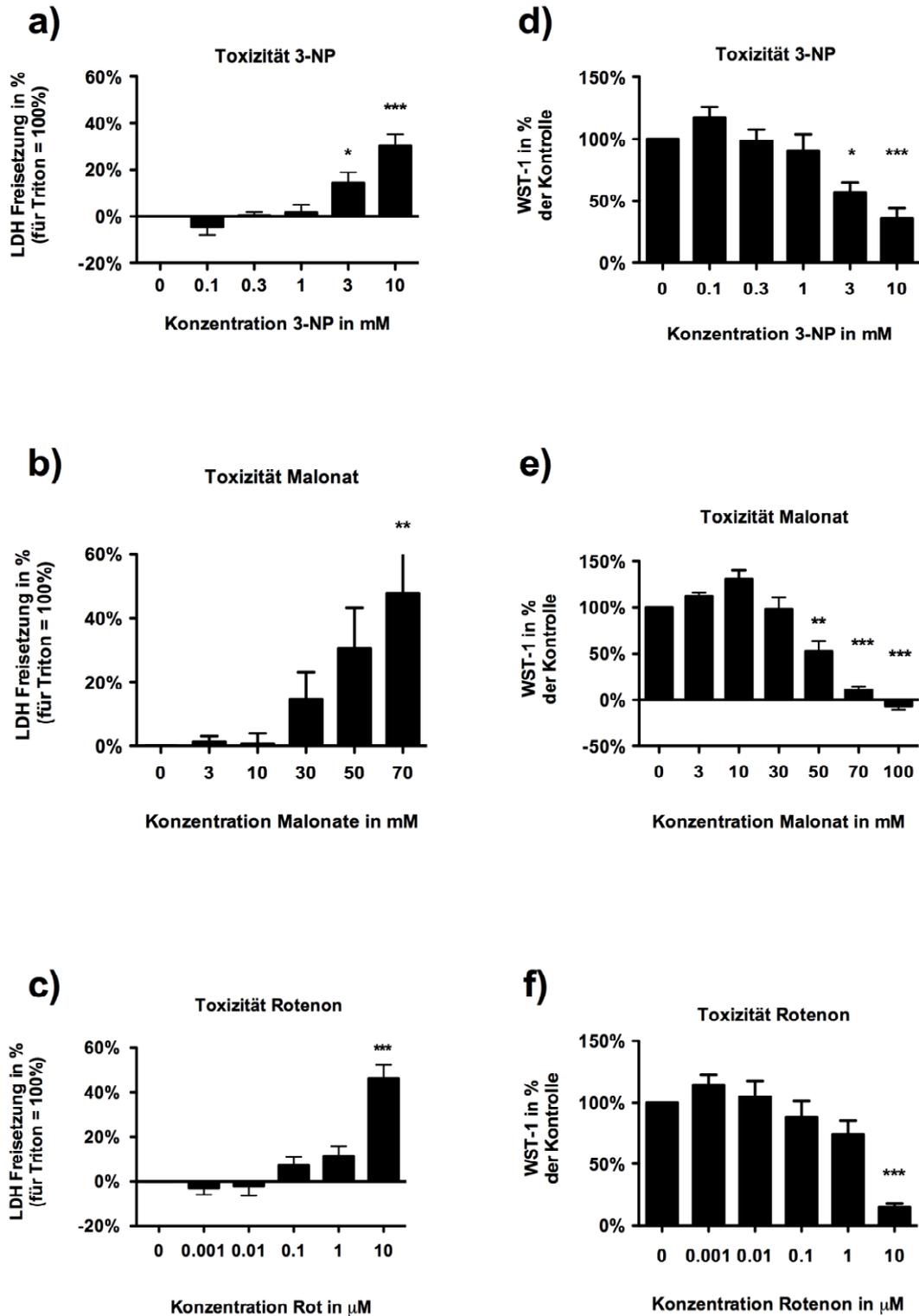


Abb. 3 LDH-Freisetzung und WST-1 Gehalt. Die Zellen wurden 48 h mit den Toxinen in genannter Konzentration behandelt und anschliessend der entsprechende Assay durchgeführt wie im Methodenteil beschrieben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; $n = 8-18$; Mittelwerte \pm SEM).

3.2 Argininstoffwechsel: NO - Freisetzung und Arginase - Aktivität

Eine proinflammatorische Stimulation mit LPS sollte die NO-Synthese erhöhen während eine antiinflammatorische Stimulation mit IL4 die Arginaseaktivität erhöhen sollte (siehe Abb. 1).

3.2.1 Die LPS-induzierte NO-Freisetzung wird durch mitochondriale Toxine inhibiert

LPS induzierte einen Anstieg der NO-Freisetzung. IL-4 hatte keinen Effekt auf die NO-Freisetzung (siehe Abb. 4a). Auch die Toxine Malonat bzw. Rotenone hatten keinen Effekt auf die basale NO-Freisetzung (Abb. 4c). 3-NP induzierte einen erhöhten NO-Gehalt auch in zellfreien Systemen und wurde aufgrund dieses unspezifischen Effekts aus der Auswertung herausgenommen (Daten nicht gezeigt).

Malonat als auch Rotenon führten zu einer dosisabhängigen signifikanten Reduktion der LPS-induzierten NO-Freisetzung (siehe Abb. 4b), die sich schon bereits in geringen Konzentrationen nicht mehr signifikant von der unbehandelten Kontrolle unterschied (siehe Abb 4c).

Zusammenfassend zeigte sich eine LPS-induzierte NO-Freisetzung, die durch die mitochondrialen Toxine inhibiert wurde.

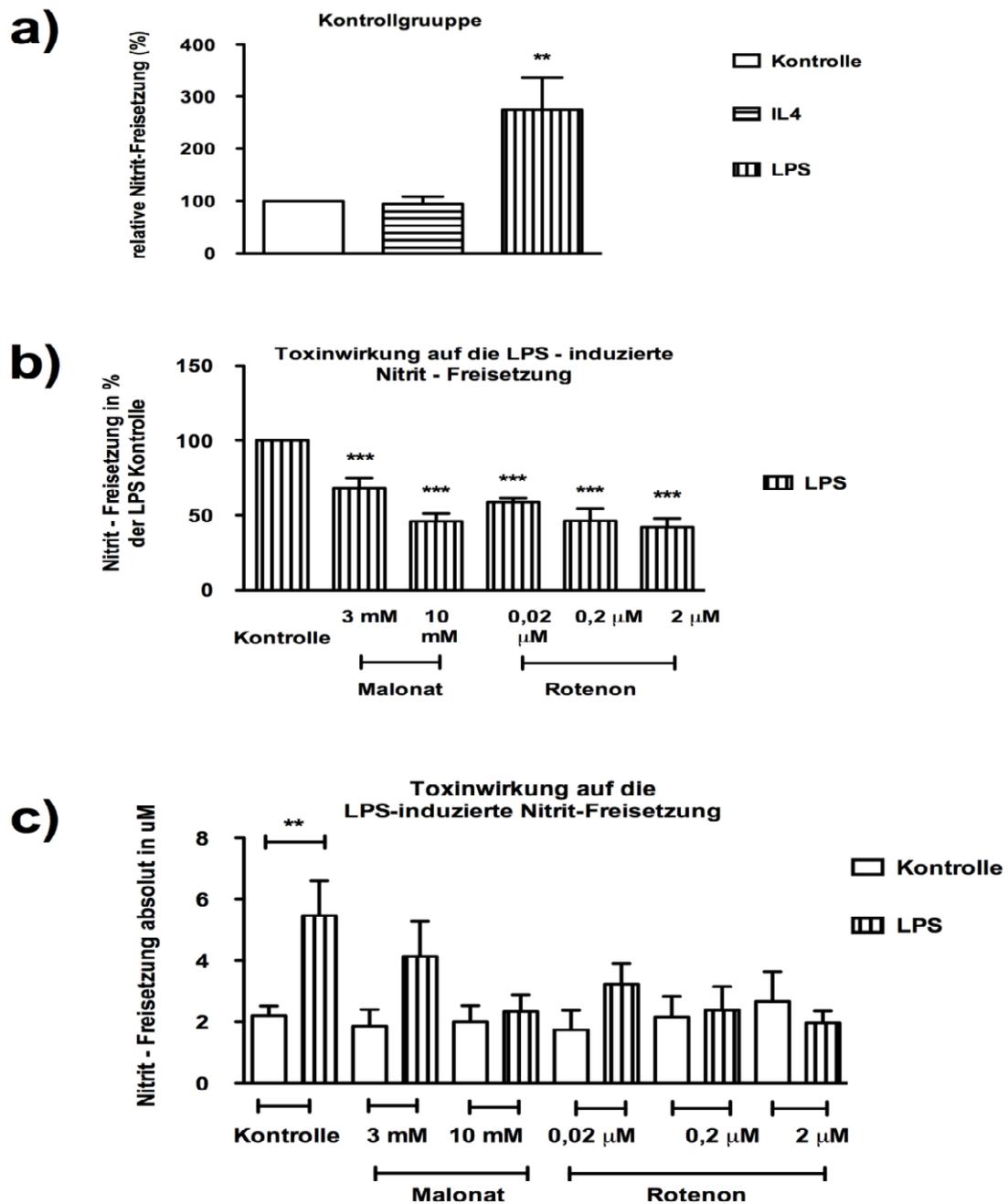


Abbildung 4: Effekt mitochondrialer Toxine auf die Nitrit-Freisetzung

Mikrogliazellen wurden mit 10 ng/ml IL4 für 42 h bzw. mit 1 µg/ml LPS für 18 h inkubiert (a).

