

**Charakterisierung der
Amyloidplaque-assoziierten Entzündungsreaktion
in APP23 transgenen Mäusen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt
beim Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von Stefanie Frank
aus Frankfurt am Main

Frankfurt 2009
(D30)

Vom Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität
als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. D. Steinhilber

Gutachter: Prof. Dr. D. Steinhilber

Prof. Dr. T. Deller

Datum der Disputation: 21. August 2009

Meiner Familie

Die Ergebnisse der folgenden Arbeit wurden bereits teilweise in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Frank, S., Burbach, G.J., Bonin, M., Walter, M., Streit, W., Bechmann, I., und Deller, T. (2008). "TREM2 is upregulated in amyloid plaque-associated microglia in aged APP23 transgenic mice". *Glia* **56** (13):1438-47

Frank, S., Copanaki, E., Burbach, G.J., Müller, U.C., und Deller, T. (2009). "Differential regulation of toll-like receptor mRNAs in amyloid plaque-associated brain tissue of aged APP23 transgenic mice". *Neuroscience Letters* **453** (1): 41-44

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	9
1. Einleitung	13
1.1 Überblick.....	13
1.2 Die Alzheimer-Erkrankung.....	14
1.2.1 Charakteristische Merkmale der Alzheimer-Erkrankung	16
1.3 Das Amyloidvorläuferprotein (APP).....	20
1.3.1 Struktur und physiologische Funktion	20
1.3.2 Die proteolytische Prozessierung von APP.....	21
1.3.2.1 Die nicht-amyloidogene APP-Prozessierung.....	22
1.3.2.2 Die amyloidogene APP-Prozessierung	23
1.4 Einfluss genetischer Faktoren und Risikofaktoren auf die Alzheimer- Erkrankung.....	25
1.5 Neuroinflammation im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung.....	28
1.5.1 Die plaqueassoziierte Entzündungsreaktion.....	28
1.5.2 Effektormoleküle der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion	30
1.5.3 Die Beteiligung des angeborenen Immunsystems an der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion.....	31
1.5.3.1 Aktivierung des angeborenen Immunsystems.....	31
1.5.3.2 Der Einfluss der Phagozytose auf die Alzheimer-Erkrankung	32
1.5.3.3 Seneszenz von Mikrogliazellen.....	33
1.5.4 Die Beteiligung des Endothelgewebes an der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion.....	34
1.6 Das APP23 transgene Mausmodell.....	35
1.7 Zielsetzung der Arbeit	38
1.7.1 Identifizierung neuer regulatorischer Kandidatenmoleküle.....	38
1.7.2 Die plaqueassoziierte Entzündungsreaktion und das angeborene Immunsystem	39
1.7.3 Beteiligung des Endothels an der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion	39

2.	Material und Methoden	40
2.1	Geräte und Materialien	40
2.1.1	Geräte	40
2.1.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	41
2.1.2.1	Chemikalien	41
2.1.2.2	Verbrauchsmaterialien	41
2.2	Tiere und Gewebepräparation	46
2.3	Laser Mikrodissektion	47
2.3.1	Histochemische Amyloidfärbung.....	47
2.3.2	Laser Mikrodissektion der Amyloidplaques	47
2.3.3	Histochemische Endothelfärbung	49
2.3.4	Laser Mikrodissektion des Endothels	49
2.4	RNA-Arbeitstechniken	50
2.4.1	RNA-Isolierung und Aufreinigung	50
2.4.2	RNA-Qualitätsanalyse.....	50
2.4.3	Reverse Transkription	51
2.5	Mikroarray-Analyse	51
2.5.1	RNA-Amplifikation	51
2.5.2	Hybridisierung und Scannen der Mikroarrays	52
2.5.3	Auswertung der Rohdaten.....	53
2.6	DNA-Arbeitstechniken	55
2.6.1	Präparation der Schwanzspitzen-DNA zur Genotypisierung.....	55
2.6.2	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	55
2.6.3	Quantitative RT-PCR	56
2.6.4	Amplifizierung der Endothel-cDNA für die qPCR-Analyse	58
2.6.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	60
2.7	Immunfärbungen	61
2.7.1	Immunfluoreszenzfärbungen auf Kryostatschnitten	61
2.7.2	Immunfluoreszenzfärbung von Vibratomschnitten.....	62
2.7.3	Histochemische DAB-Färbung auf Vibratomschnitten	62
2.8	Proteinextraktion und Proteinanalyse	64
2.8.1	Proteinextraktion	64
2.8.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	64

2.8.3	Western Blot-Analyse	65
2.8.4	Western Blot-Immudetektion.....	65
2.8.4.1	ECL-System	66
2.8.4.2	Infrarot-System.....	66
2.9	Statistische Auswertung.....	68
2.9.1	Mikroarray-Untersuchungen	68
2.9.2	qPCR-Untersuchungen von Plaques und plaqueassoziiertem Gewebe.....	69
2.9.3	qPCR-Untersuchungen des Endothelgewebes	69
2.9.4	Auswertung der Western Blot-Ergebnisse und der Mikrogliazählung	69
3.	Ergebnisse	70
3.1	Isolierung qualitativ hochwertiger RNA aus verschiedenen plaqueassoziierten Geweben APP23 transgener Mäuse.....	70
3.1.1	Mikrodissektion von Amyloidplaques für die Mikroarray-Analyse	70
3.1.2	Mikrodissektion von Amyloidplaques (qPCR-Analyse).....	73
3.1.3	Methodenetablierung: Isolierung von Endothelgewebe.....	74
3.2	Methodenetablierung: Kombination von LMD und Mikroarray- Analyse zur Identifizierung von Kandidatengenen	77
3.2.1	Differentielle Genexpression in mikrodissoziierten Amyloidplaques	77
3.2.2	Verifizierung der Mikroarray-Ergebnisse durch qPCR-Analyse	81
3.2.3	Verstärkte Trem2 und Dap12 mRNA Expression in plaqueassoziiertem Gewebe: Bestätigung der Mikroarray-Daten durch qPCR-Analyse	84
3.2.4	Verstärkte Trem2 Proteinexpression im Kortex von APP23 transgenen Mäusen ...	85
3.2.5	Lokalisation von Trem2 Protein auf der Oberfläche von Mikrogliazellen in APP23 transgenen und Kontrollmäusen.....	87
3.2.5.1	Mikrogliaedichte in plaqueassoziiertem und plaquefreiem Gewebe	88
3.3	Untersuchung spezifischer Regulatoren der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion.....	91
3.3.1	Plaqueassoziierte mRNA Expression von TNF- α und TGF- β	91
3.3.2	Plaqueassoziierte mRNA Expression von Toll-like Rezeptoren.....	92
3.3.3	Plaqueassoziierte mRNA Expression von „Supressors of Cytokine Signaling“ (SOCS)	93

