

Aus dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie  
(Direktorin: Prof. Dr. rer. nat. Elke Krüger)  
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

**Pharmakologische Hemmung und genetischer Knockout  
der Membran-Alanin-Aminopeptidase:  
Effekte auf die Expression von Zytokinen und  
Komponenten des Wnt Signalweges**

Inaugural - Dissertation  
zur  
Erlangung des akademischen  
Grades  
Doktor der Medizin  
(Dr. med.)

der  
Universitätsmedizin  
der  
Universität Greifswald

2021

vorgelegt von: Janna-Luisa Beermann  
geb. am: 31.05.1995  
in: Norderney



Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Uwe Lendeckel

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Dirk Reinhold

(3. Gutachter:)

Ort, Raum: Institut für Pharmakologie Greifswald

Tag der Disputation: 18.03.2022



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Das Immunsystem .....</b>	<b>12</b>
1.1.1 Mikrogliazellen .....	14
1.1.2 Die Zytokine der Immunantwort .....	14
<b>1.2 Die Aminopeptidase N .....</b>	<b>15</b>
1.2.1 Die Inhibitoren der Aminopeptidase N .....	17
<b>1.3 Der Wnt Signalweg .....</b>	<b>19</b>
1.3.1 Der $\beta$ -Catenin abhängige Wnt Signalweg .....	21
1.3.2 $\beta$ -Catenin unabhängige Wege .....	22
1.3.3 Wnt Signalwege in Mikrogliazellen .....	23
<b>2 Zielstellung .....</b>	<b>25</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Material .....</b>	<b>27</b>
3.1.1 Laborgeräte .....	27
3.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	29
3.1.3 Reagenzien .....	30
3.1.4 Seren .....	37
3.1.5 Versuchstiere .....	38
3.1.6 Antikörper für die Immunhistochemie .....	39
3.1.7 Antikörper für die Western Blot Analyse .....	39
3.1.8 Größenstandards für die Elektrophorese .....	40
3.1.9 Primer für RT-qPCR .....	40
3.1.10 APN-Enzymaktivität .....	42
3.1.11 Kits .....	43
3.1.12 Software .....	43
3.2.8 Die quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion .....	48
3.2.13 Splenozytenisolation .....	57
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>67</b>
<b>4.1 Einfluss von LPS und pharmakologischen Inhibitoren der APN auf die APN Expression in BV2 Mikrogliazellen .....</b>	<b>67</b>
4.1.1 Einfluss der LPS-Stimulation auf die APN-Proteinmenge .....	68
<b>4.2 Einfluss von LPS und pharmakologischen Inhibitoren der APN auf die Enzymaktivität der Aminopeptidase N in BV2 Mikrogliazellen .....</b>	<b>69</b>

<b>4.3 Einfluss von LPS und pharmakologischen Inhibitoren der APN auf die Expression von IL-6 und IL-1<math>\alpha</math> in BV2 Mikrogliazellen .....</b>	<b>70</b>
<b>4.4 Einfluss von LPS und pharmakologischen Inhibitoren der APN auf die Expression von IL-1<math>\beta</math> und TNF-<math>\alpha</math> in BV2 Mikrogliazellen .....</b>	<b>73</b>
<b>4.5 Einfluss von LPS und pharmakologischen Hemmstoffen der APN auf das Proliferationsverhalten von BV2 Mikrogliazellen .....</b>	<b>74</b>
<b>4.6 Einfluss des APN-Antikörpers My7 und des APN-Inhibitors IP10.C9 auf die Expression von IL-6 und TNF-<math>\alpha</math> in BV2 Mikrogliazellen .....</b>	<b>75</b>
<b>4.7 Expression der Komponenten des Wnt Signalweges in BV2 Mikrogliazellen</b>	<b>76</b>
4.7.1 Basale Expression der Komponenten des Wnt Signalweges .....	76
4.7.2 Einfluss von LPS und pharmakologischen Hemmstoffen der APN auf die Expression verschiedener Frizzled-Proteine .....	78
4.7.3 Der Einfluss von LPS und pharmakologischen Hemmstoffen der APN auf die Expression von Wnt 1 und Wnt 10b .....	81
4.7.4 Einfluss von LPS und pharmakologischen Hemmstoffen der APN auf Komponenten des Wnt Signalweges .....	81
4.7.5 Einfluss von LPS und pharmakologischen Hemmstoffen der APN auf die Expression von RNF 43 .....	83
4.7.6 Veränderungen in der Proteinexpression von Phospho-GSK3 $\beta$ nach LPS Stimulation der BV2 Mikrogliazellen .....	84
<b>4.8 Proteinexpression von Wnt 10b in primären murinen Mikrogliazellen .....</b>	<b>85</b>
<b>4.9 Einfluss von pharmakologischen Hemmstoffen der APN auf die Expression von APN in Splenozyten .....</b>	<b>88</b>
4.9.1 Einfluss der Inhibitoren der APN auf die APN-Enzymaktivität in Splenozyten ...	89
4.9.2 Einfluss pharmakologischer Hemmstoffe der APN auf Komponenten des Wnt Signalweges in Splenozyten aus WT- und CD13-KO-Mäusen .....	89
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>91</b>
<b>5.1 Mikrogliazellen – Fresszellen des Zentralen Nervensystems .....</b>	<b>92</b>
<b>5.2 Betrachtung der Wirkung verschiedener Inhibitoren der APN auf Mikrogliazellen im Vergleich zum genetischen CD13-Knockout in primären murinen Mikrogliazellen .....</b>	<b>93</b>
5.2.1 Vorteile und Grenzen verschiedener Expressionsanalysen .....	93
5.2.2 Die Rolle der APN und ihrer Inhibitoren in BV2 Mikrogliazellen und Splenozyten	94
5.2.3 Proinflammatorische Prozesse in BV2 Mikrogliazellen .....	97
5.2.4 Zusammenhänge des Wnt Signalweges und der Aminopeptidase N .....	101
5.2.5 Die Rolle des Wnt Signalweges in Mikrogliazellen .....	102

5.3	Schlussfolgerung .....	108
6	Zusammenfassung.....	111
	Abbildungsverzeichnis .....	CXIII
	Tabellenverzeichnis .....	CXV
	Literaturverzeichnis .....	CXVII
	Eidesstattliche Erklärung .....	CXXIII
	Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	Danksagung .....	CXXIV

---

### Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ala-pNA	L-Alanine-p-nitroanilide
APN	Aminopeptidase N
APC	Adenomatous-polyposis-coli-Protein
A. deion.	Aqua deionisata
AK	Antikörper
Bp	Basenpaare
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CamKII	Calcium/Calmodulin-Kinase-2
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary Deoxyribonucleic Acid (komplementäre Deoxyribonukleinsäure)
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAG	Diacylglycerin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphaete
DPIV	Dipeptidyl Peptidase IV
EC	Enzyme commission Nummer
FCS	Fetal Calf Serum (Fetales Kälberserum)
Geb.	geboren
ggf.	gegebenenfalls
GTP	Guanosintriphosphat
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphat
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	Mitogen activated Protein
NF-kB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Oligo(dT)	Oligo-desoxythymine
PBS	Phosphatgepufferte Waschlösung
PDE	Phosphodiesterase
Perf.	Perfundiert

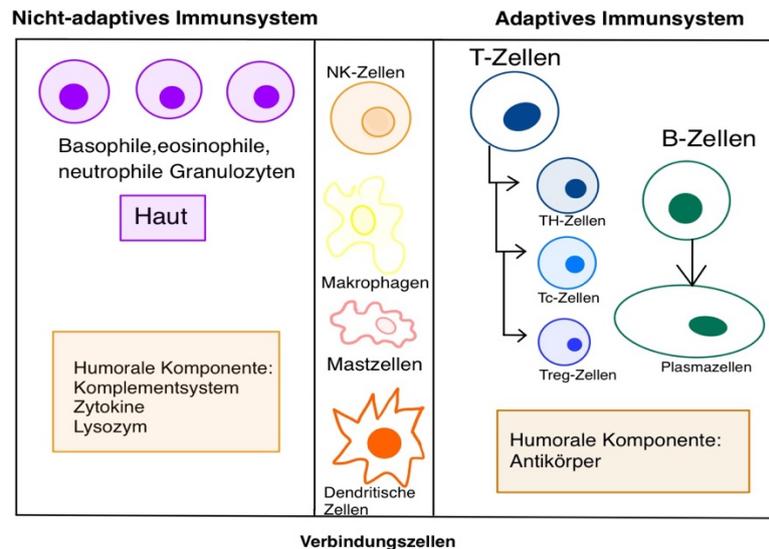
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase
PSA	Puromycin-sensitive Aminopeptidase
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RNF 43	Ring Finger Protein 43
ROR2	Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 2
RPMI Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Reverse Transkription-quantitative Polymerase- Kettenreaktion
RYK	Rezeptorthyrosinkinase der RYK-Familie
Tab.	Tabelle
TAE	Tris acetat EDTA-Puffer
TCF 7	Transkriptionsfaktor 7
T <sub>c</sub>	zytotoxische T-Zellen
T <sub>H</sub>	T-Helferzellen
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
Treg	regulatorische T-Zellen
WST	water soluble tetrazolium

## **1 Einleitung**

Im Rahmen immunologischer Erkrankungen, wie Autoimmun- oder inflammatorischen Erkrankungen, Erkrankungen des zentralen Nervensystems oder Krebserkrankungen spielen Peptidasen eine wichtige Rolle [1, 2]. Die Exopeptidasen Aminopeptidase N (APN/CD13, EC 3.4.11.2) und Dipeptidylpeptidase IV (DP IV/CD26, EC 3.4.14.5.) sind essentiell für die Regulation vieler biologischer Prozesse, vor allem für Autoimmunität und Inflammation. Sie dienen als Schaltstellen in der Regulation der T-Zell-Aktivierung im Rahmen inflammatorischer Erkrankungen [3-5]. Des Weiteren konnte der Einfluss der Inhibitoren der APN auf die Entwicklung und Therapie von Tumorerkrankungen gezeigt werden [6]. Die immunmodulatorische Rolle von APN und DP IV-Inhibitoren konnte in diversen Geweben und Zelllinien des peripheren Kreislaufsystems verdeutlicht werden, z.B. in T-Zellen [3], Splenozyten, Epithelzellen [7] oder Zellen des mononukleären Systems [8, 9]. In untersuchten T-Zell-Populationen konnte einerseits eine geringere T-Zell-Aktivität und -Funktion detektiert werden [3, 5, 10], andererseits ergab sich eine gesteigerte Aktivität der CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen [7]. Die Inhibitoren stellen ein wichtiges Target in der Therapie T-Zell assoziierter Erkrankungen, Autoimmun- oder inflammatorischer Erkrankungen dar [2]. In Mausmodellen der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), die eine mit der menschlichen Multiplen Sklerose vergleichbare entzündliche Erkrankung des ZNS darstellt, sind therapeutische Effekte durch Gabe von APN-Inhibitoren beschrieben [11]. Multiple Sklerose ist die häufigste chronisch entzündliche Erkrankung des Zentralen Nervensystems bei jungen Erwachsenen [12]. Es kommt zu Entzündungen des Gehirns und der Blutgefäße, was die Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke zur Folge hat. Im Bereich dieser Entzündungsherde führt das zu Einwanderung aktivierter T-Zellen. Im Gehirn wirken diese autoreaktiven T-Zellen auf Mikrogliazellen und deren Antigene, was zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine führt. Die Gesamtheit der entzündlichen und Autoimmun-Prozesse bedingt einen Verlust der Myelinscheide, die normalerweise die Axone der Nerven umhüllt, sodass es zu Störungen der neurologischen Funktionen kommt [13]. Die Gabe der Inhibitoren führte im Mausmodell zu einer deutlichen Reduktion der klinischen Symptome im Akutstadium der EAE, als auch zu einem abgeschwächten chronischen Krankheitsverlauf [9, 11]. Dadurch wird die therapeutische Relevanz der Inhibitoren für neurologische Erkrankungen besonders deutlich.

## 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem reagiert durch eine Vielzahl von Effektorzellen und Molekülen auf innere und äußere Reize und bildet das Abwehrsystem des menschlichen Körpers. Erreger lösen eine Antwort des angeborenen (nicht-adaptiven) Immunsystems aus und nur, wenn der Erreger nicht beseitigt werden kann, wird eine Reaktion des adaptiven Immunsystems ausgelöst [14]



**Abbildung 1: Die Komponenten des Immunsystems**

Schematische Darstellung der Komponenten des Immunsystems, die eine nicht-adaptive oder eine adaptive Immunantwort auslösen können. Die Schnittstelle zwischen beiden Systemen stellen die Antigenpräsentierenden Zellen dar, welche als „Verbindungszellen“ dargestellt sind.

Aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks entwickeln sich lymphatische und myeloische Vorläuferzellen, aus denen sich die Zellen des Immunsystems bilden. Aus der myeloischen Vorläuferzelle entwickeln sich die Granulozyten und die dendritischen Zellen, sowie Makrophagen, die die Fresszellen des Immunsystems darstellen und Teil der direkten Immunantwort sind (Abb. 1). Sie betreiben Phagozytose, den Abbau von Krankheitserregern und infizierten Zellen, sowie die Beseitigung toter Zellen und Zelltrümmer. Makrophagen und neutrophile Granulozyten übernehmen zusätzlich wichtige Aufgaben in der Initiierung der Entzündung, ebenso wie die dendritischen Zellen, bei der Antigenpräsentation. Dadurch können T-Zellen, im Rahmen der indirekten Immunantwort, Antigene erkennen und durch Aktivierung der B-Zellen die Antikörperproduktion anstoßen. Mastzellen, die ebenfalls in die Gruppe der myeloischen Zellen gehören, können lokale

Entzündungsreaktionen als Abwehrreaktion auf ein Antigen initiieren. Alle Zellen, die Phagozytose betreiben gehören zum mononukleären System [14]. Die Fresszellen des ZNS sind die Mikrogliazellen, dessen Vorläuferzellen, wie bei den Makrophagen, die Monozyten sind. Sie werden durch pathogene Keime aktiviert und übernehmen sowohl die Phagozytose, als auch die Erkennung und Präsentation der Antigene im ZNS [15]. Aus der lymphatischen Vorläuferzelle entwickeln sich B-, T- und NK-Zellen. Die antigenunspezifischen natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) können auf abnormale Zellen im Rahmen einer Infektion reagieren und diese abtöten (Abb.1). Die antigenspezifischen Zellen hingegen haben die Möglichkeit auf diverse Antigene zu reagieren. Die B-Zellen können in ihrer Effektorform, der Plasmazelle, Antikörper als Reaktion auf ein Antigen produzieren. Sie bilden damit die sogenannte humorale Immunantwort [16]. Die T-Zellen, welche im Thymus ausreifen, werden durch Antigenkontakt aktiviert und differenzieren sich zu T-Effektorlymphozyten. Die T-Zellen können sich zu T-Helferzellen, zytotoxischen T-Zellen oder zu T-Gedächtniszellen differenzieren. Die T-Helferzellen lassen sich in verschiedene Subgruppen unterteilen. In Abhängigkeit verschiedener Zytokine differenzieren sich diese zu  $T_{H1}$ -,  $T_{H2}$ -, oder  $T_{H17}$  Helferzellen. Die  $T_{H1}$  Helferzellen aktivieren die zytotoxischen T-Zellen, die Antigene erkennen und in den infizierten Zellen den programmierten Zelltod auslösen. Die  $T_{H2}$ - Helferzellen sind an der Aktivierung der B-Zellen beteiligt, sodass die Antikörperproduktion angestoßen wird. Die  $T_{H17}$  Zellen spielen eine wichtige Rolle für die Aktivierung von Granulozyten und im Rahmen chronisch entzündlicher und Autoimmunerkrankungen [14, 16]. Eine weitere wichtige Gruppe der T-Helferzellen sind die regulatorischen T-Zellen. Sie übernehmen regulatorische Aufgaben bei der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz. Durch Suppression autoreaktiver Immunprozesse werden unerwünschte oder überschießende Immunreaktionen auf körpereigene Prozesse unterdrückt [17]. Die Reifung der B-Lymphozyten im Knochenmark sowie die Reifung der T-Lymphozyten im Thymus zählen zum adaptiven Immunsystem, das zusätzlich zum angeborenen Abwehrsystem das Erkennen bestimmter Erreger und die Entwicklung eines Gedächtnisses zum langfristigen Schutz ermöglicht. Ein Ausfall des Immunsystems lässt sich entweder darauf zurückführen, dass der Erreger die Abwehr verhindert, ein Gendefekt oder eine Immunschwäche vorliegt [16].

### 1.1.1 Mikrogliazellen

Die Mikrogliazellen sind die Fresszellen des ZNS und übernehmen wichtige Aufgaben der Immunabwehr und werden zum mononukleären-phagozytären System gezählt. Die Mikrogliazellen werden im Rahmen aller Erkrankungen und Verletzungen des ZNS aktiviert und können durch ihre amöboide Fortbewegung jeden Erkrankungsherd erreichen. Zu ihren Aufgaben gehört die Phagozytose von Fremdkörpern und Zellfragmenten, die Eliminierung von apoptotischen Neuronen und Gliazellen während der Embryonalentwicklung, sowie die Antigenpräsentation [18]. Die BV2 Mikrogliazellen sind eine murine Zelllinie, die durch Infektion primärer Mikrogliazellen mit einem v-raf/v-myc Retrovirus (J2) generiert wurde. Vielfach wurde beschrieben, dass BV2 Mikrogliazellen größtenteils die gleichen morphologischen und funktionellen Eigenschaften zeigen wie primäre Mikrogliazellen und dadurch ein vergleichbares Model für Untersuchungen an aktivierten Mikrogliazellen darstellen [19, 20]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch LPS eine vergleichbare Immunantwort wie in primären Mikrogliazellen ausgelöst werden kann [21].

### 1.1.2 Die Zytokine der Immunantwort

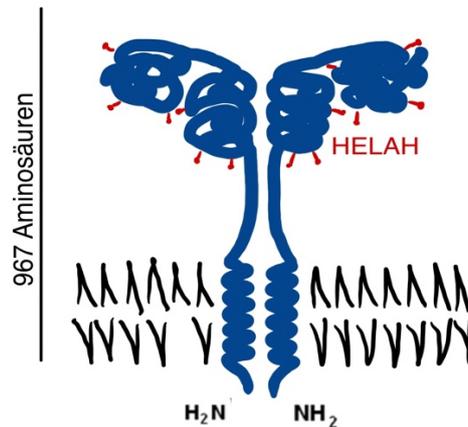
Zytokine sind körpereigene Proteine, die eine wichtige Rolle in der Regulation verschiedener Signaltransduktionswege übernehmen und ihrerseits durch die Aktivität verschiedener Signaltransduktionswege reguliert werden. Sie werden von immunrelevanten Zellen des Körpers, von Makrophagen, T- oder B-Zellen produziert. Zu den Zytokinen des Immunsystems gehören die Interleukine, Interferone, Chemokine und die Vertreter der TNF-Superfamilie. Die Interleukine und Interferone übernehmen dabei in erster Linie Aufgaben der interzellulären Kommunikation. Im Rahmen immunologischer Prozesse lassen sich zwei Gruppen unterscheiden: die proinflammatorischen und die antiinflammatorischen Zytokine [22]. Zu den proinflammatorischen Zytokinen, welche vor allem von aktivierten  $T_{H1}$ - und  $T_{H2}$ -Zellen ausgeschüttet werden, gehören IL-1, IL-6, IL-12 und IL-3, die ihrerseits B-Zellen für die Antikörperproduktion aktivieren. Weitere proinflammatorische Mediatoren sind INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-2, die über die zytotoxischen T-Zellen für die Zellzerstörung verantwortlich sind. Die wichtigsten antiinflammatorischen Zytokine sind IL-10 und TGF- $\beta$ , welche aktivierte Makrophagen inhibieren können und dadurch die Entzündungsinitation hemmen [14].

### 1.1.3 LPS-vermittelte Aktivierung proinflammatorischer Prozesse

Das Lipopolysaccharid (LPS), ein Endotoxin, wird vielfach im Rahmen experimenteller Stimulationsversuche des Immunsystems verwendet. LPS ist Bestandteil der äußeren Zellwand aller gramnegativen Bakterien und setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen. Die funktionelle Gruppe des LPS, das Lipid A, ist für die immunogene und proinflammatorische Wirkung verantwortlich und ermöglicht die Interaktion mit LPS-bindenden Proteinen und Rezeptoren [23]. Das LPS bindet an den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR-4) bindet, welcher wichtig für die Erkennung verschiedenster Krankheitserreger ist. Durch Aktivierung des TLR4-Rezeptors wird über verschiedene Signaltransduktionswege, wie den MAP-Kinase oder NF- $\kappa$ B-Weg, die Expression proinflammatorischer Zytokine ausgelöst. NF- $\kappa$ B zählt zu den Transkriptionsfaktoren, die in nahezu allen Zellen vorhanden sind, meist in inaktiver Form. Des Weiteren kann nicht nur durch LPS, sondern auch über Feedbackmechanismen, z.B. durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , der NF- $\kappa$ B Weg aktiviert werden [23]. In vielen Forschungsarbeiten, wie auch in der Stimulation von Mikrogliazellen, werden sich die immunogenen und proinflammatorischen Eigenschaften von LPS zunutze gemacht [24].

### 1.2 Die Aminopeptidase N

Die Aminopeptidase N (APN, EC 3.4.11.2), auch CD13, ist ein zinkabhängiges Typ II Transmembranprotein. Diese Aminopeptidase hat eine Größe von 150 kDa, ist auf Chromosom 15 (q25-q26) lokalisiert und setzt sich aus 967 Aminosäuren (3560 Basenpaare) zusammen. Die APN kann in sieben Domänen unterteilt werden, mit einem kurzen N-terminalen zytoplasmatischen Ende und einem langen zellulären, glykolisierten C-Terminus und bildet ein Homodimer (Abb.2). Innerhalb der katalytischen Domäne befindet sich die zinkbindende Domäne HELAH, welche für Metallopeptidasen charakteristisch ist und ein Zinkion bindet [25].



### Abbildung 2: Darstellung des Homodimers

Schematische Darstellung der APN (modifiziert nach [26]).

Als Ektoenzym katalysiert die APN die Abspaltung neutraler Aminosäuren vom N-terminalen Ende von Oligopeptiden und kann diese stoppen, wenn die Aminosäure Prolin an der zweiten Stelle der N-terminalen Sequenz auftritt. Die APN zeigt die höchste Affinität zu Aminosäuren mit langen, nichtpolaren Seitenketten, wie Leucin [2]. Charakteristisch für die APN ist eine hohe Substratspezifität und eine besondere Affinität zu folgenden Aminosäuren: Alanin > Phenylalanin > Leucin > Glycin. Zu den natürlichen Substraten gehören vasoaktive Peptide, wie Angiotensin III, Neuropeptide, wie Enkephalin oder Neurokinin oder Zytokine, wie IL-8 [4]. Durch diese proteolytischen Eigenschaften ist sie in die Regulation von Wachstum und Differenzierung zahlreicher zellulärer Systeme involviert [4, 25].

Die Expression der APN wird durch zwei unterschiedliche Promotoren reguliert, die in Abhängigkeit zum Expressionsort der APN aktiviert werden. Charakteristisch ist das ubiquitäre Auftreten der APN, wobei sie vor allem in den Nieren, der Mukosa des Magen-Darm-Traktes sowie der Leber exprimiert wird [3, 9, 25]. Durch das ubiquitäre Vorkommen auf Stammzellen und allen Vorläuferzellen der myeloischen Zellreihe gilt sie als Marker des mononukleären System [4]. Dabei spielt die APN für die funktionelle Entwicklung von Zellen des Immunsystems, wie T-Zellen oder monozytären Zellen eine entscheidende Rolle [3, 27], ist ein Marker in der Erkennung von Erkrankungen und übernimmt eine Schlüsselrolle in der Therapie von hämatologischen Erkrankungen, wie der myeloischen Leukämie [25, 28].

In Kooperation mit anderen Peptidasen, sowie in Abhängigkeit vom Expressionsort der APN kann diese verschiedene Aufgaben übernehmen. Neben der enzymatischen Aktivität der APN ist sie im Interstitium in die proteolytische Spaltung von Peptiden involviert oder an Synapsen des ZNS in die Regulation der Enkephalin- oder Endorphinausschüttung [4]. Dabei übernimmt die APN nicht nur katalytische Aufgaben, sondern fungiert auch als Rezeptor für verschiedene Viren oder als Adhäsionsmolekül auf Monozyten [25].

Vor allem in der Regulation immunologischer Prozesse, der Tumorgenese oder zellulären Interaktionen übernimmt die APN eine Schlüsselrolle [25, 29]. Neben der Regulation von Autoimmunität und Inflammation, vor allem in T-Zellen [3], zeigte sich die therapeutische Relevanz in der Tumorgenese. In zahlreichen Forschungsarbeiten ist beschrieben, dass die APN in Tumorerkrankungen hochreguliert wird und dadurch die Angiogenese, Migration und Metastasierung unterstützt [25, 30]. Diese Prozesse erfolgen vielfach über Aktivierung von Signalkaskaden, wie den Ras- oder MAP-Kinase-Signalweg. Im Rahmen der Angiogenese werden Zytokine aktiviert, die ihrerseits über den Ras- oder MAP-Kinase-Signalweg die Transkription der APN steigern [30, 31]. Dadurch stellt die Regulation der APN ein wichtiges therapeutisches Target dar. Das kann durch Modulation von Synthese oder Abbau der APN, über Zytokine oder interzelluläre Prozesse, oder durch einen Inhibitor, der die Substratspaltung verhindert, erfolgen [4]. Die Entwicklung von Inhibitoren der APN erfolgte auf Grundlage bekannter Substrate und stellt ein großes therapeutisches Potential für immunologische Prozesse bei Tumorerkrankungen dar [4, 25, 32].

### **1.2.1 Die Inhibitoren der Aminopeptidase N**

Grundsätzlich lassen sich die Inhibitoren der APN in natürliche und synthetische Inhibitoren unterteilen. Zu den natürlichen Inhibitoren gehören Bestatin und Phebestin, welche aus Bakterien generiert werden [25]. Zu den spezifischeren Inhibitoren gehören Actinonin [33] und RB3014 [34]. Es konnte vielfach gezeigt werden, dass die APN in Wachstum und Differenzierung von Krebszellen involviert ist. Daraus ergibt sich eine große therapeutische Relevanz der Inhibitoren der APN für die Krebstherapie [1, 28, 35]. Führendes Beispiel ist die Therapie der akuten myeloischen Leukämie mit Bestatin (Ubenimex) [28, 36]. Einerseits wird durch die Inhibierung mit Bestatin die

Apoptose der Krebszellen stimuliert [6], andererseits konnte eine höhere Sensibilität dieser für die Strahlentherapie detektiert werden [37].

Darüber hinaus ist die APN sowohl in vitro als auch in verschiedenen Krankheitsmodellen der Maus in die Regulation inflammatorischer Prozesse involviert. Durch Actinonin sind immunsuppressive Effekte in T-Zellen beschrieben. Es kommt sowohl zu einer Hemmung proinflammatorischer Zytokine, als auch zu einer gesteigerten Produktion antiinflammatorischer Zytokine [2, 8]. In diesem Zusammenhang stellte sich heraus, dass die Hemmung von DP IV ebenfalls antiinflammatorische Effekte in T-Zellen bewirken kann. Gemeinsam untersucht wurden die beiden Aminopeptidasen in erster Linie in T-Zellen. In der T-Zell Regulation konnten die T-Zell Proliferation und Funktion deutlich stärker durch den additiven Effekt einer dualen Inhibition von DPIV und APN, als durch einfache Inhibition beeinflusst werden kann [2, 9]. Daraufhin wurden duale synthetische Inhibitoren entwickelt. Dazu gehören auch die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren A1.002 und IP10.C9. In zahlreichen Forschungsarbeiten konnte verdeutlicht werden, dass die Inhibitoren der APN eine wichtige Rolle für chronisch-entzündliche Erkrankungen oder Autoimmunerkrankungen spielen. Führende Untersuchungen wurden am Mausmodell zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Multipler Sklerose durchgeführt, um das therapeutische Potenzial der Inhibitoren zu quantifizieren [8, 9]. Durch die duale Inhibition werden immunsuppressive Kaskaden zusätzlich verstärkt, sodass ein therapeutischer Einfluss auf den Krankheitsverlauf beobachtet werden konnte [9, 38, 39]. Im Vergleich dazu ist die APN auch im zentralen Nervensystem ubiquitär exprimiert und übernimmt dort vergleichbare Aufgaben wie im peripheren Immunsystem [40, 41]. Durch die Inhibitoren der APN konnte ein immunsuppressiver Einfluss auf die ZNS-Inflammation, sowie auf den Verlauf verschiedener Krebserkrankungen im ZNS detektiert werden [11, 42, 43].

Des Weiteren spielen Zusammenhänge zwischen der Inhibition der APN und verschiedenen Signalwegen eine wichtige Rolle. Es konnte eine Hemmung der Aktivität des MAPK- oder des PI3K-(Phosphatidylinositol 3-Kinase) Signalweges detektiert werden, welche für Migration und Wachstum im Rahmen verschiedener Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle spielen [2, 30]. Eine wichtige Schaltstelle für Differenzierung und Zellwachstum stellt der Wnt Signalweg dar, welcher durch die

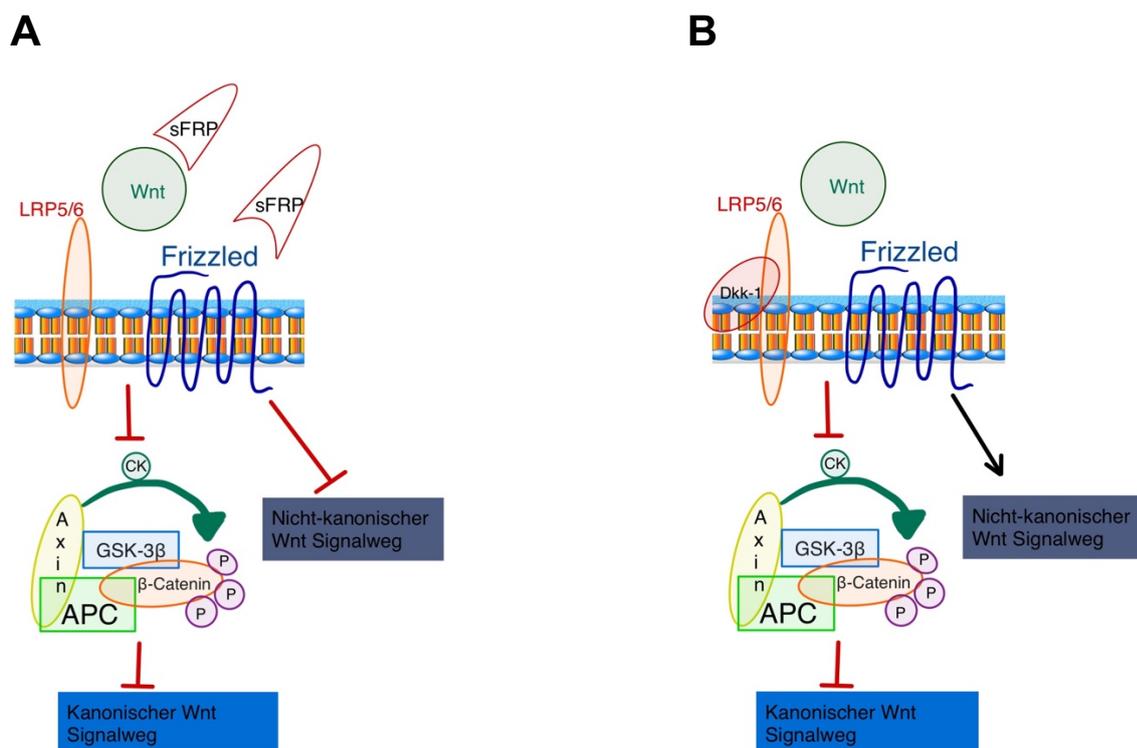
Inhibition der APN verstärkt aktiviert werden kann. Durch Actinonin konnte die Expression von Wnt 5a, ein Wnt-Protein welches sowohl auf den kanonischen, als auch auf den nicht-kanonischen Wnt Signalweg Einfluss hat, gesteigert werden [2, 44, 45]. Die Regulation verschiedener Signalkaskaden stellt die Schnittstelle zwischen der APN und ihrer Bedeutung für die Regulation inflammatorischer- und Tumorerkrankungen dar.

### 1.3 Der Wnt Signalweg

Der Wnt Signalweg ist ein wichtiger Signaltransduktionsweg für die Regulation von Zellmigration, Polarität, interzellulärer Kontakte und für die frühe Embryonalentwicklung [46, 47]. Des Weiteren stellte sich heraus, dass der Wnt Signalweg eine wichtige Schaltstelle in der Regulation der Entwicklung von Stammzellen und im Zusammenhang mit Krebserkrankungen ist [48]. Der Name setzt sich aus dem *Wingless*-Gen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, und dem Homolog der Wirbeltiere als *integrated*, welches als Protoonkogen beschrieben wurde zusammen [49]. Ein extrazelluläres Signal stimuliert intrazelluläre Signaltransduktionswege, bei denen vor allem zwischen dem  $\beta$ -catenin abhängigen (kanonischen) und dem  $\beta$ -Catenin unabhängigen (nicht-kanonischen) Wnt Signalweg unterschieden werden muss. Bei beiden Wegen binden die extrazellulären Wnt-Liganden, als sekretierte Glykoproteine, zuerst an die N-terminale Domäne des *Frizzled*-Rezeptors (Fzd), die als Siebentransmembran-Proteine vorliegen. Die Wnt-Proteine haben eine Größe von 40 kDa und setzen sich aus mehreren konservierten Cysteinen zusammen. Sie sind durch eine einfach ungesättigte Fettsäure, welche an ein Serin gebunden ist, modifiziert, worüber die Bindung von Liganden stattfindet. Wnt Proteine sind hydrophob und häufig mit der Extrazellulärmembran assoziiert. Die Lipide auf den Wnt-Proteinen sind essentiell für die Signalübertragung und für deren Modulation und Sekretion. An der Aktivierung verschiedener Wnt Signalwege sind in erster Linie 19 Wnt-Proteine und 10 Frizzled-Proteine beteiligt [49, 50]. Je nach Kombination der Wnt-Proteine mit Fzd-Rezeptoren und in Abhängigkeit ihrer Interaktionen mit Rezeptoren auf den Zellen, wie beispielsweise LRP5/6-, Ror2 oder RYK/Derailed-Typ-Rezeptoren, wird der jeweilige Signalweg aktiviert [51].

Der Wnt Signalweg kann durch verschiedene Mechanismen reguliert werden. Man kann sekretierte und transmembranöse Inhibitoren und Aktivatoren unterscheiden

(Abb.3) [52]. Vielfach untersucht sind die extrazellulären Antagonisten, die sich in zwei Klassen unterteilen lassen. Zur ersten Klasse gehören die sFRP- (secreted-Frizzled-related protein) Familie, die WIF-1 (Wnt inhibitory facrot) und Cerberus, die direkt an die Wnt-Proteine binden, sodass diese nicht an den Rezeptor binden können. Dies führt zur Inaktivierung sowohl des kanonischen, als auch des nicht-kanonischen Wnt Signalweges. Die sFRP-Familie kann zusätzlich noch die Interaktion zwischen Wnt und Frizzled hemmen. Zur zweiten Klasse gehören Teile der Dkk- (Dickkopf) Familie, die eine Untereinheit des Wnt-Rezeptor-Komplexes binden. Dkk-1 interagiert mit den Co-Rezeptoren LRP5/6, sodass sich der LRP5/6-Wnt-Frizzled-Komplex nicht ausbilden kann. Dadurch wird der kanonische Wnt-Signalweg inhibiert, wohingegen durch Bildung des Wnt-Frizzled-Komplexes eine Aktivierung des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges weiterhin möglich ist [53].