Mikrogliazellen wurden mit den gezeigten Toxinkonzentrationen (a und b) für 24 h und ggfs. anschliessend für weitere 18 h zusätzlich mit 1 µg/ml LPS inkubiert. Der Nitritgehalt wurde mit dem Griess Reagent System bestimmt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; $n = 8$; Mittelwerte \pm SEM).

3.2.2 Die IL4-induzierte Arginase-Aktivität wird durch mitochondriale Toxine inhibiert

IL4 induzierte deutlich die Arginaseaktivität. Unter dem Einfluss von LPS konnte ebenfalls eine signifikant erhöhte Arginaseaktivität nachgewiesen werden, jedoch nicht in dem Maße wie unter der IL-4 Stimulation (siehe Abb. 5a).

Die Toxine hatten keinen Einfluss auf die basale Arginaseaktivität. Die IL4-induzierte Arginaseaktivität wurde jedoch von 3-NP oder Rotenon inhibiert. Malonat hatte hingegen keinen Einfluss auf die IL4-induzierte Arginaseaktivität (siehe Abb. 5b).

Zusammenfassend zeigte sich bei Anwesenheit von 3-NP oder Rotenon ein Verlust der IL4-abhängigen Erhöhung der Arginaseaktivität.

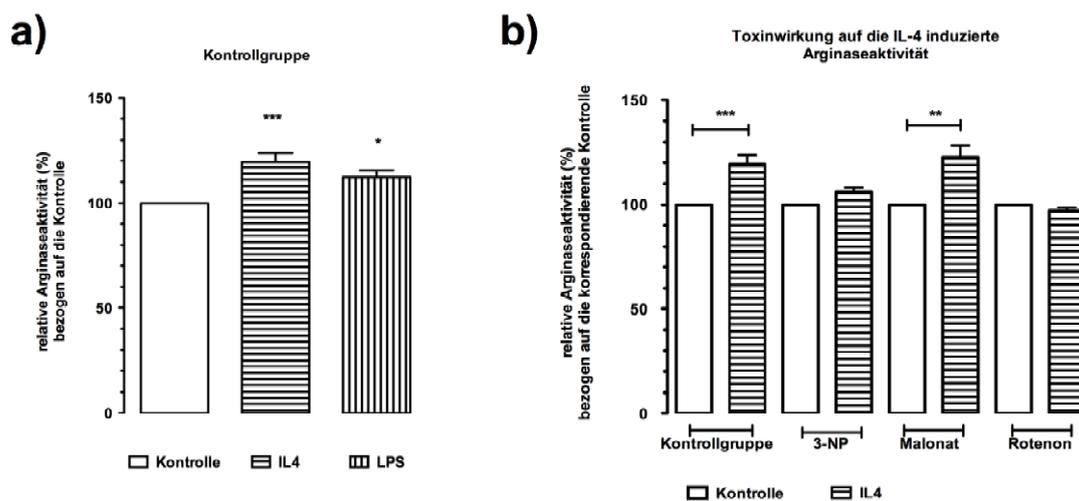


Abb. 5: Effekt mitochondrialer Toxine auf die Arginase-Aktivität

Mikrogliazellen wurden für 42 h mit 10 ng/ml IL4 bzw. für 18 h mit 1 µg/ml LPS inkubiert. (n=22; a). Mikrogliazellen wurden für 42 h mit den gezeigten Toxinen (1mM 3-NP bzw. 3mM Mal bzw. 0,2 µM Rot) sowie mit 10 ng/ml IL4 inkubiert ((3-NP und Malonat n=22, für Rotenone n=10; b).. Es wurde Thioarginin und DTNB dazugegeben und nach 5 h Inkubationszeit die Absorption bei 405 nm gemessen (* p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001; gezeigte Daten als Mittelwert +/- SEM)

3.3 Effekte der mitochondrialen Toxine auf die Ausschüttung von IL6, TNF-alpha und IGF-1

Um weiterhin zu bestimmen, ob mitochondriale Toxine die klassische Aktivierung (LPS-Stimulation) oder die alternative Aktivierung (zusätzliche IL4-Stimulation) beeinflussen, wurde die Ausschüttung der Zytokine IL6 und TNF-alpha bestimmt. IGF-1 wurde nur für den Bereich der alternativen Aktivierung gemessen.

3.3.1 Die klassische Aktivierung für IL6 und TNF-alpha

LPS induzierte die Ausschüttung von IL6 und TNF-alpha (Abb. 6). Die Toxine hatten keinen Einfluss auf die basale Zytokinausschüttung. Ausserdem hatten die Toxine 3-NP, Malonat und Rotenon auch keinen signifikanten Einfluss auf die LPS induzierte Zytokinausschüttung. Zwar kommt es bei 1mM 3-NP and auch bei allen verwendeten Rotenonkonzentrationen zu erhöhten mittleren Werten der IL-6 Ausschüttung, jedoch waren diese erhöhten Werte nicht signifikant im Vergleich zu den LPS induzierten IL-6 Werten.

Zusammenfassend zeigte sich die LPS-induzierte Ausschüttung von IL6 bzw. TNF-alpha bei Anwesenheit der verwendeten mitochondrialen Toxine nicht beeinflusst.

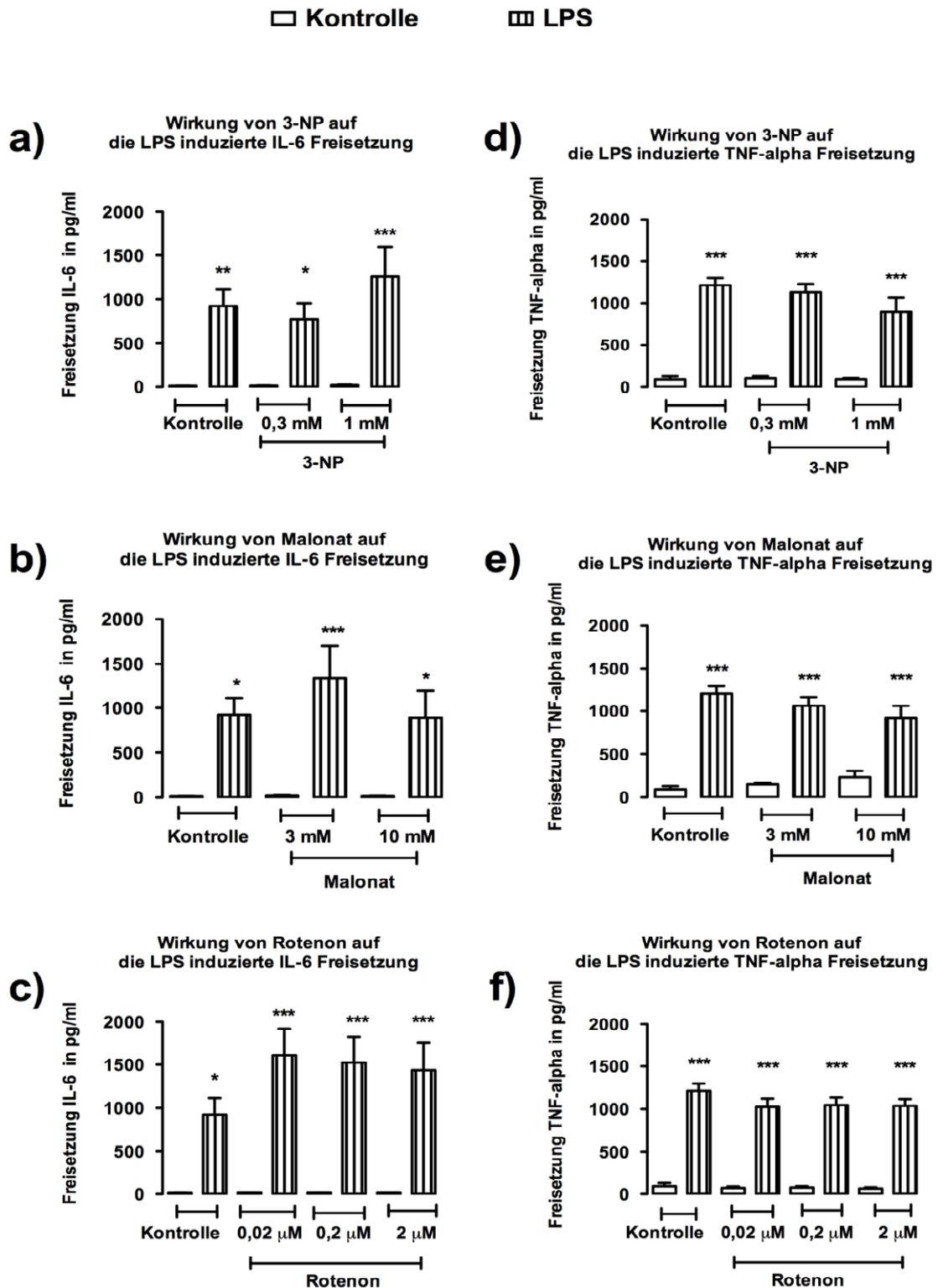


Abbildung 6: Effekte der mitochondrialen Toxine auf die Ausschüttung der Zytokine IL6 und TNF-alpha (klassische Aktivierung)

Nach 24 h Inkubation mit dem jeweiligen Toxin wurde anschliessend LPS für 18 h hinzugefügt. IL-6 (a-c) und TNF-alpha (d-f) wurden quantifiziert wie im Methodenteil beschrieben (* p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001; n=14-20; gezeigte Daten als Mittelwert +/- SEM).