3.3.4	Reaktion des Endothelgewebes auf Amyloidablagerungen im Gehirn APP23 transgener Mäuse.....	95
3.3.4.1	Differentielle mRNA Expression in plaqueassoziiertem Endothelgewebe im Vergleich zu Endothelgewebe aus nicht-transgenen Mäusen	95
4.	Diskussion.....	97
4.1	Die plaqueassoziierte Entzündungsreaktion.....	97
4.2	Methodik	98
4.2.1	Färbung und Fixierung der Kryoschnitte für die Isolierung von Amyloidplaques..	98
4.2.2	Mikrodissektionsprozedur	98
4.2.3	Auswahl der Sammelstellen im Mausgehirn.....	99
4.2.4	Amplifikation der RNA und Mikroarray-Analyse	100
4.2.5	Vergleichbarkeit von Mikroarray- und qPCR-Daten	101
4.3	Die Rolle von Trem2 bei der Alzheimer-Erkrankung	102
4.4	Andere Regulatoren der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion.....	104
4.4.1	Die Rolle des angeborenen Immunsystems bei der Regulierung der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion	104
4.4.1.1	Der Einfluss der „Supressors of Cytokine Signaling“ auf die plaqueassoziierte Entzündungsreaktion	106
4.4.2	Die Reaktion des Endothels auf Amyloidablagerungen im Gehirn	107
5.	Zusammenfassung	110
6.	Literaturverzeichnis.....	112
	Danksagung	132
	Publikationen	134
	Lebenslauf.....	135

Abkürzungsverzeichnis

AD	Alzheimer's disease
ADAM	A disintegrin and metalloprotease
AICD	Amyloid Precursor Protein (APP) intracellular domain
APH-1	Anterior pharynx-defective 1
APLP	„amyloid precursor-like proteins“
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid-Vorläufer-Protein („Amyloid-Precursor-Protein“)
A β	Amyloid- β
A β 40	40 Aminosäuren langes Amyloid- β -Peptid
A β 42	42 Aminosäuren langes Amyloid- β -Peptid
BACE	β Amyloid Precursor Protein (APP) cleaving enzyme
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BSA	bovines (Rinder) Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C1q	Komplementfaktor 1q
CAA	Zerebrale Amyloidangiopathie
cDNA	komplementäre DNA
CoCl ₂	Cobalddichlorid
cRNA	komplementäre RNA
CT	Schwellenwert-Zyklus („Cycle Threshold“)
CTF	„C-terminal Fragments“
CXCL10	CXC Chemokine Ligand 10
CXCR3	CXC Chemokine Receptor 3
d.h.	das heißt
DAB	Diaminobenzidin
DCs	Dendritische Zellen
dCTP	2'-Deoxycytidin 5'-triphosphat
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
DEPC	Diethylene Pyrocarbonate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	2'-Desoxynucleosidtriphosphat
EAE	experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis
ECL	„enhanced chemoluminescence“

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatischer Retikulum
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
FAD	„Familial-Alzheimer-Disease“
FD-Filter	Fold difference-Filter
Hex B	Hexosaminidase B
HRP	horseradish peroxidase
Iba1	ionized calcium binding adapter molecule 1
IgG	Immunglobulin G
IL10r b	Interleukin-10 Rezeptor b
JAK/STAT	Janus-Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
LMD	Laser Mikrodisektion
LOWESS	locally weighted scatterplot smoothing
LTP	long term potentiation
M	molar (mol/l)
MAPT	Mikrotubulin-assoziiertes Protein
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumdichlorid
MHC II	Major Histocompatibility Complex II
min	Minute(n)
MIP-1 α (CCL3)	Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha (Chemokine (CC-motif) Ligand 3)
mm	Millimeter
μ m	Mikrometer
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Msr2	Macrophage scavenger receptor 2
nACh-Rezeptoren	nikotinsche Acetylcholinrezeptoren
NaCl	Natriumchlorid
NFT	Neurofibrillenbündel („neurofibrillary tangles“)
NF- κ B	Nukleärer Faktor- κ B (“nuclear factor- κ B”)
ng	Nanogramm
NH ₄ NiSO ₄	Ammoniumnickelsulfat
NKs	Natürliche Killerzellen

NO	Stickstoffmonoxid
PB	Phosphatpuffer
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung („phosphate buffered saline“)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEN2	Presenilin enhancer protein 2
PET	Polyethylenterephthalat
PFA	Paraformaldehyd
PHF	Paired helical filaments
PLOSL	Polyzystische Lipomembranöse Osteodysplasie mit sklerosierender Leukenzephalopathie
POL	Polyester
PS1	Präsenilin 1
PS2	Präsenilin 2
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qPCR	Quantitative Polymerase Kettenreaktion
RAGE	Receptor for advanced glycation end products
RIN	RNA Integrity Number
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-Time-PCR
sAPP α	soluble Amyloid Precursor Protein α
sAPP β	soluble Amyloid Precursor Protein β
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SOCS	Suppressors of Cytokine Signaling
Sog.	sogenannte
SSC	Saline Sodiumcitrat
Std	Stunde(n)
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TGF- α	Transforming growth factor- α
TGF- β	Transforming growth factor- β
Thy-1.2	Thymocyte differentiation antigen 1 (Allel 2)
TLR	Toll-like Rezeptoren