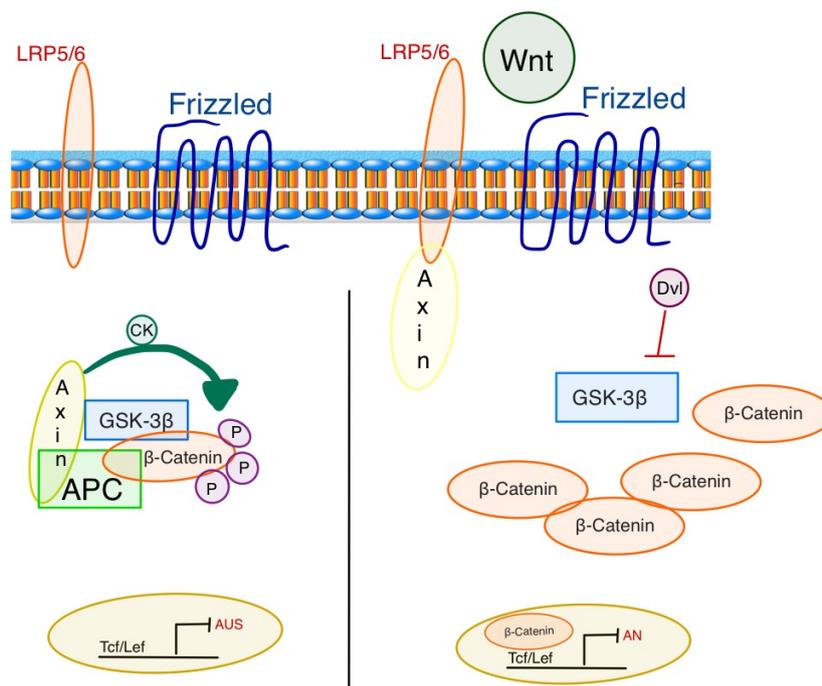


**Abbildung 3: Antagonisten des Wnt Signalweges**

Schematische Darstellung des Wnt Signalweges (modifiziert nach [53]) **A:** Durch Antagonisten des Wnt Signalweges der sFRP-Familie kann sowohl der kanonische, als auch der nicht-kanonische Signalweg gehemmt werden. **B:** Durch Antagonisten des Wnt Signalweges der Dkk-1-Familie kann der nicht-kanonische Wnt Signalweg gehemmt werden.

### 1.3.1 Der $\beta$ -Catenin abhängige Wnt Signalweg

Der  $\beta$ -Catenin abhängige Wnt Signalweg wird auch als kanonischer Signalweg bezeichnet und dient in erster Linie der Regulation des Protoonkogens  $\beta$ -Catenin und damit der Transkription Wnt-assoziiierter Gene. Im inaktiven Zustand wird  $\beta$ -Catenin durch einen Proteinkomplex, der sich aus APC, GSK3 $\beta$ , CK1 und Axin zusammensetzt, im Zytosol phosphoryliert (Abb.4). Durch Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin wird dieses inhibiert und durch Proteasomen abgebaut. Im aktiven Zustand binden die Wnt Liganden, beispielsweise Wnt 1, Wnt 3a oder Wnt 8 [53] an Frizzled, das mit dem Co-Rezeptor LRP5/6 (low-density-Protein) einen Komplex bildet. Das cytoplasmatische Phosphoprotein Dishevelled (Dvl) wird durch Bindung an die Transmembrandomäne des Frizzled aktiviert und inhibiert seinerseits den Proteinkomplex und somit die Phosphorylierung des  $\beta$ -Catenin. Dieses reichert sich im Zytosol an, wandert in den Zellkern und kann dort mit Proteinen der Tcf/LEF-Familie interagieren, um die Transkription der Wnt-Zielgene zu beeinflussen [46, 54].



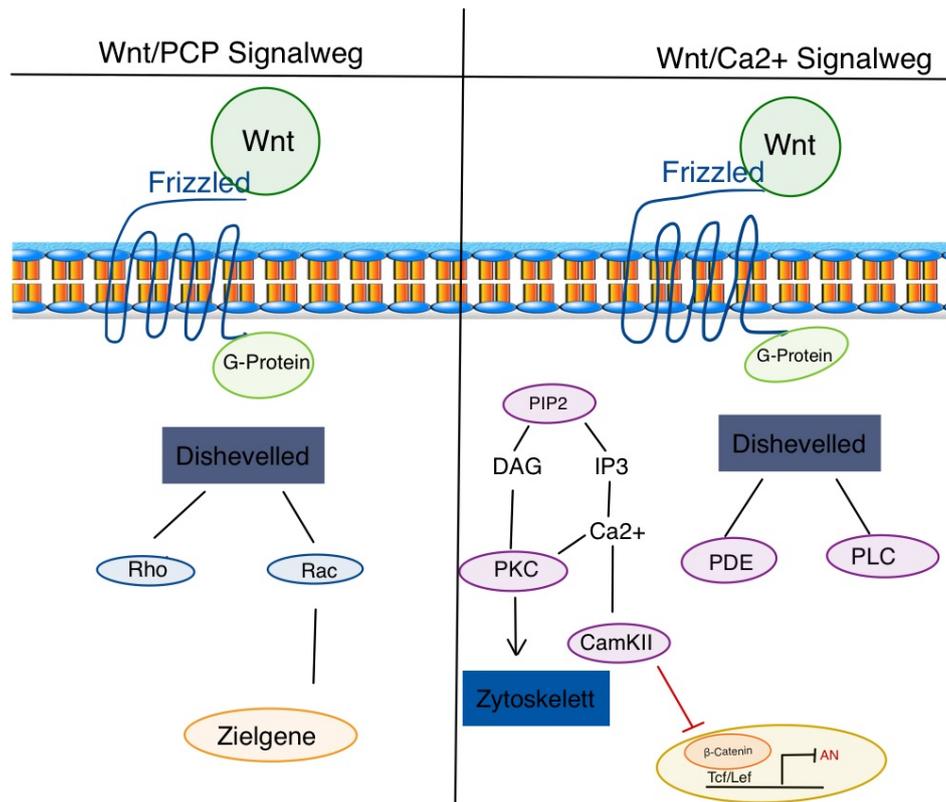
**Abbildung 4: Der  $\beta$ -Catenin abhängige Wnt Signalweg**

Schematische Darstellung des  $\beta$ -Catenin abhängigen Wnt Signalweges (modifiziert nach [46]).

**Links:** Inaktiver Wnt Signalweg durch Abwesenheit des Wnt-Liganden. **Rechts:** Die Anwesenheit des Wnt-Liganden setzt verschiedene Kaskaden in Gang, die zu Wanderung des  $\beta$ -Catenin in den Zellkern und darüber zu Aktivierung von Target-Genen führen.

### 1.3.2 $\beta$ -Catenin unabhängige Wege

Zu den  $\beta$ -Catenin unabhängigen Signalwegen gehören der Zellpolaritäts- (PCP: Planar Cell Polarity) und der Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  Signalweg (Abb. 5). Die Wnt-Liganden, beispielsweise Wnt 4, Wnt 5a oder Wnt 11 [55] binden an Frizzled-Rezeptoren, unabhängig vom Co-Rezeptor LRP5/6, sodass Rezeptortyrosinkinasen aktiviert werden und eine Aktivierung der Zielgene induzieren [56]. Vereinzelt können Wnt-Proteine sowohl den kanonischen, als auch den nicht-kanonischen Wnt Signalweg aktivieren. Im Wnt/PCP Signalweg erfolgt die Aktivierung der Dishevelled-Proteine, die kleinere Rho- und Rac-GTPasen aktivieren. Das daraus resultierende Signal führt zu Reorganisation des Zytoskeletts mit Einfluss auf die Zellpolarität und Embryogenese [57]. Im Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  abhängigen Signalweg kommt es nach Aktivierung von Wnt und Frizzled ebenfalls zur Aktivierung der Dishevelled-Proteine. Diese aktivieren gekoppelt an ein G-Protein eine Phospholipase C, die über  $\text{IP}_3$  zur Freisetzung intrazellulären Calciums führt. Das  $\text{Ca}^{2+}$  kann über Effektormoleküle, wie Calcineurin, die Calcium/Calmodulin abhängige Kinase oder die Proteinkinase C wirken. Der Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  Signalweg übernimmt eine wichtige Rolle in der Regulation embryologischer Prozesse, wie der Entwicklung der Wirbelsäule oder Gewebeausdifferenzierungen [56].



**Abbildung 5: Der  $\beta$ -Catenin unabhängige Wnt Signalweg**

Schematische Darstellung des  $\beta$ -Catenin unabhängigen Wnt Signalweges (modifiziert nach [56]) **A:** Beim Wnt/PCP Signalweg erfolgt die Aktivierung über Dishevelled-Proteine, sowie kleine Rho-und Rac-GTPasen. **B:** Der WNT/ $\text{Ca}^{2+}$  Signalweg erfolgt die Aktivierung sowohl über Dishevelled, als auch über  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige G-Proteine.

### 1.3.3 Wnt Signalwege in Mikrogliazellen

In Mikrogliazellen spielt sowohl der kanonische als auch der nicht-kanonische Wnt Signalweg eine wichtige Rolle. Beschrieben sind interzelluläre Kontakte von Mikrogliazellen, die im Rahmen immunologischer Prozesse durch den  $\beta$ -Catenin unabhängigen Weg beeinflusst werden [58]. Des Weiteren kann sowohl durch LPS-Aktivierung der Mikrogliazellen, als auch durch Aktivierung des Wnt Signalweges die inflammatorische Reaktion beeinflusst werden [59]. Nach inflammatorischer Aktivierung konnten nicht nur in Mikrogliazellen, sondern auch in anderen Bestandteilen des ZNS, z.B. in Astrozyten, immunmodulatorische Interaktionen mit dem Wnt Signalweg beobachtet werden [60]. Der Wnt Signalweg stellt sich in Mikrogliazellen als wichtige therapeutische Schnittstelle, für die Therapie von Morbus Alzheimer und Krebserkrankungen, wie dem Glioblastom, heraus [61, 62].



### 2 Zielstellung

Literaturdaten und Vorarbeiten verschiedener Arbeitsgruppen belegen immunmodulatorische Eigenschaften von Inhibitoren der enzymatischen Aktivität der APN. Sowohl in vitro als auch in verschiedenen Krankheitsmodellen der Maus in vivo (Psoriasis, EAE, Colitis ulcerosa u.a.) zeigten sich therapeutisch relevante immunsuppressive Effekte dieser Inhibitoren [7, 11]. Mechanistisch liegen diesen positiven Wirkungen eine Hemmung der Produktion und Sekretion proinflammatorischer Zytokine, die Verstärkung der Produktion und der Sekretion immunsuppressiver Zytokine, (insbesondere von TGF- $\beta$  und IL-10), sowie die Stärkung der suppressiven Aktivität von Treg-Zellen zu Grunde. Dabei scheint eine Modulation des Wnt Signalweges beteiligt zu sein [2]. Diese Effekte ließen sich sowohl im peripheren Blut als auch in Organen wie Milz, Haut oder Darm nachweisen [3, 9]. Inwieweit die Inhibitoren auch neuronale Zellen beeinflussen können, ist nicht vollständig geklärt.

Vor diesem Hintergrund ergibt sich die Zielstellung der vorliegenden Arbeit, den Einfluss verschiedener Inhibitoren der APN auf Zellen des Zentralen Nervensystems, insbesondere auf Mikrogliazellen und deren Aktivierung zu untersuchen. Dabei soll der Einfluss auf die Modulation und Expression des Wnt Signalweges gesondert berücksichtigt werden.



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Laborgeräte

Absaugsystem Vacusafe	Integra/Deutschland
Agarose-Gelkammersystem	BioRad/Deutschland
Analysewaage	Sartorius AG/Deutschland
Owl™ Semi-Dry Elektrobloetter-System	Thermo Scientific/USA
CO <sub>2</sub> - Brutschrank	MMM Medcenter GmbH/ Deutschland
Eismaschine	Manitowoc/Deutschland
Elektronische Pipettierhilfe	Thermo Scientific/USA
Feinwaage AC210S Analytic	Sartorius AG/Deutschland
Flaschen für Puffer und Lösungen	Biochrom AG/Deutschland
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr/Deutschland
Gel-Dokumentationssystem	Intas/Deutschland
Pro Blot Hybridisierungsofen 37 °C	Labnet/USA
Inkubator 37 °C	Haereus sepatech GmbH/ Deutschland
Kaltlichtquelle Vibratom	Schott KL 1500 Electronic/ Schott AG/ Deutschland
Kühlschrank (2-8 °C)	Liebherr/Deutschland
Lab dancer S40	VWR™/Deutschland
Mehrstellenmagnetrührer	Thermo Scientific/USA
Cimarec i Poly 15	
Mikroskop Primo Vert	ZEISS/Deutschland
Mikrowelle	Severin/Deutschland
Mili-Q® Referenzsystem	Millipore/Deutschland
Mini-Zentrifuge	Roth/Deutschland
NanoDrop 2000c	Thermo Scientific/USA
Fluoreszenzmikroskop	Olympus BX63/Deutschland
Objektive: UPlan FLN 4x/0,13; 10x/0,13; 20x/0,75	
Kamera: DP80	Olympus Life Science/Japan
Pipetten (100-1000 µl, 50-200 µl, 10-100 µl,	Eppendorf/Deutschland

2-20 µl, 0,5-10 µl)	
Plattenreader Infinite M200	Thermo Scientific/USA
qPCR Thermal Cycler	Bio Rad CFX96 Real time system C1000 <sup>TM</sup> /Deutschland
RT- PCR Mastercycler personal	Eppendorf/Deutschland
Schüttler 3005	GFL/Deutschland
Schüttler neoLab	neoLab/Deutschland
SDS-Page Kammersystem	analyticjena/Deutschland
Spannungsgerät Consort E443	Consort/Belgien
Consort E831	
Sterile Sicherheitsbank (Microflow Biological Safety Cabinet)	Nunc/Deutschland
Tischzentrifuge Universal 320	Hettich/Deutschland
Wasserbad Autogene II	Grant/England
Wasserbad Typ WCB	WiseCircu®/Deutschland
Vibratrom 1000S	Leica/Deutschland
Zählkammer	Neubauer/Deutschland
Zentrifuge Hereus Fresco 17	Thermo Scientific/USA
Zentrifuge Micro Star 17R	VWR <sup>TM</sup> /Deutschland

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

5 ml Spritzen	BRAUN/Deutschland
96-Well-/6-Well-/24-Well-Kulturplatten	Sarstedt/Deutschland
Adhäsive PCR-Folien	Biozym/Deutschland
Deckgläser	R. Langenbrinck GmbH/ Deutschland
Falconröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt/Deutschland
Fettstift (Liquid Blocker)	PLANO/Japan
Filterpipetten - Biosphere® Filter Tip (1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl)	Biozym/Deutschland
Handschuhe Peha-Soft	Hartmann/Deutschland
Küvetten (Glas/Plastik)	Wheaton/USA
Mikrotiterplatte 96-Well	Greiner/Deutschland
Nitrocellulose-Membranen	GE Healthcare/Deutschland
Objektträger Super Frost ®	R. Langenbrinck GmbH/ Deutschland
Pasteur-Pipetten Glas (150 mm, 230 mm)	VWR™/Deutschland
PCR 96-Well-Platten	Biozym/Deutschland
Pinsel	TOPDENT/Deutschland
Pipettenspitzen (1000 µl, 200 µl, 100 µl, 10 µl)	Sarstedt/Deutschland
Präparierbesteck	Vedena Braack/Deutschland
Rasierklinge (Vibratom)	Wilkinson Sword/Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt/Deutschland
Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Biozym/Deutschland
Röntgenfilm	CEA/Deutschland
Röntgenfilmkassetten	Ortho-Medium/Deutschland
Rotibabo® Faltenfilter	Roth/Deutschland
Sekundenkleber	UHU/Deutschland
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt/Deutschland
T75 Zellkulturflaschen	Greiner/Deutschland
Whatman-Papier (dick, dünn)	Sigma-Aldrich/USA

Zellschaber	Sarstedt/Deutschland
Zellsiebe 70 µm	BD Falcon™/Deutschland

### 3.1.3 Reagenzien

#### 3.1.3.1 Allgemeine Reagenzien

100bp-DNA Ladder 50 µg	Roth/Deutschland
Page Ruler™ Proteinmarker	ThermoFisher/USA
β-Mercaptoethanol	Gibco/Deutschland
p-(Hydroxy) Coumarinsäure	Roth/Deutschland
4-(2-Hydroxyethyl) piperazine -1-ethansulfonic acid (HEPES)	Sigma-Aldrich/Deutschland
Agarose	Biozym/Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS) 10 %	Roth/Deutschland
Bromphenolblau	Rheinchemie K.H. Kallies/ Deutschland
Ciprofloxacin 200 mg/100 ml	FreseniusKabi/Deutschland
Complete Mini Tabletten	Roche/Schweiz
Coomassie Brilliant Blue 250	Fluka/Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma Life Science/ Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth/Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Roth/Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAN/Deutschland
Dodecyl-β-Maltosid	Applichem/USA
Entwickler	Roth/Deutschland
Essigsäure	Roth/Deutschland
Ethanol	Roth/Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth/Deutschland
Fixierer	Roth/Deutschland
Glucose 40 %	BRAUN/Deutschland
Glutamin 200 mM	PAN/Deutschland
Glycin	Roth/Deutschland
Hyper HRP Substrat	TAKaRa/Deutschland

Isopropanol	Roth/Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Roth/Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth/Deutschland
Luminol	Sigma Aldrich/USA
Methanol	Roth/Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth/Deutschland
Natriumcitrat (NaN <sub>3</sub> )	Merck/USA
Natriumpyruvat	Sigma Aldrich/USA
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	PAN/Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAN/Deutschland
Paraformaldehyd 4% (PFA)	Fluka/Deutschland
Phosphorsäure (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth/Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich/USA
Ponceau S	Roth/Deutschland
Red Safe™	iNtRon Biotechnology/ Deutschland
Anodenpuffer (Roti A)	Roth/Deutschland
Roti-Block	Roth/Deutschland
Kathodenpudder (Roti B)	Roth/Deutschland
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640)	PAN/Deutschland
Saccharose	Roth/Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth/Deutschland
Sodium-Pyruvat 100 mM	GE Healthcare/Deutschland
SuperSignal™ West Dura Substrat	ThermoFisher/USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth/Deutschland
Trichloressigsäure (TCA)	Merck/USA
Tris	Roth/Deutschland
Tris-HCl	Roth/Deutschland
Triton® X-100 pure	SERVA Electrophoresis GmbH/Deutschland
Tween 20	Roth/Deutschland
Trypanblau	Gibco/Deutschland
Trypsin/ EDTA (10x)	Gibco/Deutschland

WST-1	Sigma-Aldrich/USA
Zinkchlorid (ZnCl <sub>2</sub> )	Roth/Deutschland
Zitronensäure	Roth/Deutschland

### 3.1.3.2 Puffer und Lösungen

**Tabelle 1 : Allgemeine Puffer und Lösungen**

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung)	136,89 mM NaCl 2,68 mM KCl 10,11 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 1,76 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> gelöst in A. deion. (pH 7,4)
TBS (10-fach)	200 mM Tris 1,38 M NaCl gelöst in 1 l A. deion. (pH 7,6)
TAE-Puffer (50-fach)	2 M Tris 0,95 M Essigsäure 0,05 M EDTA gelöst in A. deion. (pH 8,0)

**Tabelle 2: Puffer und Lösungen für die Gelelektrophorese**

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Agarose	1,5 % Agarose 1,55 µl RedSafe (1:10) auf 30 ml Agarose gelöst in TAE-Puffer
DNA-Ladepuffer (10-fach)	0,2 M EDTA 25 % Saccharose 0,25 % Bromphenolblau gelöst in A. deion. (pH 8,0)

**Tabelle 3: Puffer für die Bestimmung der Enzymaktivität**

Puffer	Zusammensetzung
HEPES	50 mM HEPES 100 mM NaCl 10 mM ZnCl <sub>2</sub> 1 % DMSO gelöst in A. deion. (pH 6,8)

**Tabelle 4: Puffer und Lösungen für die Isolation von Gesamtprotein**

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung
Maltosid-Puffer	20 mM Tris-HCl 50 µM EDTA 137 mM NaCl 1% Dodecyl-β-Maltosid 0,2 mM PMSF gelöst in A. deion. (pH 7,4)
Inhibitorcocktail	2 Tabletten Complete mini gelöst in 1 ml A. deion.
Aufschlusspuffer	2 ml Maltosid-Puffer 0,1 ml Inhibitorcocktail 4 µl/ ml PMSF

**Tabelle 5: Lösungen zur Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Lösungen	Zusammensetzung
BSA-Stammlösung	0,2 mg/ ml BSA gelöst in A. deion.
Bradford-Reagenz	0,01 % Coomassie Brilliant Blue G-250 4,7 % Ethanol 8,5 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> gelöst in A. deion.

Tabelle 6: Lösungen und Puffer für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung
Ammoniumpersulfat (10-fach)	2,3 M Ammoniumpersulfat gelöst in A. deion.
SDS-Laufpuffer (10-fach)	248 mM Tris 1,92 M Glycin 1% SDS gelöst in A. deion. (pH 8,3)
Probenpuffer (4-fach)	0,13 M Tris HCl (pH 6,8) 0,16 M SDS 20,8 % Glycerol 10,4 % $\beta$ -Mercaptoethanol 1,5 $\mu$ M Bromphenolblau (0,1 %) gelöst in A. deion.
Sammelpuffer	0,5 M Tris HCl (pH 6,8) gelöst in A. deion.
Trenngelpuffer	1,5 M Tris HCl (pH 8,8)

Tabelle 7: Lösungen und Puffer für die Western Blot Analyse

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung
Anodenpuffer	10 % Roti A (10-fach) 20 % Methanol gelöst in A. deion.
Kathodenpuffer	10 % Roti K (10-fach) 20 % Methanol gelöst in A. deion.
TBS-Tween 20	0,001 % Tween 20 gelöst in TBS
Blockierungslösung	10 % Roti®-Block (10-fach) gelöst in A. deion.
Antikörperlösung	5 % BSA 0,03 % NaN <sub>3</sub> gelöst in TBS-Tween 20

Elektrochemilumineszenzsubstrat (ECL)	10 ml Lösung A 1 ml Lösung B 3 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 %
Lösung A	0,025 % (w/v) Luminol gelöst in 0,1 M Tris-HCl (pH 8,6)
Lösung B	0,11 % (w/v) para-Hydroxy- coumarinsäure gelöst in DMSO

**Tabelle 8: Lösung für die Ponceau-S-Färbung von Nitrocellulose-Membranen**

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Ponceaurot	0,2 % (w/v) Ponceau S 3 % (w/v) Trichloressigsäure gelöst in A. deion.

**Tabelle 9: Lösungen und Puffer für die Herstellung von histologischen Schnittpräparaten**

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung
Stammlösung A	0,1 M Zitronensäure gelöst in A. deion.
Stammlösung B	0,08 M Natriumcitrat gelöst in A. deion.
Mikrowellenpuffer	9 ml Stammlösung A 41 ml Stammlösung B 450 ml A. bidest.
Permeabilisierungslösung	3 % Ziegen-Serum 0,3 % Triton (100-fach) gelöst in PBS
Blockierungslösung	3 % Ziegen-Serum 0,1 % Triton (100-fach) gelöst in PBS
Moviol	10 g Moviol 20 ml Glycerol gelöst in PBS

**Tabelle 10: Nährmedien zur Kultivierung verschiedener Zellkulturen**

Medium	Zusammensetzung
DMEM (5 mM Glukosekonzentration)	500 ml DMEM 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin
DMEM (25 mM Glukosekonzentration)	500 ml DMEM 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin 20 mM Glukose
RPMI 1640	500 ml RPMI 1640 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin 4 mM Glutamin

DMEM für Splenozyten	500 ml DMEM 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin 0,01 % $\beta$ -Mercaptoethanol 1 % Natriumpyruvat 5 $\mu$ l/ ml Ciprobay
----------------------	---

### 3.1.3.3 Antikörper und Reagenzien für Zellkulturexperimente

**Tabelle 11: Inhibitor und Stimulans für den Zellkulturansatz**

<b>APN-Inhibitoren</b>	<b>Hersteller</b>
IP10.C9 (10 mM)	Institut für Medizintechnologie Magdeburg GmbH
A1.002 (10 mM)	
<b>Stimulans</b>	
E. coli 0111: B4 LPS (1 mg/ mL)	Sigma-Aldrich/Deutschland
<b>Anti-Maus CD13 Antikörper</b>	
Antikörper Klon MY7 (1 mg/mL)	Beckmann Coulter/Deutschland
<b>IgG-Antikörper</b>	
Cdc25 (100 $\mu$ g/ 172 $\mu$ l)	Update/USA

### 3.1.4 Seren

**Tabelle 12: Verwendete Seren**

<b>Serum</b>	<b>Hersteller</b>
Normales Ziegenserum (normal goat serum)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, INC/Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco/Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth/Deutschland

**3.1.5 Versuchstiere**

Alle Tiere wurden in der Zentralen Versuchstierkunde in Greifswald gehalten. Die C57BL/6J –Mäuse dienten als Wildtyp-Mäuse. KO = Knockout, WT = Wildtyp. Der CD13 Knockout wurde durch Linda H. Shapiro und weitere, Center for Vascular Biology (CVB); University of Connecticut Health Center; USA entwickelt [63].

**Tabelle 13: Verwendete Versuchstiere für die Immunhistochemie**

<b>Versuchstier</b>	<b>Haltung/Herkunft</b>
C57BL/6N 4 geb.15.11.17; perf. 23.2.18	Zur Verfügung gestellt vom Institut der Anatomie und Zellbiologie aus der Arbeitsgruppe von Prof. von Bohlen und Halbach
C57BL/6N 3251 geb. 24.8.17; perf.26.2.18	
C57BL/6N 3436 geb. 1.1.18; perf. 17.7.18	
CD13 KO 2471 geb. 15.01.2018 perf. 19.04.2018	Zentrale Versuchstierkunde Greifswald; Deutschland
CD13 KO 2478 geb. 16.01.2018; perf. 19.04.2018	
C57BL/6J 2484 geb. 17.01.2018; perf. 19.04.2018	Zentrale Versuchstierkunde Greifswald; Deutschland
C57Bl6J 2485 geb. 17.01.2018 geb. 17.01.2018; perf. 19.04.2018	

**Tabelle 14: Verwendete Versuchstiere für die Splenozytenisolation**

CD13 KO 2324 geb. 23.11.2017	Zentrale Versuchstierkunde Greifswald; Deutschland
CD13 KO 2325 geb. 23.11.2017	
CD13 KO 2327 geb. 23.11.2017	
CD13 KO 2329 geb. 23.11.2017	
C57Bl6J 2333 geb.25.11.2017	Zentrale Versuchstierkunde Greifswald; Deutschland
C57Bl6J 2334 geb. 25.11.2017	
C57Bl6J 2338 geb. 27.11.2017	
C57Bl6J 2349 geb. 27.11.2017	

### 3.1.6 Antikörper für die Immunhistochemie

Tabelle 15: Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie

Primärantikörper	Firma
Anti-Ratte-Frizzled 2 Antikörper	ReliaTech GmbH/Deutschland
Anti-Kaninchen-Wnt 10b Antikörper	Abcam/England
Anti-Maus-Iba 1 Antikörper	Thermo Fisher/USA
Anti-Kaninchen-Iba 1 Antikörper	Wako Chemicals/USA

Sekundärantikörper	Firma
Anti-Kaninchen-Cy3	Dianova/Deutschland
Anti-Ratte-Cy3	Dianova/Deutschland
Anti-Kaninchen-488	Dianova/Deutschland
Anti-Maus-488	Dianova/Deutschland

### 3.1.7 Antikörper für die Western Blot Analyse

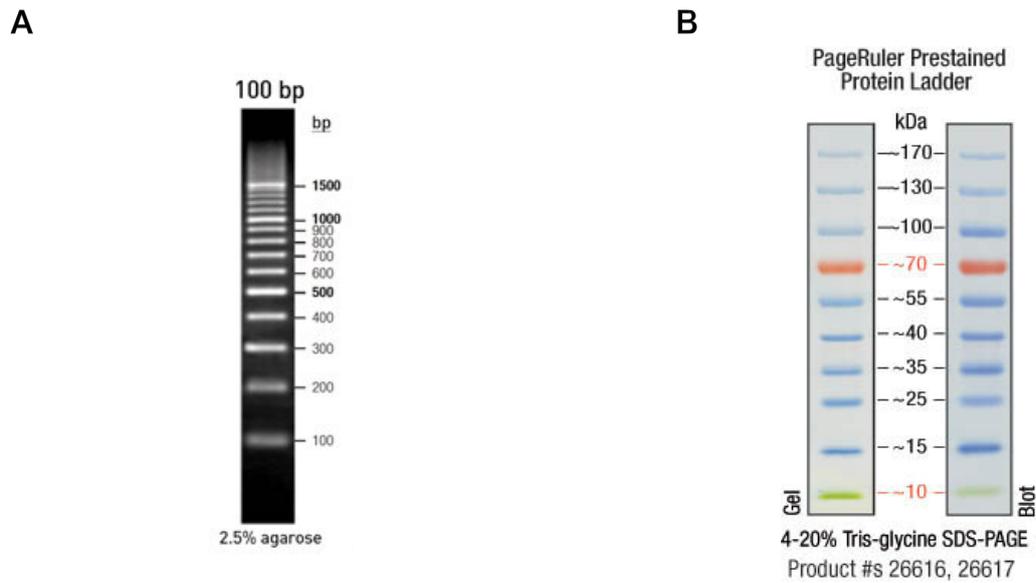
Tabelle 16: Primärantikörper

Primärantikörper	Firma
Anti-CD13-Antikörper	Abcam/England
Anti-phospho-GSK3 $\beta$	Cell signaling/USA
Anti- $\alpha$ -Tubulin	Abcam/England
Anti-GAPDH	Cell signaling/USA

Tabelle 17: Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Firma
Anti-Kaninchen-HRP-linked-Antikörper	Cell Signaling/Deutschland
Anti-Maus-HRP-linked-Antikörper	Cell Signaling/Deutschland

### 3.1.8 Größenstandards für die Elektrophorese



**Abbildung 6: Größenstandards für die Elektrophorese**

**A:** 100-Basenpaarmarker DNA-Marker für die Agarose-Gelelektrophorese (Thermofisher) [64]

**B:** Proteinmarker für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Thermofisher) [65]

### 3.1.9 Primer für RT-qPCR

**Tabelle 18: Verwendete Primer für die RT-qPCR. Hersteller: Invitrogen/Deutschland**

US: Vorwärtsprimer; DS: Rückwärtsprimer; APN: Aminopeptidase N; DVL: Dishevelled-Protein; Fzd: Frizzled-Protein; IL: Interleukin; LRP: Low-density Lipoprotein Receptor-Related-Protein; PSA: Puromycin sensitive Aminopeptidase; Rnf: Ring Finger Protein; TCF: T-Zell-Faktor TNF $\alpha$ : Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ; Wnt: Wingless-Gen; Bp: Basenpaare

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur (°C)	Größe (Bp)
m-APNE7-US	CGT TTT GAC AGC ATC ACC TAC AGC	59,0-65,0	318
m-APNE10-DS	GGT AAC GTT GGA CTT GGA ATC CAG		
m-Dvl1-US	GAC AAT GCC AAG TTG CCC TG	55,0-64,5	410
m-Dvl1-DS	CGG CTC GTA TTG TCC TCC TC		
m-Dvl2-US	AGT AAC GAG CGT GGT GAT GG	55,0-64,5	338
m-Dvl2-DS	GAT GAG GAG CCA GGG TAA GC		

m-Dvl3-US	AGA TCT CGG ACG ACA ATG CC	61,4	309
m-Dvl3-DS	TGG TTC CAT TGA GTC GGG C		
m-Fzd1-US	CAT CGT CAT CGC CTG CTA CT	64,5	292
m-Fzd1-DS	GGT AGT CTC CCC CTG TTT GC		
m-Fzd2-US	GCA CCA TCA TGA AGC ACG AC	61,0-65,0	187
m-Fzd2-DS	GGT AGT CTC CCC CTG TTT GC		
m-Fzd4-US	TGA CCC TAG CAG TCC ATC CC	59,0-65,0	399
m-Fzd4-DS	CAC GTT GTA GCC GAGA GTT CT		
m-Fzd5-US	GTG ATG GAC ACC CCC TTA CC	59,0-65,0	289
m-Fzd5-DS	GGC TCA GGC TTA ACT CTC CC		
m-Fzd6-US	GAG CGA CCA CAA ATC ATG GC	59,0-65,0	398
m-Fzd6-DS	GGA AGC TGA GTG AAC AGG CA		
m-Fzd7-US	AGG GTG ATA CCG CTC TGT CT	61,4	310
m-Fzd7-DS	ACT GTA TCT CCC ACT CGC CT		
m-Fzd8-US	CCT TCC CAG TGT TGA CTG CT	63,3	251
m-Fzd8-DS	CCT TGG ATG AAG TCT GCG GT		
m-Fzd9-US	GGG CAT TGG CTA CAA CCT GA	64,6	331
m-Fzd9-DS	GTT CTC GGG TGC CTC T'CAT AC		
m-IL-1a-US	AGG GAG TCA ACT CAT TGG CG	63,3-65,0	289
m-IL-1a-DS	CTT CCC GTT GCT TGA CGT TG		
m-IL-1b-US	GCC ACC TTT TGA CAG TGA TGA G	61,4-65,0	212
m-IL-1b-DS	ACG GGA AAG ACA CAG GTA GC		
m-IL-6-US	CTG GAG TCA CAG AAG GAG TGG	55,0-64,0	155
m-IL-6-DS	CTG ACC ACA GTG AGG AAT GTC		
m-IL-10-US	CAC TAC CAA AGC CAC AAG GC	61,4	339
m-IL-10-DS	GCC TGG GGC ATC ACT TCT AC		
m-LRP5-US	GAC CCT GGA AGA TGC CAA CA	63,3-65	347
m-LRP5-DS	GAT CAG GGG AGC AGG TAG GA		
m-LRP6-US	TGG ACA CTG AAC TTG CCT CC	57-64,5	196
m-LRP6-DS	GAA ACA AGC CAC ACC GTT CC		
m-PSA-US	ATC CGT GAC CTT TCT CTG CC	61,0-65,0	166
m-PSA-DS	CCA GGT TAC AGC TCA GGT CG		
m-RNF-43-US	GTG ATG CTG CGA AGC TGA TG	57,0-65,0	192
m-RNF-43-DS	GAT CCG GTC TGC TAT GGT GG		

m-TNF $\alpha$ -US	CGG GCA GGT CTA CTT TGG AG	61,4-65,0	166
m-TNF $\alpha$ -DS	ACC CTG AGC CAT AAT CCC CT		
m-TCF7-US	CTA TCC CAG GTT CAC CCA CC	61,4-63,3	457
m-TCF7-DS	TTT TCC TCC TGT GGT GGA TTC		
m-Wnt1-US	CAA CAG TAG TGG CCG ATG GT	64,5	278
m-Wnt1-DS	AGC CTC GGT TGA CGA TCT TG		
m-Wnt2-US	ACA CGG AGT CTG ACC TGA TG	59,65	280
m-Wnt2-DS	GGA ACT GGT GTT GGC ACT CT		
m-Wnt2b-US	CAG GAG TGG TCC ACG CTA TC	57,0-64,0	272
m-Wnt2b-DS	CTT GCA CTC CAG CTT CAG GA		
m-Wnt3a-US	TCT GCC ATG AAC CGT CAC AA	63,3	246
m-Wnt3a-DS	GTA CGT GTA ACG TGG CCT CA		
m-Wnt4-US	GAA TCA ACT GCC TCT CGG CT	65°C	213 Bp
m-Wnt4-DS	AGA GGA GAG TTT GTG CAG GC		
m-Wnt5a-US	AAA GGG AAC GAA TCC ACG CT	60,4-64,5	157
m-Wnt5a-DS	CAG CAC GTC TTG AGG CTA CA		
m-Wnt8a-US	CHH TGG AAT TGT CCT GAG CA	61,4-63,3	155
m-Wnt8a-DS	CCG CAG TTT TCC AAG TCA CC		
m-Wnt9b-US	TCT GCT CAA CGA GAC CCC TA	60,4-64,5	183
m-Wnt9b-DS	TCT TCC AGG CAT TTG GAC CC		
m-Wnt10b-US	TGT GGA TCC TGC ACC TGA AC	64,5	152
m-Wnt10b-DS	GCT TAG AGC CCG ACT GAA CA		
m-Wnt11-US	GCC CGT TTC CCT GTA TGT GA	59,0-64,5	324
m-Wnt11-DS	ACA TCA GTA GCC ACA AGC CC		

### 3.1.10 APN-Enzymaktivität

**Tabelle 19: Zusätze für die Messung der Enzymaktivität**

<b>Substrat</b>	<b>Hersteller</b>
Ala-pNA	Bachem/Schweiz
<b>Inhibitor</b>	<b>Hersteller</b>
RB3014 (1 $\mu$ M)	Zur Verfügung gestellt von Roques BP [34]

### 3.1.11 Kits

**Tabelle 20: Verwendete Kits**

innuPREP RNA Mini Kit	analyticjena/Deutschland
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific/USA
SensiMix <sup>TM</sup> SYBR Hi-ROX	Bioline/Deutschland

### 3.1.12 Software

**Tabelle 21: Verwendetet Softwares**

Biorad CFX-Manager	Biorad/Deutschland
Biostep Imaging Software	Biostep® GmbH/Deutschland
CellSens Imaging Software	Olympus/Deutschland
Endnote X8/X9 2018	Clarivate Analytics/USA
Excel 2013	Microsoft/USA
I control 1.12	Tecan/Österreich
Image J 2016	USA
Intas GDS	Intas/Deutschland
Nanodrop 2000	Thermo Scientific/USA
Power Point 2013	Microsoft/USA
Prism GraphPad 6	GraphPad Software/Deutschland

---

### 3.2 Methoden

#### 3.2.1 Auftauen von BV2 Mikrogliazellen

Die BV2 Mikrogliazellen wurden von Frau Prof. Krüger aus dem Institut für Biochemie der Charité Universitätsmedizin Berlin zur Verfügung gestellt. Die Kryokonserven wurden in Flüssigstickstoff gelagert. Für die Kultivierung wurde ein Aliquot der Kryokonserven mit  $4 \times 10^6$  Zellen für 2 Minuten in einem Wasserbad mit 37°C aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml Kulturmedium resuspendiert und in ein steriles 15 ml-Reaktionsgefäß mit 8 ml Kulturmedium überführt. Die Zellsuspension wurde 5 Minuten bei 1500 x g bei 20 °C zentrifugiert. Die Kultivierung erfolgte zuerst in DMEM mit einer 5 mM Glukosekonzentration. In einer T75-Zellkulturflasche wurden 20 ml des Nährmediums vorgelegt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das entstandene Zellpellet in 10 ml Nährmedium vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in die vorbereitete T75-Zellkulturflasche überführt und in einem Brutschrank mit 37 °C und unter 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert.