3.3.2 Die alternative Aktivierung: IL6 und TNF-alpha

IL-4 reduzierte die LPS induzierte IL6 und TNF-alpha Freisetzung (Abb.7).

Der Effekt der IL4-abhängigen Inhibition der LPS-induzierten Zytokinfreisetzung wurde bei Anwesenheit von 3-NP und Rotenon dosisabhängig inhibiert. In den höchsten verwendeten Konzentrationen von 3-NP und Rotenon wurde der inhibitorische Effekt von IL-4 auf die Zytokinfreisetzung vollständig aufgehoben. Malonat hatte keinen Effekt auf die IL4-abhängige Inhibition der LPS induzierten IL6-Freisetzung, inhibierte jedoch die LPS induzierte TNF-alpha Freisetzung (Abb.7b). Diese Malonat induzierte Inhibition war jedoch im Vergleich zu den Toxinen 3-NP und Rotenon schwächer, da eine vollständige Inhibition des IL-4 Effekts nicht erfolgte.

Somit zeigte sich sowohl für die Ausschüttung von TNF-alpha als auch für IL6 bei Anwesenheit von 3-NP oder Rotenon und teilweise auch für Malonat ein Verlust der IL4-abhängigen Inhibition der Zytokinfreisetzung.

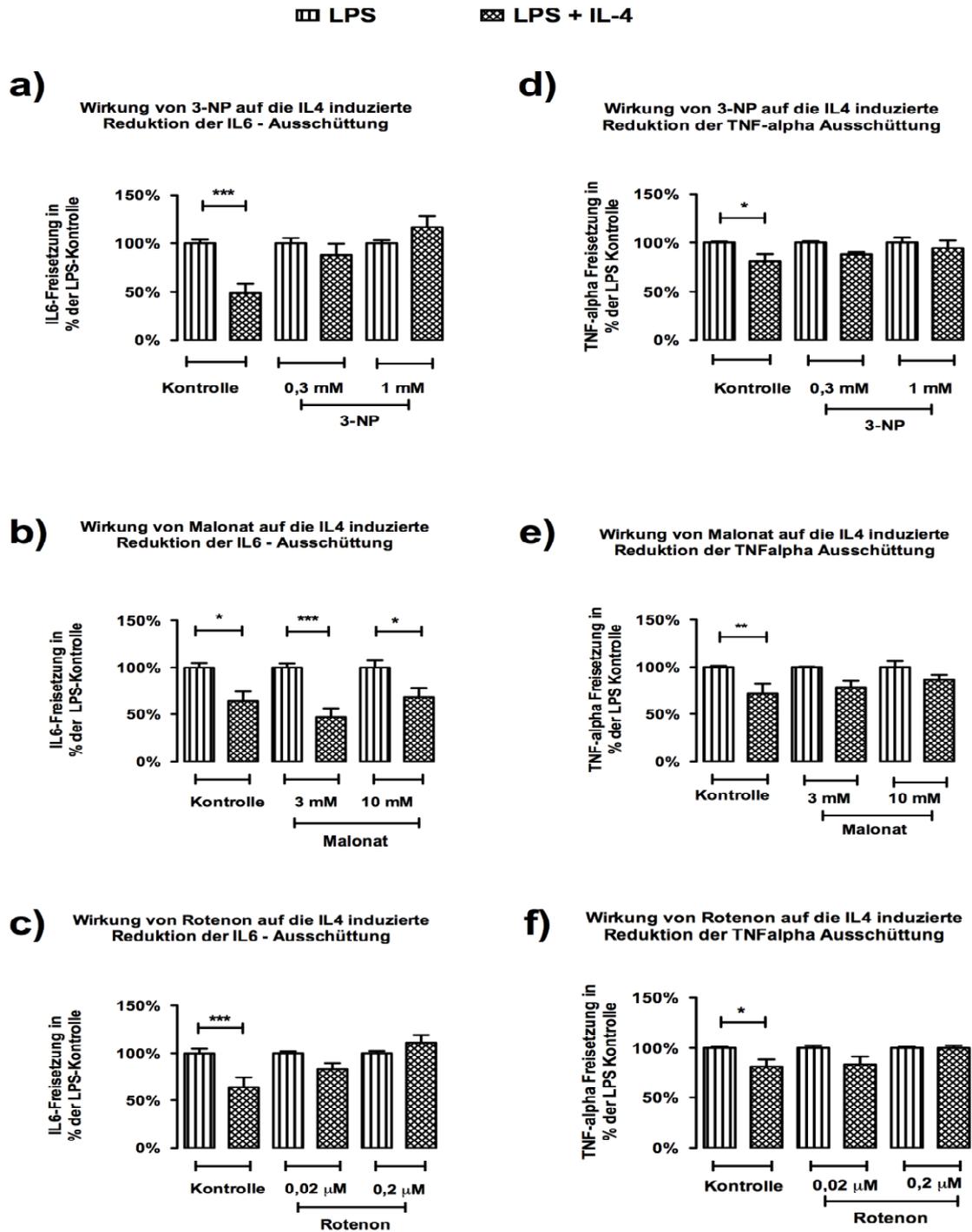


Abbildung 7: Effekte der mitochondrialen Toxine auf die Ausschüttung der Zytokine IL6 und TNF-alpha (alternative Aktivierung)

Nach 24 h Inkubation mit dem jeweiligen Toxin und ggfs. IL4 wurde anschliessend LPS für 18 h hinzugefügt. IL-6 (a-c) und TNF-alpha (d-f) wurden quantifiziert wie im Methodenteil beschrieben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; $n=10-16$; gezeigte Daten als Mittelwert +/- SEM).

3.3.3 Die alternative Aktivierung für IGF-1

IL4 induzierte eine IGF-1 Freisetzung (Abb.8). Die mitochondrialen Inhibitoren 3-NP und Malonat hatten keinen Effekt auf die basale IGF-1 Ausschüttung. Eine Behandlung mit Rotenon hatte hingegen bei einer Konzentration von 0,2 μ M einen inhibitorischen Effekt auf die basale IGF-1 Ausschüttung. Rotenon zeigte bei allen getesteten Konzentrationen eine Hemmung der IL4 induzierten IGF-1 Freisetzung. Zu einer Inhibition der IL4 induzierten IGF-1 Freisetzung kam es ausserdem bei einer Konzentration von 1 mM 3-NP, jedoch nicht bei 0,3 mM 3-NP. Malonat bewirkte bei allen getesteten Konzentrationen eine Hemmung der IL4 induzierten IGF-1 Freisetzung. Jedoch wurden bei allen kombiniert mit Malonat- und IL4- behandelten Zellen ähnlich hohe IGF-1 Konzentrationen erreicht wie auch in der IL4 induzierten Positivkontrolle.

Zusammenfassend zeigte sich bei Anwesenheit der mitochondrialen Toxine Rotenon und 3-NP ein Verlust der IL4-abhängigen Erhöhung von IGF-1.