TNF- α	Tumor necrosis factor- α
Trem2	Triggering receptor expressed on myeloid cells
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vip	Vasointestinales Peptid
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Überblick

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung der Amyloidplaque-assoziierten Entzündungsreaktion in APP-transgenen Mäusen. Die Alzheimer-Erkrankung tritt aktuell aufgrund ihrer wirtschaftlichen und epidemiologischen Bedeutung in den Vordergrund des Interesses. Betrachtet man die Altersstruktur der Bevölkerung und die Prävalenz der Erkrankung, die nahezu jeden Zehnten über 65 Jahre und jeden Vierten über 90 Jahre betrifft, zeigt sich, dass sie in den nächsten Jahren noch an Bedeutung zunehmen wird.

Pathohistologisch ist die Alzheimer-Erkrankung durch Ablagerungen von unlöslich aggregierten Proteinen innerhalb und außerhalb der Nervenzellen charakterisiert. Dabei handelt es sich intrazellulär um die sogenannten Neurofibrillenbündel („Neurofibrillary tangles“, NFT), die hauptsächlich aus dem abnorm hyperphosphorylierten Tau-Protein bestehen.

Bei den extrazellulären Ablagerungen, die auch in der Umgebung von sowie in Blutgefäßen vorkommen, handelt es sich um die sogenannten Amyloidplaques. Diese bestehen aus dem zu unlöslichen Fibrillen zusammengelagerten Amyloid- β -Protein ($A\beta$), einem Spaltprodukt des Amyloid-Vorläuferproteins APP. Man unterscheidet diffuse und senile $A\beta$ -Plaques, wobei die senilen Plaques mit dystrophen Neuriten assoziiert und von Astrozyten und Mikrogliazellen umgeben sind. Wenngleich die Amyloidplaques auch als pathohistologisches Merkmal der Erkrankung bekannt sind, sind ihre biologische Bedeutung und ihre Auswirkungen bisher weitestgehend unverstanden.

In der aktuellen Literatur wird unter anderem auf die Umgebung der $A\beta$ -Plaques fokussiert, da hier eine plaqueassoziierte Entzündungsreaktion lokalisiert ist, die mit dem Fortschreiten der Erkrankung in Verbindung gebracht wird. Die Bedeutung der Entzündungsreaktion wird kontrovers diskutiert. Einerseits hat sie positive Auswirkungen, wie die Abräumung der unlöslichen Amyloidablagerungen, andererseits zeigt sie aber auch negative Effekte, wie die erhöhte Expression proinflammatorischer Mediatoren, die zu einer verstärkten Entzündungsreaktion führen können. Neueste Untersuchungen ordnen der plaqueassoziierten glialen Reaktion neuroprotektive Funktionen zu. Insofern kann die plaqueassoziierte Entzündungsreaktion als wesentlicher Teil der Alzheimer-Erkrankung wahrgenommen werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, die plaqueassoziierte Entzündungsreaktion näher zu charakterisieren. Dabei wurden zwei methodisch prinzipiell

verschiedene Ansätze genutzt: Im ersten Teil der Arbeit wurde in einem hypothesenfreien Ansatz versucht, neue regulatorische Kandidatenmoleküle für die plaqueassoziierte Entzündungsreaktion zu identifizieren. Im zweiten und dritten Teil der Arbeit wurde mit einem hypothesenbasierten Ansatz die plaqueassoziierte mRNA Expression verschiedener Moleküle untersucht, die bereits mit der Alzheimer-Erkrankung in Zusammenhang gebracht werden konnten. Mit Hilfe dieser Ansätze konnten neue regulatorische Kandidatenmoleküle ermittelt werden, die eventuell zu neuen Therapieansätzen führen könnten.

1.2 Die Alzheimer-Erkrankung

Die Diagnose der Alzheimer-Erkrankung als progressive Demenzerkrankung erfolgte erstmals zu Beginn des 20. Jahrhunderts durch den Neurobiologen und Psychiater Alois Alzheimer. Als junger Assistenzarzt untersuchte er in der damaligen „Irrenanstalt“ Frankfurt am Main die 51-jährige Patientin Auguste Deter, die an schwerem Gedächtnisverlust, Verwirrtheit, Wesensveränderungen und Desorientierung litt. Alois Alzheimer untermauerte seine klinische Diagnose durch neuropathologische Befunde, die er durch die post mortem Untersuchung des Gehirngewebes von Auguste Deter erhalten hatte, die 4 ½ Jahre nach der Diagnose verstorben war. Dabei entdeckte er die Bildung von „Ablagerungen flammenartiger Gestalt“, den sog. Plaques, und „miliaren Herdchen“, die heute als neurofibrilläre Bündel bezeichnet werden. Alzheimer fasste seine Ergebnisse daraufhin unter dem Titel „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ zusammen, die 1907 veröffentlicht wurde (Alzheimer, 1907).