#### 3.2.2 Kultivierung von BV2 Mikrogliazellen

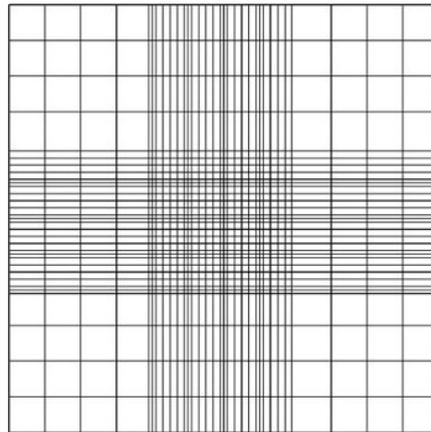
Die BV2 Mikrogliazellen wurden unter verschiedenen Kulturbedingungen kultiviert. Dazu wurden die BV2 Zellen bei vollständiger Konfluenz passagiert. Nach Entfernen des Nährmediums erfolgte ein Waschschriff mit 10 ml PBS, um das gesamte Medium vom Zellrasen zu entfernen und tote Zellen zu eliminieren. Im Anschluss wurde dieser mit 3 ml Trypsin/EDTA bedeckt und für 3 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, sodass sich die Zellen vollständig vom Boden der Zellkulturflasche ablösen konnten. Durch das Resuspendieren der Zellen mit 12 ml Waschmedium wurde die Trypsinierung beendet. Die Zellsuspension wurde in ein steriles 15 ml Falcon überführt und bei 1500 x g für 5 Minuten bei 20 °C zentrifugiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte, wie in 3.2.3 beschrieben, mit der Neubauer Zählkammer. Nachdem der Überstand abgenommen wurde, wurde das Zellpellet in 1 ml Nährmedium pro  $1 \times 10^6$  Zellen resuspendiert. Es wurden drei T75-Zellkulturflaschen mit je 29 ml der in Tabelle 22 dargestellten Kulturmedien vorbereitet. Es erfolgte die Überführung von  $1 \times 10^6$  Zellen in die Zellkulturflaschen und die Inkubation bei 37 °C unter 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.

**Tabelle 22: Kulturbedingungen der BV2 Mikrogliazellen**

1. T75 - Zellkulturflasche	2. T75 - Zellkulturflasche	3. T75 - Zellkulturflasche
DMEM mit 5 mM Glukose	RPMI 1640 mit 11 mM Glukose	DMEM mit 25 mM Glukose

### 3.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit einem speziellen Objektträger mit zwei eingravierten Zählnetzen, der Neubauer Zählkammer. Zwischen die Kammer und ein Deckglas wurden 8 µl der Zellsuspension gegeben. Unter dem Mikroskop wurde ein Raster mit vier Quadranten aus je 4 x 4 Quadranten sichtbar. Die Zellen innerhalb der 4 Quadranten wurden gezählt und mittels der folgenden Rechnung die Zellzahl bestimmt:



**Abbildung 7: Neubauer Zählkammer**

Darstellung einer Neubauer Zählkammer [66]

Zellzahl = gezählte Zellen in allen 4 Quadranten /  $4 \times 10.000 \times \text{ml Medium}$  in denen die Zellen aufgenommen wurden

### 3.2.4 Kultivierung der BV2 Mikrogliazellen mit LPS und pharmakologischen Inhibitoren der APN

Die BV2 Mikrogliazellen wurden in 6-Well-Platten für 24 h bei 37 °C unter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Dafür wurden je Well 0,4 x 10<sup>6</sup> Zellen in 3 ml Nährmedium resuspendiert. Die Zusätze LPS (1 µM) und die APN-Inhibitoren IP10.C9 (1 µM) und A1.002 (1 µM) wurden wie in der folgenden Tabelle dargestellt hinzugegeben:

**Tabelle 23: Kultivierung der BV2 Mikrogliazellen mit LPS, IP10.C9 und A1.002**

6-Well-Platte	1	2	3
A	Kontrolle	IP10.C9	A1.002
B	LPS	LPS + IP10.C9	LPS + A1.002

In einem weiteren Ansatz wurden  $0,4 \times 10^6$  Zellen je Well in einer 6-Well Platte über Nacht bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden IP10.C9 (1 µM), der Anti-CD13-Antikörper My7 (10 µg/µl) und Anti-Cdc25-Antikörper (10 µg/µl) hinzugegeben. Der Antikörper gegen Cdc25 diente als IgG-Isotypkontrolle für den Anti-CD13-Antikörper My7. Nach 30 Minuten wurde LPS (1 µM) für 3 h hinzugegeben.

**Tabelle 24: Kultivierung der BV2 Mikrogliazellen mit LPS, IP10.C9, My7 und Cdc25**

6-Well-Platte	1	2	3
A	Kontrolle	LPS	Anti CD13-Ak My 7 + LPS
B	Anti-CD13-Ak My 7 + IP10.C9 + LPS	Anti-Cdc25 Ak + LPS	-

Für Expressionsanalysen verschiedener Gene wurden RNA-Präparationen, cDNA-Synthesen und RT-qPCR durchgeführt.

### 3.2.5 RNA-Präparation aus BV2 Mikrogliazellen

Die RNA wurde mithilfe des innuPrep RNA mini Kits (Fa. analytic Jena) isoliert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 2 Minuten mit 400 µl des Lysepuffers inkubiert. Anschließend wurde das Zelllysat mit einem Zellschaber vom Plattenboden gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die weitere RNA-Präparation erfolgte nach den Vorgaben des innuPrep RNA mini Kits.

### 3.2.6 Bestimmung der RNA-Konzentration

Mit dem NanoDrop 2000 Mikrovolumen-Spektralphotometer konnte die RNA-Konzentration und die Reinheit der RNA durch Absorptionsmessung quantifiziert werden. Dazu wurden 1,5 µl der RNA-Probe auf den Probenträger aufgetragen und die Messung der Absorption durch die Software gestartet. Mithilfe der Absorptionsmessungen konnte die RNA-Konzentration durch die Software berechnet werden. Es wurde die Absorption bei den Wellenlängen 260 und 280 nm gemessen. Die reine RNA-Konzentration errechnete sich aus der Differenz zwischen der Verunreinigung und dem Proteinanteil. Dabei sollten die Werte zwischen 1,8 und 2,2 (260/280 nm) liegen. Anschließend wurden die isolierten RNA-Proben bei -20 °C gelagert [67].

### 3.2.7 Synthese der cDNA aus mRNA

Zur Quantifizierung der mRNA-Mengen müssen diese mithilfe der reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dazu wurde das RevertAid cDNA Synthese Kit verwendet. Die reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, benötigt einen Primer um an die RNA binden zu können [68]. Dafür wurden zu 1 µg RNA 1,5 µl des Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer hinzugefügt und mit A. deion. auf 18 µl aufgefüllt und für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert. Für die Synthese wurden zu der Probe 6 µl Reaktionspuffer, 6 µl dNTPs, 1,5 µl Reverse Transkriptase und 1,5 µl des RNase Inhibitors pipettiert. Durch die RNA-abhängige DNA-Polymerase wurde der komplementäre DNA-Strang zum RNA-Strang synthetisiert. Die cDNA wurde anschließend für die Genexpressionsanalyse verwendet.

**Tabelle 25: Programm zur Synthese von cDNA**

25 °C	10 Min
42 °C	60 Min
72 °C	10 Min
10 °C	∞

### 3.2.8 Die quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion

Die quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR) dient der Vervielfältigung von DNA-Molekülen. Die RT-qPCR ermöglicht durch Fluoreszenzmessungen die quantitative Detektion der Nukleinsäuren in einer Probe

während der Reaktion. Der Ablauf einer RT-qPCR umfasst die zyklische Vervielfältigung spezifischer cDNA-Abschnitte nach Denaturierung der DNA bei 95°C. Daran schließt sich die Phase der DNA-Primer-Hybridisierung an, dessen Annealing-Temperatur primerspezifisch zwischen 55-65°C liegt. Um die Spezifität der Primer zu gewährleisten, wurde für jeden Primer eine Optimierung durchgeführt, bei der die Annealing-Temperatur ermittelt wurde. Abschließend erfolgt die Elongation der Primer-Oligonukleotide durch eine DNA-Polymerase bei 72°C. Während der Elongation erfolgt in jedem Zyklus eine Fluoreszenzmessung, wodurch die Quantifizierung der vervielfältigten DNA ermöglicht wird [69]. Als Farbstoff wurde SYBR®-Green I verwendet, welcher die doppelsträngige DNA interkaliert, wodurch sich ein Farbstoff-DNA-Komplex bildet. Dieses Signal kann gemessen werden und korreliert mit dem Gehalt doppelsträngiger DNA. Bei der Fluoreszenzmarkierung werden alle enthaltenen doppelsträngigen DNA-Produkte markiert [70]. Um eine Verfälschung des Fluoreszenzsignals durch unspezifische Produkte auszuschließen und sicherzustellen, ob ein oder mehrere Produkte gebildet wurden, erfolgte eine Schmelztemperaturbestimmung der DNA-Doppelstrang-Produkte. Diese variieren zwischen den DNA-Doppelstrang-Produkten entsprechend ihrer Länge und der Basenzusammensetzung. Um ein Maß für die in der Probe enthaltenen cDNA-Menge zu erhalten, wurde der Cq-Wert (Cycle quantification value) verwendet. Der Cq-Wert gibt den Zyklus an bei dem die Amplifikationskurve die Threshold-Linie, die den Start der exponentiellen Amplifikation markiert, schneidet. Je mehr cDNA-Kopien in einer Probe vorliegen, desto eher bekommt man ein signifikantes Fluoreszenzsignal und desto niedriger ist der Cq-Wert [69]. Der Reaktionsansatz (Prämix) für eine RT-qPCR setzt sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

SensiMix®	10 µl
US-DS-Primer-Mix (5 µM)	1 µl
A. deion.	8 µl
cDNA	1 µl

19 µl Prämix wurden in jedes Well der 96-Well Platte pipettiert. Abschließend wurde 1 µl der cDNA hinzugefügt. Vor der Amplifikation (Tab. 26) im Thermocycler wurde die Platte kurz bei 500 x g zentrifugiert.

Tabelle 26: RT-qPCR – Amplifikation im Thermocycler

	Aktivierung der Polymerase	10 min	95°C
44 Zyklen	Denaturierung	10 sec	95 °C
	Primerannealing	15 sec	55-65°C (primerspezifisch)
	Elongation	20 sec	72 °C
	→ Fluoreszenzaufnahme		
	Denaturierung	10 sec	95 °C
	Schmelzkurve	0,5 °C/ 5 sec	65°C auf 95°C

Alle Proben wurden in Doppelbestimmung analysiert. Einer zusätzlichen Probe wurde anstelle der cDNA Wasser hinzugefügt. Dies diente als Kontrolle, um Verfälschungen der RT-qPCR-Ergebnisse durch Verunreinigungen oder Fremd-DNA im Prämix auszuschließen. Grundsätzlich wurde die Expression der Zielgene immer in Relation zu der des Housekeeping-Gens PSA bestimmt, wodurch Schwankungen in der Menge der verwendeten cDNA ausgeglichen werden sollten.

### 3.2.8.1 Auswertung mit der delta-delta-C<sub>q</sub>-Methode

Die relative Quantifizierung der RT-qPCR erfolgte mithilfe der  $\Delta\Delta\text{-C}_q$ -Methode. So kann eine Aussage über konditionsabhängige Expressionsveränderungen einzelner Gene nach Normalisierung getroffen werden. Die Expression des Zielgens wurde mit der Expression eines Housekeeping-Gens (PSA) normiert, um Unterschiede die durch die reverse Transkription entstanden sind, auszugleichen [71]. Die Berechnung der relativen Veränderung der Genexpression wird am Beispiel der IL-6-Bestimmung dargestellt:

$$1. \text{ Kontrolle: } \Delta\text{C}_q = \text{C}_q (\text{IL-6}) - \text{C}_q (\text{PSA})$$

$$\text{Probe + Inhibitor: } \Delta\text{C}_q = \text{C}_q (\text{IL-6}) - \text{C}_q (\text{PSA})$$

$$2. \Delta\Delta\text{C}_q = \Delta\text{C}_q(\text{Probe}) - \Delta\text{C}_q (\text{Kontrolle})$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{C}_q}$$

(Ratio entspricht der n-fachen Expression)

Diese Werte können direkt miteinander verglichen werden, sodass eine Aussage über die Unterschiede in der Genexpression unter verschiedenen Konditionen getroffen werden kann [72].

### 3.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Produktkontrolle diente die Auftrennung doppelsträngiger DNA-Fragmente nach ihrer Größe mittels Agarose-Gelelektrophorese. Durch die parallele Auftragung des DNA-Standards (Abbildung 6 A) konnte die Basenlänge der DNA-Fragmente ermittelt werden. Es wurde 1,5 %ige Agaroselösung, erhitzt und 3  $\mu$ l (1:10) RedSafe® hinzugegeben. RedSafe®, ein unter UV-Licht fluoreszierender Farbstoff, interkaliert mit der DNA, wodurch die Auftrennung sichtbar gemacht werden kann [73]. Die flüssige Agarose wurde in das Agarose-Gelsystem gegossen und nach vollständiger Polymerisierung 1 x TAE Laufpuffer aufgefüllt. Die DNA-Proben wurden mit 2  $\mu$ l 10 x Auftragspuffer versetzt und anschließend 10  $\mu$ l je Tasche auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde je Gel ein DNA-Größenstandard zur Einordnung der Bandengröße aufgetragen (Abb. 6). Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für etwa 50 Minuten. Abschließend wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet und die Größe der DNA-Banden bestimmt.

### 3.2.10 Bestimmung der APN-Enzymaktivität

Die Enzymaktivität der APN wurde in BV2 Mikrogliazellen und primären murinen Splenozyten untersucht. Grundsätzlich lässt sich die Aktivität eines Enzyms entweder durch Detektion der Konzentration eines Substrates, welches verbraucht wird oder durch Detektion der Konzentration eines entstehenden Produktes bestimmen. Die Enzymaktivität der APN wird nach Hinzugabe von Ala-pNA durch Messung der Produktbildung in Abhängigkeit zur Zugabe des Inhibitors (RB3014) mithilfe einer photometrischen Absorptionsmessung erfasst [74]. Die Zellen wurden wie in Tabelle 23 angegeben kultiviert. Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde der Zellrasen mit 1 ml PBS mithilfe eines Zellschabers vom Boden der Wells abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Bestimmung der Zellzahl, wie in 3.2.3 beschrieben, wurden  $0,6 \times 10^6$  Zellen je Ansatz in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei  $300 \times g$  für 5 Minuten bei  $4^\circ C$  zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in HEPES-Puffer resuspendiert. Es wurde je ein Ansatz (50 $\mu$ l) ohne und einer mit dem APN-Inhibitor RB3014 (1  $\mu$ M) inkubiert. Alle Proben wurden mit HEPES-Puffer auf 150

µl aufgefüllt. Nach 15-minütiger Inkubationszeit bei 37 °C wurden allen Ansätzen 50 µl der Ala-pNA Substratlösung hinzugegeben und weitere 60 Minuten inkubiert. Der mitgeführte Leerwert, ohne Zugabe der Proben diente als Kontrolle. Nach Zentrifugation der Ansätze bei 300 x g für 5 Minuten bei 4 °C wurde der Probenüberstand in eine Mikrotiterplatte überführt.

Nach Kultivierung der Splenozyten für 24 h mit A1.002 (1µM) und IP10.C9 (1µM), wurde der Überstand abgenommen und die Zellzahl bestimmt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 300 x g für 5 Minuten bei 4 °C, sowie anschließendes Resuspendieren der Zellpellets in 1 ml HEPES-Puffer/1 x 10<sup>6</sup>. Es wurden 1 x 10<sup>6</sup> Zellen je Ansatz für die Bestimmung der Enzymaktivität der APN verwendet und das Protokoll, wie zuvor beschrieben, durchgeführt. Die Messung erfolgte immer in Duplikaten. Das Substrat Ala-pNA wurde mit der Endkonzentration von 2,925 mM eingesetzt. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Messwellenlänge von  $\lambda=390$  nm gegen die Referenzwellenlänge von  $\lambda = 620$  nm in einer transparenten 96-Well-Platte im Absorptionsplattenreader. Durch die enzymatische Aktivität Ala-pNa spaltender Enzyme wird para-Nitroanilin freigesetzt, welches das Licht in den gegebenen Wellenlängen absorbiert. Da das Substrat nicht APN spezifisch ist, bestimmt man bei Anwesenheit des spezifischen APN-Inhibitors RB3014 den hemmbaren Anteil der APN [34]. Daraus ergibt sich die spezifische Aktivität der APN an der Gesamtaktivität. Für die Auswertung wurde zwischen den gemessenen Absorptionen, mit und ohne Zugabe des Inhibitors, eine Differenz gebildet, dessen Ergebnis den hemmbaren Anteil der Ala-pNA-umsetzenden Aktivität darstellt. Diese entspricht der Aktivität der APN.

### 3.2.11 Der WST-1 Assay

Die BV2 Mikrogliazellen (5 x 10<sup>2</sup> je Well/200 µl) wurden vier Tage, nach Hinzugabe von LPS und der verschiedenen Inhibitoren, in RPMI in einer 96-Well Platte bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden 100 µl des Mediums abgenommen und in jedes Well 10 µl WST-1 hinzugegeben. Der durch die Spaltung des WST entstandene lösliche Stoff Formazan kann photometrisch detektiert werden [75]. Durch den Assay wurde das Proliferationsverhalten der BV2 Zellen in Abhängigkeit der Reagenzien untersucht. Dazu erfolgte die photometrische Messung der Absorption bei  $\lambda= 440$  nm direkt vor (Leerwert) und nach der Zugabe, sowie nach 30, 60 und 90 Minuten.

Zwischen den Messungen wurden die Zellen weiterhin bei 37 °C inkubiert. Die gemessene Absorption stellt ein Maß der Proliferation der BV2 Zellen dar. Jeder Ansatz wurde in sechs Replikaten gemessen. Für die Auswertung wurde der Mittelwert jeder Messreihe, an den verschiedenen Zeitpunkten der Messung bestimmt, und der Leerwert abgezogen. Für die graphische Darstellung wurden lediglich die nach 60 Minuten ermittelten Werte verwendet.

### **3.2.12 Proteinanalytische Methoden**

#### **3.2.12.1 Der Proteinaufschluss**

Die Proteinisolierung erfolgte aus den zuvor für 24 h mit und ohne LPS (1 µM) kultivierten BV2 Mikrogliazellen. Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Nachdem das Medium abgenommen wurde, wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und 300 µl des Aufschlusspuffers auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der 6-Well-Platte gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die anschließende Lyse der Zellen erfolgte durch Inkubation auf Eis für 30 Minuten. Abschließend erfolgte die Zentrifugation für 30 Minuten bei 17.000 x g und 4 °C. Für die weitere Verwendung wurde der Überstand abgenommen und bei -20 °C gelagert.

#### **3.2.12.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung der Proteingesamtkonzentration der Proben erfolgte mit dem photometrischen Test nach Bradford. Dabei wird der Farbstoff Coomassie Blue G250 verwendet, welcher mit den Seitenketten der Proteine interagiert und somit in seiner anionischen Form stabilisiert wird. Dadurch ändert sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm (kationische Form) auf 595 nm (anionische Form) [76]. Um die Proteinkonzentrationen ermitteln zu können, wurde eine Eichkurve mithilfe der BSA – Stammlösung (0,2 mg/ml) erstellt. Die entsprechenden Volumina an BSA-Standard und A. deion. (Tab. 27) wurden in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und zu jedem Well 300 µl Bradford Reagenz hinzugegeben. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm der Bradfordlösung mit Protein und ohne Protein als Leerwert gemessen.

**Tabelle 27: Pipettierschema für die Eichreihe zur Bestimmung der Proteinkonzentration mithilfe des Bradford-Assays**

Proteinmenge ( $\mu\text{g}$ )	BSA-Stammlösung (0,2 mg/ml)	A. deion.
0	-Leerwert-	20 $\mu\text{l}$
0,4	2 $\mu\text{l}$	18 $\mu\text{l}$
0,8	4 $\mu\text{l}$	16 $\mu\text{l}$
1,2	6 $\mu\text{l}$	14 $\mu\text{l}$
1,6	8 $\mu\text{l}$	12 $\mu\text{l}$
2,0	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$
2,4	12 $\mu\text{l}$	8 $\mu\text{l}$
2,8	14 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte immer in Dreifachbestimmung mit 2  $\mu\text{l}$  Proteinlysat, 18  $\mu\text{l}$  A. deion. und 300  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz. Mit der gemessenen Absorption der Probe konnte, in Anlehnung an die Standardreihe, auf den Proteingehalt der Probe geschlossen werden.

### 3.2.12.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) dient der analytischen Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in einem diskontinuierlichen Puffersystem [77]. Die SDS-Polyacrylamid-Gele wurden in einem dafür vorgesehenen Kammersystem angefertigt. Abhängig von der Größe der aufzutrennenden Proteine wurde die Polyacrylamid-Konzentration im Trenngel angepasst. Die Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele kann aus den nachfolgenden Tabellen entnommen werden.

**Tabelle 28: Zusammensetzung 7,5, 10 und 12%iger Trenngelge**

Reagenzien	7,5 %	10 %	12 %
A. deion.	2,9 ml	2,4 ml	2,0 ml
Trenngelpuffer	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
Acrylamid 30 %	1,5 ml	2,0 ml	2,4 ml
SDS 10%	60 µl	60 µl	60 µl
APS 10%	60 µl	60 µl	60 µl
TEMED	6 µl	6 µl	6 µl

**Tabelle 29: Zusammensetzung der Sammelgelge 4%**

Reagenzien	Volumen
A. deion.	1,45 ml
Sammelgelpuffer	625 µl
Acrylamid 30 %	375 µl
SDS 10%	25 µl
APS 10%	25 µl
TEMED	5 µl

Die Proben, welche alle die gleiche Proteinkonzentration (20 µg/20 µl) aufwiesen, wurden mit Probenpuffer mit ME (4-fach) versetzt und bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert. Die Inkubation mit SDS führt einerseits zur Denaturierung andererseits lagert sich das SDS an die Proteine an, sodass diese gleichmäßig mit SDS beladen und negativ geladen sind wodurch sie entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden können [77]. Die verwendeten Glasplatten für die Gelkammern wurden nach Reinigung luftdicht mit Klammern und Gummibändern verschlossen. Nach luftblasenfreiem Einfüllen des Trenngels wurde es mit 1 ml Isopropanol beschichtet, welches nach 15-minütiger Polymerisation dekantiert werden konnte. Anschließend wurde die Kammer luftblasenfrei mit Sammelgel befüllt und ein Kamm mit Taschen für die Proben oberhalb des Trenngels im Sammelgel platziert. Die Gelelektrophoresekammer wurden mit 1-fach konzentriertem SDS-Laufpuffer aufgefüllt und luftblasenfrei eingespannt. Die Proteinproben wurden zusammen mit einem Proteinstandard (Abb.6) als Größenvergleich auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bis zum Ende des Sammelgels bei 100 Volt, anschließend bei 120-150 Volt.

### 3.2.12.4 Western Blot

Beim Western Blot werden die zuvor aufgetrennten Proteine durch Elektrotransfer auf eine Trägermembran übertragen und anschließend durch spezifische Antikörper sichtbar gemacht [78]. Der Proteintransfer vom Transferringel erfolgte auf eine Nitrocellulose-Membran durch ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel angelegtes elektrisches Feld. Dafür wurden neben der Nitrocellulose-Membran zwei weitere Filterpapiere (Whatman-Papier) vorbereitet. Das unterste Whatman-Papier, sowie das Protein-Gel wurden in Kathodenpuffer äquilibriert und anschließend nacheinander auf den Blotter gestapelt. Die Nitrocellulose-Membran und ein weiteres Whatman-Papier wurden in Anodenpuffer äquilibriert und nacheinander auf das Protein-Gel gelegt. Der Blot erfolgte bei  $1 \text{ mA/cm}^2$  je Membran für 90 Minuten. Nach dem Blot wurde die Nitrocellulosemembran von Gel- und Filterpapierresten befreit. Der Erfolg des Proteintransfers wurde durch die reversible Ponceau-Färbung sichtbar gemacht. Anschließend wurde die Membran mit A. deion. gewaschen, sodass die Proteinbanden auf der Trägermembran gut sichtbar wurden. Nach dem Proteintransfer auf die Nitrocellulose-Membran wurde diese für eine Stunde mit Roti-Block inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend erfolgte dreimal hintereinander für 5 Minuten ein Waschschrift in TBS/T. Nach dem Waschen wurde der Primärantikörper hinzugegeben und über Nacht bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Die verwendeten Antikörper und deren Verdünnung sind Tabelle 30 zu entnehmen. Anschließend wurde nach dreimaligem Waschen mit TBS/T der Sekundärantikörper hinzugegeben und für 1 h bei ständigem Schwenken inkubiert.

**Tabelle 30: Verwendete Antikörper für den Western Blot**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung in PBS</b>
Anti-CD13, Kaninchen	1:1000
Anti-phospho-GSK3 $\beta$ , Kaninchen	1:1000
Anti-Tubulin, Maus	1:10000
Anti-GAPDH, Kaninchen	1:10000
<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung in Roti Blot</b>
Anti-Kaninchen	1:10000
Anti-Maus	1:10000

### 3.2.12.5 Röntgenfilm-Entwicklung

Um die spezifischen Proteinbanden sichtbar zu machen, wurden die Trägermembranen mit verschiedenen Lumineszenz-Substraten inkubiert. Die HRP-gekoppelten Sekundärantikörper katalysieren die Umsetzung des Luminols, dessen Lumineszenz auf einem Röntgenfilm detektiert werden kann. Für die Proteine GAPDH und Tubulin wurde das Elektrochemilumineszenz (ECL)-Substrat verwendet [79]. Die Proteine APN und GSK3 $\beta$  wurden mit dem sensitiveren Lumineszenz-Substrat SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate inkubiert, sodass ein Produkt entstand, welches auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden konnte. Die Membranen wurden 3 Minuten mit dem jeweiligen Substrat inkubiert. Anschließend wurden die Membranen 1 bis 5 Minuten unter einem Röntgenfilm inkubiert und die Banden mithilfe des Entwicklers sichtbar gemacht. Anschließend wurde der Röntgenfilm kurze Zeit in Fixierlösung geschwenkt und abschließend in A. deion. gewaschen.

### 3.2.13 Splenozytenisolation

Es wurden primäre murine Splenozyten aus der Milz von Wildtyp (WT) und CD13 Knockout (KO) Mäusen isoliert. Dafür wurde die Milz extrahiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml PBS überführt. Anschließend wurde die Kapsel der Milz längs gespalten und die Milz aufgeklappt. Es wurde 1 ml des Kulturmediums (RPMI 1640) in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und die Milz über ein Zellsieb (70  $\mu$ m) gedrückt. Nach Zentrifugation bei 300 x g für 10 Minuten bei RT wurden auf das Pellet 720  $\mu$ l A. deion. zur Lyse der Erythrozyten gegeben und dieses 5 Sekunden resuspendiert. Die Reaktion wurde mit 80  $\mu$ l 10 x PBS gestoppt. Abschließend wurde die Zellsuspension erneut über ein Zellsieb (70  $\mu$ m) gegeben und bei 300 x g für 10 Minuten bei RT zentrifugiert. Die primären murinen Splenozyten wurden in ihrem Kulturmedium aufgenommen und die Zellzahl, wie in 3.2.3 beschrieben, bestimmt. Zusätzlich wurde durch den Trypanblau-Test die Anzahl nicht lebender Zellen bestimmt. Dafür wurden 50  $\mu$ l der Zellsuspension mit 50  $\mu$ l Trypanblau 0,4 % in PBS für 2 Minuten inkubiert und anschließend die Zellzahl bestimmt.

$$Y \times 10^6 \text{ Zellen} = MW_{\text{gezählte Zellen}} \times 2^{1/1} \text{ Verdünnung des Trypanblau} \times 10000 \times \text{gesamte ml der Zellsuspension}$$

### 3.2.13.1 Kultivierung der Splenozyten

Es wurden  $2 \times 10^6$  Zellen je Well in eine 6-Well-Platte ausgesät und mit den Zusätzen IP10.C9 (1  $\mu$ M) und A1.002 (1  $\mu$ M) für 24 h kultiviert. Anschließend wurden verschiedene Genexpressionsanalysen durchgeführt oder die Enzymaktivität von APN bestimmt.

**Tabelle 31: Kultivierung von primären murinen Splenozyten**

6-Well-Platte	1	2	3
A	Kontrolle	IP10.C9	A1.002

### 3.2.14 Immunhistochemische Untersuchungen

Die folgenden Untersuchungen an Gewebeschnitten von Mausgehirnen wurden im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universitätsmedizin Greifswald in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. von Bohlen und Halbach durchgeführt. Immunhistochemische Untersuchungen ermöglichen die Detektion verschiedener Antigene auf Gewebeschnitten nach Inkubation mit spezifischen Antikörpern. Es wird eine direkte und eine indirekte Methode unterschieden. Bei der direkten Methode bindet ein markierter Antikörper direkt an die spezifischen Epitope und ermöglicht somit eine direkte Detektion. Bei der indirekten Methode binden unmarkierte Antikörper an die spezifischen Epitope. An den epitopspezifischen ersten Antikörper binden sekundär fluoreszenzmarkierte Antikörper, die eine anschließende Detektion ermöglichen [14]. Für die Untersuchung verschiedener Antigene auf Gewebeschnitten von Mausgehirnen wurde die indirekte Methode verwendet. Es sollten zwei verschiedene Antigene durch Doppelfärbung mit zwei sekundären Antikörpern, die zwei unterschiedliche Farbdarstellungen ermöglichen, dargestellt werden.

#### 3.2.14.1 Perfusion von Mausgehirnen

Die Perfusion der Gehirne mit PFA 4% von je zwei Wildtyp und zwei CD13 KO Mäusen erfolgte durch das Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universitätsmedizin Greifswald. Die Perfusion dient der Fixation des zu untersuchenden Gewebes, um repräsentative Ergebnisse in der Fluoreszenzmikroskopie erreichen zu können. Die Gehirne wurden anschließend in einem 5 ml Reaktionsgefäß mit 4 ml PFA (4 %) bei 4 °C gelagert.

**3.2.14.2 Anfertigung von Gehirnschnitten am Vibratom**

Für die Herstellung histologischer Schnitte wurden die Mausgehirne mit dem Vibratom Leica VT 1000s geschnitten. Zuvor wurde das Gehirn mit einer Rasierklinge zurechtgeschnitten und auf eine dafür vorgesehene Plattform geklebt. Anschließend wurde das Gehirn senkrecht, mit dem Kortex in Richtung der Klinge zeigend, ausgerichtet und der Schneidevorgang begonnen. Es wurden Schnitte mit einer Dicke von 30 µm angefertigt. Die Schnitte wurden in einer 24-Well-Platte mit Ethanol 20 % aufgenommen und bis zum Aufziehen bei 4 °C gelagert. Am selben Tag wurden 4 Schnitte pro Objektträger mit einem Pinsel auf einen Superfrost-Objektträger „aufgezogen“ und über Nacht bei 37 °C im Hybridisierungssofen inkubiert. Als Kontrolle wurden zwei einzelne Schnitte auf einen Objektträger aufgezogen. Es wurden je Maus und Färbung 5 Objektträger angefertigt.

**3.2.14.3 Testung der Antikörper für die Färbung histologischer Schnitte**

Für die Verwendung der verschiedenen Antikörper musste zuerst die optimale Konzentration ermittelt werden. Dafür wurden Gehirne mehrerer Wildtyp-Mäuse am Vibratom geschnitten und die Schnitte mit den Primärantikörpern Anti-Fzd 2, Anti-Wnt 10b und Anti-Iba 1 in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden die Sekundärantikörper ebenfalls in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben (Tab. 32). Die Färbung erfolgte nach dem nachfolgend beschriebenen Protokoll.

**Tabelle 32: Testung der Antikörper Wnt 10b, Frizzled-2 (Fzd 2) und Iba 1 (Anti-Maus)**

	Wnt 10b/Fzd 2/Iba 1				Wnt 10b/Fzd 2/Iba 1				Wnt 10b/Fzd 2/Iba 1			
Primär-antikörper	1:50	1:100	1:250	1:500	1:50	1:100	1:250	1:500	1:50	1:100	1:250	1:500
Sekundär-antikörper	1:200	1:200	1:200	1:200	1:400	1:400	1:400	1:400	1:800	1:800	1:800	1:800

Anschließend wurde die Doppelfärbung der Primärantikörper getestet. Dafür wurden die beiden Primärantikörper zeitgleich oder nacheinander auf die histologischen Schnitte gegeben (Tab. 33). Die Färbung erfolgte ebenfalls nach dem nachfolgend beschriebenen Protokoll.

**Tabelle 33: Testung der Doppelfärbung der primären Antikörper (Verdünnungsreihen Tab. 32)**

	Wnt 10 b und Iba 1 (Anti-Maus)			Fzd 2 und Iba 1 (Anti-Kaninchen)		
Primär-antikörper	1. Iba 1 2. Wnt 10b	1. Wnt 10b 2. Iba 1	Iba 1 und Wnt 10b zusammen	1. Iba 1 2. Fzd 2	1. Fzd 2 2. Iba 1	Iba 1 und Fzd 2 zusammen
Sekundär-antikörper	Beide Sekundärantikörper wurden immer zeitgleich hinzugegeben.					

Nach Auswertung der am Fluoreszenzmikroskop erstellten Bilder wurden die in Tabelle 34 dargestellten Konzentrationen für die Färbung der histologischen Schnitte verwendet. Es zeigte sich, dass die besten Ergebnisse erzielt werden konnten, wenn beide primären Antikörper zur gleichen Zeit hinzugegeben wurden.

### **3.2.14.4 Doppelfärbung der histologischen Schnitte**

Nach der Trocknung im Hybridisierungssofen wurden die Objektträger zur Rehydrierung für 5 Minuten in A. deion. gewaschen. Dieser Waschschrift erfolgte in einer Glasküvette unter leichtem Schütteln. Anschließend wurden sie zur Antigen-Demaskierung mit dem Mikrowellenpuffer für 20 Minuten bei 800 Watt inkubiert. Zum Abkühlen wurde die Küvette in einem mit Wasser gefüllten Glasbehälter gestellt und kontinuierlich mit kaltem Wasser für ca. 20 Minuten gekühlt. Die Antigen-Demaskierung ermöglicht einen leichteren Zugang der Antikörper zur Antigenoberfläche [14]. Nach Abkühlung der Lösung wurden die Objektträger erneut mit A. deion. und anschließend zweimal 5 Minuten mit 1 x PBS gewaschen. Die anschließende Blockierung erfolgte, um unspezifische Bindungen der Antikörper mit ihrem F<sub>c</sub>-Teil zu verhindern, durch 3 % Goat-Serum + 0,3 % Triton x 100 in PBS. Das Serum richtet sich nach dem Wirt des später zu verwendenden sekundären Antikörpers. Nach Umrahmung der Schnitte mit einem Fettstift (Liquid Blocker), wurden diese in einer feuchten Kammer mit je 50 µl der Blockierungslösung für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte erneut 5 Minuten mit 1 x PBS gewaschen und die Primärantikörper (50 µl/ Schnitt) hinzugegeben. Die Kontrolle wurde mit 1 x PBS ohne primären Antikörper inkubiert.