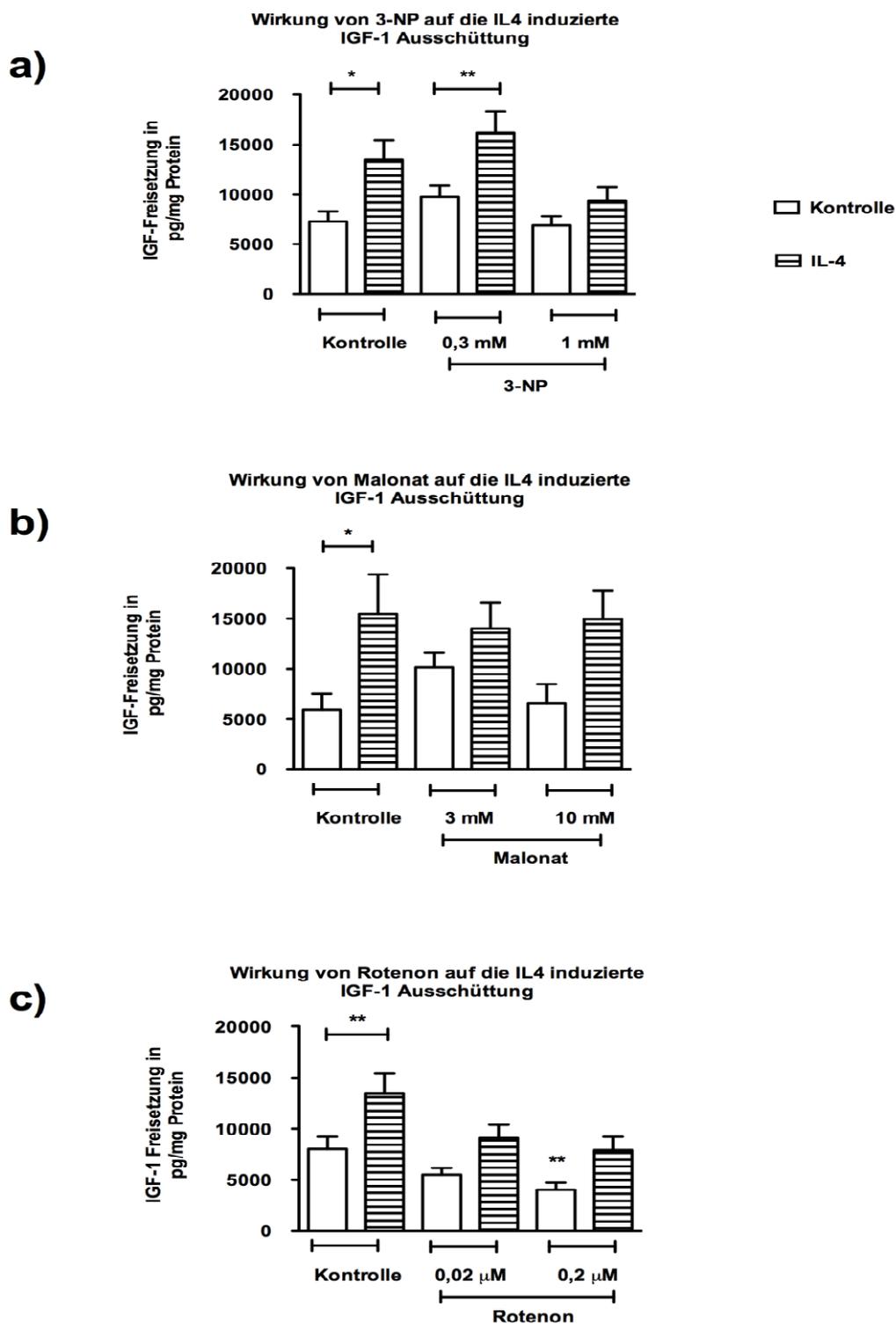


Abbildung 8: Effekte der mitochondrialen Toxine auf die Ausschüttung von Insulin-like Growth Factor-1 (alternative Aktivierung). Nach insgesamt 48 h zeitgleicher Inkubation mit dem jeweiligen Toxin und ggfs. Interleukin - 4 wurde die Daten photometrisch erfasst wie im Methodenteil beschrieben. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; $n=9 - 21$; gezeigte Daten als Mittelwert \pm SEM).

3.4 HIF-1alpha Bestimmung

Zur Bestimmung der Toxinwirkung auf subzellulärer Ebene wurden Messungen des Transkriptionsfaktors HIF-1alpha durchgeführt. HIF-1alpha wird physiologisch unter hypoxischen Bedingungen stimuliert, kann anderen Studien zufolge auch durch LPS induziert werden.

In unseren Versuchen konnte weder eine Stimulation mit LPS, noch mit 3-NP oder Malonat eine Erhöhung von HIF-1alpha bewirken (Abb. 9).

Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit dem Halbmetall Cobaltchlorid (CoCl_2), welches auch unter normaler Oxygenierung eine Stabilisierung von HIF-1alpha bewirkt. Hierunter zeigte sich ein signifikanter Anstieg des HIF-1alpha Gehalts.

Zusammenfassend zeigte sich keine Änderung des HIF-1alpha Gehalts bei Anwesenheit der mitochondrialen Toxine 3-NP bzw. Malonat oder durch LPS.

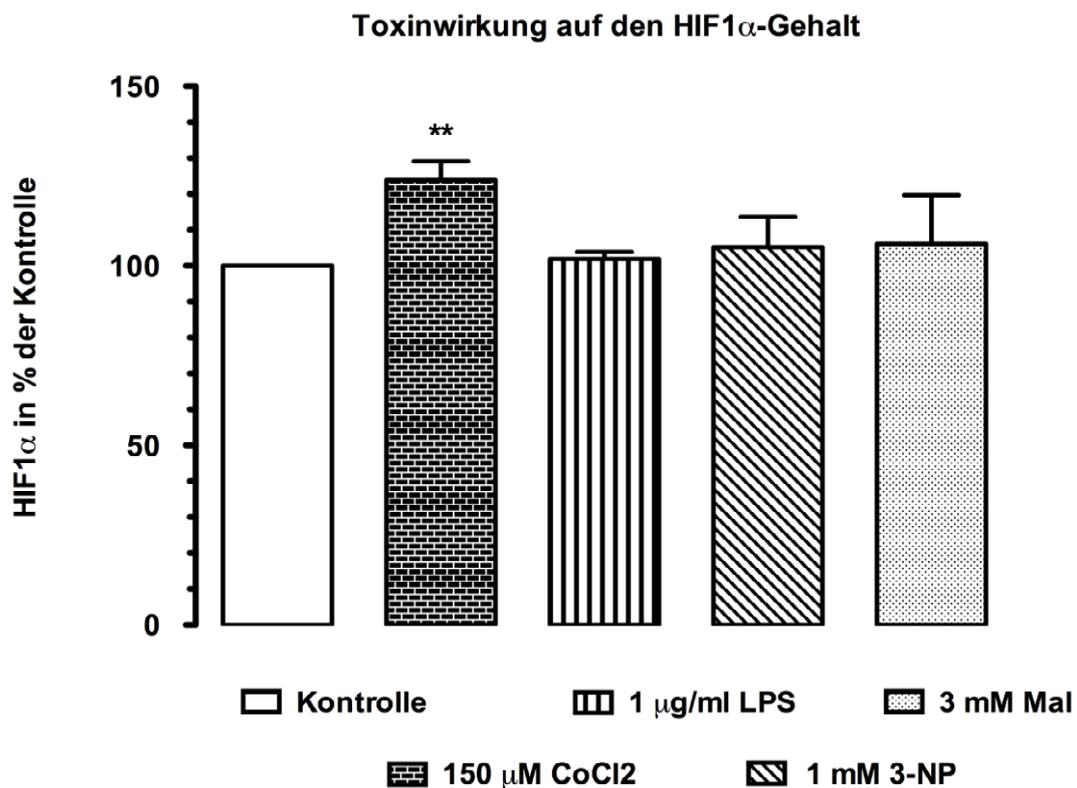


Abb. 9: Relativer HIF-1alpha Gehalt. Nach 48 h Inkubation mit dem jeweiligen Toxin oder LPS wurden die Zellen lysiert und die Daten photometrisch erfasst wie im Methodenteil beschrieben. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; $n = 6 - 19$; gezeigte Daten als Mittelwert \pm SEM).

4. Diskussion

In der vorliegenden experimentellen Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob die Immunantwort von mitochondrial geschädigten Mikrogliazellen beeinträchtigt ist.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass die Immunantwort von mitochondrial geschädigten Mikrogliazellen zu Ungunsten der alternativen Aktivierung beeinträchtigt ist. Dabei zeigte sich die klassische Aktivierung von den mitochondrialen Toxinen kaum beeinflusst.

4.1 Mitochondriale Toxine

Rotenon wird oft verwendet, um Parkinson im Tiermodell auszulösen, einerseits, weil das Toxin bei Ratten Parkinson ähnliche Symptome auslöst, andererseits weil in Gewebeproben von Parkinsonpatienten Defizite an Komplex I nachgewiesen wurden (Bonsi et al., 2006). Behandlungen mit Rotenon im Tier führen zu einem neuronalen Zelltod der auch nicht-dopaminergen Neurone betrifft (George et al., 2009; Hisahara and Shimohama, 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls ein zytotoxischer Effekt nachgewiesen werden. In dieser Studie wurde ein signifikanter Zelluntergang ab 10 μM Rotenon gemessen werden, so dass die Arbeitskonzentrationen von 0,02 μM bis 2 μM Rotenon als geeignet erschienen, um entsprechende Versuche zu generieren, ohne das Überleben der Zellen zu vermindern. Diese Konzentrationen liegen in Bereichen, die auch andere Arbeitsgruppen verwendet haben. Beispielsweise wurden in anderen Studien Rotenonkonzentrationen von 5nM (chronische vierwöchige Applikation bei humaner Mikroglia - Zelllinie, (Shaikh and Nicholson, 2009) über 10 bis 50 nM für primäre Mikroglia kulturen (Klintworth et al., 2009) bis zu einer hochdosierten Einmalgabe von 10 μM Rotenon bei einer hybridisierten Zelllinie (Esteves et al., 2010) verwendet. Die Arbeitsgruppe um Zhou verabreichte Ratten über 4 Wochen eine Dosis von 2,5 mg/kg KG/d (Zhou et al., 2007). Mit den von Klintworth et al. verwendeten Rotenonkonzentrationen sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentrationen am ähnlichsten, ebenso wie die verwendete Zellkultur von primären Mikrogliazellen der Maus.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten ähnlich denen von Klintworth ebenfalls keine Änderung der basalen Sekretion proinflammatorischer Zytokine unter dem Einfluss

von Rotenon (Klintworth et al., 2009). Dem gegenüber stehen Daten von der Arbeitsgruppe um Zhou, die von einem stimulatorischen Effekt des Rotenons auf die basale Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins TNF-alpha berichteten (Zhou et al., 2007). Dieser Unterschied könnte spezie - spezifisch sein, da Zhou et al. an Rattengewebe arbeiteten oder aber er ist auf die unterschiedliche Zeitspanne der Versuchsdauer zurückzuführen (Einmalapplikation vs. chronische Applikation).