Als klinisches Leitsymptom der Alzheimer-Erkrankung gilt die Demenz (von lat. *demens*, „verwirrt“), die als Störung höherer geistiger Funktionen des Gehirns, einschließlich Gedächtnis, Denken, Orientierung, Auffassung, Rechnen, Lernfähigkeit, Sprache und Urteilsvermögen, verstanden wird (Jelicic et al, 1995; Dallas Barba und Bolles, 1998; Berger et al, 1999; Förstl und Kurz, 1999; Ferretti et al, 2001). Dieser Verlust von geistigen Funktionen führt dazu, dass alltägliche Aktivitäten nicht mehr selbstständig durchgeführt werden können (Carlesimo und Oscar-Berman, 1992; Jelicic et al, 1995). Die Krankheit tritt vorwiegend im Alter auf und beginnt mit scheinbar zufälliger Vergesslichkeit. Treten diese Symptome langsam und schleichend auf und können andere Demenzursachen ausgeschlossen werden, liegt die Diagnose der Alzheimer-Erkrankung nahe (Jelicic et al, 1995; Förstl und Kurz, 1999). Zu den Demenzerkrankungen zählen neben der Alzheimer-Demenz die Vaskuläre Demenz, die Frontotemporale Demenz sowie die Demenz im Rahmen der

Parkinson-Erkrankung (Fratiglioni et al, 2000; Jellinger et al, 2002; Tsuchiya et al, 2002; Braaten et al, 2006). Aktuelle Untersuchungen haben gezeigt, dass die Alzheimer-Erkrankung mit weltweit 15 Millionen betroffenen Patienten die häufigste Form der Demenzerkrankung ist (Haass und De Strooper, 1999; Fratiglioni et al, 2000; Honig und Mayeux, 2001; Ferri et al, 2005). Im Gehirn des Alzheimerpatienten kommt es zu einem Absterben von Nervenzellen und ihrer Verbindungen, d.h. zu einer Atrophie des Gehirngewebes, die in den Regionen beginnt, die mit Gedächtnis und Informationsverarbeitung assoziiert sind (unter anderem Hippokampus, Temporallappen und basales Vorderhirn; Abbildung 1) (Mann, 1991; Cummings und Cotman, 1995). Neuropathologisch lassen sich in Gehirnen von Patienten mit Alzheimer charakteristische Ablagerungen von unlöslich verklumpten Proteinen innerhalb und außerhalb der Nervenzellen nachweisen (Bowen und Davidson, 1980; Bergeron, 1990; Braak und Braak, 1991; Goedert et al, 1991; Jellinger und Brancher, 1998).

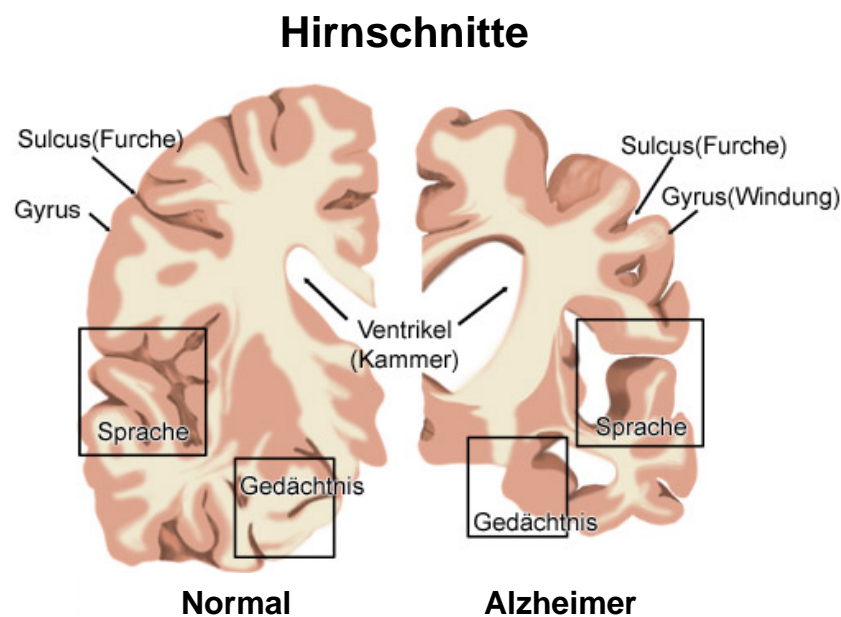


Abbildung 1: Vergleich der Hirnschnitte von gesunden und an Alzheimer erkrankten Personen

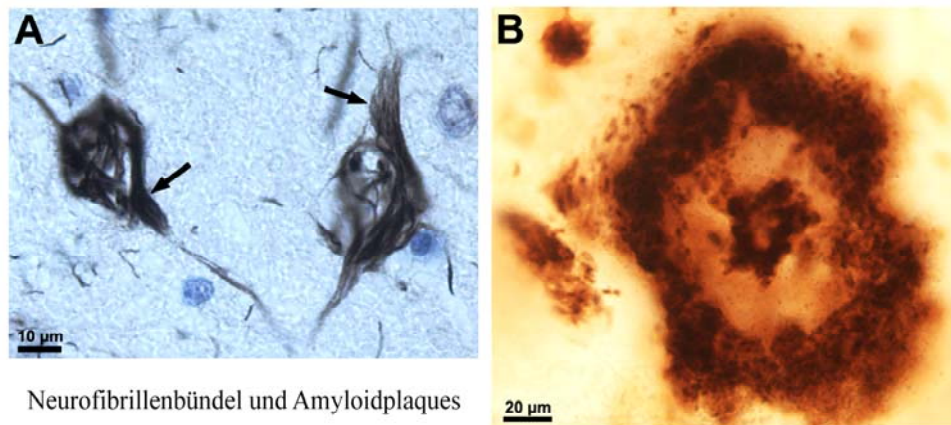
Der Vergleich der Hirnschnitte von gesunden und an Alzheimer erkrankten Personen zeigt eine Atrophie des Gehirngewebes, die vorzugsweise in Regionen beginnt, die mit Gedächtnis und Informationsverarbeitung assoziiert sind (unter anderem Hippokampus und Temporallappen) (entnommen aus <http://www.alzheimerforschung.de>).