**Tabelle 34: Verdünnung der eingesetzten Primärantikörper**

Primärantikörper	Verdünnung (in 3 % Goat-Serum + 0,1 % Triton x 100 in PBS)
Anti-Fzd 2-Ratte	1:50
Anti-Wnt 10b-Kaninchen	1:100
Anti-Iba 1-Kaninchen	1:500
Anti-Iba 1-Maus	1:100

Es wurde der Anti-Fzd 2-Ratte mit dem Anti-Iba 1-Kaninchen Antikörper kombiniert und der Anti-Wnt 10b-Kaninchen mit dem Ani-Iba 1-Maus Antikörper. Die Objektträger wurden in der feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht inkubiert.

### 3.2.14.5 Sekundärantikörper und Kernfärbung

Die Sekundärantikörper binden an die Primärantikörper und sorgen durch die gekoppelte Fluoreszenz für die Sichtbarmachung der jeweiligen Antigene im Fluoreszenzmikroskop. Nachdem die Objektträger mit 1 x PBS gewaschen wurden, wurden diese mit den Sekundärantikörpern, in den in Tabelle 35 angegebenen Konzentrationen, in einer feuchten Kammer 2 h inkubiert.

**Tabelle 35: Verdünnung der eingesetzten Sekundärantikörper**

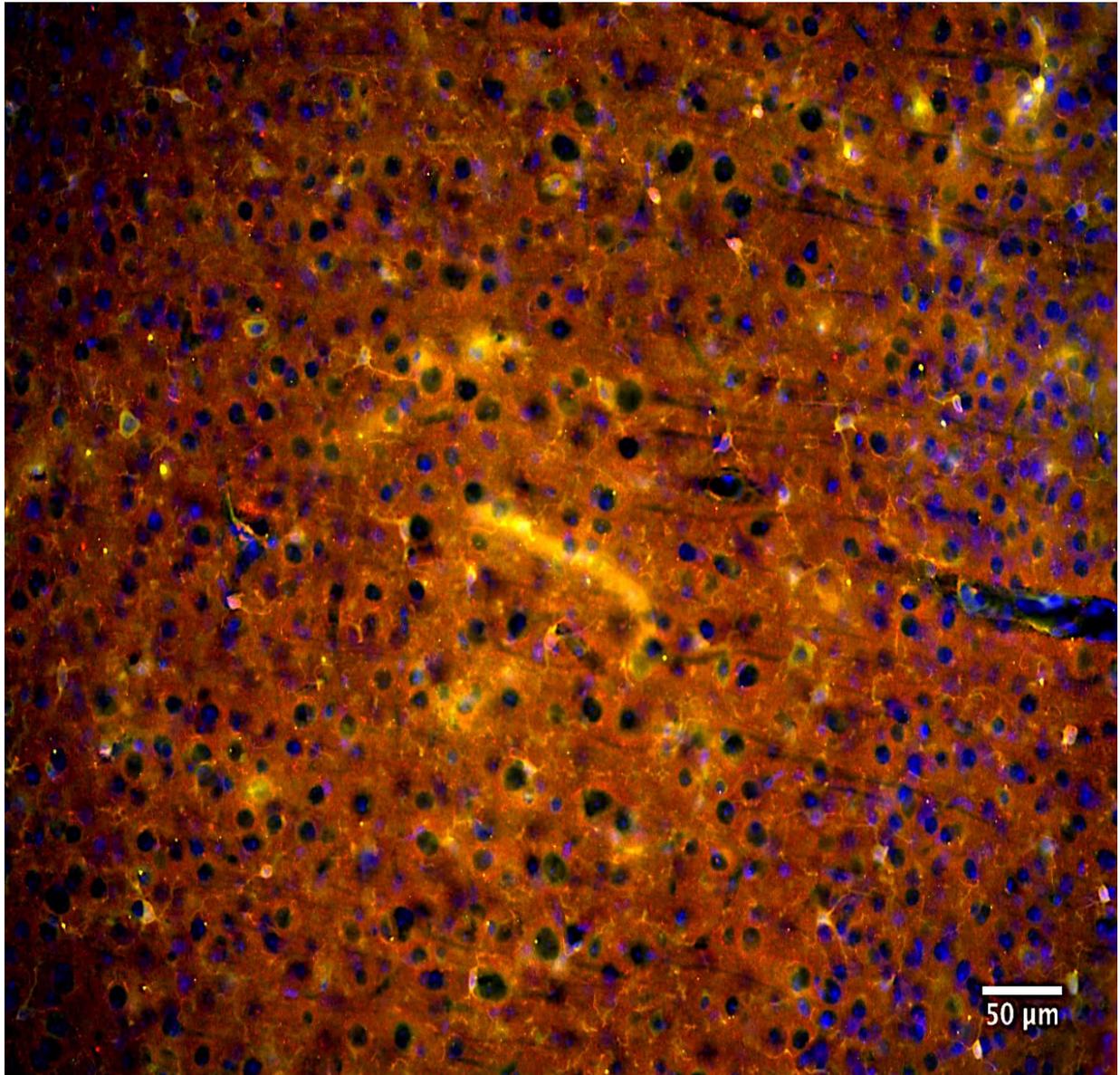
Sekundärantikörper	Verdünnung (in 3 % Goat-Serum + 0,1 % Triton x 100 in PBS)
Anti-Maus-488	1:400
Anti-Kaninchen-Cy3	1:800
Anti-Kaninchen-488	1:400 (1h Inkubation)
Anti-Ratte-Cy3	1:400

Anschließend wurden die Objektträger in 1 x PBS gewaschen und mit DAPI in der Verdünnung 1:10000 bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Die Färbung mit DAPI dient der Anfärbung der Zellkerne. Für die Auswertung der Objektträger am Fluoreszenzmikroskop wurden diese mit Moviol und einem Deckglas eingedeckelt und bei 4 °C gelagert.

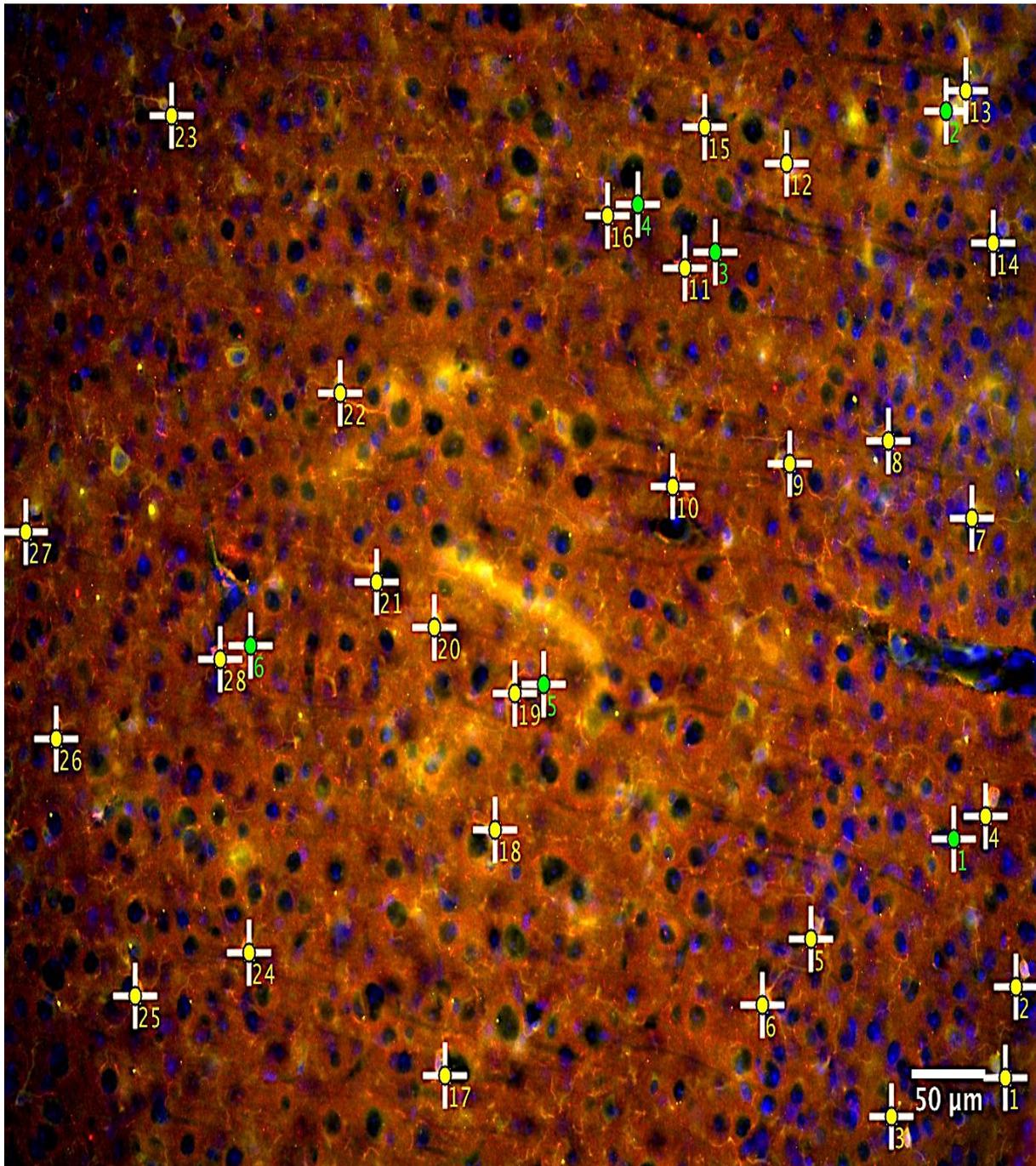
### 3.2.14.6 Auswertung der Fluoreszenzbilder

Die Bilder der histologischen Schnitte wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Olympus mithilfe des Cell Sens Olympus Viewers erstellt. Es wurde ein 20 x Objektiv verwendet und jeweils zwei Bilder einer anatomischen Region (z.B. Motorkortex) und Seite (rechte/linke Hemisphäre) von jedem Schnitt angefertigt. Am Ende konnte der gesamte Motorkortex von kaudal nach rostral dargestellt werden. Die Auswertung erfolgte mithilfe von Image J. anhand anatomischer Landmarken (z.B. Mark-Rinden Grenze, Ventrikelsystem) konnte je Schnitt immer der gleiche Bereich des Motorkortex markiert werden. Innerhalb dieses Feldes wurde in allen Schnitten die Anzahl der Mikrogliazellen und die Zahl Wnt 10b positiver Mikrogliazellen verglichen. Abschließend wurden die Ergebnisse zwischen der rechten und linken Hemisphäre verglichen und eine statistische Auswertung mit GraphPad Prism durchgeführt.

A



B



**Abbildung 8: Auswertung fluoreszierender Bilder von histologischen Schnitten des Motorkortex aus CD13-Knockout und CD13-Wildtyp Mäusen**

Dargestellt ist exemplarisch ein Ausschnitt der des Motorkortex der rechten Hirnhemisphäre nach Doppelfärbung mit Iba 1, Wnt 10b und DAPI-Kernfärbung **A**: natives Bild **B**: gelbe Kreuze markieren die Iba 1 positiven Mikrogliazellen; grüne Kreuze markieren die Iba 1 und Wnt 10b positiven Mikrogliazellen

### 3.2.15 Statistik

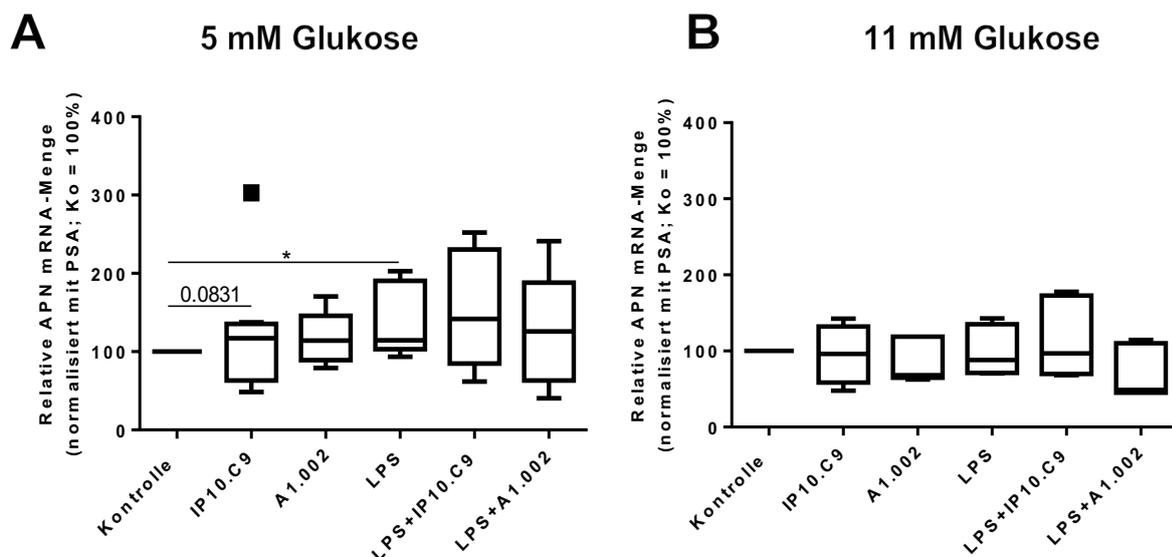
Die statistische Auswertung aller Ergebnisse erfolgte mit „GraphPad Prism 6.03“. Um zwischen den Versuchsgruppen signifikante Unterschiede im Expressionsverhalten oder der Enzymaktivität zu determinieren, wurde der „Mann-Whitney-U-Test“ durchgeführt. Dieser Test zur statistischen Auswertung eignet sich für ungepaarte, nicht-parametrische Daten. Die statistische Signifikanz wurde für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $<0,05$  definiert. Die Ergebnisse ( $n \geq 4$ ) wurden als Box Plot dargestellt. Die Signifikanzen wurden wie folgt dargestellt: nicht signifikant  $p = >0,05$ ; \*  $p = <0,05$ ; \*\*  $p = <0,01$ ; \*\*\*  $p = <0,001$ .



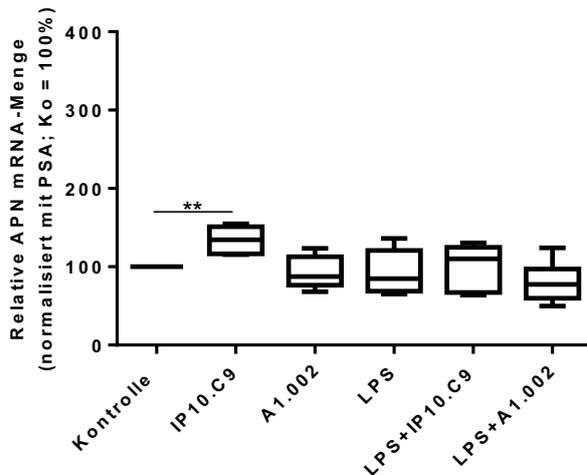
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Einfluss von LPS und pharmakologischen Inhibitoren der APN auf die APN Expression in BV2 Mikrogliazellen

Es wurde die Expression der APN in BV2 Mikrogliazellen auf der Ebene der mRNA mittels RT-qPCR untersucht. Dafür wurden diese, wie in 3.2.4 beschrieben, kultiviert. Nach Kultivierung der Zellen mit 25 mM oder 11 mM Glukose und Stimulation der BV2 Mikrogliazellen mit LPS zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 9 B, C). Bei niedrigen Glukosekonzentrationen (5 mM) im Nährmedium und ohne LPS-Stimulation konnte ein Anstieg der APN Expression unter dem Einfluss von IP10.C9 auf 117 [63,3; 135,5] % detektiert werden. Aus der Aktivierung der BV2 Mikrogliazellen durch LPS resultierte, wie in Abbildung 8 A dargestellt, ein Anstieg der relativen mRNA-Menge von APN (114,4 [103; 190,4] %). Durch die Kultivierung der Zellen mit einer hohen Glukosekonzentration (25 mM) konnte keine Effekte nach Zugabe von IP10.C9 dargestellt werden. Die relative mRNA-Menge der APN konnte in den unstimulierten BV2 Mikrogliazellen auf 134 [116; 151] % gesteigert werden (Abb. 9 C). Bei der Kultivierung der Zellen mit einer Glukosekonzentration von 11 mM bewirkte die Zugabe der APN Inhibitoren keine signifikanten Unterschiede in den relativen mRNA-Mengen der APN (Abb. 9 B).



### C 25 mM Glukose



#### Abbildung 9: Einfluss von LPS und pharmakologischen Inhibitoren der APN auf die relative mRNA-Menge von APN

Die BV2 Mikrogliazellen wurden 24 h mit und ohne LPS (1  $\mu$ M) und Zugabe von IP10.C9 (1  $\mu$ M) und A1.002 (1  $\mu$ M) kultiviert. Zellen ohne Zusätze dienten als Kontrolle. Dabei wurden drei Kulturmedien mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen zur Kultivierung verwendet. Durch die RT-qPCR-Messungen wurde die relative mRNA-Menge von APN bestimmt und eine Normierung auf das *Housekeeping-Gene* PSA vorgenommen. [n=5; Mann-Whitney: \*p<0,05; \*\*p<0,01]. **A:** relative mRNA-Menge von APN nach Kultivierung in DMEM mit 5 mM Glukose; **B:** relative mRNA-Menge von APN nach Kultivierung in RPMI mit 11 mM Glukose; **C:** relative mRNA-Menge von APN nach Kultivierung in DMEM mit 25 mM Glukose.

#### 4.1.1 Einfluss der LPS-Stimulation auf die APN-Proteinmenge

Der Einfluss von LPS auf die Proteinmenge von APN wurde mittels Immunoblot-Analyse untersucht. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz-Exposition auf einem Röntgenfilm und densitometrischer Auswertung des spezifischen APN Signals bei 150 kDa. Zur Normierung der Daten diente Tubulin. Es zeigte sich, dass die Stimulation von BV2 Mikrogliazellen mit LPS keinen Einfluss auf die APN Proteinmenge hat.

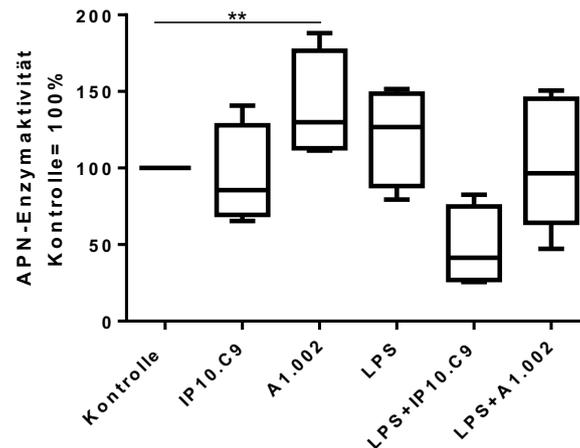


#### Abbildung 10: Quantifizierung der APN-Proteinmenge nach LPS-Stimulation

Die BV2 Mikrogliazellen wurden 24 h mit und ohne LPS (1  $\mu$ M) kultiviert und anschließend das Protein isoliert. Es wurden vier unabhängige Versuche mit BV2 Mikrogliazellen mit und drei unabhängige Versuche ohne Stimulation mit LPS durchgeführt. Die Bande für APN lag, wie das zu erwartende Molekulargewicht bei 150 kDa. Die Normierung erfolgte mit Tubulin (55 kDa). Es konnte keine Veränderung in der Proteinmenge durch die Zugabe von LPS detektiert werden.

#### 4.2 Einfluss von LPS und pharmakologischen Inhibitoren der APN auf die Enzymaktivität der Aminopeptidase N in BV2 Mikrogliazellen

Die enzymatische Aktivität der Aminopeptidase N in unstimulierten und mit LPS stimulierten BV2 Mikrogliazellen wurde anhand der RB3014-hemmbarer Fraktion der Ala-pNA-Hydrolyse-Aktivität gemessen, wie in Methode 3.2.10 beschrieben. Durch die Kultivierung der BV2 Mikrogliazellen mit A1.002 ergab sich ein signifikanter Anstieg der APN-Enzymaktivität (129 [113; 176,6] %) in unstimulierten BV2 Mikrogliazellen (Abb. 11). Durch die Stimulation mit LPS konnte ebenfalls ein Anstieg der APN-Aktivität detektiert werden (126,8 [88,2; 148,5] %). Aus der Zugabe von IP10.C9 resultierte sowohl für die unstimulierten, als auch für die stimulierten BV2 Mikrogliazellen eine tendenzielle Abnahme der Enzymaktivität ( $\emptyset$  LPS: 85,6 [69,4; 128] %; + LPS: 41,4 [26,9; 82,6] %).



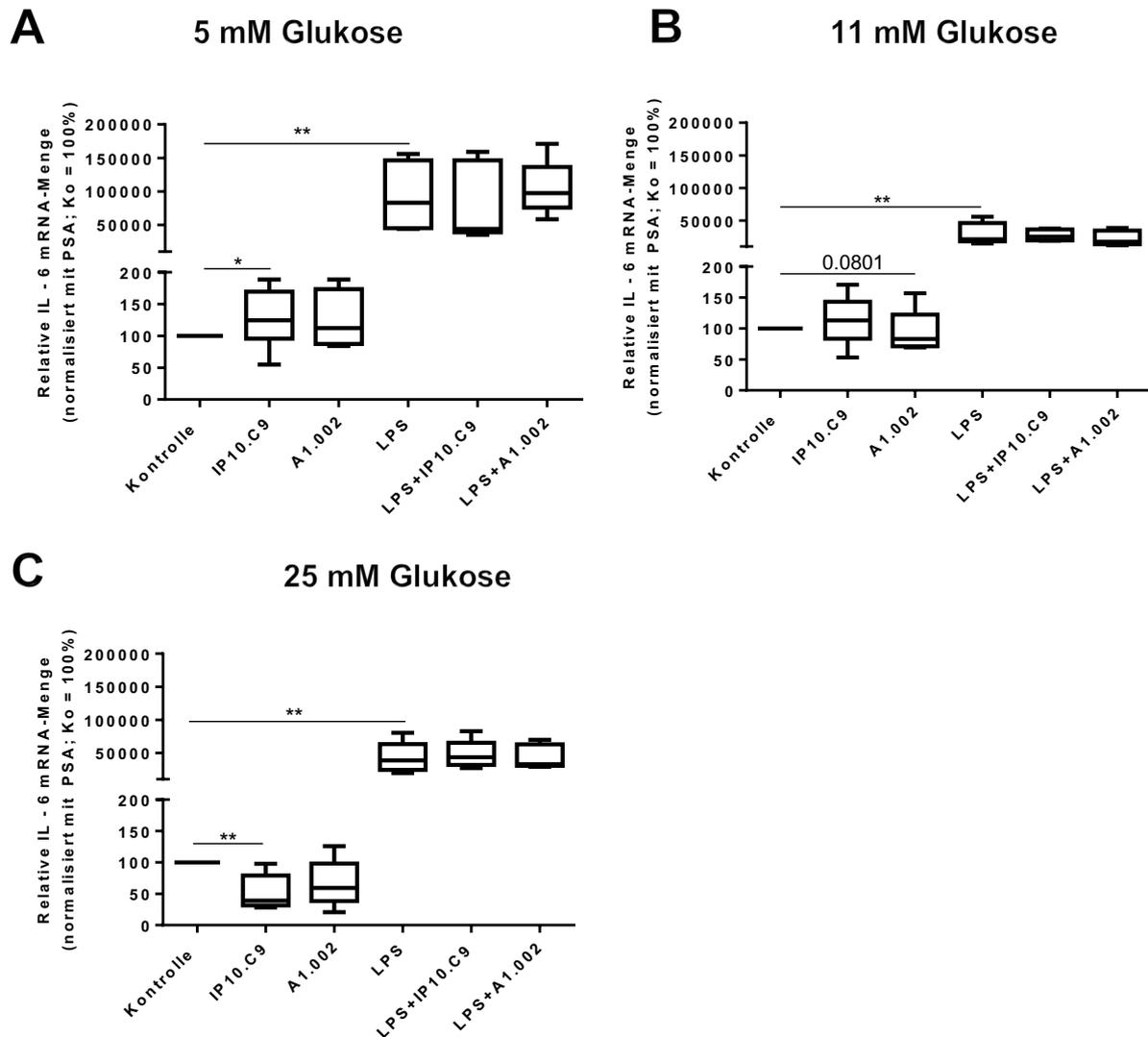
**Abbildung 11: Einfluss von LPS und pharmakologischen Inhibitoren der APN auf die APN-Enzymaktivität**

Die Zellen wurden für vier Tage nach Zugabe von LPS (1  $\mu$ M) und IP10.C9 (1  $\mu$ M) oder A1.002 (1  $\mu$ M) in Nährmedium mit 11 mM Glukosekonzentration kultiviert. Die Werte beziehen sich auf die Kontrollgruppe ohne Zusätze (100 %). Nach Kultivierung der BV2 Mikrogliazellen mit A1.002 zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Enzymaktivität der APN (129 [113; 176,6] %). [n=4; Mann-Whitney: \*\*p<0,01]

#### 4.3 Einfluss von LPS und pharmakologischen Inhibitoren der APN auf die Expression von IL-6 und IL-1 $\alpha$ in BV2 Mikrogliazellen

Die Stimulation mit LPS führt zu Aktivierung der BV2 Mikrogliazellen, sodass verschiedene proinflammatorische Zytokine verstärkt exprimiert werden. Die Kultivierung erfolgte wie im Methodenteil 3.2.4 beschrieben. Unter allen drei Glukosekonzentrationen konnte ein signifikanter Anstieg der relativen mRNA-Menge von IL-6 durch die Stimulation mit LPS dargestellt werden (5 mM Glukose: 83185 [45186; 146561] %; 11 mM Glukose: 21102 [18034; 45987] %; 25 mM Glukose: 38450 [24240; 63138] %). Die Gabe von Inhibitoren der APN führte bei den unstimulierten BV2 Mikrogliazellen zu Veränderungen der relativen IL-6-mRNA-Menge. Bei niedrigen Glukosekonzentrationen (Abb. 12 A) stieg die relative mRNA-Menge von IL-6 bei Zugabe von IP10.C9 signifikant auf 124,4 [95,8; 169,4] %. Die Zugabe von IP.10.C9 zu BV2 Mikrogliazellen, die bei 25 mM Glukose kultiviert wurden führen zu einer signifikanten Abnahme der relativen mRNA-Menge von IL-6 (39,1 [31,4; 79,1] %). In der Gruppe der unstimulierten BV2 Mikrogliazellen, die bei 11 mM Glukosekonzentration (Abb. 12 B) kultiviert wurden, konnte kein signifikanter Unterschied nach Zugabe von IP10.C9 detektiert werden. Nach Zugabe von A1.002

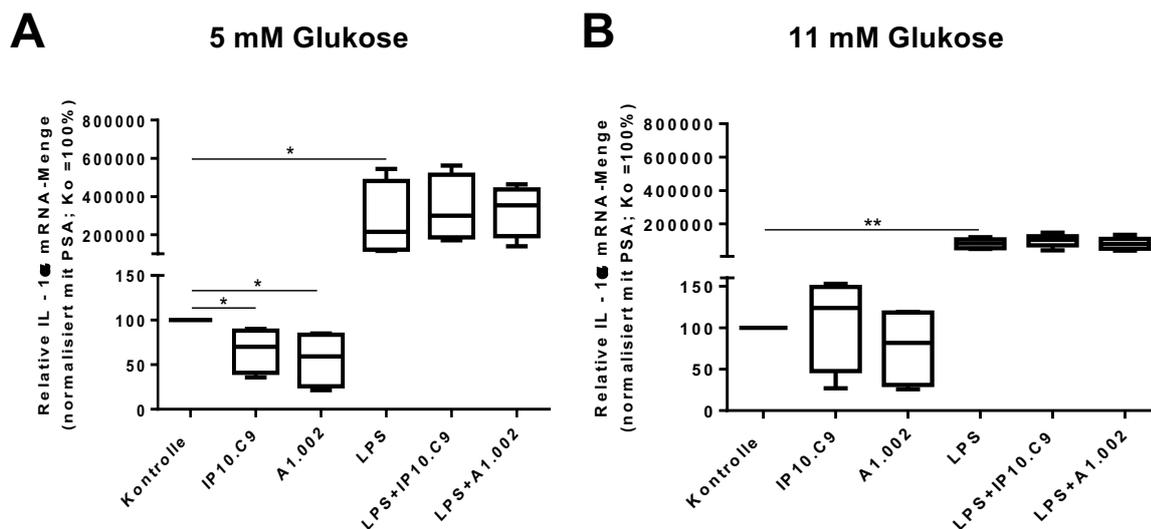
zeigte sich eine tendenzielle Verringerung der relativen IL-6-mRNA-Menge auf 83,2 [71; 122,5] %).

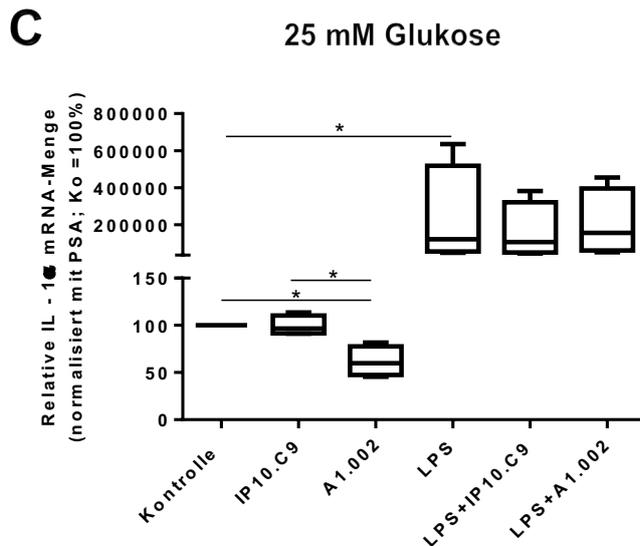


### Abbildung 12: Einfluss von LPS und pharmakologischen Inhibitoren der APN auf die IL-6 Expression

Die BV2 Mikrogliazellen wurden 24 h mit und ohne LPS (1  $\mu$ M) und Zugabe von IP10.C9 (1  $\mu$ M) und A1.002 (1  $\mu$ M) kultiviert. Zellen ohne Zusätze dienten als Kontrolle. Es wurden drei verschiedene Glukosekonzentrationen zur Kultivierung verwendet. Durch die RT-qPCR-Messungen wurden die relative mRNA-Menge von IL-6 bestimmt und auf das *Housekeeping-Gene* PSA normiert. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der relativen mRNA-Menge von IL-6 nach Zugabe von LPS unter allen Kulturbedingungen. [n=5; Mann-Whitney: Tendenz 0.08; \*p<0,05; \*\*p<0,01] **A**: relative mRNA-Menge von IL-6 nach Kultivierung in DMEM mit 5 mM Glukose; **B**: relative mRNA-Menge von IL-6 nach Kultivierung in RPMI mit 11 mM Glukose; **C**: relative mRNA-Menge von IL-6 nach Kultivierung in DMEM mit 25 mM Glukose.

Durch Stimulation der BV2 Mikrogliazellen konnten signifikante Veränderungen in der relativen mRNA-Menge von IL-1 $\alpha$  (5 mM Glukose: 121644 [55220; 518367] %; 11 mM Glukose: 83274 [54974; 107782] %; 25 mM Glukose: 215025 [122086; 481050] %) detektiert werden. Sowohl bei hohen (Abb. 13 C) als auch bei niedrigen (Abb. 13 A) Glukosekonzentrationen resultierte aus der Zugabe von A1.002 in der Gruppe der unstimulierten BV2 Mikrogliazellen eine signifikante Abnahme der relativen mRNA-Menge (5 mM Glukose: 59,8 [47,5; 77,7] %; 25 mM Glukose: 59,22 [25,8; 83,6] %). Die Gabe von IP10.C9 führte in BV2 Mikrogliazellen, die mit 25 mM Glukosekonzentration kultiviert wurden, zu einer signifikanten Verringerung der relativen mRNA-Menge von IL-1 $\alpha$  (70,1 [40,99; 88,33] %). Nach LPS-Stimulation der BV2 Mikrogliazellen konnten keine signifikanten Veränderungen in der relativen mRNA-Menge in Abhängigkeit zur Zugabe von IP10.C9 und A1.002 detektiert werden.





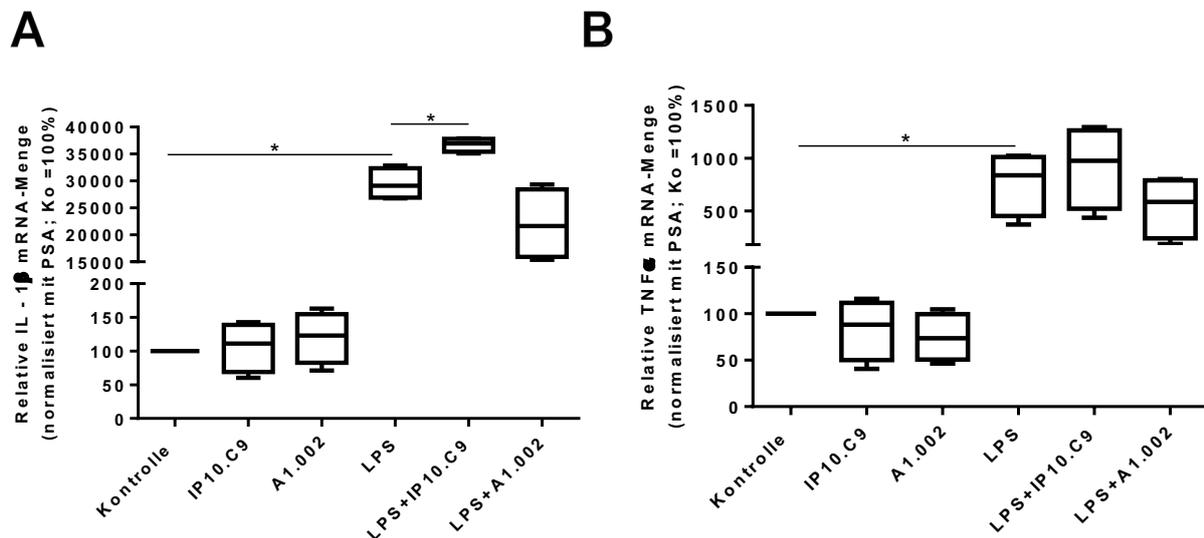
**Abbildung 13: Einfluss von LPS und pharmakologischen Inhibitoren der APN auf die relative mRNA-Menge von IL-1 $\alpha$**

Die BV2 Mikrogliazellen wurden 24 h mit und ohne LPS (1  $\mu$ M) und Zugabe von IP10.C9 (1  $\mu$ M) und A1.002 (1  $\mu$ M) kultiviert. Zellen ohne Zusätze dienten als Kontrolle. Es wurden drei Glukosekonzentrationen verwendet. Durch die RT-qPCR-Messungen wurden die relative IL-1 $\alpha$ -mRNA-Menge bestimmt und auf das *Housekeeping-Gene* PSA normiert [n=4; Mann-Whitney: \*p<0,05; \*\*p<0,01]. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der relativen mRNA-Menge von IL-1 $\alpha$  nach Zugabe von LPS unter allen drei Kulturbedingungen. Bei 5 mM und 25 mM Glukosekonzentrationen im Nährmedium konnte eine signifikante Abnahme in der relativen mRNA-Menge von IL-1 $\alpha$  durch Gabe von A1.002 in unstimulierten BV2 Mikrogliazellen gezeigt werden. **A:** relative mRNA-Menge von IL-1 $\alpha$  nach Kultivierung in DMEM mit 5 mM Glukose; **B:** relative mRNA-Menge von IL-1 $\alpha$  nach Kultivierung in RPMI mit 11 mM Glukose; **C:** relative mRNA-Menge von IL-1 $\alpha$  nach Kultivierung in DMEM mit 25 mM Glukose.