Der Komplex II Inhibitor 3-NP hemmt die mitochondriale Succinatdehydrogenase und löst im Tiermodell M. Huntington aus (Bonsi et al., 2006). 3-NP führt wie Rotenon auch zu einem zeit- und dosisabhängigen Zellsterben (Ryu et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde bei primären Mikrogliaulturen ein signifikantes Zellsterben ab 3 mM 3-NP beobachtet. Im Gegensatz dazu berichteten Garcia und Kollegen (Garcia et al., 2002) davon, dass in primären striatalen Neuronenkulturen der Ratte nach 48 h Inkubationszeit in 1 mM 3-NP 50% Zelluntergang nachweisbar war. Die Arbeitsgruppe um Liot hingegen arbeitete an primären Neuronenkulturen der Ratte mit Konzentrationen zwischen 0,1 mM, und 10 mM 3-NP. Nach einer Inkubationszeit von 12 h konnte ein signifikantes Neuronensterben wie auch bei unseren Versuchen bei 10 mM 3-NP beobachtet werden (Liot et al., 2009). Die meisten publizierten Versuche mit 3-NP beziehen sich auf Neuronenkulturen und somit nur bedingt vergleichbar mit der vorliegenden Arbeit. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ähneln jedoch denen von Liot et. al., da jeweils Arbeitskonzentrationen von 0,1 mM bis 10mM getestet wurden.

Der Komplex II Inhibitor Malonat hemmt die mitochondriale Succinatdehydrogenase und löst im Tiermodell M. Huntington aus (Bonsi et al., 2006). Im Gegensatz zu 3-NP ist Malonat jedoch ein reversibler Hemmer der mitochondrialen Atmungskette (Gil and Rego, 2008). Die vorliegenden Ergebnissen zeigten, dass ein deutliches Sterben der Mikrogliazellen ab 50 mM Malonat nachweisbar war. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch andere Studien: Moy und Kollegen beobachteten mit Malonatkonzentrationen von 75 mM einen ca. 25% Neuronenuntergang in striatalen Neuronenkulturen fötaler Ratten (Moy et al., 2007). Die Arbeitsgruppe um Gomez-Lazaro verwendete 50 mM Malonat um eine Apoptose in der Zelllinie eines Neuroblastoms auszulösen (Gomez-Lazaro et al., 2007).

4.2 Argininstoffwechsel: NO Freisetzung und Arginase – Aktivität

Die Bioverfügbarkeit von Arginin in der Zelle sowie dessen weitere Verstoffwechslung könnte eine Schlüsselrolle in der Immunantwort von Mikrogliazellen sein. Die Arginase und die induzierbare NO-Synthase konkurrieren um das selbe Substrat und die jeweilige Verstoffwechslung wird von externen Stimuli wie IL4 oder LPS beeinflusst. Jedoch zeigten sich deutliche Änderungen der Immunantwort in Anwesenheit der verwendeten Toxine.

4.2.1 NO-Freisetzung: Die mitochondrialen Toxine Malonat und Rotenon bewirkten einen Verlust der LPS-induzierten NO-Freisetzung.

Wie aus Abb. 4 ersichtlich wird, bewirkten die verwendeten mitochondrialen Toxine einen Verlust der LPS-induzierten NO-Freisetzung. Dabei blieb die basale NO-Freisetzung unverändert. Die Tatsache, dass sich die basale NO-Freisetzung nicht veränderte (vgl. Abb. 4c), jedoch der LPS-induzierte NO-Anstieg bei Anwesenheit der Toxine verloren ging, deutete darauf hin, dass die Toxine einen inhibitorischen Effekt speziell auf die induzierbare NO-Synthase (iNOS) hatten. Es ist daher möglich, dass die iNOS Aktivität direkt an den Metabolismus gekoppelt ist. Interessanterweise zeigte eine Studie mit NOS-Inhibitoren an Mäusen eine verminderte Gewichtszunahme bei erhöhter Kalorienzufuhr sowie Veränderungen in der Insulinsensitivität der Skelettmuskulatur und der Thermogenese (Tsuchiya et al., 2007). Auch eine andere Studie konnte metabolische Veränderungen unter NOS-Inhibitoren im Sinne einer verbesserten Glucosetoleranz nachweisen (Cha et al., 2011). Zudem zeigte sich unter NOS-Inhibitoren an Mäusen auch eine veränderte Expression von Inflammationsmarkern (Tsuchiya et al., 2007). Derartige metabolische Veränderungen sind auch für neurodegenerative Erkrankungen beschrieben. Aktueller Gegenstand der Diskussion sind die Ergebnisse aus Tierversuchen, in denen NOS-Inhibitoren zur Therapie L-Dopa induzierter Spätdyskinesien verwendet werden, wobei auch hier der Mechanismus noch unbekannt ist (Padovan-Neto et al., 2011).

Die hier vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch mitochondriale Schädigungen die Produktion von NO eingeschränkt ist. Dieser Eindruck wird durch die Ergebnisse einer kleinen klinischen Studie unterstützt, in der im Blut von PD-Patienten signifikant erniedrigte NO-Spiegel beobachtet wurden. Insgesamt gibt es jedoch bezüglich des NO-Spiegel bei PD sehr widersprüchliche Daten: Verschiedene Studien im Liquor von

PD Patienten zeigten unveränderte, erniedrigte oder erhöhte NO-Level (Tuncel et al., 2009). Wie die Bedeutung dieses Ergebnis einzuordnen ist, bleibt abzuwarten.

4.2.2 Arginaseaktivität: Die mitochondrialen Toxine 3-NP bzw. Rotenone bewirkten einen Verlust der IL4-abhängigen Erhöhung der Arginaseaktivität

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten in Anwesenheit der mitochondrialen Toxine 3-NP bzw. Rotenon einen fehlenden Anstieg der IL4-abhängigen Arginaseaktivität (siehe Abb. 5b). Dies lässt darauf schliessen, dass eine intakte mitochondriale Atmungskette eine Voraussetzung für die IL-4 abhängige Erhöhung der Arginaseaktivität bei Mikrogliazellen zu sein scheint.

Ähnliche Ergebnisse wie die hier dargestellten konnten bereits anderweitig für Makrophagen gezeigt werden. Dabei führte eine Inhibition der mitochondrialen Atmung zu einem Verlust der IL-4 abhängigen Effekte und somit auch zu einer Reduktion der IL4-induzierten Arginaseaktivität. Diese Ergebnisse verdeutlichten die Abhängigkeit der alternativen Aktivierung von einem funktionierenden oxidativen Stoffwechsel (Vats et al., 2006). Eine Störung der mitochondrialen Atmungskette bringt daher sowohl bei Makrophagen als auch bei Mikrogliazellen eine Beeinträchtigung der alternativen Aktivierung mit sich. Dieses unterstreicht die Parallele von Makrophagen und Mikrogliazellen.

Die basale Arginaseaktivität zeigte sich unter dem Toxineinfluss nicht verändert. Ein Anstieg der Arginaseaktivität unter LPS-Stimulation ist schon mehrfach beobachtet worden (Nelin et al., 2007) (Chang et al., 2008). Ein möglicher Grund könnte sein, dass durch die LPS-Stimulation auch mehr Substrat in die Zelle gelangt und somit mehr Substrat für beide Stoffwechselwege zur Verfügung steht. Allerdings ist es auch denkbar, dass die Arginase aus „Sicherheitsgründen“ mitaktiviert wird, um eine überschüssige NO-Produktion zu vermeiden.

Für das Toxin Malonat konnte in der vorliegenden Arbeit keine inhibitorische Wirkung auf die Erhöhung der Arginase-aktivität nachgewiesen werden. Allerdings kann daraus nicht zwangsläufig geschlossen werden, dass Malonat die Arginase-aktivität nicht beeinträchtigen könnte. Bei Malonat ist zu beachten, dass es als einziges der verwendeten Toxine ein kompetitiver Inhibitor ist und somit über die Zeit wieder aus seiner Bindung

verdrängt werden kann. Möglicherweise war in diesem Experiment des Zeitfenster zwischen Inkubationsbeginn und Auswertung zu gross.

Möglicher Schwachpunkt des Ergebnisses könnte die Methode darstellen, da eine bisher nicht etablierte Methode zur Bestimmung der Arginase – Aktivität genutzt wurde. Daher liegen auch keine Referenzwerte vor.