Betrachtet man die derzeitige Altersstruktur der Bevölkerung, die sich in den letzten Jahrzehnten stark gewandelt hat, ergibt sich daraus eindeutig eine Notwendigkeit für die Entwicklung präventiver Maßnahmen und therapeutischer Medikamente zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen. Die Entwicklung der Altersstruktur in den Industrienationen zeigt, dass die Lebenserwartung der Menschen stetig steigt und damit auch der Anteil der Bevölkerung, der älter als 65 Jahre ist (Roush, 1996). Epidemiologische Untersuchungen konnten zeigen, dass die Prävalenz der Alzheimer-Erkrankung mit dem Alter drastisch zunimmt (Rocca et al, 1991; Mattson, 2004; Ferri et al, 2005). Mittlerweile gibt es in Deutschland schätzungsweise über 1 Million Demenzpatienten (Deutsche Alzheimer-Gesellschaft). Bei den über 65-Jährigen ist jeder Zehnte und bei den über 90-Jährigen jeder Dritte von einer Demenz betroffen. Pro Jahr treten in Deutschland fast 200 000 neue Erkrankungsfälle auf. Aktuelle Statistiken gehen davon aus, dass die Anzahl der erkrankten Menschen in den nächsten 30 Jahren weltweit um mehr als 40 % steigen wird (Mattson, 2004; Ferri et al, 2005). Die Alzheimer-Erkrankung ist zu 60 % Ursache der Demenzen, d.h. bei den über 90-Jährigen ist jeder Vierte an Alzheimer erkrankt (Robert Koch-Institut, 2005; Ghebremedin und Deller, 2007) (siehe auch Tabelle 1).

Da die durchschnittlichen Kosten für die Behandlung eines Alzheimer-Patienten in Deutschland ca. 45 000 Euro betragen (Robert Koch-Institut, 2005), stellt die Erkrankung neben dem Leid für die Betroffenen und ihre Familien zusätzlich eine erhebliche Belastung der Volkswirtschaft dar.

1.2.1 Charakteristische Merkmale der Alzheimer-Erkrankung

Auch heute noch erfordert die eindeutige Diagnose der Alzheimer-Erkrankung die pathohistologische post mortem Untersuchung des Gehirns. Die Diagnose umfasst dabei die Identifizierung der charakteristischen Ablagerungen von unlöslich verklumpten Proteinen innerhalb und außerhalb der Nervenzellen (Braak und Braak, 1991; Braak et al, 1996; Goedert, 1996; Jellinger und Brancher, 1998; Thal et al, 2005). Intrazellulär befinden sich die sogenannten Neurofibrillenbündel (NFT, „Neurofibrilläre Tangles“, Abbildung 2A), die hauptsächlich aus dem hyperphosphorylierten Zytoskelett-Protein Tau bestehen, einem neuronalen Mikrotubulin-assoziierten Protein (MAPT) (Goedert et al, 1988; Mandelkow und Mandelkow, 1998).



Neurofibrillenbündel und Amyloidplaques

Abbildung 2: Alzheimer-typische Proteinablagerungen

Bild (A) zeigt die durch die Aggregation von abnorm hyperphosphoryliertem Tau entstandenen intrazellulären Neurofibrillenbündel (Pfeil). Bild (B) zeigt die durch die Aggregation von Amyloid- β entstandenen extrazellulären Amyloidplaques (entnommen aus Ghebremedhin und Deller, 2007).

Das Tau-Protein ist beim gesunden Menschen an der Erhaltung der normalen Nervenzellstruktur und an intrazellulären Transportvorgängen beteiligt. Dabei liegt das Tau-Protein mit den Mikrotubuli assoziiert in Axonen vor und bildet die sog. Fibrillen, die zur Stabilisierung des Zytoskeletts dienen (Mandelkow und Mandelkow, 1998; Friedhoff et al, 2000). Diese Stabilität ist unter anderem essentiell für die axonalen Transportvorgänge der Zellen (Mandelkow et al, 1999). Dabei bestimmt der Grad der Phosphorylierung die Stärke der Interaktion von Tau-Protein und Mikrotubuli, wobei eine geringere Phosphorylierung zur Stärkung der Interaktion führt (Friedhoff et al, 2000). Bei der Alzheimer-Erkrankung kommt es zu pathologischen Veränderungen, d.h. zu einer abnormen Hyperphosphorylierung des Proteins, die zu einem Verlust der normalen Funktionen des Tau-Proteins führen. Infolge dieser abnormen Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins löst dieses sich aus der Interaktion und es kommt zur Bildung von sogenannten gepaarten helikalen Filamenten („Paired helical filaments“, PHF). Dadurch kommt es zu einer Zellstoffwechselstörung, zur Entstehung der charakteristischen Neurofibrillenbündel und schließlich zur Degeneration der betroffenen Nervenzellen (Goedert et al, 1991; Iqbal et al, 1998).

Außerhalb der Nervenzellen und in der Umgebung von Blutgefäßen finden sich ebenfalls unlösliche Proteinablagerungen, die sogenannten Amyloidplaques (Abbildung 2B). Diese extrazellulären Ablagerungen wurden bereits Mitte des 19. Jahrhunderts entdeckt und als „amyloid“, also „stärkeähnlich“, bezeichnet, da sie sich mit Färbemethoden nachweisen

lassen, mit denen auch Stärke angefärbt werden kann (Virchow, 1853). Der Hauptbestandteil der Amyloidplaques und vaskulären Amyloidablagerungen ist das Amyloid- β -Protein ($A\beta$), ein Spaltprodukt des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) (Hardy und Selkoe, 2002). Das APP ist ein physiologischer Bestandteil der meisten Zellmembranen mit bislang nicht voll aufgeklärter Funktion. Es wird im Krankheitsfall von zwei Enzymen, den β - und γ -Sekretasen so gespalten, dass es zur Bildung und Aggregation des krankhaften $A\beta$ -Proteins kommt (Haass et al, 1992; Hardy und Selkoe, 2002).