#### 4.4 Einfluss von LPS und pharmakologischen Inhibitoren der APN auf die Expression von IL-1 $\beta$ und TNF- $\alpha$ in BV2 Mikrogliazellen

Es wurden die Veränderungen der IL-1 $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -mRNA-Mengen in Abhängigkeit zur Stimulation mit LPS bzw. der Gabe von IP10.C9 oder A1.002 untersucht (Abb. 14). Aus der Stimulation der BV2 Mikrogliazellen mit LPS (Abb. 14 A) resultierte ein Anstieg der relativen IL-1 $\beta$  mRNA-Menge auf 29117 [26911; 32357] %. Diese proinflammatorische Reaktion zeigte sich in einer signifikanten Steigerung der TNF- $\alpha$ -Expression nach Stimulation mit LPS (837,6 [452,2; 1012] %) (Abb. 14 B). Die

stimulierten BV2 Mikrogliazellen führten zu einer signifikanten Zunahme der relativen IL-1 $\beta$ -mRNA-Menge nach Gabe von IP10.C9 (36953 [35422; 37834] %) und zu einer tendenziellen Verringerung nach Gabe von A1.002 um 7462 % (21655 [15910; 28459] %).

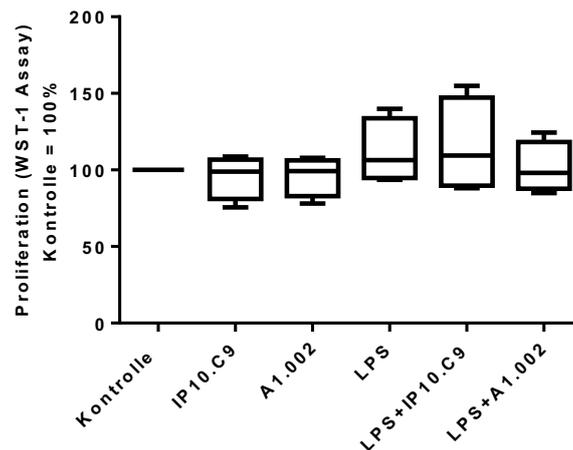


**Abbildung 14: Einfluss von LPS und pharmakologischen Inhibitoren der APN auf die IL-1 $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -mRNA-Menge**

Die BV2 Mikrogliazellen wurden 24 h in Nährmedium mit 11 mM Glukosekonzentration mit und ohne LPS (1  $\mu$ M) und Zugabe von IP10.C9 (1  $\mu$ M) und A1.002 (1  $\mu$ M) kultiviert. Zellen ohne Zusätze dienten als Kontrolle. Durch die RT-qPCR-Messungen wurden die relative mRNA-Menge von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  bestimmt und auf das *Housekeeping-Gene* PSA normiert [n=4; Mann-Whitney: \*p<0,05]. Es konnte ein signifikanter Anstieg der relativen mRNA-Menge von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  durch LPS-Stimulation gezeigt werden. **A**: relative mRNA-Menge von IL-1 $\beta$ ; **B**: relative mRNA-Menge von TNF- $\alpha$ .

#### 4.5 Einfluss von LPS und pharmakologischen Hemmstoffen der APN auf das Proliferationsverhalten von BV2 Mikrogliazellen

Die BV2 Mikrogliazellen wurden für 4 Tage in Nährmedium mit 11 mM Glukosekonzentration und den in 3.2.11 beschriebenen Zusätzen kultiviert. Anschließend erfolgte die Durchführung des in Methodenteil 3.2.12 beschriebenen WST-1 Proliferationsassays. Die Auswertung erfolgte normiert auf die Kontrollgruppe. Die Stimulation mit LPS, sowie die Gabe der Inhibitoren der APN ergab keinen Einfluss auf die Proliferation der BV2 Mikrogliazellen (Abbildung 15).



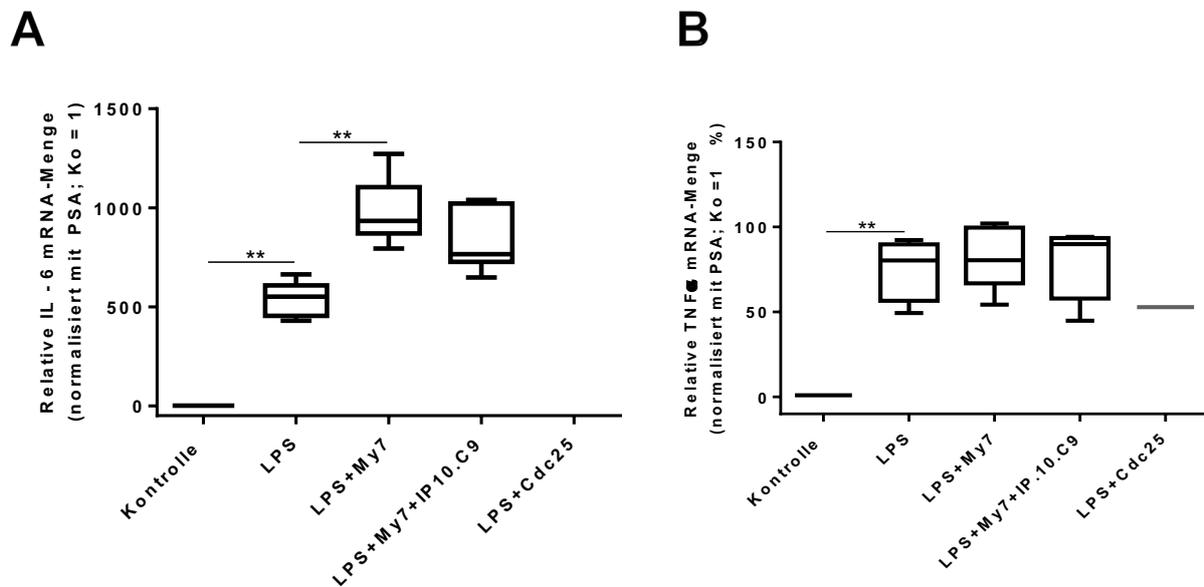
**Abbildung 15: Einfluss von LPS und verschiedener Inhibitoren der APN auf die Proliferation von BV2 Mikrogliazellen**

Die BV2 Mikrogliazellen wurden für vier Tage nach Zugabe von LPS (1  $\mu$ M) und IP10.C9 (1  $\mu$ M) oder A1.002 (1  $\mu$ M) in Nährmedium mit 11 mM Glukosekonzentration kultiviert. Dargestellt sind die Veränderungen der Proliferation (%) in Abhängigkeit von der Zugabe von LPS, IP10.C9 und A1.002 in Bezug auf die Kontrollgruppe (100%). Es zeigten sich in vier unabhängigen Versuchen keine signifikanten Unterschiede im Proliferationsverhalten der BV2 Zellen in Abhängigkeit zur Gabe von LPS, IP10.C9 und A1.002.

#### 4.6 Einfluss des APN-Antikörpers My7 und des APN-Inhibitors IP10.C9 auf die Expression von IL-6 und TNF- $\alpha$ in BV2 Mikrogliazellen

Die BV2 Mikrogliazellen wurden in Anwesenheit von IP10.C9 oder dem monoklonalen Anti-CD13-Antikörper My7 vorkultiviert. Nach 30 Minuten wurde LPS für 3 h hinzugegeben und anschließend die Veränderungen der relativen mRNA-Mengen von IL-6 und TNF- $\alpha$  untersucht. Die Stimulation der BV2 Mikrogliazellen mit LPS führte zu einer Verstärkung der Expression von IL-6 und TNF- $\alpha$ . Die IL-6-mRNA-Menge konnte auf 550 [455; 608] % (Abb. 16 A), die von TNF- $\alpha$  auf 80 [56,5; 89,9] % (Abb. 16 B) gesteigert werden. Die Zugabe von My 7 und LPS ergab eine signifikante Steigerung der relativen mRNA-Menge von IL-6 (933 [870; 1103] %). Die zusätzliche Zugabe von IP10.C9 (Abb. 16 A) resultierte in einer tendenziellen Verringerung der relativen mRNA-Menge von IL-6 im Vergleich zur Gruppe, die nur mit LPS und My7 behandelt wurde (765 [727; 1022] %). Zusätzlich wurden die BV2 Mikrogliazellen eine halbe Stunde vor Aktivierung mit LPS mit dem Anti-Cdc25- Antikörper vorkultiviert. Der Antikörper diente als IgG-Isotyp-Kontrolle des CD13-Antikörpers My7. Wie in Abbildung 15 zu sehen, konnte durch Zugabe des Cdc25-Antikörpers die relative

mRNA-Menge von IL-6 und TNF- $\alpha$ , im Vergleich zur Gruppe stimulierter BV2 Mikrogliazellen, nicht weiter gesteigert werden (IL-6: 460-fach TNF- $\alpha$ : 65-fach). Dieses Ergebnis bestätigt die spezifische Wirkung des von My7 auf die Induktion der Zytokinproduktion.



**Abbildung 16: Einfluss des Anti-CD13-Antikörpers My7 und des Anti-Cdc25-Antikörpers auf die Aktivierung der BV2 Mikrogliazellen**

Die BV2 Mikrogliazellen wurden in Nährmedium mit 11 mM Glukosekonzentration in einer 6-Well-Platte kultiviert. Anschließend wurde der APN-Antikörper My7 (10  $\mu$ g/ml), IP10.C9 (1  $\mu$ M) und Cdc25 (10  $\mu$ g/ml) hinzugegeben. Nach 30 Minuten wurden die BV2 Mikrogliazellen für 3 h mit LPS (1  $\mu$ M) stimuliert. Zellen ohne Zusätze dienten als Kontrolle. Durch die RT-qPCR-Messungen wurden die relative mRNA-Menge von IL-6 und TNF- $\alpha$  bestimmt und auf das *Housekeeping-Gene* PSA normiert [n=4; Mann-Whitney: \*\*p<0,01]. Es konnte eine signifikante Erhöhung der relativen mRNA-Menge von IL-6 und TNF- $\alpha$  gezeigt werden. Durch die zusätzliche Gabe des CD13-Antikörpers My7 konnte die relative mRNA-Menge von IL-6 weiter gesteigert werden. **A**: relative mRNA-Menge von IL-6; **B**: relative mRNA-Menge von TNF- $\alpha$

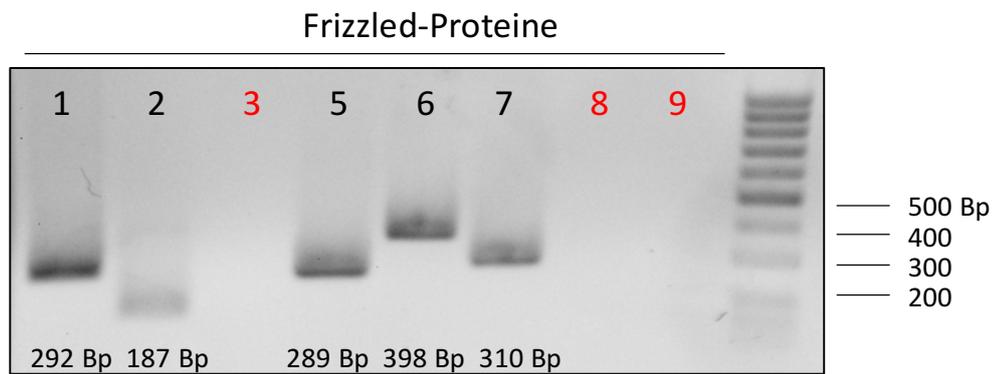
## 4.7 Expression der Komponenten des Wnt Signalweges in BV2 Mikrogliazellen

### 4.7.1 Basale Expression der Komponenten des Wnt Signalweges

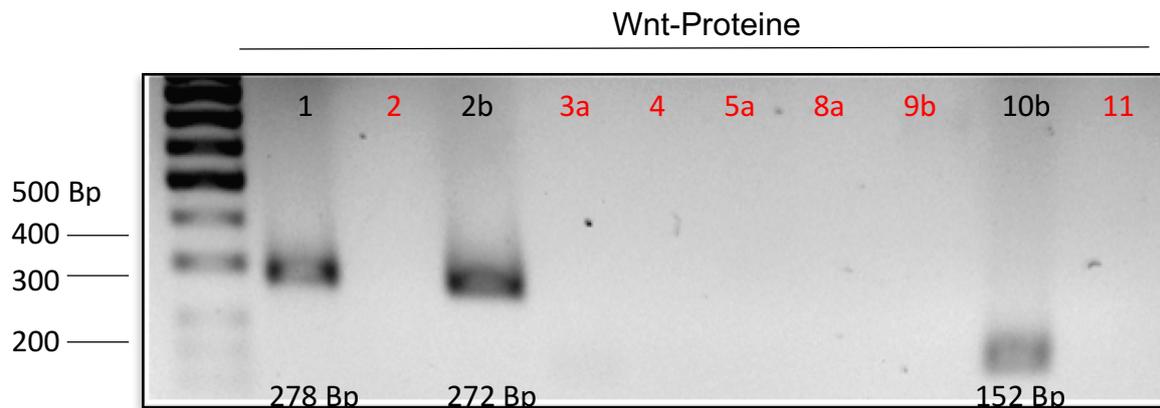
Der Wnt Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Fettstoffwechsels, Zellmigration und Polarität, bei nahezu allen Prozessen der Embryonalentwicklung, sowie bei der Regeneration von Stammzellen. Des Weiteren ist beschrieben, dass der Wnt Signalweg auch im Rahmen von Krebserkrankungen und immunologischen

Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt. Wichtigste Komponenten sind die Frizzled- und Wnt- Proteine. Dabei stellen die Fzd-Proteine die Rezeptoren und die Wnt-Proteine die Liganden des Signalweges dar. Um die basale Expression der Komponenten des Wnt Signalweges in BV2 Mikrogliazellen auf Genebene zu untersuchen, wurden diese ohne Zusätze kultiviert und nach der RT-qPCR die Produkte zur Elektrophorese auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

### A



## B

**Abbildung 17: Basale Expression der Komponenten des Wnt Signalweges**

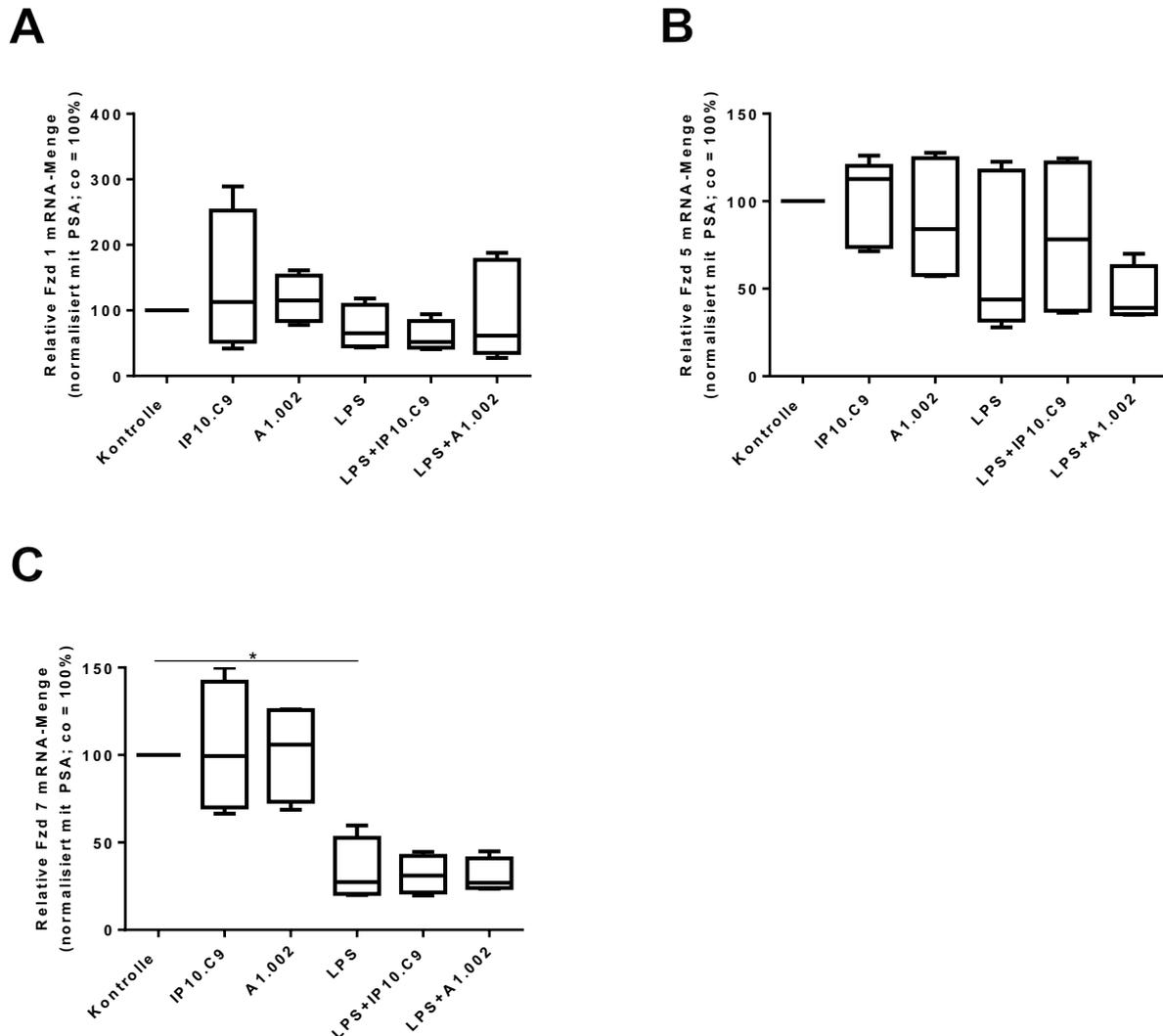
Die BV2 Mikrogliazellen wurden 24 h ohne Zusätze kultiviert. Das Produkt der RT-qPCR wurde für die Agarose-Gelelektrophorese verwendet, um die Größe der jeweiligen DNA-Fragmente zu überprüfen. **A:** Exprimiert zeigten sich die Frizzled-Proteine 1 (292 Bp), 2 (187 Bp), 5 (289 Bp), 6 (398 Bp) und 7 (310 Bp) und als die jeweilige Bande im Gel dargestellt. Die Frizzled-Proteine 3, 8 und 9 werden auf den BV2 Mikrogliazellen nicht exprimiert. Der DNA-Marker wurde rechts im Gel aufgetragen. **B:** Gezeigt sind die durch die BV2 Zellen exprimierten Wnt-Proteine 1 (278 Bp), 2b (272 Bp) und 10b (152 Bp). Die Wnt-Proteine 2, 3a, 4, 5a, 8a, 9b und 11 wurden nicht exprimiert. Der DNA-Marker wurde links im Bild aufgetragen.

#### 4.7.2 Einfluss von LPS und pharmakologischen Hemmstoffen der APN auf die Expression verschiedener Frizzled-Proteine

Je nachdem welche Fzd-Rezeptoren exprimiert werden und in Abhängigkeit des vorhandenen Liganden können unterschiedliche Signalwege aktiviert werden. Auf Ebene der mRNA wurden mittels RT-qPCR die Veränderungen, der in Abbildung 17 dargestellten Fzd-Proteine in Abhängigkeit zur Zugabe von LPS, IP10.C9 und A1.002 untersucht.

Durch die Stimulation mit LPS zeigten sich tendenziell verminderte mRNA-Mengen von Fzd1 (65 [45, 109] %), aber keine signifikanten Veränderungen. Die Untersuchungen der Fzd5-mRNA-Mengen ergaben vergleichbare Veränderungen durch die Stimulation mit LPS (44 [31,8; 117] %). Nach Zugabe von LPS konnte ebenfalls eine signifikante Verringerung der relativen mRNA-Menge von Frizzled 7 auf 27 [20; 53] % detektiert werden. Die Zugabe von IP10.C9 und A1.002 ergab sowohl in

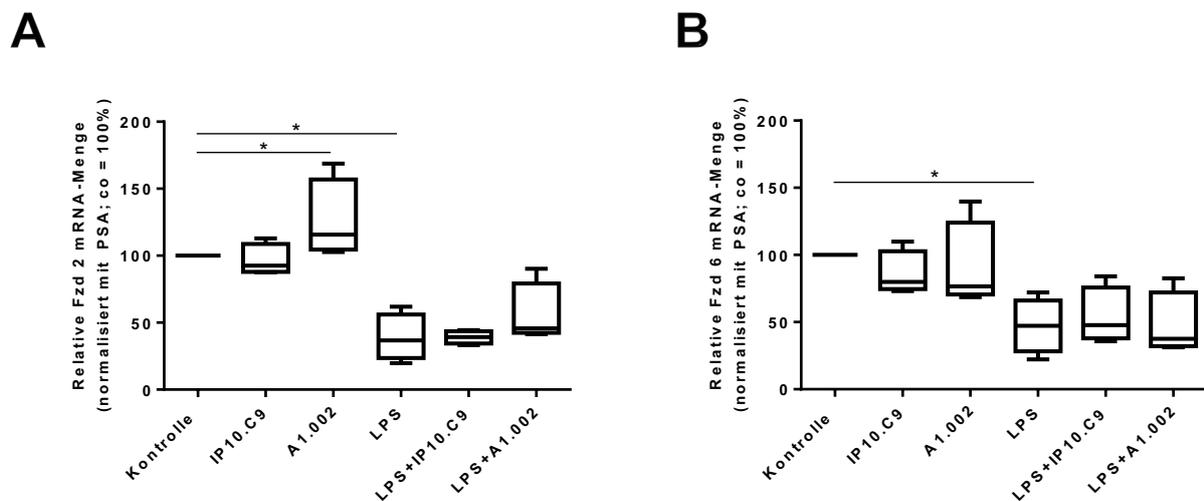
der Gruppe der unstimulierten BV2 Mikrogliazellen als auch in der der stimulierten BV2 Mikrogliazellen keine Veränderungen in der relativen mRNA-Menge der Frizzled Proteine 1, 5 oder 7.



**Abbildung 18: Einfluss von LPS und pharmakologischen Hemmstoffen der APN auf die Expression von Fzd 1, Fzd 5 und Fzd 7**

Die BV2 Mikrogliazellen wurden 24 h in Nährmedium mit 11 mM Glukosekonzentration mit und ohne LPS (1  $\mu$ M) und IP10.C9 (1  $\mu$ M) und A1.002 (1  $\mu$ M) kultiviert. Zellen ohne Zusätze dienten als Kontrolle. Durch die RT-qPCR-Messungen wurden die relative mRNA-Menge von Frizzled 1, Frizzled 5 und Frizzled 7 bestimmt und auf das *Housekeeping-Gene* PSA normiert [n=4; Mann-Whitney: \*p<0,05]. Nach Stimulation mit LPS konnte eine signifikante Verringerung der relativen Fzd 7-mRNA-Menge detektiert werden. Für Fzd5 und Fzd 1 zeigten sich keine signifikanten Veränderungen. **A:** relative mRNA-Menge von Frizzled 1 **B:** relative mRNA-Menge von Frizzled 5 **C:** relative mRNA-Menge von Frizzled 7

Für die untersuchten Kultivierungsbedingungen bedingt die Aktivierung der BV2 Mikrogliazellen durch LPS eine signifikante Verringerung der Fzd 2- (11 mM Glc: 37 [23; 56] %) und Fzd 6- (11 mM Glc: 47 [28; 66] %) mRNA-Mengen. Nach Zugabe von A1.002 und Kultivierung der unstimulierten BV 2 Mikrogliazellen mit einer 11 mM Glukosekonzentration konnten Veränderungen in der relativen mRNA-Menge von Fzd 2 detektiert werden. Die Fzd 2-mRNA-Menge konnte auf 116 [104; 157] % erhöht werden. Die Expression von Frizzled 6 konnte durch die Zugabe der APN-Inhibitoren nicht beeinflusst werden.



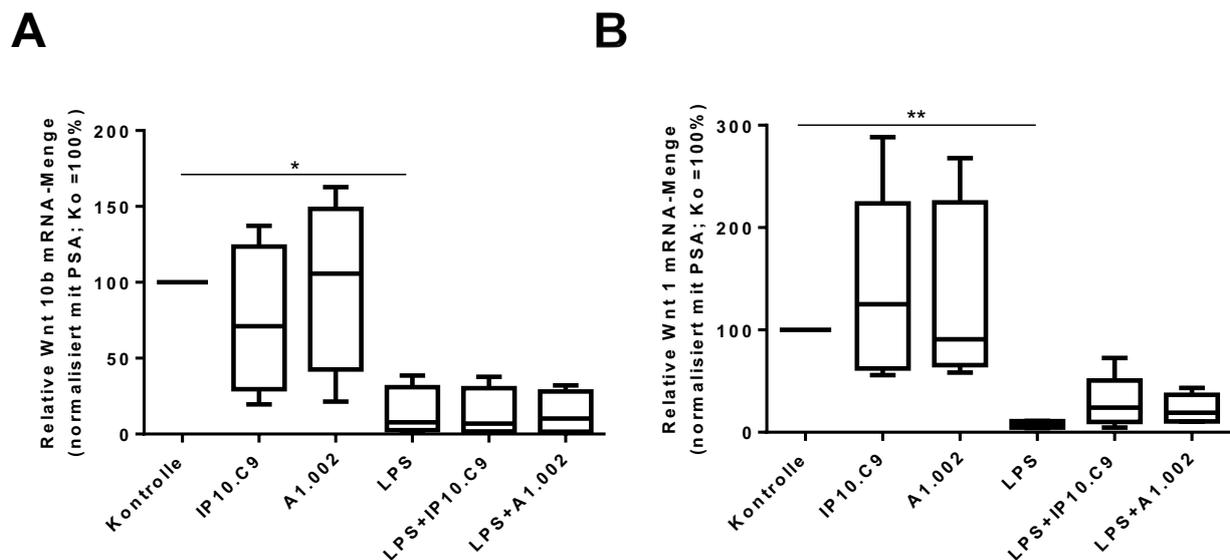
**Abbildung 19: Einfluss von LPS und pharmakologischen Inhibitoren der APN auf die Fzd 2- und Fzd 6-mRNA-Menge**

Die BV2 Mikrogliazellen wurden 24 h in Nährmedium 11 mM Glukosekonzentration und LPS (1  $\mu$ M), IP10.C9 (1  $\mu$ M) oder A1.002 (1  $\mu$ M) kultiviert. Zellen ohne Zusätze dienten als Kontrolle. Durch die RT-qPCR-Messungen wurden die relativen mRNA-Mengen von Frizzled 2, Frizzled 6 bestimmt und auf das *Housekeeping-Gene* PSA normiert [n=4; Mann-Whitney: \*p<0,05]. Nach Stimulation mit LPS ergaben sich signifikante Verringerungen der Fzd 2- und Fzd 6-mRNA-Mengen. Die BV2 Mikrogliazellen, die mit 11 mM Glukosekonzentration und ohne LPS kultiviert wurden, zeigten eine signifikante Erhöhung der relativen mRNA-Menge von Fzd 2 nach Gabe von IP.10.C9. **A:** relative mRNA-Menge von Frizzled 2 nach Kultivierung der BV-2 Mikrogliazellen in Nährmedium mit 11 mM Glukosekonzentration; **B:** relative mRNA-Menge von Frizzled 6 nach Kultivierung der BV-2 Mikrogliazellen in Nährmedium mit 11 mM Glukosekonzentration

#### 4.7.3 Der Einfluss von LPS und pharmakologischen Hemmstoffen der APN auf die Expression von Wnt 1 und Wnt 10b

Nachdem verdeutlicht werden konnte, dass die unstimulierten BV2 Mikrogliazellen verschiedene Wnt-Proteine exprimieren, wurden die Veränderungen von Wnt 1 und Wnt 10b durch die Zugabe von LPS, IP10.C9 und A1.002 untersucht.

Auch für Wnt 1 und Wnt 10b konnte eine signifikante Verringerung der relativen mRNA-Menge nach Zugabe von LPS (Wnt 10b: 8 [3; 31] %; Wnt 1: 8 [5,11] %) dargestellt werden.



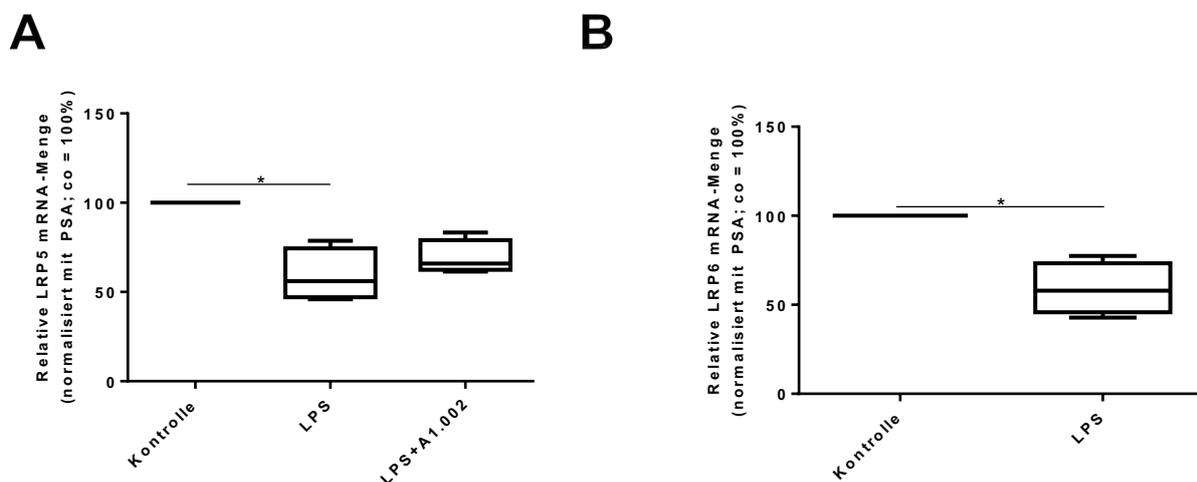
**Abbildung 20: Einfluss von LPS und pharmakologischen Inhibitoren der APN auf die relative mRNA-Menge von Wnt 10b und Wnt 1**

Die BV2 Mikrogliazellen wurden 24 h in Nährmedium mit 11 mM Glukosekonzentration, mit LPS (1  $\mu$ M), IP10.C9 (1  $\mu$ M) und A1.002 (1  $\mu$ M) kultiviert. Zellen ohne Zusätze dienten als Kontrolle. Durch die RT-qPCR-Messungen wurden die relativen mRNA-Mengen von Wnt 10b und Wnt 1 bestimmt und auf das *Housekeeping-Gene* PSA normiert [n=4; Mann-Whitney: \*p<0,05, \*\*<0,01]. Sowohl für Wnt 10b, als auch für Wnt 1 konnte eine verringerte Expression durch LPS detektiert werden. **A**: relative mRNA-Menge von Wnt 10b bei 11 mM Glukosekonzentration; **B**: relative mRNA-Menge von Wnt 1 bei 11 mM Glukosekonzentration

#### 4.7.4 Einfluss von LPS und pharmakologischen Hemmstoffen der APN auf Komponenten des Wnt Signalweges

Die Proteine LRP5 und LRP6 sind die Co-Rezeptoren der Frizzled-Rezeptoren, direkt an diese gekoppelt und stellen eine Schlüsselposition in der Aktivierung des Wnt Signalweges dar. Eine weitere Schaltstelle des Signalweges sind die Dishevelled-

Proteine. Die BV2 Mikrogliazellen wurden mit LPS, A1.002 oder IP10.C9 kultiviert und die Veränderungen der relativen mRNA-Menge der Co-Rezeptoren und Dishevelled-Proteine mittels RT-qPCR untersucht. Dafür wurde zuerst ein Probenpool (n=4) untersucht. Die Gabe von IP10.C9 führte nicht zu signifikanten Veränderungen in den LRP5- und LRP6-mRNA-Mengen (Daten nicht gezeigt). Durch A1.002 und LPS ergaben sich Veränderungen, die im Folgenden genauer untersucht wurden. Es konnten deutliche Veränderungen der mRNA-Mengen der Co-Rezeptoren LRP5 und LRP6 durch die Aktivierung der BV2 Mikrogliazellen dargestellt werden. Nach Stimulation mit LPS verringerte sich die relative mRNA-Menge von LRP5 auf 56 [47; 74] % und die von LRP6 auf 58 [46; 73] %.

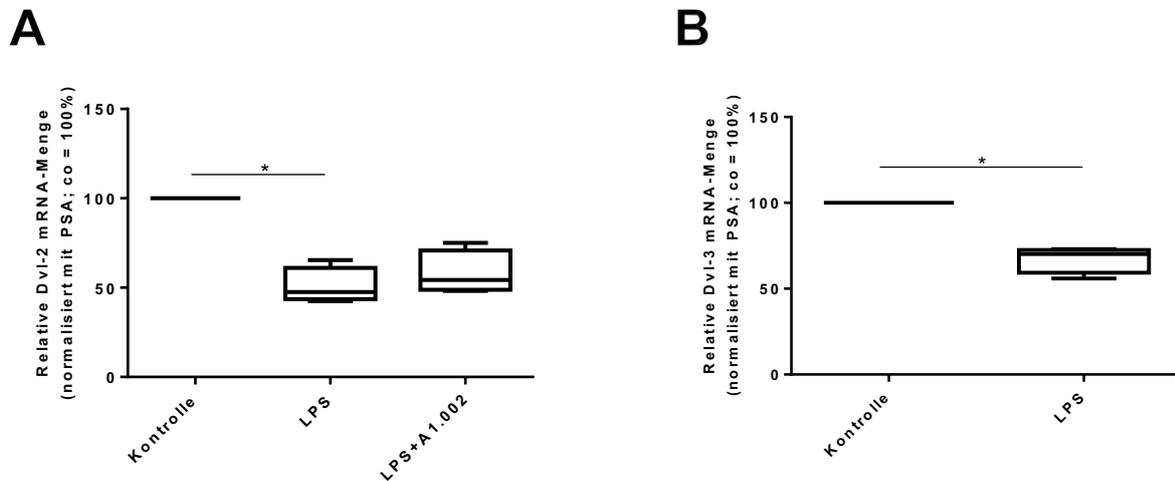


**Abbildung 21: Einfluss von LPS auf die LRP5- und LRP6-mRNA-Mengen sowie der Einfluss von A1.002 auf die relative mRNA-Menge von LRP5**

Die BV2 Mikrogliazellen wurden 24 h in Nährmedium mit 11 mM Glukosekonzentration und LPS (1  $\mu$ M) und A1.002 (1  $\mu$ M) kultiviert. Zellen ohne Zusätze dienten als Kontrolle. Durch die RT-qPCR-Messungen wurden die relative mRNA-Menge von LRP5 und LRP6 bestimmt und auf das *Housekeeping-Gene* PSA normiert [n=4; Mann-Whitney: \*p<0,05]. Es konnte eine signifikante Verringerung der relativen mRNA-Menge von LRP5 und LRP6 durch die Gabe von LPS gezeigt werden. **A**: relative mRNA-Menge von LRP5; **B**: relative mRNA-Menge von LRP6

Vergleichbare Ergebnisse zu den Veränderungen von LRP5 und LRP6 konnten für Dvl-2 und Dvl-3 dargestellt werden (Abb. 22). Für Dvl-1 ergaben sich keine Veränderungen im Probenpool nach Zugabe von LPS, IP10.C9 oder A1.002 (Daten nicht gezeigt). Die relative mRNA-Menge von Dvl-2 verringerte sich durch die Aktivierung der BV2 Mikrogliazellen auf 47 [44; 61] % und auf 70 [60; 73] % für Dvl-3.

Durch die Zugabe von A1.002 konnte ein leichter Anstieg der relativen mRNA-Menge von Dvl-2 (54 [49; 71] %), detektiert werden.



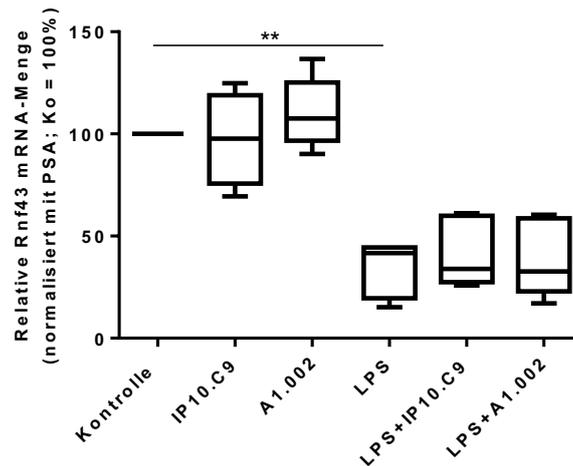
**Abbildung 22: Einfluss von LPS und A1.002 auf die Dvl-2-mRNA-Menge sowie der Einfluss von LPS auf die DVI-3-mRNA-Menge**

Die BV2 Mikrogliazellen wurden 24h in Nährmedium mit 11 mM Glukosekonzentration und LPS (1  $\mu$ M) und A1.002 (1  $\mu$ M) kultiviert. Zellen ohne Zusätze dienten als Kontrolle. Durch die RT-qPCR-Messungen wurden die relative mRNA-Menge der Dishevelled-Proteine 2 und 3 bestimmt und auf das *Housekeeping-Gene* PSA normiert [n=4; Mann-Whitney: \*p<0,05]. Die Dishevelled-Proteine 2 und 3 zeigten nach Kultivierung der BV2 Mikrogliazellen mit LPS ebenfalls eine signifikante Verringerung der relativen mRNA-Menge. **A**: relative mRNA-Menge von Dvl-2; **B**: relative mRNA-Menge von Dvl-3

#### 4.7.5 Einfluss von LPS und pharmakologischen Hemmstoffen der APN auf die Expression von RNF 43

Der Wnt Signalweg kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Das RNF 43 Protein kann zur Hemmung des Wnt Signalweges über die Frizzled-Proteine führen [80]. Die BV2 Mikrogliazellen wurden in Nährmedium mit 11 mM Glukosekonzentration und Zugabe von LPS, IP10.C9 und A1.002 kultiviert. Die Veränderungen wurden auf mRNA-Ebene mittels RT-qPCR untersucht.