4.3 Auswirkungen der mitochondrialen Toxine auf die Ausschüttung von IL6, TNF-alpha und IGF-1

Eine LPS-Stimulation von Mikrogliazellen führt zu einer proinflammatorischen Immunantwort, dabei werden unter anderem auch TNF-alpha und IL6 freigesetzt (Nakamura, 2002). IL4 inhibiert diesen proinflammatorischen Effekt von LPS bei peripheren Makrophagen. Ähnliches wurde inzwischen auch für Mikrogliazellen gezeigt (zusammengefasst von Colton, 2009). IL4 bewirkte bei ihnen sowohl eine morphologische Änderung als auch eine Änderung der Genexpression mit einer Verminderung proinflammatorischer Mediatoren wie IL6 und TNF-alpha und einer vermehrten Expression antiinflammatorischer und wachstumsfördernder Mediatoren (Colton, 2009). Zu diesen wachstumsfördernden Substanzen gehört auch IGF-1 (insulin-like-growth-factor-1), der über seine insulin-ähnliche Wirkung auf den Glucosestoffwechsel Heilung und Wachstum fördert. Mikrogliazellen setzen unter IL4 Einfluss vermehrt IGF-1 frei (Chiu et al., 2008; Neumann et al., 2009).

In den gezeigten Ergebnissen (Abb.6) lässt sich erkennen, dass keines der verwendeten mitochondrialen Toxine einen Effekt auf die basale oder LPS-induzierte Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 bzw. TNF-alpha bei Mikrogliazellen hatte. Sowohl die basale Zytokinausschüttung als auch nach LPS-Stimulation zeigten sich die Werte der toxinbehandelten Zellen ähnlich der entsprechenden Kontrolle.

Im Gegensatz dazu wurde der IL4 Effekt auf die Freisetzung von TNF-alpha und IL6 durch die Toxine gehemmt: Wie aus Abbildung 7 ersichtlich ist, wurde die IL4-abhängige Inhibition der LPS-induzierten Zytokinfreisetzung durch die mitochondrialen Toxine aufgehoben. Insbesondere die IL4-abhängige Reduktion der TNF-alpha Freisetzung ging in Anwesenheit der mitochondrialen Inhibitoren verloren. Sowohl unter 3-NP also auch unter Malonat oder Rotenon hatte IL4 keinen Effekt mehr auf die TNF-alpha Ausschüttung.

Gleiches zeigte sich für die Freisetzung von IL6: Der LPS Effekt konnte von IL4 in Anwesenheit der Toxine nicht mehr neutralisiert werden. Einzige Ausnahme war der

kompetitive Inhibitor Malonat, welcher die IL4 induzierte Reduktion der IL6 Freisetzung nicht hemmen konnte (Abb. 7b). Ein möglicher Grund, warum Malonat keinen signifikanten Effekt hatte, könnte die Tatsache sein, dass Malonat als kompetitiver Inhibitor verdrängt wird und daher nicht dieselben Ergebnisse erzielte wie 3-NP, welches ein irreversibler Komplex II Inhibitor ist.

IL4 bewirkte eine signifikante Erhöhung der IGF-1 Freisetzung von Mikrogliazellen. Auch dieser IL4-induzierte Effekt wurde durch die mitochondrialen Toxine aufgehoben (Abb. 8).

Vergleichbare Daten zeigte Vats et al. bereits 2006 für periphere Makrophagen: Bei aktivierten Makrophagen wurde die Freisetzung von IL6 und TNF-alpha durch mitochondriale Inhibitoren nicht gesenkt, jedoch ging der inhibitorische IL4 Effekt auf die Ausschüttung von IL6 bzw. TNF-alpha verloren (Vats et al., 2006).

Eine mitochondriale Störung, wie sie bei neurodegenerativen Erkrankungen vorliegt, könnte daher mit einem Verlust der anti-inflammatorischen Antwort der Mikrogliazellen verbunden sein. Werden solche dysfunktionalen Mikrogliazellen aktiviert, so könnte es zu einer gesteigerten pro-inflammatorischen Antwort kommen. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese stehen die Befunde von Björkqvist et al. von 2008. Sie zeigten, dass bei isolierten Mikrogliazellen von neugeborenen transgenen Mäusen (R6/2 Mausmodell für M. Huntington) eine LPS-Stimulation zur Überaktivität im Sinne einer signifikant erhöhten IL-6 Ausschüttung führte. Ausserdem fand die Arbeitsgruppe erhöhte Zytokinwerte im Plasma von Genträgern für die Huntingtonenerkrankung bereits im präklinischen Stadium, als auch erhöhte RNA-Level für IL6 und TNF-alpha in post-mortem Gehirnen von Huntington-Patienten. Zusammenfassend deuten die Daten von Björkqvist et al. darauf hin, dass es bei Mutationsträgern für M. Huntington zu einer Veränderung des Immunprofils zu Gunsten eines proinflammatorischen Milieus kommt (Bjorkqvist et al., 2008). Ähnliche Daten liegen auch für Parkinson vor. 2007 fand Chen mit seinen Kollegen in einer prospektiven klinischen Studie, dass erhöhte Blutwerte für IL6 mit einem signifikant erhöhten Risiko einhergehen, an Parkinson zu erkranken (Chen et al., 2008).

Obwohl in unseren Studien mitochondriale Störungen mit einer verminderten IGF-1 Ausschüttung verbunden sind, wurden bei Huntington-Patienten Erhöhungen der IGF-1 Plasmawerte beobachtet. Ebenso sind erhöhte IGF-1 Spiegel bei Parkinsonpatienten sowohl für Liquor als auch –wenngleich nur als Tendenz- für Blutproben beschrieben (Saleh et al., 2009; Tuncel et al., 2009; Mashayekhi et al., 2010) .

Die Bedeutung dieser veränderten IGF-1 Werte ist bisher nicht klar. Es wird aber davon ausgegangen, dass diese Beobachtung als Reaktion auf chronische neuroinflammatorische Prozesse zu werten ist (Bjorkqvist et al., 2008; Saleh et al., 2009; Tuncel et al., 2009). Insofern kann die in dieser Arbeit beobachtete in vitro IGF-1 Verminderung als möglicher lokaler und initialer Prozess gedeutet werden, der im Verlauf der Erkrankung eine systemische Gegenregulation mit sich bringt.

Zwischen IGF-1 und den proinflammatorischen Zytokinen IL-6 und TNF-alpha besteht zudem eine wechselseitige Beziehung: IGF-1 wirkt inhibitorisch auf die Expression von IL6 und TNF-alpha (Sukhanov et al., 2007). Umgekehrt haben beide Zytokine die Eigenschaft, Zellen für die Wirkung von IGF-1 resistent zu machen und somit IGF-1 vermittelte Signale zu stoppen (O'Connor et al., 2008). Ein Ungleichgewicht zwischen den proinflammatorischen Zytokinen und dem anti-inflammatorischen IGF-1 scheint eine Rolle bei vielen Erkrankungen zu spielen: So ist die Beziehung zwischen den genannten Mediatoren auch von grossem Interesse in der Erforschung von metabolischen Störungen wie Diabetes oder vaskulären Erkrankungen wie die Arteriosklerose. Dabei wurde oft dieselbe Konstellation mit erhöhten Entzündungsmediatoren und erniedrigten Serumwerten für IGF-1 gefunden (Kaushal et al., 2004; Rajpathak et al., 2008).

4.4 HIF-1alpha Bestimmung und ihre Grenzen

Um das Überleben bei hypoxischem Stress zu sichern, haben Zellen eine Reihe von Adaptionmöglichkeiten, unter anderem die Stabilisierung des Transkriptionsfaktors HIF-1alpha. Dieser reguliert zahlreiche Gene, die sowohl für die anaerobe Glykolyse als auch für die proinflammatorische Immunantwort wichtig sind (Cramer et al., 2003; Seppet et al., 2009; Walmsley et al., 2009).

Unter hypoxischen Bedingungen exprimieren auch Mikrogliazellen HIF-1alpha (Deshmane et al., 2009). Neben dieser Hypoxie-induzierten HIF-1alpha Expression kann es aber auch zu einer HIF-1alpha Expression unter normaler Oxygenierung kommen. LPS ist neben IGF-1 und NO als Stimulator für HIF-1alpha bekannt (Chavez and LaManna, 2002; Ke and Costa, 2006; Brahimi-Horn and Pouyssegur, 2009; Seppet et al., 2009; Walmsley et al., 2009; Huang et al., 2010). In unseren Versuchen führte die LPS-Stimulation zu keiner Steigerung des Transkriptionsfaktors HIF-1alpha (siehe Abb. 9). Auch die mitochondrialen Inhibitoren waren nicht in der Lage eine Stabilisierung von HIF-1alpha zu bewirken. Die Tatsache, dass LPS allgemein als ein Induktor von HIF-1alpha

angesehen wird und die hier vorliegenden Daten keinerlei Wirkung von LPS auf den HIF-1alpha Gehalt nachweisen konnten, lässt vermuten, dass die hier angewandte Methode nicht sensitiv genug war, um mögliche feinere Unterschiede des HIF-1alpha Gehalts zu erfassen. Allein die Positivkontrolle mittels Cobaltchlorid (CoCl_2) zeigt einen kleinen signifikanten Effekt, wodurch Fehler in der Durchführung des Versuchs ausgeschlossen werden konnten. Um diese Frage zu klären sollten weitere, sensitivere Nachweismethoden wie ein Western Blot hilfreich sein.