Das $A\beta$ -Peptid besteht aus maximal 40 bzw. 42 Aminosäureresten und wurde vor 24 Jahren erstmals aus Hirnhautblutgefäßen von Patienten mit Down-Syndrom isoliert und sequenziert (Glennner und Wong, 1984). Die extrazelluläre Ansammlung des 4kDa großen Amyloid- β -Peptids ($A\beta$) führt zu dessen Aggregation und zur Entstehung von diffusen (amorphen) und neuritischen (senilen) Plaques. Es gibt zwei verschiedene $A\beta$ -Peptide, das 40 Aminosäuren lange $A\beta_{40}$ -Peptid und das 42 Aminosäuren lange $A\beta_{42}$ -Peptid. $A\beta_{42}$ macht nur 5-10 % der Gesamtmenge von $A\beta_{40/42}$ aus, ist aber toxischer als das $A\beta_{40}$ -Peptid und aggregiert wesentlich schneller (Hartmann et al, 1997). Bei der Aggregation von $A\beta$ kommt es zuerst zu einer Zusammenlagerung von einzelnen $A\beta$ -Peptiden zu Oligomeren des Peptids. Bei steigender $A\beta$ -Konzentration lagern sich weitere $A\beta$ -Peptide an, und es entstehen sogenannte Protofibrillen, aus denen sich bei weiterer $A\beta$ -Aggregation Fibrillen entwickeln (Hardy und Selkoe, 2002). Diffuse Plaques haben eine amorphe Gestalt, enthalten vorwiegend unstrukturierte, d.h. mono- bis oligomere Formen des Amyloid- β -Peptids und nur wenige Amyloid- β -Protofibrillen oder Fibrillen. Senile Plaques enthalten einen extrazellulären Kern aus dichten Bündeln von Amyloid- β -Fibrillen und Protofibrillen, sind assoziiert mit dystrophen Neuriten, die sowohl zerfallene Axone als auch Dendriten darstellen und sind umgeben von Astrozyten und Mikrogliazellen (Yamaguchi et al, 1988; 1989).

Die sogenannte „Amyloid-Kaskaden-Theorie“ stellt einen Zusammenhang zwischen Amyloid, dem Tau-Protein und dem Entstehen der Alzheimer-Erkrankung her. Dabei steht die Bildung von löslichem $A\beta$ (in monomerer und oligomerer Form) am Anfang einer Kaskade, die schließlich zum neuronalen Zelltod und der daraus resultierenden Demenz führt. Hierbei wird davon ausgegangen, dass lösliches $A\beta$ einerseits direkt neurotoxisch wirken kann (Oddo et al, 2003), andererseits durch Aggregation zu einer Astrozytose und Gliose in der Umgebung der Amyloidplaques führt. Diese inflammatorische Reaktion wiederum führt zu oxidativem Stress, in der Folge zu neuronaler Schädigung, neuronaler Dysfunktion, einem

Neurotransmitter-Defizit und letztlich zu neuronalem Zelltod. Parallel dazu führen das Neurotransmitter-Defizit und der oxidative Stress zu einem Ungleichgewicht der Aktivität verschiedener Kinasen und Phosphatasen. Dieses Ungleichgewicht bewirkt wiederum die Hyperphosphorylierung von Tau, die daraus resultierende Bildung von Neurofibrillenbündeln und zuletzt ebenfalls den neuronalen Zelltod (Hardy und Selkoe, 2002; Citron, 2004; Hardy, 2006).

Die Alzheimer-typischen Pathologien, d.h. vor allem die intrazellulären Ablagerungen von hyperphosphoryliertem Tau-Protein, aber auch die extrazellulären Amyloid- β -Ablagerungen, beginnen im Regelfall in bestimmten Gebieten des Gehirns und breiten sich auf vorhersagbare Weise weiter aus. Das dadurch entstehende Schädigungsmuster wurde von Braak und Braak 1991 in bestimmte Stadien gegliedert („Alzheimer-Staging“, Abbildung 3).

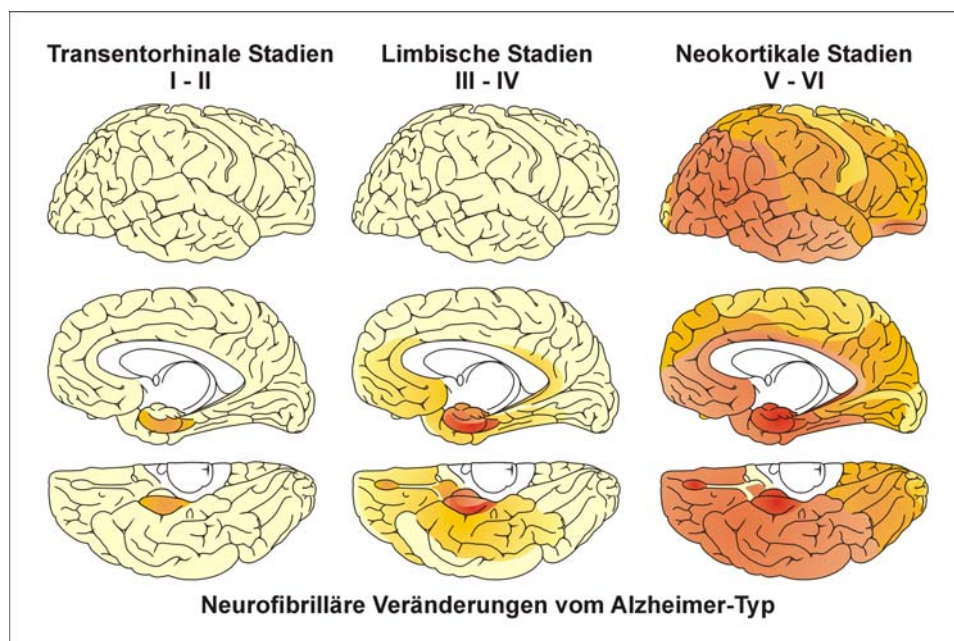


Abbildung 3: Einteilung der Alzheimer-Erkrankung nach Braak und Braak (1991)

Die Alzheimer-typischen Pathologien, vor allem die Neurofibrillenbündel, entstehen zunächst im Temporallappen des Gehirns (Stadien I und II), als nächstes im Hippokampus und anderen Teilen des limbischen Systems (Stadien III und IV) sowie schließlich im Kortex (Stadien V und VI) (entnommen aus Ghebremedhin und Deller, 2007).