Die Stimulation mit LPS führte zu einer signifikanten Verringerung der RNF 43-mRNA-Menge in BV2 Mikrogliazellen (42 [20; 45] %). Es konnten keine Veränderungen durch die Gabe der APN-Inhibitoren dargestellt werden.

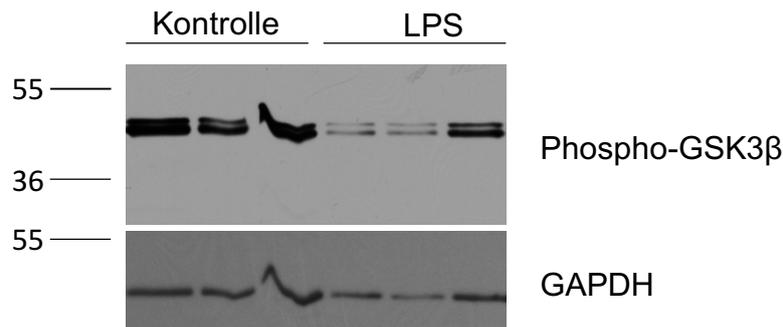


**Abbildung 23: Einfluss von LPS und pharmakologischen Hemmstoffen der APN auf die relative mRNA-Menge von RNF 43**

Die BV2 Mikrogliazellen wurden 24 h in Nährmedium mit 11 mM Glukosekonzentration mit und ohne LPS (1  $\mu$ M), IP10.C9 (1  $\mu$ M) oder A1.002 (1  $\mu$ M) kultiviert. Zellen ohne Zusätze dienten als Kontrolle. Durch die RT-qPCR-Messungen wurden die relativen mRNA-Mengen von RNF43 bestimmt und auf das *Housekeeping-Gene* PSA normiert [n=4; Mann-Whitney: \*\*p<0,01]. Die relative mRNA-Menge von RNF 43 konnte durch die Stimulation mit LPS signifikant verringert werden.

#### 4.7.6 Veränderungen in der Proteinexpression von Phospho-GSK3 $\beta$ nach LPS Stimulation der BV2 Mikrogliazellen

GSK3 $\beta$  ist ein wichtiger Bestandteil des  $\beta$ -Catenin-abhängigen Wnt Signalweges. GSK3 $\beta$  bildet zusammen mit Axin und APC, sowie weiteren Proteinen, einen Komplex, der den proteasomalen Abbau von  $\beta$ -Catenin initiiert. Um Veränderungen des phosphorylierten GSK3 $\beta$  in BV2 Zellen zu untersuchen wurde die Proteinmenge im Zelllysate nach Proteinisolation bestimmt und eine Immunoblot-Analyse durchgeführt. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz-Exposition auf einem Röntgenfilm und densitometrischer Auswertung des spezifischen Phospho-GSK3 $\beta$ -Signals bei 46 kDa. Charakteristischerweise zeigt Phospho-GSK3 $\beta$  Doppelbanden in der Immunoblot-Analyse. Zur Normierung der Daten diente GAPDH. Es stellte sich heraus, dass die Stimulation von BV2-Mikrogliazellen mit LPS zu einer Verringerung der Proteinmenge von Phospho-GSK3 $\beta$  führt.



#### Abbildung 24: Quantifizierung der GSK3β-Proteinmenge nach LPS-Stimulation

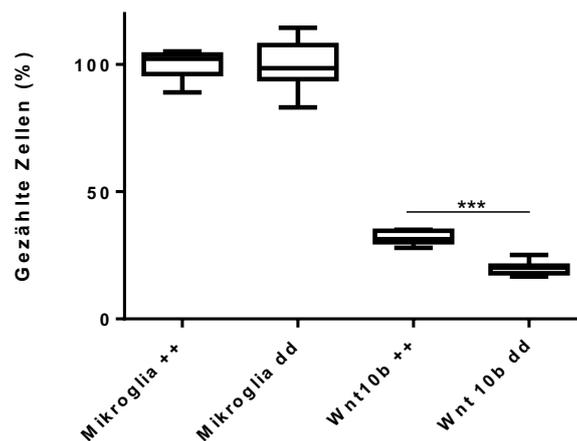
BV2 Mikrogliazellen wurden 24 h mit LPS (1  $\mu$ M) stimuliert und anschließend die Proteine isoliert. Nach Durchführung der Immunoblotanalyse erfolgte die Detektion mittels Chemilumineszenz-Exposition. Die Normierung erfolgte mit GAPDH. Es wurden drei unabhängige Versuche mit und ohne LPS-Stimulation durchgeführt. Den detektierten Doppelbanden für GSK3 $\beta$  lag wie das zu erwartende Molekulargewicht bei 46 kDa. Die Bande für GAPDH befindet sich bei 36kDa.

#### 4.8 Proteinexpression von Wnt 10b in primären murinen Mikrogliazellen

Die Expression von Wnt 10b wurde in primären murinen Mikrogliazellen aus Wildtyp- und CD13-Knockout Mäusen untersucht. Die histologischen Schnitte wurden nach einem etablierten Protokoll erstellt und anschließend ausgewertet. Es wurde der Anteil Wnt 10b positiver Mikrogliazellen im Motorkortex Wildtyp- und CD13-Knockout-Mäusen untersucht. Der verwendete Iba 1 Antikörper diente der Identifizierung der Mikrogliazellen.

Zwischen den Zellzahlen der rechten und linken Gehirnhälfte konnten keine Unterschiede detektiert werden, sodass im Folgenden die Zellzahlen der Mikrogliazellen des gesamten Motorkortex verglichen wurden (Daten nicht gezeigt). In 35 Schnitten des Motorkortex von je zwei CD13-WT Mäusen konnten durchschnittlich 56 Iba 1 positive Mikrogliazellen je Gesamtausschnitt ausgezählt werden, von denen durchschnittlich 18 je Schnitt Wnt 10b positiv waren. In 40 Schnitten des Motorkortex von je zwei CD13-KO Mäusen konnten durchschnittlich 56 Iba 1 positive Mikrogliazellen je Gesamtausschnitt gezählt werden, von denen durchschnittlich 5,5 je Schnitt Wnt 10b positiv waren.

Es ließen sich keine Unterschiede zwischen den Iba 1 positiven Mikrogliazellen im Motorkortex von Wildtyp Mäusen und den Iba 1 positiven Mikrogliazellen im Motorkortex von CD13-Knockout Mäusen darstellen (Abb.25). In den CD13-Knockout Mäusen zeigte sich der Anteil an Wnt 10b positiven Mikrogliazellen signifikant vermindert (++: 20 [17;25] %; dd: 31[28;35] %).

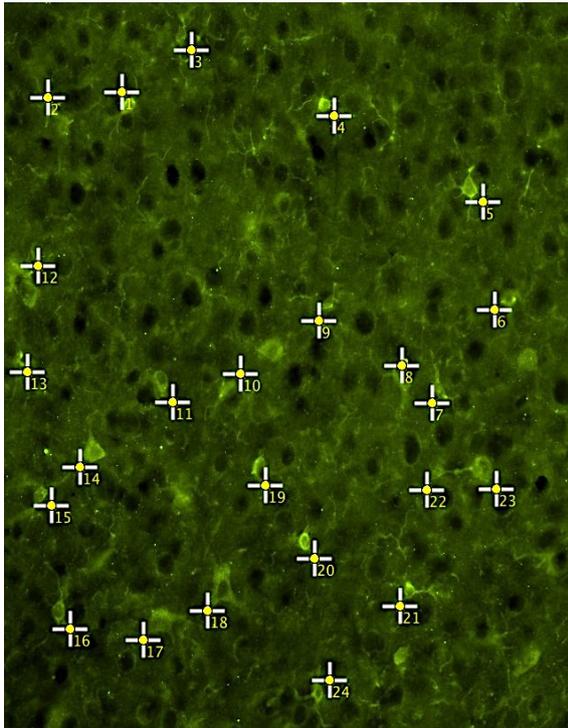


#### Abbildung 25: Expression von Wnt 10b in primären murinen Mikrogliazellen

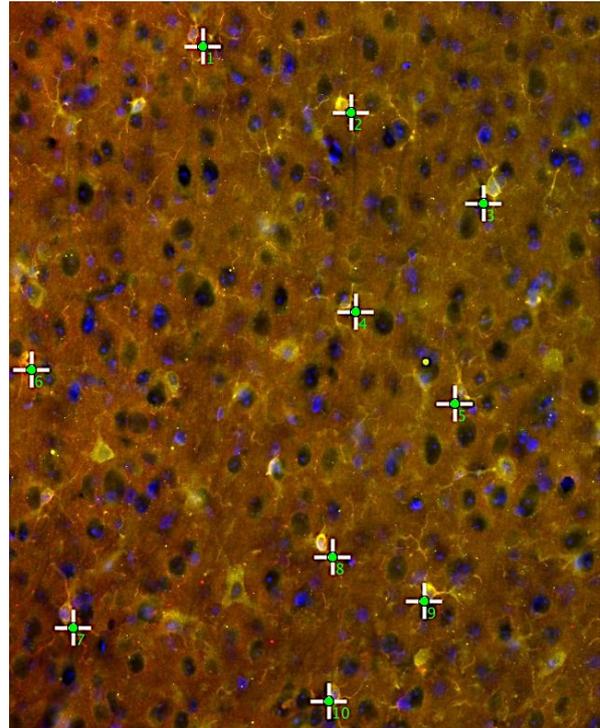
Nach der Herstellung histologischer Schnitte, wie in 3.2.14.2 beschrieben, wurde die Zellzahl der Iba 1 positiven Mikrogliazellen aus zwei WT und zwei CD13-KO Mäusen bestimmt. (Mikrogliia der WT Mäuse = 100 %). Anschließend wurde der Anteil Wnt10b positiver Mikrogliazellen bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Mann-Whitney [n=8; Mann-Whitney: \*\*\* p<0,001]. Es zeigte sich ein signifikant verringerter Anteil an Wnt10b positiven Mikrogliazellen in den KO Mäusen im Vergleich zu den WT Mäusen.

Exemplarisch sind in Abbildung 26 einzelne Ausschnitte des Motorkortex von CD13-Knockout und Wildtyp-Mäusen nach Immunhistochemischer Doppelfärbung dargestellt. Die Iba 1 positiven Mikrogliazellen wurden durch die gelben Kreuze markiert, sowie die Iba 1/ Wnt 10b positiven Mikrogliazellen durch die grünen Kreuze.

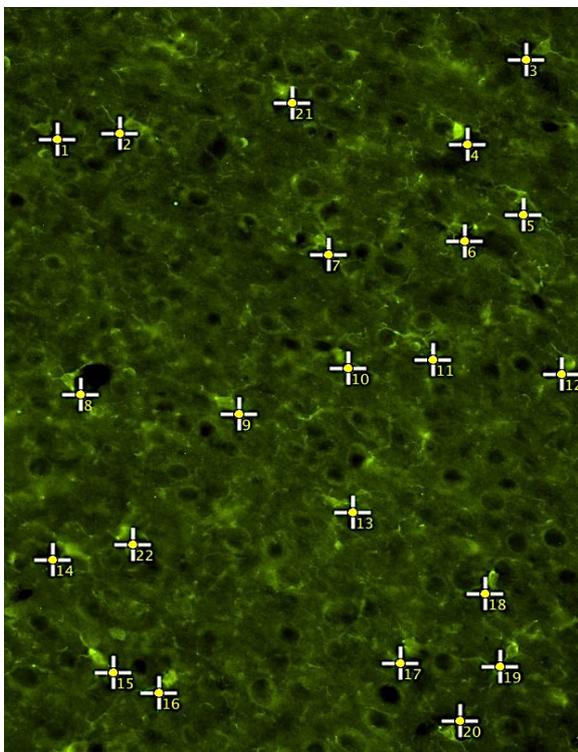
**A**



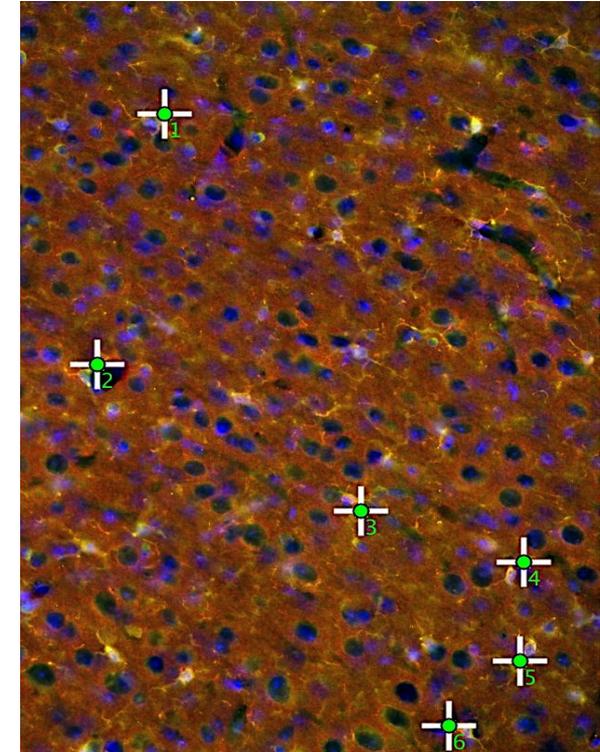
**B**



**C**



**D**

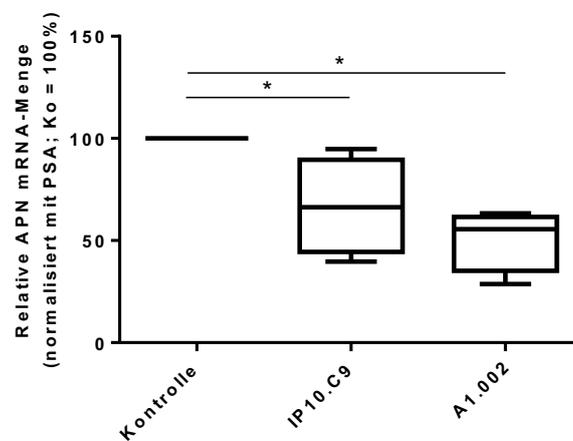


### Abbildung 26: Fluoreszenzbilder des Motorkortex von CD13-Knockout und Wildtyp-Mäusen

Dargestellt sind Ausschnitte des Motorkortex von CD13-Knockout und Wildtyp-Mäusen. Die Bilder wurden wie in 3.2.14.6 beschrieben ausgewertet. **A:** Anzahl Iba 1 positiven Mikrogliazellen im Motorkortex von Wildtyp-Mäusen. **B:** Anzahl der Iba 1 und Wnt 10b positiven Mikrogliazellen im Motorkortex von Wildtyp-Mäusen. **C:** Anzahl der Iba 1 positiven Mikrogliazellen im Motorkortex von CD13-Knockout-Mäusen. **D:** Anzahl der Iba 1 und Wnt 10b positiven Mikrogliazellen im Motorkortex von CD13-Knockout-Mäusen.

### 4.9 Einfluss von pharmakologischen Hemmstoffen der APN auf die Expression von APN in Splenozyten

Die isolierten Splenozyten aus Wildtyp (WT) Mäusen wurden für 24 h mit IP10.C9 oder A1.002 kultiviert. Es wurden die Veränderungen der relativen mRNA-Menge von APN untersucht. Nach Kultivierung der Splenozyten mit IP10.C9 konnte die APN-mRNA-Menge auf 66 [44; 89] % verringert werden. Der duale Inhibitor A1.002 konnte die relative mRNA-Menge von APN um weitere 10 % (56 [35; 62] %) verringern.

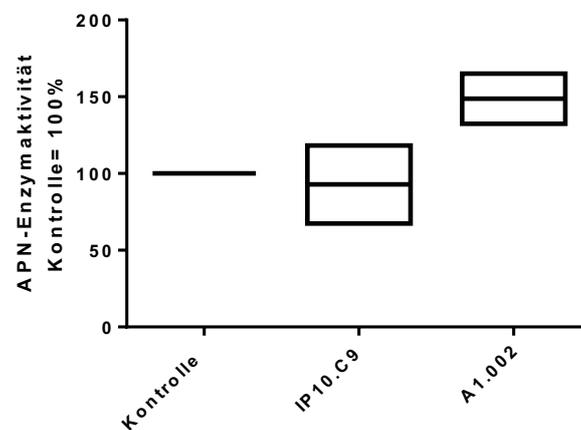


### Abbildung 27: Einfluss von IP10.C9 und A1.002 auf die mRNA-Menge von APN in Splenozyten

Die isolierten Splenozyten aus WT-Mäusen wurden 24 h in Nährmedium nach Hinzugabe der Inhibitoren IP10.C9 (1  $\mu$ M) oder A1.002 (1  $\mu$ M) kultiviert. Zellen ohne Zusätze dienten als Kontrolle. Durch die RT-qPCR-Messungen wurden die relative mRNA-Menge von APN bestimmt und auf das *Housekeeping-Gene* PSA normiert [n=4; Mann-Whitney: \*p<0,05]. Es zeigte sich sowohl nach Zugabe von IP10.C9 als auch bei A1.002 eine signifikante Verringerung der relativen mRNA-Menge von APN in Splenozyten.

#### 4.9.1 Einfluss der Inhibitoren der APN auf die APN-Enzymaktivität in Splenozyten

Es wurde die enzymatische Aktivität der Aminopeptidase N in isolierten Splenozyten aus WT-Mäusen untersucht. Die enzymatische Aktivität der Aminopeptidase N in Splenozyten wurde anhand der RB3014-hemmbareren Fraktion der Ala-pNA-Hydrolyse-Aktivität gemessen. Durch Zugabe von IP10.C9 zur Zellkultur zeigte sich eine tendenziell verminderte APN-Enzymaktivität (93 [67; 118] %). Die Zugabe von A1.002 zur Zellkultur hingegen führte zu einer Zunahme der APN-Enzymaktivität auf 149 [132; 165] %. Aufgrund des geringen Probenpools lassen sich keine abschließenden Aussagen treffen.



**Abbildung 28: Einfluss der Inhibitoren der APN auf die APN-Enzymaktivität in Splenozyten**

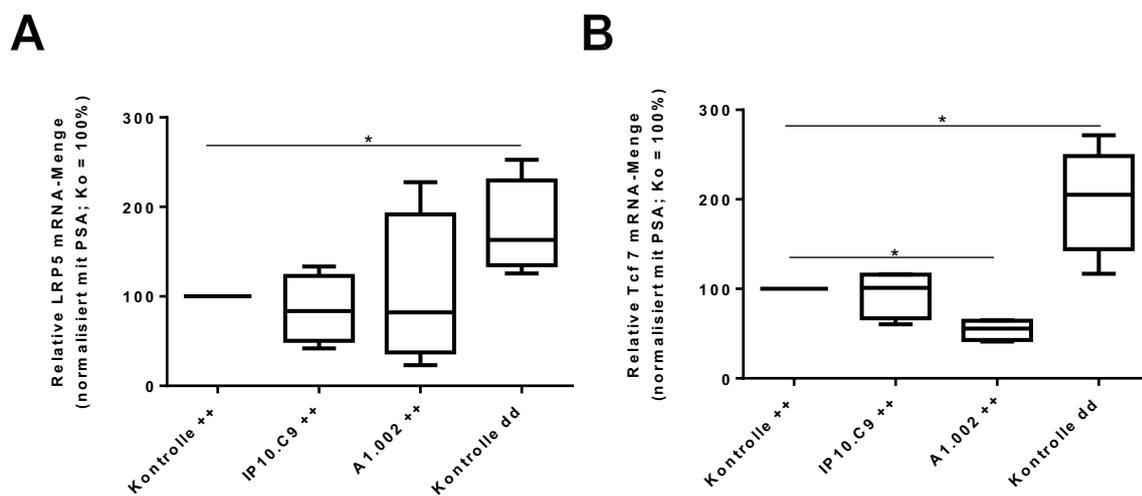
Die Splenozyten wurden 24 h in Nährmedium mit IP10.C9 (10  $\mu$ M) oder A1.002 (1  $\mu$ M). Die Werte beziehen sich auf die Kontrollgruppe ohne Zusätze (100 %). Es wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt.

#### 4.9.2 Einfluss pharmakologischer Hemmstoffe der APN auf Komponenten des Wnt Signalweges in Splenozyten aus WT- und CD13-KO-Mäusen

Nach Kultivierung der Splenozyten mit A1.002 und IP10.C9 wurde die relative mRNA-Menge von LRP5 und TCF7 untersucht. Für LRP5 konnten keine signifikanten Veränderungen nach Zugabe von IP10.C9 oder A1.002 detektiert werden. Dennoch ist eine tendenzielle Verringerung der LRP5 Expression zu erkennen. Dargestellt ist eine signifikante Erhöhung der relativen mRNA-Menge von LRP5 in der

Splenozytenpopulation der KO-Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe der Splenozytenpopulation der WT-Mäuse ohne Zusätze [163 (126; 253) %].

Die Zugabe von A1.002 führte in der Splenozytenpopulation der WT-Mäuse zu einer signifikanten Verringerung der TCF7-mRNA-Menge (56 [41; 65] %). Die relative mRNA-Menge von TCF7 blieb nach der Zugabe von IP10.C9 nahezu unverändert (101 [67; 116] %). Die TCF7-mRNA-Menge war in der Splenozytenpopulation der KO-Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe der WT-Mäuse signifikant erhöht [205 (117; 27) %].



**Abbildung 29: Einfluss pharmakologischer Inhibitoren der APN auf die relative mRNA-Menge von LRP5 und TCF7 in Splenozyten**

Die isolierten Splenozyten aus Wildtyp-Mäusen (++) und CD13 KO-Mäusen (dd) wurden 24 h in Nährmedium kultiviert. Den Splenozyten der Wildtyp-Mäuse wurden IP10.C9 (1  $\mu$ M) oder A1.002 (1  $\mu$ M) hinzugegeben. Zellen ohne Zusätze dienten als Kontrolle. Durch die RT-qPCR-Messungen wurden die LRP5- und TCF7-mRNA-Mengen bestimmt und auf das *Housekeeping-Gene* PSA normiert [n=4; Mann-Whitney: \*p<0,05]. Die LRP5- und TCF7-mRNA-Mengen zeigten sich in den KO-Mäusen signifikant erhöht.

### 5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener pharmakologischer Inhibitoren der APN auf die proinflammatorische Reaktion von Mikrogliazellen, sowie auf die Expression von Komponenten des Wnt Signalweges untersucht. Zusätzlich erfolgten Untersuchungen einzelner Komponenten des Wnt Signalweges an primären murinen Mikrogliazellen im genetischen CD13-Knockout Modell.

Die APN, eine konstitutiv exprimierte Aminopeptidase, spielt eine wichtige regulatorische Rolle für die Immunantwort. In zahlreichen Forschungsarbeiten konnte verdeutlicht werden, dass die Modulation der APN durch pharmakologische Inhibitoren immunmodulatorische Auswirkungen auf immunologische und neuroinflammatorische Erkrankungen hat [25]. Als hervorstechendes Modell ist die Rolle der APN in Mäusen mit Multipler Sklerose (EAE) beschrieben. In diesem Modell wurden die Mäuse mit verschiedenen Inhibitoren der APN behandelt, wodurch z.B. in aktivierten T-Zellen eine Unterdrückung der proinflammatorischen Zytokinausschüttung (z.B. IL-17) beobachtet werden konnte [39, 81]. Ähnliche therapeutische Effekte durch die Inhibitoren stellten sich in Bezug auf verschiedene Krebserkrankungen heraus. Durch die Therapie mit Bestatin, ein kompetitiver Inhibitor der APN, konnte die Aktivität der APN gehemmt und dadurch die Migration und Invasion von Tumorzellen gestoppt werden [28, 37, 82]. Da bisher vorrangig die Einflüsse der Inhibitoren auf Zellen des „peripheren“ Immunsystems untersucht wurden, ergibt sich als erste Fragestellung dieser Arbeit, welche Rolle die APN in Zellen des Zentralen Nervensystems in Bezug auf die Regulation der Immunantwort spielt. Die Rolle der APN für das ZNS und der Einfluss ihrer Inhibitoren auf die proinflammatorische Reaktion von Mikrogliazellen wurde im Rahmen dieser Arbeit an BV2 Mikrogliazellen, sowie an primären murinen Mikrogliazellen im genetischen CD13-Knockout-Modell untersucht werden. Eine weitere wichtige Schaltstelle immunologischer Prozesse stellt der Wnt Signalweg dar. In Forschungsarbeiten konnte dargestellt werden, dass es zwischen der Aktivität der APN, sowie ihrer Inhibitoren, und der Aktivität des Wnt Signalweges einen immunmodulatorischen Zusammenhang gibt [44, 83]. In aktivierten T-Zellen konnte nach Kultivierung (24h) mit Actinonin eine Expressionssteigerung von Wnt 5a, sowie eine Hemmung von GSK3 $\beta$  beobachtet werden, wodurch antiproliferative Prozesse verstärkt werden [44]. Ob sich dieser Zusammenhang in Mikrogliazellen bestätigen lässt wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

### 5.1 Mikrogliazellen – Fresszellen des Zentralen Nervensystems

Die verwendeten BV2 Mikrogliazellen sind eine murine Zelllinie, die durch Infektion primärer Mikrogliazellen mit einem v-raf/v-myc Retrovirus (J2) generiert wurden und vergleichbare morphologische, phänotypische und funktionelle Eigenschaften isolierter primärer Mikrogliazellen aufweisen [20]. Aufgrund der Heterogenität des Gehirns ist es technisch sehr aufwendig, eine große reine Population primär isolierter Mikrogliazellen zu generieren. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht etabliert werden, sodass die BV2 Mikrogliazellen verwendet wurden. Um die idealen Kulturbedingungen zu identifizieren wurden auf Grundlage der Literatur verschiedene Bedingungen untersucht. Die Zelllinie wurde in DMEM mit einer 25 mM Glukosekonzentration [84], in RPMI mit 11 mM Glukose [20] oder DMEM mit 5 mM Glukose [85] kultiviert. Die Bewertung der Kulturbedingungen erfolgte anhand der Untersuchungen zum Aktivierungsverhalten der BV2 Mikrogliazellen. Dafür wurde das Expressionsverhalten von IL-1 $\alpha$ , IL-6 und APN nach Stimulation mit LPS verglichen. Die verwendete LPS-Konzentration orientiert sich an den in der Literatur verwendeten LPS-Konzentrationen für die Stimulation von BV2 Mikrogliazellen [86, 87]. Zusätzlich wurden verschiedene LPS Konzentrationen im Rahmen einer Titration verglichen (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren kann die Konzentration abhängig von verschiedenen Chargen des LPS sehr unterschiedlich sein, sodass in allen Untersuchungen das LPS derselben Charge verwendet wurde. Die daraus, für die maximale Aktivierung der BV2 Mikrogliazellen resultierende Konzentration von 1  $\mu$ g/ml wurde für alle Untersuchungen angewandt.

Für die Inhibition der APN in BV2 Mikrogliazellen wurden zwei verschiedene Inhibitoren verwendet. Duale Inhibitoren wie IP10.C9, die sowohl die APN als auch die Dipeptidylpeptidase 4 (DP IV) hemmen, führen durch ihren additiven Effekt einen stärkeren immunmodulatorischen Einfluss als singuläre Inhibitoren der APN [9, 38]. In der Therapie von Colitis in Mäusen konnte dadurch stärkere immunsuppressive Effekte, wie die Aktivierung von TGF- $\beta$  und IL-10 oder die Unterdrückung der T-Zellreaktion beobachtet werden [9, 81]. In Bezug auf den Progress und die Therapie verschiedener maligner Erkrankungen ist Bestatin, ein spezifischer Inhibitor der APN, von großer Bedeutung [1, 6, 88]. Der zweite verwendete Inhibitor A1.002, ist ein spezifischer Inhibitor der APN, wodurch die spezifische Hemmung der APN untersucht werden kann [8].

Durch den dualen Inhibitor IP10.C9 konnte die IL-6 Expression signifikant, aber in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen, beeinflusst werden. Die Gabe von IP10.C9 führte bei 5 mM Glukose zu einem Expressionsanstieg von IL-6 um 24 %, bei 25 mM Glukose hingegen zu einem Abfall der IL-6 Expression um 60 %. Die Kultivierung der BV2 Mikrogliazellen unter hypo- (5 mM) und hyperglykämischen (25 mM) Bedingungen löst möglicherweise unspezifische Stressreaktionen bei BV2 Mikrogliazellen aus, die zu den zuvor aufgeführten und weiteren unspezifischen Reaktionen führen könnten. Da im Rahmen dieser Arbeit der spezifische Effekt der Inhibitoren und nicht Effekte der Inhibitoren in Abhängigkeit zum Glukosehaushalt untersucht werden sollte, wurden nachfolgende Untersuchungen mit RPMI (11 mM Glukose) durchgeführt, die am ehesten der physiologischen Glukosekonzentration von Mäusen (8–11 mM) entspricht [89].

### **5.2 Betrachtung der Wirkung verschiedener Inhibitoren der APN auf Mikrogliazellen im Vergleich zum genetischen CD13-Knockout in primären murinen Mikrogliazellen**

Die Quantifizierung verschiedener Expressionsveränderungen auf mRNA-Ebene in Abhängigkeit der Inhibitoren in stimulierten und unstimulierten BV2 Mikrogliazellen erfolgte mittels RT-qPCR. Immunfluoreszenzuntersuchungen dienten der Analyse ausgewählter Proteinexpressionen in Mikrogliazellen in Gehirnschnitten von Wildtyp- und CD13-knock-out-Mäusen.

#### **5.2.1 Vorteile und Grenzen verschiedener Expressionsanalysen**

Die RT-qPCR ermöglicht eine quantitative Erfassung der Menge des PCR-Produktes, und somit des Nukleinsäure-Templates, während der exponentiellen Vervielfältigungsphase. Während bei der herkömmlichen PCR nur die Menge des angereicherten PCR-Produktes am Ende der Zyklen gemessen werden kann und damit maximal eine semiquantitative Auswertung möglich ist, wird bei der RT-qPCR die DNA-Amplifikation in Echtzeit gemessen. Die RT-qPCR ist eine etablierte Methode die vielfältig, z.B. zur Quantifizierung der Genexpression, Verifizierung von Microarrays oder zum Pathogennachweis, angewandt wird [67, 90]. Um keine unspezifischen Ergebnisse zu verwenden, wurden alle Produkte die einen Cq-Wert größer 38 hatten als nicht exprimiert betrachtet und nicht in die Analysen mit einbezogen. Zusätzlich erfolgte nach der PCR eine Produktkontrolle mittels

Gelelektrophorese bzw. einer Schmelzkurvenanalyse. Da die mRNA-Menge nicht in jedem Fall mit der Proteinmenge korreliert, wurde von ausgewählten Genen die Proteinmenge bestimmt.

Weitere Expressionsanalysen erfolgten am genetischen Knockout-Modell an primären murinen Mikrogliazellen. Um histologische Schnitte von Mausgehirnen zu generieren, wurde eine etablierte Methode verwendet (siehe 3.12.14). Durch die Fixation mit PFA können die Mausgehirne in ihrer aktuellen Stoffwechselsituation fixiert werden. Das ermöglicht Untersuchungen, durch die auf die physiologischen Funktionen der untersuchten Zellen geschlossen werden kann. Um eine objektive und vergleichbare Auswertung aller Schnitte zu erreichen, wurde die Zellpopulation immer im gleichen Bereich des Gehirns ausgezählt. Da sich die Mikrogliazellen im Motorkortex ansammeln wurde vorzugsweise diese Region untersucht [91]. Die Auswahl identischer Gehirnabschnitte konnte durch anatomische Landmarken gewährleistet werden, unterlag aber individuellen Schwankungen der einzelnen Abschnitte der Mausgehirne. Es konnten zwei Gehirne je Gruppe (dd/++) im Rahmen der Arbeit untersucht werden, was in folgenden Projekten noch erweitert werden sollte.

### **5.2.2 Die Rolle der APN und ihrer Inhibitoren in BV2 Mikrogliazellen und Splenozyten**

Die immunmodulatorische Rolle der APN konnte vor allem in Zellen der myelomonozytären Reihe bestätigt werden. Zu den Splenozyten gehören eine Vielzahl von Zellpopulationen wie T- und B-Lymphozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen, welche im Rahmen immunologischer Erkrankungen wichtige Aufgaben der Immunabwehr übernehmen [3, 25]. Diese Zellreihen führen ihre Aufgaben charakteristischerweise im peripheren Blutkreislauf aus. Die Mikrogliazellen gehören zu den antigenpräsentierenden Zellen des ZNS und spielen als makrophagenähnliche Zellen eine wichtige Rolle für die Immunabwehr des ZNS. Sie werden im Rahmen verschiedener Prozesse, wie Entzündung, Verletzung oder degenerativen Erkrankungen aktiviert und übernehmen vergleichbare phagozytotische Aufgaben der Immunabwehr, wie Makrophagen in der Peripherie [91]. Des Weiteren ist die APN auch auf Mikrogliazellen, den antigenpräsentierenden Zellen des ZNS, exprimiert, wodurch sie vielfach in immunologische Prozesse involviert ist [40]. In Untersuchungen zur Aktivität der APN in Mikrogliazellen stellte sich heraus, dass die basale Aktivität

der APN durch Aktivierung der Mikrogliazellen gehemmt werden kann [40]. In BV2 Mikrogliazellen konnte ebenfalls eine basale Expression und Aktivität der APN detektiert werden. Durch Aktivierung konnte die Aktivität der APN um 30% gesteigert werden. In Untersuchungen verschiedener Zelllinien ist beschrieben, dass die APN eine für die jeweilige Zelllinie spezifische Aktivität hat. T-Zellen haben beispielsweise eine geringere basale Aktivität der APN als Splenozyten und BV2 Mikrogliazellen, zeigten aber eine gesteigerte Aktivität nach Aktivierung [3]. Es hat sich herausgestellt, dass die APN in Mausgehirnen weniger stark exprimiert ist, als in hämatopoetischen Zellen, wie Splenozyten oder Monozyten [40]. Beispielsweise war die Expression in J774-Monozyten, eine etablierte murine Makrophagen Zelllinie, sowie in Splenozyten, viermal höher als in Zellen des Mausgehirns [92]. Dieses konnte in BV2 Mikrogliazellen bestätigt werden, deren basale Expression der APN nur halb so hoch war wie die der Splenozyten. Diese Beobachtungen lassen sich auf die Zuordnung der jeweiligen Zellreihen zum peripheren oder zentralen Immunsystem zurückführen, möglicherweise spielen die individuellen Eigenschaften der einzelnen Zelllinien eine entscheidende Rolle.

Die Mikrogliazellen übernehmen im aktivierten Zustand, als antigenpräsentierende Zellen, Aufgaben des Immunsystems die der Erkennung, Bekämpfung und Präsentation von Antigenen dienen [18]. Mikrogliazellen verändern durch Aktivierung ihre Konformation, sodass sich der Zellkörper und die Zellfortsätze verdicken. In Untersuchungen an Mikrogliazellen aus Ratten konnte verdeutlicht werden, dass die APN keinen ubiquitären Marker darstellt, die Expression der APN aber abhängig von den funktionellen und morphologischen Veränderungen der Mikrogliazellen durch Aktivierung ist. Durch Aktivierung wurde die Expression der APN im Vergleich zu inaktiven Mikrogliazellen herunterreguliert [40, 91]. Anders als in Zellen des myelomonozytären Systems oder anderen Mikrogliazelllinien konnte die Expression der APN weder auf Gen-, noch auf Proteinebene durch Aktivierung der BV2 Mikrogliazellen beeinflusst werden. Entweder ist die Aktivierung der BV2 Mikrogliazellen so stark, dass sie andere Effekte überdeckt oder durch individuelle Veränderungen der BV2 Mikrogliazellen konnten die der APN nicht detektiert werden. Es ist nicht auszuschließen, dass aufgrund der besonderen Eigenschaften dieser Mikrogliazelllinie bekannte Effekte unterdrückt oder nicht aktiviert werden. Daraus

lässt sich schlussfolgern, dass die Ergebnisse der BV2 Mikrogliazellen spezifisch für diese Zelllinie, und nicht repräsentativ für alle Mikrogliazellen zu betrachten sind.