5. Zusammenfassung

Unter der Annahme, dass die unterschiedlichen Immunantworten der Mikrogliazellen von jeweils unterschiedlichen zellulären Stoffwechselfvorgängen abhängen, war es die Aufgabe der vorliegenden experimentellen Arbeit, die Frage zu klären, ob die Immunantwort von mitochondrial geschädigten Mikrogliazellen beeinträchtigt ist. Zu diesem Zweck wurden primäre Mikrogliazellkulturen von neugeborenen Mäusen mit mitochondrialen Toxinen inkubiert und klassisch oder alternativ aktiviert (mittels Lipopolysaccharid (LPS) bzw. Interleukin – 4 (IL4)). Als mitochondriale Inhibitoren dienten Komplex I- bzw. Komplex II-Inhibitoren, die dafür bekannt sind, im Tiermodell Parkinson- bzw. Huntington-ähnliche Symptome auszulösen. Die Aktivität der Arginase als auch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO), Interleukin – 6 (IL6), Tumor – Necrosis - Factor – alpha (TNF-alpha) und Insulin – like Growth Factor – 1 (IGF-1) sowie der Hypoxia - Inducible Factor – 1 alpha (HIF-1alpha) Gehalt wurden bestimmt. Unter dem Einfluss der mitochondrialen Inhibitoren waren vor allem Beeinträchtigungen der Interleukin - 4 vermittelten alternativen Aktivierung fassbar: Der Interleukin - 4 Effekt auf die Arginaseaktivität, die Insulin-like Growth Factor Freisetzung sowie auf die Lipopolysaccharid-getriggerte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wurde durch die Toxine aufgehoben. Hingegen blieb die Lipopolysaccharid - induzierte Freisetzung von Interleukin - 6 und des Tumor-necrosis-factors – alpha unbeeinträchtigt.

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit zeigen, dass die Immunantwort von mitochondrial geschädigten primären Mikrogliazellkulturen von neugeborenen Mäusen vor allem zu Ungunsten der alternativen Aktivierung beeinträchtigt ist. Dabei zeigte sich die klassische Aktivierung von den mitochondrialen Toxinen weitestgehend unbeeinflusst.

Diese Ergebnisse sind bedeutsam für neurodegenerative Erkrankungen, die mit mitochondrialen Schäden einhergehen: Kommt es krankheitsbedingt auch zu mitochondrialen Dysfunktionen in den Mikrogliazellen, so würden diese mit einer übermäßig starken und prolongierten pro-inflammatorischen Antwort auf Schäden reagieren. Da die neurodegenerativen Erkrankungen durch eine pro-inflammatorische Antwort gekennzeichnet sind, könnten daher solche Mechanismen durchaus eine Rolle spielen. Die Rolle der Mikrogliazellen bei neurodegenerativen Veränderungen wie bei M. Parkinson oder M. Huntington zu klären, würde nicht nur ein tieferes Verständnis für den Pathomechanismus der Neurodegeneration mit sich bringen, sondern vielleicht auch potentielle Therapieansätze eröffnen.

6. Literaturverzeichnis

1. Bjorkqvist M, Wild EJ, Thiele J, Silvestroni A, Andre R, Lahiri N, Raibon E, Lee RV, Benn CL, Soulet D, Magnusson A, Woodman B, Landles C, Pouladi MA, Hayden MR, Khalili-Shirazi A, Lowdell MW, Brundin P, Bates GP, Leavitt BR, Moller T, Tabrizi SJ (2008) A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *J Exp Med* 205:1869-1877.
2. Block ML, Zecca L, Hong JS (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8:57-69.
3. Bonsi P, Cuomo D, Martella G, Sciamanna G, Tolu M, Calabresi P, Bernardi G, Pisani A (2006) Mitochondrial toxins in Basal Ganglia disorders: from animal models to therapeutic strategies. *Curr Neuropharmacol* 4:69-75.
4. Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J (2009) HIF at a glance. *J Cell Sci* 122:1055-1057.
5. Cattaneo E, Zuccato C, Tartari M (2005) Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci* 6:919-930.
6. Cha HN, Song SE, Kim YW, Kim JY, Won KC, Park SY (2011) Lack of inducible nitric oxide synthase prevents lipid-induced skeletal muscle insulin resistance without attenuating cytokine level. *J Pharmacol Sci* 117:77-86.
7. Chang R, Chicoine LG, Cui H, Kanagy NL, Walker BR, Liu Y, English BK, Nelin LD (2008) Cytokine-induced arginase activity in pulmonary endothelial cells is dependent on Src family tyrosine kinase activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295:L688-697.
8. Chavez JC, LaManna JC (2002) Activation of hypoxia-inducible factor-1 in the rat cerebral cortex after transient global ischemia: potential role of insulin-like growth factor-1. *J Neurosci* 22:8922-8931.
9. Chen H, O'Reilly EJ, Schwarzschild MA, Ascherio A (2008) Peripheral inflammatory biomarkers and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol* 167:90-95.
10. Chiu IM, Chen A, Zheng Y, Kosaras B, Tsiftoglou SA, Vartanian TK, Brown RH, Jr., Carroll MC (2008) T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:17913-17918.
11. Colton CA (2009) Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol* 4:399-418.

12. Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Forster I, Pawlinski R, Mackman N, Haase VH, Jaenisch R, Corr M, Nizet V, Firestein GS, Gerber HP, Ferrara N, Johnson RS (2003) HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 112:645-657.
13. Dauer W, Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889-909.
14. Deshmane SL, Mukerjee R, Fan S, Del Valle L, Michiels C, Sweet T, Rom I, Khalili K, Rappaport J, Amini S, Sawaya BE (2009) Activation of the oxidative stress pathway by HIV-1 Vpr leads to induction of hypoxia-inducible factor 1alpha expression. *J Biol Chem* 284:11364-11373.
15. Esteves AR, Lu J, Rodova M, Onyango I, Lezi E, Dubinsky R, Lyons KE, Pahwa R, Burns JM, Cardoso SM, Swerdlow RH (2010) Mitochondrial respiration and respiration-associated proteins in cell lines created through Parkinson's subject mitochondrial transfer. *J Neurochem* 113:674-682.
16. Frank-Cannon TC, Alto LT, McAlpine FE, Tansey MG (2009) Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? *Mol Neurodegener* 4:47.
17. Garcia M, Vanhoutte P, Pages C, Besson MJ, Brouillet E, Caboche J (2002) The mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid induces striatal neurodegeneration via a c-Jun N-terminal kinase/c-Jun module. *J Neurosci* 22:2174-2184.
18. George JL, Mok S, Moses D, Wilkins S, Bush AI, Cherny RA, Finkelstein DI (2009) Targeting the progression of Parkinson's disease. *Curr Neuropharmacol* 7:9-36.
19. Gil JM, Rego AC (2008) Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur J Neurosci* 27:2803-2820.
20. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH (2010) Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 140:918-934.
21. Gomez-Lazaro M, Galindo MF, Melero-Fernandez de Mera RM, Fernandez-Gomez FJ, Concannon CG, Segura MF, Comella JX, Prehn JH, Jordan J (2007) Reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase activate Bax to induce mitochondrial cytochrome c release and apoptosis in response to malonate. *Mol Pharmacol* 71:736-743.
22. Guidetti P, Reddy PH, Tagle DA, Schwarcz R (2000) Early kynurenergic impairment in Huntington's disease and in a transgenic animal model. *Neurosci Lett* 283:233-235.

23. Ha AD, Jankovic J (2011) Exploring the correlates of intermediate CAG repeats in Huntington disease. *Postgrad Med* 123:116-121.
24. Han XJ, Tomizawa K, Fujimura A, Ohmori I, Nishiki T, Matsushita M, Matsui H (2011) Regulation of mitochondrial dynamics and neurodegenerative diseases. *Acta Med Okayama* 65:1-10.
25. Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10:1387-1394.
26. Henschcliff C, Beal MF (2008) Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nat Clin Pract Neurol* 4:600-609.
27. Hisahara S, Shimohama S (2010) Toxin-induced and genetic animal models of Parkinson's disease. *Parkinsons Dis* 2011:951709.
28. Huang YF, Yang CH, Huang CC, Tai MH, Hsu KS (2010) Pharmacological and genetic accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha enhances excitatory synaptic transmission in hippocampal neurons through the production of vascular endothelial growth factor. *J Neurosci* 30:6080-6093.
29. Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW (2009) Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol* 187:761-772.
30. Kaushal K, Heald AH, Siddals KW, Sandhu MS, Dunger DB, Gibson JM, Wareham NJ (2004) The impact of abnormalities in IGF and inflammatory systems on the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 27:2682-2688.
31. Ke Q, Costa M (2006) Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 70:1469-1480.
32. Kim J, Moody JP, Edgerly CK, Bordiuk OL, Cormier K, Smith K, Beal MF, Ferrante RJ (2010) Mitochondrial loss, dysfunction and altered dynamics in Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 19:3919-3935.
33. Klintworth H, Garden G, Xia Z (2009) Rotenone and paraquat do not directly activate microglia or induce inflammatory cytokine release. *Neurosci Lett* 462:1-5.
34. Koh H, Chung J (2010) PINK1 and Parkin to control mitochondria remodeling. *Anat Cell Biol* 43:179-184.
35. Kumar P, Kalonia H, Kumar A (2010) Huntington's disease: pathogenesis to animal models. *Pharmacol Rep* 62:1-14.
36. La Spada AR, Weydt P, Pineda VV (2011) Huntington's Disease Pathogenesis. In: *Neurobiology of Huntington's Disease: Applications to Drug Discovery*. (Lo DC HD, Hughes RE, ed). Boca Raton, Florida: CRC Press.