Diese Einteilung der Alzheimer-Erkrankung in sechs Verlaufsstadien wird seit 1997 aufgrund einer Empfehlung des amerikanischen National Institute on Aging (NIA) international eingesetzt und ist zum „Goldstandard“ der Alzheimer-Stadieneinteilung geworden.

1.3 Das Amyloidvorläuferprotein (APP)

1.3.1 Struktur und physiologische Funktion

Wie zuvor bereits erwähnt, treten als neuropathologische Charakteristika der Alzheimer-Erkrankung unter anderem Amyloid- β -Plaques auf, deren Hauptbestandteil Amyloid- β durch proteolytische Spaltung aus dem Amyloid-Vorläufer-Protein APP hervorgeht. Das APP ist ein Typ I Transmembranprotein, das aus einer großen N-terminalen Ektodomäne, einer Transmembrandomäne und einer kurzen cytoplasmatischen C-terminalen Domäne besteht (Kang et al, 1987). APP wird ubiquitär in fast allen Zelltypen und Geweben exprimiert (Selkoe et al, 1988). Durch alternatives Spleißen der mRNA entstehen insgesamt 8 Isoformen, wobei im Gehirn hauptsächlich drei Isoformen vorkommen, die aus 695, 751 oder 770 Aminosäuren bestehen (Sandbrink et al, 1994; Selkoe, 1994). Während die längeren Isoformen APP₇₅₁ und APP₇₇₀ in fast allen Geweben gebildet werden, exprimieren neuronale Zellen hauptsächlich die kürzere Isoform APP₆₉₅ (Koo et al, 1990a; Haass et al, 1994a).

APP ist Mitglied einer evolutionär hochkonservierten Genfamilie. Im Menschen und in der Maus konnten neben dem APP auch APLP1 und APLP2 („Amyloid precursor-like proteins“) identifiziert werden (Wasco et al, 1992; 1993). Während APP und APLP2 ubiquitär exprimiert werden, wird APLP1 ausschließlich im Nervensystem gebildet. APLP1 und APLP2 zeigen einen dem APP-ähnlichen Aufbau, besitzen allerdings keine Amyloid- β -Domäne, d.h. sie bilden kein Amyloid- β .

Die physiologische Funktion und Bedeutung von APP ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Allerdings wird APP mittlerweile eine Beteiligung an diversen physiologischen Prozessen zugesprochen, wie z.B. Proteaseinhibition, Förderung von Zelladhäsion und Zellwachstum sowie Neuroprotektion (Selkoe, 1994; 1999). Ein wichtiger Schritt in der Untersuchung der physiologischen Funktion von APP war die Generierung von „Knockout“-Mäusen, in denen beide Allele ausgeschaltet wurden. Diese „Knockout“-Mäuse zeigten im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen keinen ausgeprägten Phänotyp (Zheng et al, 1995), sondern lediglich ein Defizit im postnatalen Wachstum. Anscheinend übernehmen die anderen Mitglieder der Genfamilie, APLP1 und APLP2, einige der Funktionen von APP.

Zusätzlich wird APP auch eine physiologische Funktion beim axonalen Transport in Neuronen zugeschrieben. Dabei erfolgt der axonale Transport von APP zu den präsynaptischen Nervenendigungen anterograd (Koo et al, 1990; Kamal et al, 2000), wobei APP dann präsynaptisch akkumuliert (Schubert et al, 1991). Neuere Befunde zeigen, dass

APP ebenfalls eine Rolle bei synaptischer Plastizität spielt (Ring et al, 2007). Dabei scheint sAPP α dazu in der Lage zu sein, die physiologischen Funktionen von APP zu übernehmen (Ring et al, 2007).

1.3.2 Die proteolytische Prozessierung von APP

Die Spaltung von APP erfolgt durch drei verschiedene Proteasen, auch Sekretasen genannt, die α -, β - und γ -Sekretase (Lichtenthaler und Haass, 2004) (Abbildung 4). Dabei konkurrieren alle Sekretasen um dasselbe Substrat, das APP. Die APLPs unterliegen zwar auch der Prozessierung durch die α -, β - und γ -Sekretase, jedoch stellt APP die einzige Quelle für Amyloid- β dar. Generell lässt sich die Prozessierung von APP in zwei verschiedene Wege einteilen: in die amyloidogene und die nicht-amyloidogene Prozessierung, auf die in den folgenden Absätzen näher eingegangen wird.

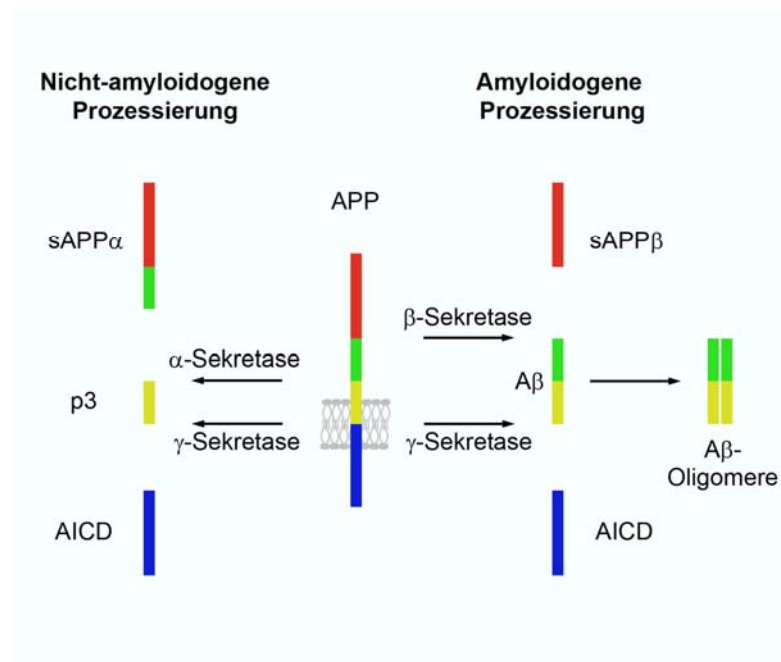


Abbildung 4: Amyloidogene und nicht-amyloidogene Prozessierung des APP-Proteins („Amyloid Precursor protein“, Amyloidvorläuferprotein)

Das Vorläuferprotein APP wird durch drei verschiedene Sekretasen, die α -, β - und γ -Sekretase, auf dem amyloidogenen Weg in das A β -Protein und auf dem nicht-amyloidogenen Weg in die löslichen Fragmente p3 und sAPP α gespalten.