Zur weiteren Analyse der APN in BV2 Mikrogliazellen wurde der Einfluss der Inhibitoren der APN, A1.002 und IP10.C9, untersucht. Verschiedene Arbeiten zur Rolle der APN und deren Inhibitoren für die Modulation des Immunsystems erfolgten in erster Linie an Zellen des peripheren Immunsystems [3, 9, 27]. In Monozyten führte die Inhibition durch Bestatin und Probestatin zu einer signifikanten Hemmung der Aktivität der APN, wodurch deren Einfluss auf den Progress von Krebserkrankungen gestoppt werden konnte. Dabei ist Bestatin (Ubenimex) in die Therapie der akuten myeloischen Leukämie involviert, da er das Zellwachstum hemmt und den Phänotyp der Zellen beeinflusst [36, 92, 93]. Des Weiteren konnte eine Stimulation der antiinflammatorischen Immunantwort, sowie die Aktivierung regulatorischer T-Zellen im Rahmen chronisch-entzündlicher Erkrankungen beobachtet werden [81, 94]. Führende Modelle sind Untersuchungen an T-Zellen aus Mäusen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, in denen die Hinzugabe von Inhibitoren der APN zu einer Unterdrückung der proinflammatorischen Zytokinausschüttung durch aktivierte T-Zellen führt [38]. Die Inhibitoren der APN auch in Zellen des ZNS eine immunmodulatorischen Rolle. Die Aktivität der APN in Mikrogliazellen konnte durch Bestatin ebenfalls gehemmt werden [40, 92]. Die Bedeutung der APN konnte an Mäusen mit experimenteller Autoimmunenzephalitis (EAE) verdeutlicht werden. Sowohl nach intraperitonealer, als auch nach oraler Gabe des dualen APN/DP IV Inhibitors PETIR-001 konnten die klinischen Symptome der Multiplen Sklerose gehemmt und somit der Krankheitsprogress gestoppt werden [81]. In einem weiteren Modell konnte durch Inhibition der APN das Infarktvolumen in Rattengehirnen nach ischämischem Schlaganfall signifikant reduziert werden [43].

In BV2 Mikrogliazellen wurde der Einfluss von IP10.C9 und A1.002 betrachtet. Nach Inkubation der BV2 Mikrogliazellen für 24 h mit A1.002, konnte eine Steigerung der Aktivität der APN um 30 % detektiert werden. Auch in Splenozyten, die zur myelomonozytären Zelllinie gehören, konnte dies (Steigerung um 50 %) bestätigt werden. Zusätzlich wurden Expressionsanalysen durchgeführt. Die Expression der APN konnte, sowohl durch IP.10.C9, um 34 %, als auch durch A1.002, um 44 %, ebenfalls nach 24 h Inkubation, gehemmt werden. Dass die Expression der APN in

Zellen der myelomonozytären Reihe durch Inhibitoren gehemmt werden kann, ist vielfach, sowohl in vitro, als auch in vivo, beschrieben. Führendes Beispiel ist Bestatin, welches sowohl die Expression als auch die Aktivität der APN in maligne entarteten Zellreihen hemmt [28, 95]. Diese Effekte konnten im Rahmen dieser Arbeit auf Transkriptionsebene für die Splenozytenpopulation durch die Inhibitoren A1.002 und IP10.C9 bestätigt werden. In BV2 Mikrogliazellen konnten keine Effekte der Inhibitoren auf die Expression der APN beobachtet werden. Dass die Inhibitoren der APN einen vergleichbaren Einfluss auf Mikrogliazellen haben, wie in zuvor untersuchten Zelllinien der myelomonozytären Reihe, konnte im Rahmen dieser Untersuchungen nicht bestätigt werden. Dieses lässt sich entweder durch die spezifischen Eigenschaften der ausgewählten Zelllinie oder durch die Umgebungsbedingungen erklären. Dabei spielen sowohl die Konzentration und Inkubationsdauer mit den Inhibitoren, sowie die verwendeten Methoden zur Detektion von Veränderungen eine wichtige Rolle. Möglicherweise führt eine veränderte Konzentration oder eine längere Inkubationszeit der BV2 Mikrogliazellen mit den Inhibitoren zu stärkeren Effekten, was in folgenden Arbeiten untersucht werden sollte. Des Weiteren sollten Untersuchungen der Expression der APN in BV2 Mikrogliazellen auf Proteinebene angeschlossen werden, da auf dieser auch in T-Zellen und Splenozyten ein immunsuppressiver Einfluss durch die Inhibitoren detektiert werden konnten [3, 96].

Die Effekte durch die Inhibitoren konnten deutlich stärker durch den Inhibitor A1.002 als durch IP10.C9 beschrieben werden. In vorherigen Arbeiten konnten dargestellt werden, dass duale Inhibitoren, wie IP10.C9, stärkere Effekte auf inflammatorische Prozesse zeigen als spezifische Inhibitoren der APN [9, 38]. Möglicherweise spielt die insbesondere in T-Zellen exprimierte Peptidase DP IV in Mikrogliazellen nur eine untergeordnete Rolle, sodass duale Inhibitoren keine vergleichbare Wirkung erzielen können. Als modifizierte Zelllinie weisen die BV2 Mikrogliazellen ggf. Eigenschaften auf, die nicht repräsentativ für alle Mikrogliazellen sind. Aufgrund dieser Erkenntnisse sollten in folgenden Untersuchungen den BV2 Mikrogliazellen Untersuchungen an primären Mikrogliazellen gegenübergestellt werden.

### **5.2.3 Proinflammatorische Prozesse in BV2 Mikrogliazellen**

Die Aktivierung der Mikrogliazellen erfolgt im Rahmen aller entzündlichen, degenerativen oder traumatischen Prozesse im ZNS, da diese durch ihre Aufgaben

der Immunabwehr, eine wichtige Rolle bei deren Bekämpfung übernehmen. Diese kann durch verschiedene Moleküle wie Neurotransmitter, Zytokine oder Chemokine beeinflusst werden [15]. Im Kulturmodell erfolgte die Aktivierung der BV2 Mikrogliazellen mit LPS, welches auf der Oberfläche von Bakterien exprimiert wird, sodass eine Entzündung simuliert wird. Die Aktivierung von Mikrogliazellen durch LPS führt zu Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Kaskade, was zu Ausschüttung verschiedener Zytokine, Chemokine und antimikrobieller Proteine führt [24]. Zytokine, wie TNF- $\alpha$  können durch autokrine Stimulation die Aktivierung der Mikrogliazellen induzieren [97]. Man unterscheidet proinflammatorische Zytokine, wie IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$  oder INF- $\gamma$  und antiinflammatorische Zytokine, wie IL-10 oder TGF- $\beta$ 1 [22].

### **5.2.3.1 Aktivierungsmuster der BV2 Mikrogliazellen**

Untersucht wurden Effekte auf die proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1 und TNF- $\alpha$  auf mRNA Ebene, welche unterschiedliche Aufgaben der Immunabwehr übernehmen [22]. Durch Aktivierung der BV2 Mikrogliazellen konnte die relative mRNA Menge von IL-1 $\alpha$  um das 830-fache gesteigert werden. Für IL-1 $\beta$  und IL-6 konnten Steigerungen im Expressionsverhalten, um das 200-300-fache, detektiert werden, was sich am ehesten über deren gemeinsames Funktionsspektrum in Zielgeweben erklären lässt [98]. Der Einfluss der Aktivierung auf TNF- $\alpha$  war mit einer 8-fachen Steigerung des Expressionsverhaltens am schwächsten ausgeprägt. Bei BV2 Mikrogliazellen, die bei 5 mM oder 25 mM Glukose kultiviert wurden, konnten zweifach so starke Expressionssteigerungen für IL-6 und IL-1 $\alpha$  durch Aktivierung, wie bei BV2 Mikrogliazellen, die mit 11 mM Glukose kultiviert wurden, beobachtet werden. Diese Kulturbedingungen stellen eine hypo- bzw. hyperglykämische Situation für BV2 Mikrogliazellen dar, die keine Rückschlüsse auf die physiologischen Verhältnisse in Mikrogliazellen zulassen. Es ist davon auszugehen, dass die BV2 Mikrogliazellen dadurch einer Stressreaktion ausgesetzt sind, die diese und möglicherweise auch weitere unspezifische Reaktionen der Zellpopulation hervorruft.

### **5.2.3.2 Einfluss der APN Inhibitoren auf proinflammatorische Zytokine in unstimulierten BV2 Mikrogliazellen**

Bevor die Einflüsse der Aktivierung auf proinflammatorische Zytokine in BV2 Mikrogliazellen untersucht wurden, wurde die basale Expression dieser näher betrachtet. Unter allen drei Kulturbedingungen konnten Veränderungen im

Expressionsverhalten der Zytokine durch die Inhibitoren detektiert werden. Im Folgenden wurde besonderes Augenmerk auf die Untersuchungen bei 11 mM Glukose gelegt. Dort konnte die Expression von IL-6 um 20 % durch A1.002 verringert werden. Diese immunsuppressive Wirkung der Inhibitoren der APN konnte zuvor vielfach in antigenpräsentierenden Zellen beobachtet werden. Sowohl in T-Zellen als auch in Monozyten resultierte aus der Inhibition der APN eine Suppression inflammatorischer Zytokine, als auch eine Synthese antiinflammatorischer Zytokine [8, 27].

### **5.2.3.3 Einfluss der APN Inhibitoren auf aktivierte BV2 Mikrogliazellen**

Anschließend wurde der Einfluss der Inhibitoren auf das Expressionsverhalten der APN und verschiedener proinflammatorischer Zytokine in aktivierten BV2 Mikrogliazellen, die bei 11 mM Glukose kultiviert wurden, untersucht. Vereinzelt wurden diese den Untersuchungen der BV2 Mikrogliazellen unter hyper- und hypoglykämischen Bedingungen gegenübergestellt. In aktivierten BV2 Mikrogliazellen, welche den hyper-, bzw. hypoglykämischen Kulturbedingungen ausgesetzt waren, ergaben sich keine Effekte auf die Expression verschiedener Zytokine und der APN in Abhängigkeit von den Inhibitoren.

In der Population der BV2 Mikrogliazellen die mit 11 mM Glukose kultiviert wurden, führte die Gabe von IP10.C9 zu Veränderungen von IL-1 $\beta$ . Durch Aktivierung der BV2 Mikrogliazellen konnte IL-1 $\beta$  von allen untersuchten Zytokinen am stärksten in seiner Expression stimuliert werden. Durch Hinzugabe von IP10.C9 steigerte sich diese um weitere 27%. In aktivierten Mikrogliazellen konnten nur wenige antiinflammatorische Effekte durch die Inhibitoren der APN gezeigt werden. Im Folgenden sollen mögliche Zusammenhänge zwischen der Aktivierung der Mikrogliazellen und der Wirkung der Inhibitoren der APN beleuchtet werden. Mikrogliazellen ändern durch Aktivierung ihre Konformation und ihr Expressionsverhalten [99]. Diese führen möglicherweise auch zu veränderten Oberflächenbeziehungen der Aminopeptidase N, wodurch sich das Bindungsverhalten der Inhibitoren verändern kann. Durch Veränderungen der zinkbindenden Domäne der APN, beispielsweise durch Deletion einzelner Aminosäuren, konnte gezeigt werden, dass sowohl die Aktivität der APN gehemmt wird, als auch Inhibitoren der APN schlechter binden können [100]. Dies könnte eine weitere Ursache für eine veränderte Inhibitorwirkung in BV2 Mikrogliazellen darstellen. Möglicherweise gibt es auch einen direkten Zusammenhang zwischen der Stärke der

Aktivierung der BV2 Mikrogliazellen und der Wirksamkeit von Inhibitoren der APN. Da die BV2 Mikrogliazellen zeitgleich mit den Inhibitoren und LPS kultiviert wurden, könnten durch die starke Aktivierung die Effekte der Inhibitoren überdeckt werden. Daraus ergibt sich die Überlegung, ob bei Vorinkubation der BV2 Mikrogliazellen mit den Inhibitoren der APN und zeitlich versetzter Hinzugabe von LPS andere Effekte zu beobachten sind.

Zusätzlich wurde der Einfluss des Anti-CD13-Antikörper My7 im Vergleich zu IP10.C9 auf das proinflammatorische Verhalten der BV2 Mikrogliazellen untersucht. Die BV2 Mikrogliazellen wurden zuerst mit dem CD13-Antikörper My7 kultiviert. Der Anti-CD13-Antikörper My7 bindet ein Epitop in der Nähe des katalytischen Zentrums, wodurch die APN partiell inhibiert wird [101]. LPS wurde erst nach 30 Minuten hinzugegeben, sodass der Antikörper vor der Aktivierung an die APN der BV2 Mikrogliazellen binden konnte. Durch die partielle Inhibition der APN durch My7 konnte die proinflammatorische Reaktion auf die Aktivierung von BV2 Mikrogliazellen, am Beispiel von IL-6, gesteigert werden. In Monozyten konnte eine funktionelle Interaktion zwischen CD13 und Rezeptoren für Immunglobulin G (Fcγ-Rezeptor) beobachtet werden [102]. Um nachzuweisen, ob die Wirkung des CD13-Antikörpers My7 spezifisch ist oder ob er durch die Bindung an einen Fcγ-Rezeptor wirkt, wurde eine Isotypkontrolle durchgeführt. Der Cdc25-Antikörper diente als Isotypkontrolle. Es konnten keine Effekte auf das Expressionsverhalten von IL-6 detektiert werden, sodass sich eine Wirkung über einen Fcγ-Rezeptor ausschließen lässt. Der CD13-Antikörper My7 bindet nicht direkt am katalytischen Zentrum der APN, hat aber einen partiellen Einfluss auf die Aktivität der APN [103]. Des Weiteren spielt die Vorinkubation der BV2 Mikrogliazellen mit dem Antikörper eine wichtige Rolle, da dieser binden kann bevor die BV2 Mikrogliazellen aktiviert werden.

Anschließend wurden die BV2 Mikrogliazellen sowohl mit dem Antikörper My7 als auch mit IP10.C9 kultiviert und wiederum LPS nach 30 Minuten hinzugegeben. Durch IP10.C9 konnte eine Immunsuppression in aktivierten BV2 Mikrogliazellen beobachtet werden. Hier wird die Bedeutung einer Vorinkubation mit den Inhibitoren auf die Effekte in BV2 Mikrogliazellen deutlich. Im Rahmen der Diplomarbeit von Julia Reinkober konnten vergleichbare Ergebnisse in Untersuchungen an humanen Monozyten beschrieben werden. Durch die alleinige Gabe von My7 konnte die relative mRNA

Menge von TNF- $\alpha$  gesteigert und durch Hinzugabe des APN Inhibitors Actinonin gehemmt werden [96]. Der Antikörper My7 bindet in der Nähe des katalytischen Zentrums, was sich sowohl auf die Aktivität, als auch auf die Konformation der untersuchten Zellen auswirken kann. Durch die Gabe des Inhibitors wird das katalytische Zentrum blockiert und die proinflammatorische Reaktion weitestgehend unterdrückt. Durch diese Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass durch Aktivierung von CD13 proinflammatorische Effekte unter Umgehung des NF- $\kappa$ B-Weges induziert werden können [104].

Zusammenfassend konnte eine Wirksamkeit der Inhibitoren auf die BV2 Mikrogliazellen detektiert werden. In anschließenden Arbeiten sollte daher untersucht werden, ob der Einfluss der Inhibitoren auf die BV2 Mikrogliazellen durch eine längere Inkubation bzw. Vorinkubation und verschiedene Konzentrationen der Inhibitoren verändert werden kann.

### **5.2.4 Zusammenhänge des Wnt Signalweges und der Aminopeptidase N**

Der Wnt Signalweg gilt als eine wichtige Schaltstelle sowohl physiologischer Prozesse als auch in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen. Dabei werden über den Wnt Signalweg verschiedenste zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Migration als auch interzelluläre Kontakte reguliert [47]. Des Weiteren spielt der Wnt Signalweg in der frühen Embryonalentwicklung eine entscheidende Rolle, so auch in der des Zentralen Nervensystems. Der Wnt Signalweg hat regulatorischen Einfluss auf die Pathogenese verschiedener Krebserkrankungen, immunologischer und neurodegenerativer Erkrankungen [62, 105]. An diesen regulatorischen Schnittstellen konnte in Zellen des myelomonozytären Systems ein wichtiger Zusammenhang zwischen der APN und dem Wnt Signalweg beobachtet werden. In isolierten T-Zellen wurde führte die T-Zellaktivierung zu einer Hemmung von Wnt 5a, wohingegen die Hinzugabe von Actinonin zu einer deutlichen Steigerung von Wnt 5a führte. Zusätzlich konnte eine Hemmung von GSK3 $\beta$  detektiert werden. Die Aktivierung des Wnt Signalweges erfolgt vielfach über die Inhibierung von GSK3 $\beta$  [44, 83]. Diese Zusammenhänge bieten ein großes Potential für die Therapie immunologischer Erkrankungen, möglicherweise sogar in der Krebstherapie [2].

### 5.2.5 Die Rolle des Wnt Signalweges in Mikrogliazellen

Im zentralen Nervensystem spielt der Wnt Signalweg eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Synapsen und neuronaler Plastizität, aber auch in neurodegenerativen Erkrankungen und Neuroinflammation, sowie für die Pathogenese von Krebserkrankungen [62, 106, 107]. Interaktionen zwischen dem Wnt Signalweg und dem Immun- und Nervensystem sind für die Kontrolle regenerativer Prozesse des ZNS, sowohl physiologisch als auch pathologisch von großer Bedeutung. Es konnte beobachtet werden, dass Komponenten des Wnt Signalweges in erster Linie auf immunologischen Zellen des ZNS, wie Makrophagen, Mikrogliazellen oder Astrozyten exprimiert sind, woraus sich die immunologische Relevanz des Wnt Signalweges ergibt [108]. Die Mikrogliazellen gehören zu den wichtigsten Zellen der Immunabwehr des Zentralen Nervensystems, da sie für die Regulation neuroinflammatorischer Prozesse verantwortlich sind.

Zwischen den 19 Wnt Liganden und den 10 Fzd Rezeptoren sind spezifische Interaktionen beschrieben [55], sodass einzelne Wnt Liganden zu einer Aktivierung des kanonischen oder des nicht-kanonischen Signalweges führen [46]. Grundsätzlich lassen sich die Wnt Liganden in funktionelle Gruppen einteilen. Die Wnt 1typischen (Wnt 2, Wnt 3, Wnt 3a und Wnt 8a) Liganden, die über den kanonischen Wnt Signalweg wirken und die Wnt 5a typischen (Wnt 4, Wnt 5a, Wnt 5a, Wnt 6 Wnt 7a, Wnt 11) Liganden, die über die nicht-kanonischen Signalwege wirken [108]. Einige Wnt Liganden können sowohl auf den kanonischen, als auch auf den nicht-kanonischen Signalweg wirken, wie beispielsweise Wnt 5a. Auf dieser Grundlage wurde das basale Expressionsmuster von verschiedenen Komponenten des Wnt Signalweges in BV2 Mikrogliazellen und die Veränderungen nach Aktivierung der BV2 Mikrogliazellen untersucht. In den unstimulierten BV2 Mikrogliazellen konnte eine Expression der Wnt Liganden Wnt 2b, Wnt 1 und Wnt 10b und der Fzd Rezeptoren 1, 2, 5, 6 und 7 nachgewiesen werden. Es ist beschrieben, dass in primären Mikrogliazellen der Maus die Fzd Rezeptoren 4, 5, 7, 8 und die Ko-Rezeptoren LRP5 und LRP6 exprimiert werden [59]. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass Wnt 1 typischerweise auf aktivierten Astrozyten und Mikrogliazellen und Wnt 10b auf Makrophagen exprimiert wird [108]. Es ist vielfach beschrieben, dass verschiedene Zellpopulationen unterschiedliche Expressionsmuster der Komponenten des Wnt Signalweges aufweisen [44, 60, 109].

Eine Aktivierung des kanonischen Wnt Signalweges bedingt vorzugsweise eine Aktivierung antiinflammatorischer Prozesse [108]. Diese erfolgt bei Wnt 1 und Wnt 3a über eine Formation des Axins im GSK3 $\beta$ -Komplex [46]. Durch Aktivierung des Wnt Signalweges über Wnt 1 werden neuroprotektive Effekte auf dopaminerge Neurone, die Interaktion zwischen Astrozyten, Mikrogliazellen und Neuronen, als auch im peripheren Immunsystem die Migration aktivierter T-Zellen gesteuert [108]. Durch die Aufgaben in der Regulation dopaminerger Neurone wird die Rolle des Wnt Signalweges in der Pathogenese des M. Parkinson deutlich [62, 110]. Des Weiteren konnten antiinfektiöse Effekte durch Aktivierung des Wnt Signalweges über Wnt 1 und Wnt 10b auf die Pathogenese der HIV-Erkrankung beobachtet werden [60]. Zusätzlich übernimmt Wnt 1 eine Schlüsselrolle in neurologischen Erkrankungen, beispielsweise in Bezug auf den ischämischen Schlaganfall oder beim Morbus Parkinson. Es konnte beobachtet werden, dass durch Aktivierung des kanonischen Wnt Signalweges durch Wnt 1 das zerebrale Infarktareal reduziert und die Regeneration induziert werden kann. In diesem Zusammenhang konnte auch eine inhibitorische Wirkung auf die inflammatorische Aktivierung von Mikrogliazellen verdeutlicht werden [104, 108].

Nach Aktivierung der BV2 Mikrogliazellen konnte für alle untersuchten Komponenten ein signifikanter Abfall der Expression detektiert werden. Sowohl Wnt 1 als auch Wnt 10b wurde, um 92 % weniger exprimiert. Zuvor wurden Zusammenhänge zwischen der Aktivierung von Mikrogliazellen oder Astrozyten und Wnt 1 beschrieben. Möglicherweise wird die Expression von Wnt 1 gehemmt, um die dadurch ausgelösten antiinflammatorischen Kaskaden zu unterdrücken. Es konnte beobachtet werden, dass Wnt 1 durch Aktivierung von Mikrogliazellen in Astrozyten herunterreguliert wird. Des Weiteren zeigte sich, dass auch Wnt 1 durch Hemmung der Aktivierung von Mikrogliazellen Einfluss auf deren inflammatorische Reaktion nehmen kann [104]. Es ist beschrieben, dass andere Komponenten, wie Wnt 3a, die proinflammatorische Reaktion der primären murinen Mikrogliazellen induzieren oder unterstützen können, andererseits eine starke Aktivität der Mikrogliazellen über verschiedene Kaskaden auch die Aktivität des Wnt Signalweges regulieren [59, 109, 111].

Zusammenfassend konnte in BV2 Mikrogliazellen ein wichtiger regulatorischer Zusammenhang zwischen der Aktivität von Mikrogliazellen und der des kanonischen Wnt Signalweges verdeutlicht werden.

In vorherigen Arbeiten stellte sich heraus, dass die Wnt-Liganden Wnt 5a, Wnt 7a oder Wnt 3a, Schlüsselfunktionen sowohl in T-Zellen [44], als auch in Mikrogliazellpopulationen im Rahmen immunologischer Prozesse übernehmen [62, 109]. In T-Helferzellen ist beschrieben, dass durch Aktivierung und Chemokinausschüttung, Wnt 5a hochreguliert wird, wodurch die T-Zellmigration angestoßen wird [108]. Die Rolle von Wnt 3a konnte in erster Linie durch Untersuchungen von Wnt 3a in zerebralem Gewebe nach ischämischen Schlaganfall beschrieben werden. Durch Wnt 3a konnte einerseits das Infarktvolume gesenkt und andererseits die Entwicklung neurologischer Defizite positiv beeinflusst werden [109]. Der Wnt Ligand 3a zählt ebenfalls zu den Liganden, die den kanonischen Wnt Signalweg aktivieren und dadurch antiinflammatorische Reaktionen in Makrophagen und protektive Signalwege im Hippocampus auslösen. Die Wnt-Liganden 5a und Wnt 7a führen zu einer Aktivierung des nicht-kanonischen Wnt Signalweges, wobei Wnt 7a und 7b nur den Wnt/Ca<sup>2+</sup> Signalweg aktivieren [108]. Im Rahmen der Aktivierung des nicht-kanonischen Signalweges durch Wnt 5a wird die durch Chemokine bedingte T-Zell-Migration, die Differenzierung dendritischer Zellen, proinflammatorische Reaktionen in Makrophagen und Mikrogliazellen, sowie autokrine Prozesse auf Endothel- und Mikrogliazellen stimuliert. Durch Wnt 7 werden ebenfalls proinflammatorische Prozesse, wie Neurogenese von Stammzellen oder der programmierte Zelltod von Endothelzellen induziert [108].

In BV2 Mikrogliazellen konnte keine basale Expression der Wnt-Komponenten Wnt 3a, Wnt 5a oder Wnt 7a detektiert werden. Dennoch konnte beobachtet werden, dass Mikrogliazellen viele Fzd-Rezeptoren und Co-Rezeptoren exprimieren, über die eine parakrine oder autokrine Stimulation über Wnt-Liganden, die von anderen Zellen exprimiert werden, möglich ist. Einzelne Fzd-Rezeptoren haben eine spezifische Bindungsaffinität zu verschiedenen Wnt-Liganden [55]. In unstimulierten BV2 Mikrogliazellen konnte für Fzd 1 das stärkste Expressionsverhalten detektiert werden, welcher die höchste Bindungsaffinität zu Wnt 3a hat. Dieser Wnt-Ligand ist charakteristisch für die Aktivierung des kanonischen Wnt Signalweges. Eine Stimulation von Mikrogliazellen mit Wnt 3a zeigte eine Aktivierung der proinflammatorischen Reaktion dieser [59]. Des Weiteren wurden die Fzd-Rezeptoren 2 und 5 in BV2 Mikrogliazellen exprimiert, die eine hohe Bindungsaffinität zu Wnt 5a haben [46, 55]. Es ist beschrieben, dass Wnt 5a über Fzd 5 zu einer

autokrinen und parakrinen Aktivierung des nicht-kanonischen Wnt Signalweges führen kann. Durch Aktivierung von Astrozyten konnte Wnt 5a hochreguliert und durch interzelluläre Zellkontakte die Mikrogliazellen aktiviert werden. In T-Zellen wurde über die parakrine Aktivierung des Wnt Signalweges die Proliferation aktivierter T-Zellen stimuliert, wohingegen in Endothelzellen über autokrine Aktivierung des Wnt Signalweges die endotheliale Entzündungsreaktion induziert werden kann [108]. Die Aktivierung der BV2 Mikrogliazellen führte am stärksten zu Effekten an Frizzled 2 Rezeptoren, deren Expression um 63 % und Frizzled 7 Rezeptoren, deren Expression um 78 % vermindert wurde. Möglicherweise ist die Aktivierung der BV2 Mikrogliazellen so stark, dass sowohl der kanonische als auch der nicht-kanonische Wnt Signalweg gehemmt wird. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass durch das vielfältige Expressionsmuster an Fzd-Rezeptoren in BV2 Mikrogliazellen möglicherweise autokrine oder parakrine Aktivierungswege des Wnt Signalweges eine wichtige Rolle übernehmen. Dadurch spielen in BV2 Mikrogliazellen sowohl der kanonische als auch der nicht-kanonische Signalweg eine wichtige Rolle.

Zusätzlich wurde auf Proteinebene Phospho-GSK3 $\beta$  als Bestandteil des Wnt Signalweges untersucht. GSK3 $\beta$  ist Bestandteil eines Proteinkomplexes welcher im Rahmen der Signaltransduktion zu Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin und dadurch zu Inaktivierung des kanonischen Wnt Signalweges führt. Durch Aktivierung des Wnt Signalweges kommt es zu Phosphorylierung von GSK3 $\beta$ , was zu dessen Inhibierung führt, sodass  $\beta$ -Catenin in den Kern wandern und die Transkriptionswege aktivieren kann [47]. Zusätzlich ist GSK3 $\beta$  ein Regulator der NF- $\kappa$ B Transkriptionsgene, wodurch sich eine direkte Verbindung zwischen dem Wnt Signalweg und LPS-vermittelten inflammatorischen Kaskaden ergibt [112]. Die Aktivierung der BV2 Mikrogliazellen führte zu einer verringerten Proteinmenge von Phospho-GSK3 $\beta$ . Durch die verringerte Aktivität des Wnt Signalweges werden Phosphatasen aktiv, die zu Abspaltung der Phosphatgruppen und somit zu einem verminderten Anteil phosphoryliertem GSK3 $\beta$  führen. Forschungsarbeiten zeigen, dass sowohl in myelomonozytären Zellreihen als auch in Mikrogliazellen, das GSK3 $\beta$  kompensatorisch hochreguliert wird, wenn der Wnt Signalweg herunterreguliert wird und entgegengesetzt [44, 83, 113]. Vielfach konnte gezeigt werden, dass durch Inhibition der GSK3 $\beta$  die proinflammatorische Antwort von Mikrogliazellen gehemmt wird und antiinflammatorische Prozesse angestoßen werden [45, 59]. Abschließend wurde mit dem Ring Finger Protein (RNF)

43 ein weiterer Bestandteil des Wnt Signalweges untersucht. RNF 43, eine E3 Ubiquitin Lipase führt zu Hemmung des Wnt Signalweg über Interaktionen mit Frizzled-Rezeptoren. Des Weiteren ist RNF 43 als Target-Gen des kanonischen Wnt Signalweges bekannt, deren Expression abhängig von der Aktivität des Wnt Signalweges ist [80]. Dies ließ sich auch in BV2 Mikrogliazellen bestätigen. Das Expressionsverhalten von RNF 43 wurde durch Aktivierung der BV2 Mikrogliazellen, um 58% vermindert. Diese Hemmung des Wnt Signalweges bekommt besondere Relevanz, wenn der Wnt Signalweg im Rahmen von Krebserkrankungen aktiviert wird [80]. Daraus entsteht eine therapeutische Relevanz für RNF 43, als Regulator der Aktivität dieses Signalweges.

In der Zusammenschau aller Ergebnisse konnten regulatorische Zusammenhänge zwischen dem Wnt Signalweg und der Aktivität von BV2 Mikrogliazellen bestätigt werden. Die Aktivierung der BV2 Mikrogliazellen führte zu einer Unterdrückung des Wnt Signalweges, sowie einer Aktivierung inflammatorischer Prozesse.

### **5.2.5.1 Der Einfluss der Inhibition der APN auf den Wnt Signalweg in Mikrogliazellen und Splenozyten**

Nachdem die Rolle der Komponenten des Wnt Signalweges als auch der APN in BV2 Mikrogliazellen und Splenozyten bestätigt werden konnte, wurde der Zusammenhang zwischen dem Wnt Signalweg und der APN in Abhängigkeit zu deren Aktivität untersucht. In unstimulierten BV2 Mikrogliazellen konnte durch A1.002 die Expression von Frizzled 2 signifikant um 16% gesteigert werden. Der Einfluss pharmakologischer Inhibitoren der APN auf die Aktivität einzelner Komponenten des Wnt Signalweges konnte bisher vor allem in T-Zellen dargestellt werden. Beschrieben ist eine gesteigerte Aktivität des Wnt Signalweges in aktivierten T-Zellen nach Stimulation mit pharmakologischen Inhibitoren der APN, wie Actinonin [2, 44]. Für GSK3 $\beta$  konnte ebenfalls eine Abhängigkeit der Expression zu den Inhibitoren der APN detektiert werden. Durch verschiedene pharmakologische Inhibitoren der APN konnte der Anstieg von GSK3 $\beta$  in aktivierten T-Zellen gehemmt werden [83].

In aktivierten BV2 Mikrogliazellen hingegen konnte kein Einfluss auf Komponenten des Wnt Signalweges durch die Inhibitoren der APN gezeigt werden. Es konnte zwar ein Einfluss der Aktivierung durch LPS auf den Wnt Signalweg detektiert werden, dieser

konnte jedoch nicht durch eine Inhibierung der APN beeinflusst werden. Dieses lässt sich entweder durch den Mechanismus der Aktivierung, die Inhibitoren oder die Inkubationsbedingungen der verschiedenen Zusätze erklären. Die Aktivierung der Mikrogliazellen mit LPS stellt eine etablierte Methode dar, die nachweislich Einfluss auf den Wnt Signalweg hat [45, 106]. Dennoch konnte keine Schnittstelle zwischen der LPS-vermittelten Mikrogliazellaktivierung, den Inhibitoren der APN und dem Wnt Signalweg detektiert werden. Da LPS ein sehr starker Effektor ist, können die zeitgleich hinzugegebenen Inhibitoren möglicherweise keine vergleichbar starken oder stärkeren Effekte bewirken. Durch eine Vorinkubation mit den Inhibitoren vor Hinzugabe von LPS könnte in folgenden Untersuchungen erneut die Effekte der Inhibitoren untersucht werden. In Forschungsarbeiten stellte sich heraus, dass im experimentellen Mausmodell für Multiple Sklerose vor allem der  $\beta$ -Catenin unabhängige Wnt Signalweg entscheidende Aufgaben zwischen aktivierten Mikrogliazellen und verschiedenen therapeutischen Kaskaden übernimmt. Die Aktivierung der Mikrogliazellen führte über die inflammatorischen Zytokine zu Stimulation von Ror 2 und Wnt 11, die charakteristischerweise den nicht-kanonischen Wnt Signalweg aktivieren. Über diese Kaskade kann der Progress der Demyelinisierung von Neuronen beeinflusst werden [58]. Da dieses Mausmodell das führende Modell zur Untersuchung der immunmodulatorischen Rolle der Inhibitoren der APN ist [39, 81], sollten im Folgenden vermehrt Untersuchungen zur Schnittstelle zwischen dem  $\beta$ -Catenin unabhängigen Wnt Signalweg und den Inhibitoren der APN in Mikrogliazellen angestrebt werden.

Die pharmakologischen Inhibitoren wurden in vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe in Zellen der myelomonozytären Reihe untersucht und es konnten in vitro und in vivo immunsuppressive Effekte durch eine langfristige pharmakologische Inhibition der APN auf den Wnt Signalweg gezeigt werden [44]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss pharmakologischer Inhibitoren, sowie des genetischen Knockout in Splenozyten auf Komponenten des Wnt Signalweges den BV2 Mikrogliazellen gegenübergestellt werden. In Splenozyten wurde der Einfluss der Inhibitoren der APN auf TCF 7 und LRP5 untersucht. Anders als in den BV2 Mikrogliazellen konnte ein Einfluss durch den Inhibitor A1.002 dargestellt werden. Es zeigte sich durch den Inhibitor A1.002 ein signifikanter Abfall der Expression von TCF 7 um 44%, welcher als Transkriptionsfaktor wichtige regulatorische Aufgaben übernimmt. Eine besondere

Aufgabe ist die Regulation verschiedener Zielgene, die durch den Wnt Signalweg aktiviert oder gehemmt werden sollen [2, 114]. In Splenozyten, die aus CD13 Knockout Mäusen isoliert wurden, konnte durch den Knockout ein Anstieg der Expression von LRP5 (um 50%) und TCF 7 (um 100%) beobachtet werden. Diese Untersuchungen stellen vergleichbare Ergebnisse zu denen in isolierten aktivierten T-Zellen dar, wo der Wnt Signalweg ebenfalls durch Inhibition der APN aktiviert wird [2, 44]. Diese Unterschiede zwischen der pharmakologischen Inhibition und dem genetischen Knockout der APN lassen sich in erster Linie durch die unterschiedlichen Mechanismen zurückführen. Durch den Knockout sind die Zellen langfristig an das Fehlen der APN angepasst. Die Aktivierung des Wnt Signalweges in Splenozyten aus CD13-Knockout Mäusen läuft am ehesten über einen Seitenweg ab, welcher durch das Fehlen der APN getriggert wird. Diese Zusammenhänge sind noch nicht abschließend geklärt und sollten in folgenden Projekten näher untersucht werden.