37. Lacy-Hulbert A, Moore KJ (2006) Designer macrophages: oxidative metabolism fuels inflammation repair. *Cell Metab* 4:7-8.
38. Lin MT, Beal MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443:787-795.
39. Liot G, Bossy B, Lubitz S, Kushnareva Y, Sejbuk N, Bossy-Wetzel E (2009) Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway. *Cell Death Differ* 16:899-909.
40. Liu B (2006) Modulation of microglial pro-inflammatory and neurotoxic activity for the treatment of Parkinson's disease. *Aaps J* 8:E606-621.
41. Lobsiger CS, Cleveland DW (2007) Glial cells as intrinsic components of non-cell-autonomous neurodegenerative disease. *Nat Neurosci* 10:1355-1360.
42. Ludolph AC, He F, Spencer PS, Hammerstad J, Sabri M (1991) 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. *Can J Neurol Sci* 18:492-498.
43. Mashayekhi F, Mirzajani E, Naji M, Azari M (2010) Expression of insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding proteins in the serum and cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *J Clin Neurosci* 17:623-627.
44. Mochel F, Haller RG (2011) Energy deficit in Huntington disease: why it matters. *J Clin Invest* 121:493-499.
45. Moy LY, Wang SP, Sonsalla PK (2007) Mitochondrial stress-induced dopamine efflux and neuronal damage by malonate involves the dopamine transporter. *J Pharmacol Exp Ther* 320:747-756.
46. Nakamura Y (2002) Regulating factors for microglial activation. *Biol Pharm Bull* 25:945-953.
47. Nelin LD, Wang X, Zhao Q, Chicoine LG, Young TL, Hatch DM, English BK, Liu Y (2007) MKP-1 switches arginine metabolism from nitric oxide synthase to arginase following endotoxin challenge. *Am J Physiol Cell Physiol* 293:C632-640.
48. Neumann H, Kotter MR, Franklin RJ (2009) Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain* 132:288-295.
49. O'Connor JC, McCusker RH, Strle K, Johnson RW, Dantzer R, Kelley KW (2008) Regulation of IGF-I function by proinflammatory cytokines: at the interface of immunology and endocrinology. *Cell Immunol* 252:91-110.

50. Padovan-Neto FE, Echeverry MB, Chiavegatto S, Del-Bel E (2011) Nitric Oxide Synthase Inhibitor Improves De Novo and Long-Term L-DOPA-Induced Dyskinesia in Hemiparkinsonian Rats. *Front Syst Neurosci* 5:40.
51. Petrozzi L, Ricci G, Giglioli NJ, Siciliano G, Mancuso M (2007) Mitochondria and neurodegeneration. *Biosci Rep* 27:87-104.
52. Rajpathak SN, McGinn AP, Strickler HD, Rohan TE, Pollak M, Cappola AR, Kuller L, Xue X, Newman AB, Strotmeyer ES, Psaty BM, Kaplan RC (2008) Insulin-like growth factor-(IGF)-axis, inflammation, and glucose intolerance among older adults. *Growth Horm IGF Res* 18:166-173.
53. Ryu JK, Nagai A, Kim J, Lee MC, McLarnon JG, Kim SU (2003) Microglial activation and cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: in vitro and in vivo studies. *Neurobiol Dis* 12:121-132.
54. Saleh N, Moutereau S, Durr A, Krystkowiak P, Azulay JP, Tranchant C, Broussolle E, Morin F, Bachoud-Levi AC, Maison P (2009) Neuroendocrine disturbances in Huntington's disease. *PLoS One* 4:e4962.
55. Sapp E, Kegel KB, Aronin N, Hashikawa T, Uchiyama Y, Tohyama K, Bhide PG, Vonsattel JP, DiFiglia M (2001) Early and progressive accumulation of reactive microglia in the Huntington disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:161-172.
56. Sato S, Hattori N (2011) Genetic mutations and mitochondrial toxins shed new light on the pathogenesis of Parkinson's disease. *Parkinsons Dis*.
57. Schwarcz R, Guidetti P, Sathyaikumar KV, Muchowski PJ (2010) Of mice, rats and men: Revisiting the quinolinic acid hypothesis of Huntington's disease. *Prog Neurobiol* 90:230-245.
58. Seppet E, Gruno M, Peetsalu A, Gizatullina Z, Nguyen HP, Vielhaber S, Wussling MH, Trumbeckaite S, Arandarcikaite O, Jerzembeck D, Sonnabend M, Jegorov K, Zierz S, Striggow F, Gellerich FN (2009) Mitochondria and energetic depression in cell pathophysiology. *Int J Mol Sci* 10:2252-2303.
59. Shaikh SB, Nicholson LF (2009) Effects of chronic low dose rotenone treatment on human microglial cells. *Mol Neurodegener* 4:55.
60. Sukhanov S, Higashi Y, Shai SY, Vaughn C, Mohler J, Li Y, Song YH, Titterington J, Delafontaine P (2007) IGF-1 reduces inflammatory responses, suppresses oxidative stress, and decreases atherosclerosis progression in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:2684-2690.

61. Tai YF, Pavese N, Gerhard A, Tabrizi SJ, Barker RA, Brooks DJ, Piccini P (2007) Microglial activation in presymptomatic Huntington's disease gene carriers. *Brain* 130:1759-1766.
62. Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, Marras C, Bhudhikanok GS, Kasten M, Chade AR, Comyns K, Richards MB, Meng C, Priestley B, Fernandez HH, Cambi F, Umbach DM, Blair A, Sandler DP, Langston JW (2011) Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect* 119:866-872.
63. Tsuchiya K, Sakai H, Suzuki N, Iwashima F, Yoshimoto T, Shichiri M, Hirata Y (2007) Chronic blockade of nitric oxide synthesis reduces adiposity and improves insulin resistance in high fat-induced obese mice. *Endocrinology* 148:4548-4556.
64. Tuncel D, Inanc Tolun F, Toru I (2009) Serum insulin-like growth factor-1 and nitric oxide levels in Parkinson's disease. *Mediators Inflamm* 2009:132464.
65. Vats D, Mukundan L, Odegaard JI, Zhang L, Smith KL, Morel CR, Wagner RA, Greaves DR, Murray PJ, Chawla A (2006) Oxidative metabolism and PGC-1beta attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell Metab* 4:13-24.
66. Vincent A, Briggs L, Chatwin GF, Emery E, Tomlins R, Oswald M, Middleton CA, Evans GJ, Sweeney ST, Elliott CJ (2012) parkin-induced defects in neurophysiology and locomotion are generated by metabolic dysfunction and not oxidative stress. *Hum Mol Genet* 21:1760-1769.
67. Walmsley SR, Chilvers ER, Whyte MK (2009) Hypoxia. Hypoxia, hypoxia inducible factor and myeloid cell function. *Arthritis Res Ther* 11:219.
68. Weydt P, G.B. L, A.C. L (2010) Huntington's Disease: Aetiology, Pathology and Pathogenesis. In: *Motor Neuron Diseases* (Fahn SaS, M., ed), pp 417-431.
69. Wyss-Coray T, Mucke L (2002) Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron* 35:419-432.
70. Zhou F, Wu JY, Sun XL, Yao HH, Ding JH, Hu G (2007) Iptakalim alleviates rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons through inhibiting microglia-mediated neuroinflammation. *Neuropsychopharmacology* 32:2570-2580.
71. Zinger A, Barcia C, Herrero MT, Guillemin GJ (2011) The involvement of neuroinflammation and kynurenine pathway in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis* 2011:716859.

7. Danksagung

Besonders dankbar bin ich Fr. Dr. A. Witting. Sie hat mich in jeder Phase meiner Arbeit unterstützt. Unter ihrer intensiven Betreuung lernte ich die Grundlagen wissenschaftlichen Arbeitens und Schreibens. Fr. Dr. Witting hat mir Verantwortung übergeben und mich stets ermutigt neue experimentelle Wege zu gehen. Für diese lehrreiche und zugleich wunderschöne Zeit sowie für die hervorragende Zusammenarbeit danke ich ihr sehr.

Mein Dank gilt Hr. Prof. Dr. A.C. Ludolph für die formale Betreuung sowie für die Unterstützung, die er mir stets entgegengebracht hat.

Besonderer Dank gilt auch Fr. Irma Merdian für ihre exzellente technische Unterstützung. Von der ersten Stunde an half sie mir, all die kleinen Hürden des Labor-Alltags zu meistern.

Der Abteilung Neurologie, insbesondere der experimentellen Neurologie danke ich für die freundliche Aufnahme und Unterstützung im Labor. Das Leben und Arbeiten im IZKF war durch die freundliche Atmosphäre und die gemeinsamen Kaffeepausen sehr angenehm.

Zudem danke ich allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Witting für die gute Zusammenarbeit.

Meinen Eltern und meinen Geschwistern danke ich für die moralische Unterstützung sowie für den unerschütterlichen Glauben an meine Fähigkeiten.

8. Curriculum Vitae

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.