Aufgrund dieser Untersuchungen wurde abschließend der Einfluss des genetischen CD13-Knockout auf Komponenten des Wnt Signalweges in Mikrogliazellen untersucht. Exemplarisch wurde in einer kleinen Mauspopulation der Anteil Wnt 10b positiver Mikrogliazellen in CD13-Knockout und Wildtyp-Mäusen untersucht. Durch Wnt 10b wird der kanonische Wnt Signalweg aktiviert [108]. Durch den Knockout von CD13 konnte die Expression von Wnt 10b signifikant um 10% im Vergleich zur Kontrollgruppe gesenkt werden. Dadurch konnte ein Zusammenhang zwischen der Aktivität des Wnt Signalweges und der Expression der APN bestätigt werden. Möglicherweise kommt es durch den CD13-Knockout in Mikrogliazellen zu einer verminderten Aktivität des Wnt Signalweges. Weitere Untersuchungen an primären Mikrogliazellen waren im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich und werden Bestandteil in folgenden Projekten sein. Dass sich in Mikrogliazellen andere Effekte zeigen als in Splenozyten ist am ehesten auf das zellspezifische Expressionsmuster der Bestandteile des Wnt Signalweges zurückzuführen. So konnte je nach Zellreihe verschiedenen Komponenten des Wnt Signalweges eine andere Bedeutung beigemessen werden [44, 60, 109].

### **5.3 Schlussfolgerung**

Das Ziel dieser Arbeit war, Effekte verschiedener Inhibitoren der APN auf Zytokine und Komponenten des Wnt Signalweges in BV2 Mikrogliazellen zu untersuchen. In zahlreichen Forschungsarbeiten konnten immunmodulatorische Effekte in Zellen des

myelomonozytären Systems durch Inhibitoren der APN dargestellt werden. Des Weiteren sollten Auswirkungen des CD13-Knockout in Splenozyten und primären Mikrogliazellen auf Komponenten des Wnt Signalweges untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Abhängigkeit zwischen der Aktivität der BV2 Mikrogliazellen und der des Wnt Signalweges bestätigt werden. In unstimulierten BV2 Mikrogliazellen wurden vereinzelt Effekte durch die Inhibitoren der APN beobachtet. Wie auch in den Splenozyten konnte dem APN spezifischen Inhibitor A1.002 dabei eine größere Bedeutung beigemessen werden, als dem dualen Inhibitor IP10.C9. Das steht den Untersuchungen in anderen Zellreihen gegenüber, dessen inflammatorische Reaktion durch duale Inhibitoren der APN stärker beeinflusst werden kann [2, 8]. In aktivierten BV2 Mikrogliazellen ließen sich keine signifikanten Effekte durch die Inhibitoren der APN auf die Expression verschiedener Zytokine und die Komponenten des Wnt Signalweges darstellen. Lediglich durch den Antikörper My7 konnten Veränderungen der TNF- $\alpha$  Expression detektiert werden. In diesem Zusammenhang wurden LPS und die Inhibitoren bzw. der Antikörper zeitlich versetzt zu den Zellen hinzugegeben. LPS stellt einen sehr starken Effektor dar, der auch in BV2 Mikrogliazellen zu einer starken Aktivierung inflammatorischer Zytokine geführt hat. Es ist davon auszugehen, dass sich diese bei zeitgleicher Hinzugabe nicht gegen die LPS-vermittelte Aktivierung durchsetzen können. Dazu kommt, dass die BV2 Mikrogliazellen als Tumorzelllinie individuell zu betrachten sind und Effekte in Tumorzellen nicht repräsentativ für gesunde Zelllinien herangezogen werden können. Da die aufwendige Isolation von primären Mikrogliazellen im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war wurden weiterführende Untersuchungen an primären murinen Mikrogliazellen zum Einfluss des CD13-Knockout auf die Wnt 10b-Expression durchgeführt. Im CD13-Knockout zeigte sich eine verminderte Wnt 10 b Expression, was einen Zusammenhang zwischen der Aktivität des Wnt Signalweges und der APN bestätigt. Daher erscheinen weiterführende Analysen in primären isolierten Mikrogliazellen sinnvoll, um die Bedeutung von Inhibitoren der APN in neuronalen Zellen zu ermitteln. Dabei spielen nicht nur die Inhibitoren selbst, sondern auch deren eingesetzte Konzentration, die Inkubationsdauer und -reihenfolge in Bezug zur Inkubation mit LPS eine wichtige Rolle.



### 6 Zusammenfassung

Im Rahmen immunologischer Erkrankungen, wie Autoimmun- oder inflammatorischer Erkrankungen, Erkrankungen des zentralen Nervensystems oder Krebserkrankungen spielen Peptidasen eine wichtige Rolle [1, 2]. Die Exopeptidasen Membran-Alanyl-Amino-peptidase N (APN/CD13) und Dipeptidylpeptidase IV (DP IV/CD26) sind essentiell für die Regulation vieler biologischer Prozesse, insbesondere für die Autoimmunität und die Inflammation [3-5]. Literaturdaten und Vorarbeiten verschiedener Arbeitsgruppen belegen immunmodulatorische Eigenschaften von Inhibitoren der enzymatischen Aktivität der APN. Sowohl *in vitro* als auch in verschiedenen Krankheitsmodellen der Maus *in vivo*, zeigten sich therapeutisch relevante immunsuppressive Effekte dieser Inhibitoren [7, 11]. Mechanistisch liegen diesen positiven Wirkungen unter anderem eine Hemmung der Produktion und Sekretion proinflammatorischer Zytokine, sowie die Verstärkung der Produktion und Sekretion immunsuppressiver Zytokine zu Grunde [5]. Die Inhibitoren scheinen auch einen immunmodulatorischen Einfluss auf den Wnt Signalweg zu haben, der als Signaltransduktionsweg wichtige Aufgaben in der Regulation von Zellmigration, Polarität, interzellulärer Kontakte und für die frühe Embryonalentwicklung übernimmt [47]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl der Einfluss verschiedener Inhibitoren der APN als auch des genetischen CD13-Knockouts in Mäusen auf die Aktivierung verschiedener Mikrogliazellpopulationen und auf die Expression von Komponenten des Wnt Signalweges untersucht. In Abhängigkeit von der Aktivierung war sowohl eine gesteigerte Expression proinflammatorischer Zytokine, als auch eine Hemmung der Komponenten des Wnt Signalweges in BV2 Mikrogliazellen zu beobachten. In BV2 Mikrogliazellen konnten keine signifikanten Einflüsse durch die Inhibitoren A1.002 und IP10.C9 detektiert werden. Lediglich durch den CD13-Antikörper My 7 konnten immunsuppressive Effekte in aktivierten BV2 Mikrogliazellen beobachtet werden. In CD13-Knockout Mäusen konnte eine signifikante Reduktion der Wnt 10b positiven Mikrogliazellen gezeigt werden. In der Zusammenschau aller Ergebnisse lassen sich regulatorische Zusammenhänge zwischen der Aktivität der Mikrogliazellen, sowie der APN und dem Wnt Signalweg aufzeigen. Daher erscheinen weiterführende Analysen in primären isolierten Mikrogliazellen sinnvoll, um die Bedeutung von Inhibitoren der APN in neuronalen Zellen zu ermitteln. Dabei spielen nicht nur die Inhibitoren selbst, sondern auch deren Inkubationsbedingungen im Verhältnis zur LPS-vermittelten Zellaktivierung eine entscheidende Rolle.

---

**Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1: Die Komponenten des Immunsystems .....</b>	<b>12</b>
<b>Abbildung 2: Darstellung des Homodimers.....</b>	<b>16</b>
<b>Abbildung 3: Antagonisten des Wnt Signalweges.....</b>	<b>20</b>
<b>Abbildung 4: Der <math>\beta</math>-Catenin abhängige Wnt Signalweg .....</b>	<b>21</b>
<b>Abbildung 5: Der <math>\beta</math>-Catenin unabhängige Wnt Signalweg .....</b>	<b>23</b>
<b>Abbildung 6: Größenstandards für die Elektrophorese .....</b>	<b>40</b>
<b>Abbildung 7: Neubauer Zählkammer.....</b>	<b>46</b>
<b>Abbildung 8: Auswertung fluoreszierender Bilder von histologischen Schnitten des Motorkortex aus CD13-Knockout und CD13-Wildtyp Mäusen.....</b>	<b>64</b>
<b>Abbildung 9: Einfluss von LPS und pharmakologischen Inhibitoren der APN auf die relative mRNA-Menge von APN.....</b>	<b>68</b>
<b>Abbildung 10: Quantifizierung der APN-Proteinmenge nach LPS-Stimulation.</b>	<b>69</b>
<b>Abbildung 11: Einfluss von LPS und pharmakologischen Inhibitoren der APN auf die APN-Enzymaktivität .....</b>	<b>70</b>
<b>Abbildung 12: Einfluss von LPS und pharmakologischen Inhibitoren der APN auf die IL-6 Expression .....</b>	<b>71</b>
<b>Abbildung 13: Einfluss von LPS und pharmakologischen Inhibitoren der APN auf die relative mRNA-Menge von IL-1<math>\alpha</math>.....</b>	<b>73</b>
<b>Abbildung 14: Einfluss von LPS und pharmakologischen Inhibitoren der APN auf die IL-1<math>\beta</math>- und TNF-<math>\alpha</math>-mRNA-Menge .....</b>	<b>74</b>
<b>Abbildung 15: Einfluss von LPS und verschiedener Inhibitoren der APN auf die Proliferation von BV2 Mikrogliazellen .....</b>	<b>75</b>
<b>Abbildung 16: Einfluss des Anti-CD13-Antikörpers My7 und des Anti-Cdc25- Antikörpers auf die Aktivierung der BV2 Mikrogliazellen .....</b>	<b>76</b>
<b>Abbildung 17: Basale Expression der Komponenten des Wnt Signalweges....</b>	<b>78</b>
<b>Abbildung 18: Einfluss von LPS und pharmakologischen Hemmstoffen der APN auf die Expression von Fzd 1, Fzd 5 und Fzd 7.....</b>	<b>79</b>
<b>Abbildung 19: Einfluss von LPS und pharmakologischen Inhibitoren der APN auf die Fzd 2- und Fzd 6-mRNA-Menge .....</b>	<b>80</b>
<b>Abbildung 20: Einfluss von LPS und pharmakologischen Inhibitoren der APN auf die relative mRNA-Menge von Wnt 10b und Wnt 1 .....</b>	<b>81</b>
<b>Abbildung 21: Einfluss von LPS auf die LRP5- und LRP6-mRNA-Mengen sowie der Einfluss von A1.002 auf die relative mRNA-Menge von LRP5 .....</b>	<b>82</b>

<b>Abbildung 22: Einfluss von LPS und A1.002 auf die Dvl-2-mRNA-Menge sowie der Einfluss von LPS auf die DVI-3-mRNA-Menge.....</b>	<b>83</b>
<b>Abbildung 23: Einfluss von LPS und pharmakologischen Hemmstoffen der APN auf die relative mRNA-Menge von RNF 43.....</b>	<b>84</b>
<b>Abbildung 24: Quantifizierung der GSK3<math>\beta</math>-Proteinmenge nach LPS-Stimulation .....</b>	<b>85</b>
<b>Abbildung 25: Expression von Wnt 10b in primären murinen Mikrogliazellen .</b>	<b>86</b>
<b>Abbildung 25: Fluoreszenzbilder des Motorkortex von CD13-Knockout und Wildtyp Mäusen .....</b>	<b>88</b>
<b>Abbildung 27: Einfluss von IP10.C9 und A1.002 auf die mRNA-Menge von APN in Splenozyten .....</b>	<b>88</b>
<b>Abbildung 28: Einfluss der Inhibitoren der APN auf die APN-Enzymaktivität in Splenozyten .....</b>	<b>89</b>
<b>Abbildung 29: Einfluss pharmakologischer Inhibitoren der APN auf die relative mRNA-Menge von LRP5 und TCF7 in Splenozyten .....</b>	<b>90</b>

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1 : Allgemeine Puffer und Lösungen</b> .....	32
<b>Tabelle 2: Puffer und Lösungen für die Gelelektrophorese</b> .....	32
<b>Tabelle 3: Puffer für die Bestimmung der Enzymaktivität</b> .....	33
<b>Tabelle 4: Puffer und Lösungen für die Isolation von Gesamtprotein</b> .....	33
<b>Tabelle 5: Lösungen zur Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford</b> ...	33
<b>Tabelle 6: Lösungen und Puffer für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</b> .....	34
<b>Tabelle 7: Lösungen und Puffer für die Western Blot Analyse</b> .....	34
<b>Tabelle 8: Lösung für die Ponceau-S-Färbung von Nitrocellulose-Membranen</b>	35
<b>Tabelle 9: Lösungen und Puffer für die Herstellung von histologischen Schnittpräparaten</b> .....	36
<b>Tabelle 10: Nährmedien zur Kultivierung verschiedener Zellkulturen</b> .....	36
<b>Tabelle 11: Inhibitor und Stimulans für den Zellkulturansatz</b> .....	37
<b>Tabelle 12: Verwendete Seren</b> .....	37
<b>Tabelle 13: Verwendete Versuchstiere für die Immunhistochemie</b> .....	38
<b>Tabelle 14: Verwendete Versuchstiere für die Splenozytenisolation</b> .....	38
<b>Tabelle 15: Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie</b> .....	39
<b>Tabelle 16: Primärantikörper</b> .....	39
<b>Tabelle 17: Sekundärantikörper</b> .....	39
<b>Tabelle 18: Verwendete Primer für die RT-qPCR. Hersteller:</b> <b>Invitrogen/Deutschland</b> .....	40
<b>Tabelle 19: Zusätze für die Messung der Enzymaktivität</b> .....	42
<b>Tabelle 20: Verwendete Kits</b> .....	43
<b>Tabelle 21: Verwendete Softwares</b> .....	43
<b>Tabelle 22: Kulturbedingungen der BV2 Mikrogliazellen</b> .....	46
<b>Tabelle 23: Kultivierung der BV2 Mikrogliazellen mit LPS, IP10.C9 und A1.00247</b>	
<b>Tabelle 24: Kultivierung der BV2 Mikrogliazellen mit LPS, IP10.C9, My7 und Cdc25</b> .....	47
<b>Tabelle 25: Programm zur Synthese von cDNA</b> .....	48
<b>Tabelle 26: RT-qPCR – Amplifikation im Thermocycler</b> .....	50
<b>Tabelle 27: Pipettierschema für die Eichreihe zur Bestimmung der Proteinkonzentration mithilfe des Bradford-Assays</b> .....	54
<b>Tabelle 28: Zusammensetzung 7,5, 10 und 12%iger Trenngele</b> .....	55

<b>Tabelle 29: Zusammensetzung der Sammelgele 4%</b> .....	55
<b>Tabelle 30: Verwendete Antikörper für den Western Blot</b> .....	56
<b>Tabelle 31: Kultivierung von primären murinen Splenozyten</b> .....	58
<b>Tabelle 32: Testung der Antikörper Wnt 10b, Frizzled-2 (Fzd 2) und Iba 1 (Anti-Maus)</b> .....	59
<b>Tabelle 33: Testung der Doppelfärbung der primären Antikörper (Verdünnungsreihen Tab. 32)</b> .....	60
<b>Tabelle 34: Verdünnung der eingesetzten Primärantikörper</b> .....	61
<b>Tabelle 35: Verdünnung der eingesetzten Sekundärantikörper</b> .....	61

## Literaturverzeichnis

1. Amin, S.A., N. Adhikari, and T. Jha, *Design of Aminopeptidase N Inhibitors as Anti-cancer Agents*. J Med Chem, 2018. **61**(15): p. 6468-6490.
2. Lendeckel, U., et al., *Synergistic action of DPIV and APN in the regulation of T cell function*. Adv Exp Med Biol, 2003. **524**: p. 123-31.
3. Lendeckel, U., et al., *Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells (review)*. Int J Mol Med, 1999. **4**(1): p. 17-27.
4. Riemann, D., A. Kehlen, and J. Langner, *CD13--not just a marker in leukemia typing*. Immunol Today, 1999. **20**(2): p. 83-8.
5. Lendeckel, U., et al., *Inhibition of human leukocyte function, alanyl aminopeptidase (APN, CD13) and dipeptidylpeptidase IV (DP IV, CD26) enzymatic activities by aqueous extracts of Cistus incanus L. ssp. incanus*. J Ethnopharmacol, 2002. **79**(2): p. 221-7.
6. Wang, Y., et al., *Ubenimex induces apoptotic and autophagic cell death in rat GH3 and MMQ cells through the ROS/ERK pathway*. Drug Des Devel Ther, 2019. **13**: p. 3217-3228.
7. Bank, U., et al., *Inhibition of alanyl-aminopeptidase on CD4+CD25+ regulatory T-cells enhances expression of FoxP3 and TGF-beta1 and ameliorates acute colitis in mice*. Int J Mol Med, 2007. **20**(4): p. 483-92.
8. Reinhold, D., et al., *Dual inhibition of dipeptidyl peptidase IV and aminopeptidase N suppresses inflammatory immune responses*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1110**: p. 402-9.
9. Bank, U., et al., *Triggering endogenous immunosuppressive mechanisms by combined targeting of Dipeptidyl peptidase IV (DPIV/CD26) and Aminopeptidase N (APN/ CD13)--a novel approach for the treatment of inflammatory bowel disease*. Int Immunopharmacol, 2006. **6**(13-14): p. 1925-34.
10. Schön, E., et al., *The dipeptidyl peptidase IV, a membrane enzyme involved in the proliferation of T lymphocytes*. Biomed Biochim Acta, 1985. **44**(2): p. K9-15.
11. Reinhold, D., et al., *Dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) and aminopeptidase N (APN, CD13) as regulators of T cell function and targets of immunotherapy in CNS inflammation*. Int Immunopharmacol, 2006. **6**(13-14): p. 1935-42.
12. R.M. Schmidt, F.H., J.H. Faiss, W. Köhler, U. Zettl, Multiple Sklerose, Urban&Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2017, Kapitel 4. .
13. K. Murphy, P.T., M. Walport, Janeway Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2009, p. 755-767, .
14. C. Schütt, B.B., Grundwissen Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2019, p.126-130.
15. Jessen, K.R., *Glial cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(10): p. 1861-7.
16. K. Murphy, P.T., M. Walport, Janeway Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2009, Kapitel 1. .
17. Gratz, I.K. and D.J. Campbell, *Organ-specific and memory treg cells: specificity, development, function, and maintenance*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 333.
18. Perry, V.H. and S. Gordon, *Macrophages and microglia in the nervous system*. Trends Neurosci, 1988. **11**(6): p. 273-7.
19. Bocchini, V., et al., *An immortalized cell line expresses properties of activated microglial cells*. J Neurosci Res, 1992. **31**(4): p. 616-21.
20. Blasi, E., et al., *Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus*. J Neuroimmunol, 1990. **27**(2-3): p. 229-37.

21. Henn, A., et al., *The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation*. *Altex*, 2009. **26**(2): p. 83-94.
22. Borish, L.C. and J.W. Steinke, *Cytokines and chemokines*. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. **111**(2 Suppl): p. S460-75.
23. K. Murphy, P.T., M. Walport, *Janeway Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2009, p. 75-80, p. 873.
24. Chen, Z., et al., *Lipopolysaccharide-induced microglial activation and neuroprotection against experimental brain injury is independent of hematogenous TLR4*. *J Neurosci*, 2012. **32**(34): p. 11706-15.
25. Luan, Y. and W. Xu, *The structure and main functions of aminopeptidase N*. *Curr Med Chem*, 2007. **14**(6): p. 639-47.
26. Danziger, R.S., *Aminopeptidase N in arterial hypertension*. *Heart Fail Rev*, 2008. **13**(3): p. 293-8.
27. Mina-Osorio, P., L.H. Shapiro, and E. Ortega, *CD13 in cell adhesion: aminopeptidase N (CD13) mediates homotypic aggregation of monocytic cells*. *J Leukoc Biol*, 2006. **79**(4): p. 719-30.
28. Alfalah, M., et al., *A mutation in aminopeptidase N (CD13) isolated from a patient suffering from leukemia leads to an arrest in the endoplasmic reticulum*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(17): p. 11894-900.
29. Bukowska, A., et al., *Transcriptional regulation of cytosol and membrane alanyl-aminopeptidase in human T cell subsets*. *Biol Chem*, 2003. **384**(4): p. 657-65.
30. Bhagwat, S.V., et al., *The angiogenic regulator CD13/APN is a transcriptional target of Ras signaling pathways in endothelial morphogenesis*. *Blood*, 2003. **101**(5): p. 1818-26.
31. Mahoney, K.M., et al., *CD13/APN transcription is regulated by the proto-oncogene c-Maf via an atypical response element*. *Gene*, 2007. **403**(1-2): p. 178-87.
32. Joshi, S., et al., *The Rational Design of Therapeutic Peptides for Aminopeptidase N using a Substrate-Based Approach*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 1424.
33. Umezawa, H., et al., *Production of actinonin, an inhibitor of aminopeptidase M, by actinomycetes*. *J Antibiot (Tokyo)*, 1985. **38**(11): p. 1629-30.
34. Chen, H., B.P. Roques, and M.C. Fournie-Zaluski, *Design of the first highly potent and selective aminopeptidase N (EC 3.4.11.2) inhibitor*. *Bioorg Med Chem Lett*, 1999. **9**(11): p. 1511-6.
35. Terauchi, M., et al., *Inhibition of APN/CD13 leads to suppressed progressive potential in ovarian carcinoma cells*. *BMC Cancer*, 2007. **7**: p. 140.
36. Urabe, A., et al., *Ubenimex in the treatment of acute nonlymphocytic leukemia in adults*. *Ann Hematol*, 1993. **67**(2): p. 63-6.
37. Tsukamoto, H., et al., *Aminopeptidase N (APN)/CD13 inhibitor, Ubenimex, enhances radiation sensitivity in human cervical cancer*. *BMC Cancer*, 2008. **8**: p. 74.
38. Bank, U., et al., *Dipeptidylpeptidase IV (DPIV) and alanyl-aminopeptidases (AAPs) as a new target complex for treatment of autoimmune and inflammatory diseases-proof of concept in a mouse model of colitis*. *Adv Exp Med Biol*, 2006. **575**: p. 143-53.
39. Reinhold, D., et al., *DP IV/CD26, APN/CD13 and related enzymes as regulators of T cell immunity: implications for experimental encephalomyelitis and multiple sclerosis*. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 2356-63.

40. Lucius, R., J. Sievers, and R. Mentlein, *Enkephalin metabolism by microglial aminopeptidase N (CD13)*. J Neurochem, 1995. **64**(4): p. 1841-7.
41. Potoличchio, I., et al., *Proteomic analysis of microglia-derived exosomes: metabolic role of the aminopeptidase CD13 in neuropeptide catabolism*. J Immunol, 2005. **175**(4): p. 2237-43.
42. Mawrin, C., et al., *Reduced activity of CD13/aminopeptidase N (APN) in aggressive meningiomas is associated with increased levels of SPARC*. Brain Pathol, 2010. **20**(1): p. 200-10.
43. Rohnert, P., et al., *Dipeptidyl peptidase IV, aminopeptidase N and DPIV/APN-like proteases in cerebral ischemia*. J Neuroinflammation, 2012. **9**: p. 44.
44. Lendeckel, U., et al., *Modulation of WNT-5A expression by actinonin: linkage of APN to the WNT-pathway?* Adv Exp Med Biol, 2000. **477**: p. 35-41.
45. Ajmone-Cat, M.A., et al., *Glycogen synthase kinase 3 is part of the molecular machinery regulating the adaptive response to LPS stimulation in microglial cells*. Brain Behav Immun, 2016. **55**: p. 225-235.
46. Komiya, Y. and R. Habas, *Wnt signal transduction pathways*. Organogenesis, 2008. **4**(2): p. 68-75.
47. Gordon, M.D. and R. Nusse, *Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors*. J Biol Chem, 2006. **281**(32): p. 22429-33.
48. Reya, T. and H. Clevers, *Wnt signalling in stem cells and cancer*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 843-50.
49. Wodarz, A. and R. Nusse, *Mechanisms of Wnt signaling in development*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1998. **14**: p. 59-88.
50. Staal, F.J. and H.C. Clevers, *WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(1): p. 21-30.
51. Mikels, A.J. and R. Nusse, *Wnts as ligands: processing, secretion and reception*. Oncogene, 2006. **25**(57): p. 7461-8.
52. Cruciat, C.M. and C. Niehrs, *Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(3): p. a015081.
53. Kawano, Y. and R. Kypta, *Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 13): p. 2627-34.
54. Schulte, G. and V. Bryja, *The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors*. Trends Pharmacol Sci, 2007. **28**(10): p. 518-25.
55. Dijksterhuis, J.P., J. Petersen, and G. Schulte, *WNT/Frizzled signalling: receptor-ligand selectivity with focus on FZD-G protein signalling and its physiological relevance: IUPHAR Review 3*. Br J Pharmacol, 2014. **171**(5): p. 1195-209.
56. Kohn, A.D. and R.T. Moon, *Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways*. Cell Calcium, 2005. **38**(3-4): p. 439-46.
57. Park, T.J., et al., *Subcellular localization and signaling properties of dishevelled in developing vertebrate embryos*. Curr Biol, 2005. **15**(11): p. 1039-44.
58. Shimizu, T., R. Smits, and K. Ikenaka, *Microglia-induced activation of non-canonical Wnt signaling aggravates neurodegeneration in demyelinating disorders*. Mol Cell Biol, 2016. **36**(21): p. 2728-2741.
59. Halleskog, C., et al., *WNT signaling in activated microglia is proinflammatory*. Glia, 2011. **59**(1): p. 119-31.
60. Richards, M.H., et al., *Dynamic interaction between astrocytes and infiltrating PBMCs in context of neuroAIDS*. Glia, 2015. **63**(3): p. 441-51.
61. Matias, D., et al., *Microglia-glioblastoma interactions: New role for Wnt signaling*. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2017. **1868**(1): p. 333-340.

62. Inestrosa, N.C. and E. Arenas, *Emerging roles of Wnts in the adult nervous system*. Nature Reviews Neuroscience, 2009. **11**: p. 77.
63. Winnicka, B., et al., *CD13 is dispensable for normal hematopoiesis and myeloid cell functions in the mouse*. J Leukoc Biol, 2010. **88**(2): p. 347-59.
64. ThermoFisherScientific, *100-Basenpaarmarker, 04/2021*, <https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-nucleic-acid-electrophoresis-purification/dna-electrophoresis-thermo-scientific/dna-ladders-thermo>.
65. ThermoFisherScientific, *Proteinmarker, 04/2021*. Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-gel-electrophoresis/protein-standards-ladders.html>.
66. Laboroptik GmbH, *Neubauer Zählkammer, 4/2021*, <http://www.zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.html>.
67. Nolan, T., R.E. Hands, and S.A. Bustin, *Quantification of mRNA using real-time RT-PCR*. Nat Protoc, 2006. **1**(3): p. 1559-82.
68. Bookout, A.L. and D.J. Mangelsdorf, *Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signaling pathways*. Nucl Recept Signal, 2003. **1**: p. e012.
69. Ginzinger, D.G., *Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream*. Exp Hematol, 2002. **30**(6): p. 503-12.
70. Rodriguez, A., et al., *Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods*. Methods Mol Biol, 2015. **1275**: p. 31-56.
71. Rao, X., et al., *An improvement of the 2<sup>-</sup>(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis*. Biostat Bioinforma Biomath, 2013. **3**(3): p. 71-85.
72. Van Steenwinckel, J., et al., *Decreased microglial Wnt/beta-catenin signalling drives microglial pro-inflammatory activation in the developing brain*. Brain, 2019. **142**(12): p. 3806-3833.
73. Mülhardt, *Der Experimentator – Molekularbiologie Genomics, 7. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013, p. 62*.
74. B. Stellmach, B.E., Steinkopf Verlag Darmstadt 1998, p.4f.
75. Tsukatani, T., et al., *Colorimetric cell proliferation assay for microorganisms in microtiter plate using water-soluble tetrazolium salts*. J Microbiol Methods, 2008. **75**(1): p. 109-16.
76. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
77. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
78. Wang, J.L., et al., *A sensitive and reversible staining of proteins on blot membranes*. Anal Biochem, 2020. **592**: p. 113579.
79. Krajewski, S., X. Huang, and M. Krajewska, *Multiple antigen detection (MAD) western blotting*. Methods Mol Biol, 2009. **536**: p. 473-81.
80. Tsukiyama, T., et al., *Molecular Role of RNF43 in Canonical and Noncanonical Wnt Signaling*. Mol Cell Biol, 2015. **35**(11): p. 2007-23.
81. Reinhold, D., et al., *PETIR-001, a dual inhibitor of dipeptidyl peptidase IV (DP IV) and aminopeptidase N (APN), ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice*. Biol Chem, 2011. **392**(3): p. 233-7.
82. Bhagwat, S.V., et al., *CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation*. Blood, 2001. **97**(3): p. 652-9.

83. Lendeckel, U., et al., *Inhibition of alanyl-aminopeptidase suppresses the activation-dependent induction of glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta) in human T cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **273**(1): p. 62-5.
84. Nam, H.Y., et al., *Ibrutinib suppresses LPS-induced neuroinflammatory responses in BV2 microglial cells and wild-type mice*. J Neuroinflammation, 2018. **15**(1): p. 271.
85. Dai, X.J., et al., *Activation of BV2 microglia by lipopolysaccharide triggers an inflammatory reaction in PC12 cell apoptosis through a toll-like receptor 4-dependent pathway*. Cell Stress Chaperones, 2015. **20**(2): p. 321-31.
86. Kim, D.C., et al., *Steppogenin Isolated from Cudrania tricuspidata Shows Antineuroinflammatory Effects via NF-kappaB and MAPK Pathways in LPS-Stimulated BV2 and Primary Rat Microglial Cells*. Molecules, 2017. **22**(12).
87. Fernandez-Calle, R., et al., *Endogenous pleiotrophin and midkine regulate LPS-induced glial responses*. Neurosci Lett, 2018. **662**: p. 213-218.
88. Lis, M., et al., *Influence of bestatin, an inhibitor of aminopeptidases, on T and B lymphocyte subsets in mice*. Pol J Vet Sci, 2011. **14**(3): p. 393-403.
89. Clee, S.M. and A.D. Attie, *The genetic landscape of type 2 diabetes in mice*. Endocr Rev, 2007. **28**(1): p. 48-83.
90. Libus, J. and H. Storchova, *Quantification of cDNA generated by reverse transcription of total RNA provides a simple alternative tool for quantitative RT-PCR normalization*. Biotechniques, 2006. **41**(2): p. 156, 158, 160 passim.
91. Gebicke-Haerter, P.J., et al., *[Microglia: mechanisms of activation and significance in pathogenesis of neuropsychiatric illnesses]*. Nervenarzt, 1998. **69**(9): p. 752-62.
92. Gabrilovac, J., et al., *Expression, regulation and functional activities of aminopeptidase N (EC 3.4.11.2; APN; CD13) on murine macrophage J774 cell line*. Immunobiology, 2011. **216**(1-2): p. 132-44.
93. Imamura, N. and A. Kimura, *Effect of ubenimex (Bestatin) on the cell growth and phenotype of HL-60 and HL-60R cell lines: up-and down-regulation of CD13/aminopeptidase N*. Leuk Lymphoma, 2000. **37**(5-6): p. 663-7.
94. Ansorge, S., et al., *Recent insights into the role of dipeptidyl aminopeptidase IV (DPIV) and aminopeptidase N (APN) families in immune functions*. Clin Chem Lab Med, 2009. **47**(3): p. 253-61.
95. Krige, D., et al., *CHR-2797: an antiproliferative aminopeptidase inhibitor that leads to amino acid deprivation in human leukemic cells*. Cancer Res, 2008. **68**(16): p. 6669-79.
96. Reinkober, J., *Untersuchungen zur Rolle der Aminopeptidase N (CD13) bezüglich der pro-inflammatorischen Zytokinproduktion von Immunzellen* 2010, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
97. Kuno, R., et al., *Autocrine activation of microglia by tumor necrosis factor-alpha*. J Neuroimmunol, 2005. **162**(1-2): p. 89-96.
98. Opal, S.M. and V.A. DePalo, *Anti-inflammatory cytokines*. Chest, 2000. **117**(4): p. 1162-72.
99. Ling, E.A. and W.C. Wong, *The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts*. Glia, 1993. **7**(1): p. 9-18.
100. Ashmun, R.A., L.H. Shapiro, and A.T. Look, *Deletion of the zinc-binding motif of CD13/aminopeptidase N molecules results in loss of epitopes that mediate binding of inhibitory antibodies*. Blood, 1992. **79**(12): p. 3344-9.
101. Fiddler, C.A., et al., *The Aminopeptidase CD13 Induces Homotypic Aggregation in Neutrophils and Impairs Collagen Invasion*. PLoS One, 2016. **11**(7): p. e0160108.

102. Mina-Osorio, P. and E. Ortega, *Aminopeptidase N (CD13) functionally interacts with FcγR2b in human monocytes*. J Leukoc Biol, 2005. **77**(6): p. 1008-17.
103. Piedfer, M., et al., *Aminopeptidase-N/CD13 is a potential proapoptotic target in human myeloid tumor cells*. FASEB J, 2011. **25**(8): p. 2831-42.
104. Ghosh, M., et al., *CD13 restricts TLR4 endocytic signal transduction in inflammation*. J Immunol, 2015. **194**(9): p. 4466-76.
105. Tran, F.H. and J.J. Zheng, *Modulating the wnt signaling pathway with small molecules*. Protein Sci, 2017. **26**(4): p. 650-661.
106. Halleskog, C. and G. Schulte, *WNT-3A and WNT-5A counteract lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory changes in mouse primary microglia*. J Neurochem, 2013. **125**(6): p. 803-8.
107. Clevers, H. and R. Nusse, *Wnt/beta-catenin signaling and disease*. Cell, 2012. **149**(6): p. 1192-205.
108. Marchetti, B. and S. Pluchino, *Wnt your brain be inflamed? Yes, it Wnt!* Trends Mol Med, 2013. **19**(3): p. 144-56.
109. Zhang, D., et al., *Wnt-3a alleviates neuroinflammation after ischemic stroke by modulating the responses of microglia/macrophages and astrocytes*. Int Immunopharmacol, 2019. **75**: p. 105760.
110. L'Episcopo, F., et al., *Reactive astrocytes and Wnt/beta-catenin signaling link nigrostriatal injury to repair in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease*. Neurobiol Dis, 2011. **41**(2): p. 508-27.
111. Yao, Y.Y., et al., *Gastrodin attenuates proliferation and inflammatory responses in activated microglia through Wnt/β-catenin signaling pathway*. Brain Res, 2019. **1717**: p. 190-203.
112. Schaale, K., et al., *Wnt signaling in macrophages: augmenting and inhibiting mycobacteria-induced inflammatory responses*. Eur J Cell Biol, 2011. **90**(6-7): p. 553-9.
113. Koriyama, Y., et al., *Anti-inflammatory effects of lipoic acid through inhibition of GSK-3β in lipopolysaccharide-induced BV-2 microglial cells*. Neurosci Res, 2013. **77**(1-2): p. 87-96.
114. Cadigan, K.M. and M.L. Waterman, *TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(11).

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum 18.03.22 Unterschrift J-L Beermann

### Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Uwe Lendeckel für die Bereitstellung des interessanten Themas, sowie für die Unterstützung während der gesamten Bearbeitungszeit meiner Dissertation herzlich danken. Dabei gilt mein Dank insbesondere der sehr guten Betreuung, den motivierenden und produktiven Gesprächen, sowie der stets geöffneten Tür.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. rer. nat. Carmen Wolke für ihre große Unterstützung sowohl bei der Arbeit im Labor, als auch bei der Durchsicht und konstruktiven Kritik während des Schreibprozesses. Dabei hatte sie immer ein offenes Ohr für alle Fragen und Sorgen und Zeit für ermutigende und herzliche Gespräche.

Ich danke allen Mitarbeiter/innen des Instituts für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universität Greifswald für die Hilfsbereitschaft und sehr angenehme Zusammenarbeit. Insbesondere Frau Manja Möller und Frau Ines Schulz, die mir im Labor immer mit Rat und Tat beiseite standen und immer Zeit für persönliche Gespräche und Spaß bei der Arbeit hatten, möchte ich meinen außerordentlichen Dank aussprechen.

Ein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. von Bohlen und Halbach des Instituts für Anatomie und Zellbiologie für die Unterstützung bei der Anfertigung und Auswertung histologischer Präparate.

Mein ausdrücklicher Dank gilt meinen beiden Schwestern, meinem Freund und meinen tollen Freund/innen für die verständnisvolle, geduldige und liebevolle Unterstützung, während jeder Phase dieser Arbeit. Dadurch hat jede/r einzelne einen kleinen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die mir das Medizinstudium und die Durchführung einer wissenschaftlichen Doktorarbeit durch ihre Unterstützung auf allen Ebenen ermöglicht haben. Ich danke euch für euren unermüdlichen Zuspruch und euren Glauben an mich.