1.3.2.1 Die nicht-amyloidogene APP-Prozessierung

Der größte Teil des APP-Proteins wird über den nicht-amyloidogenen Weg prozessiert, der mit einer Spaltung des APPs durch die α -Sekretase beginnt. Die α -Sekretase schneidet das APP kurz vor der Transmembrandomäne und innerhalb der A β -Domäne zwischen dem Lysin₁₆ und Leucin₁₇, wodurch die Generierung von A β verhindert wird. Dadurch wird die N-terminale Ektodomäne von APP, sAPP α , als lösliches Molekül freigesetzt und über die Plasmamembran extrazellulär sezerniert. Das in der Membran verbleibende 83 Aminosäuren große C-terminale APP-Fragment (C83) wird entweder reinternalisiert und in Lysosomen abgebaut oder aber durch die γ -Sekretase in zwei kleinere Fragmente gespalten (Haass et al, 1992). Dabei entstehen das lösliche p3-Fragment (Haass et al, 1993), das ebenfalls extrazellulär sezerniert wird und eine intrazelluläre Domäne, die als „APP intracellular domain“, AICD, bezeichnet wird (Selkoe, 2001).

AICD wird nach Bindung an das Protein FE65 als Transkriptionsfaktor für verschiedene Gene wie die Alzheimer-relevanten Gene APP und BACE (Von Rotz et al, 2004) sowie die für die Regulierung von Aktin relevanten Gene α 2-Actin und Transgelin diskutiert (Cao und Sudhoff, 2001; Von Rotz et al, 2004; Müller et al, 2007).

Die bisher identifizierten α -Sekretasen können alle der ADAM-Familie („a disintegrin and metalloprotease“) zugeordnet werden. Hierbei scheinen die α -Sekretasen vorrangig in einer Distanz von 12-13 Aminosäuren zur Membran und unabhängig von der Aminosäuresequenz von APP zu schneiden. Für die Erkennung der Schnittstelle ist eine α -helikale Struktur von APP notwendig (Sisodia, 1992). Drei Mitglieder der ADAM-Familie, ADAM 9, ADAM 10 und ADAM 17, können als α -Sekretasen in verschiedenen Zellsystemen agieren, wobei nur ADAM 10 und ADAM 17 sowohl eine α -Sekretase-Aktivität aufweisen als auch genau in dem Abstand zur Membran APP schneiden (Lammich et al, 1999).

Da die α -Sekretase-Spaltung innerhalb der A β -Domäne stattfindet, wird die Entstehung von A β verhindert. Dem dabei entstehenden löslichen sAPP α -Fragment werden bisher verschiedene biologische Funktionen zugesprochen. Dazu gehören die Stimulation der Zellproliferation, die Verstärkung der Zelladhäsion und die Inhibition von Serinproteasen (Chen und Yankner, 1991; Schubert et al, 1989) sowie verschiedene neuroprotektive Funktionen (Mattson, 1997; Luo et al, 2001; Ring et al, 2007). Die neuroprotektiven Eigenschaften von sAPP α werden unter anderem auf die Stabilisierung der Calcium-Homöostase sowie auf die Aktivierung des anti-apoptotischen NF- κ B-Signalwegs

zurückgeführt (Barger und Mattson, 1996; Mattson et al, 1993; Schubert und Behl, 1993). Zudem scheint es für die Mehrzahl der physiologischen Funktionen von APP verantwortlich zu sein (Ring et al, 2007). Ein möglicher therapeutischer Ansatz zur Behandlung der Alzheimer-Erkrankung könnte daher eine spezifische Erhöhung der α -Sekretase-Aktivität darstellen (Lichtenthaler und Haass, 2004).

Eine erhöhte α -Sekretase-Aktivität und damit auch eine gesteigerte sAPP α -Sekretion konnte beispielsweise durch eine Überexpression von ADAM 10 in Mäusen erreicht werden (Postina et al, 2004). Durch die Kreuzung dieser Maus mit einer transgenen APP überexprimierenden Maus konnte eine erhebliche Verringerung der Plaque-Entstehung im Vergleich zur normalen transgenen APP-Maus bewirkt werden. Da die α -Sekretase allerdings neben APP auch andere Substrate prozessiert, kommt es bei einer Erhöhung der α -Sekretase-Aktivität auch zu einer erhöhten Hydrolyse von anderen Substraten/Proteinen wie TGF- α („Transforming growth factor- α “), TNF- α („Tumor necrosis factor- α “) und L-Selektin, einem Zelladhensionsmolekül. Daher wird nun versucht, die α -Sekretase-Aktivität auf eine andere Art und Weise zu erhöhen. Dabei wird von mehreren pharmakologischen Substanzen vermutet, dass sie die sAPP α -Sekretion steigern können. Zu diesen Substanzen gehören unter anderem Statine und Omega-3 Fettsäuren, welche die Membranfluidität erhöhen können. Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass die A β -Produktion bei erhöhten Cholesterinspiegeln zunimmt (Eckert et al, 2000; 2001) und durch Gabe von Cholesterin-senkenden Mitteln wie den Statinen wieder reduziert werden kann (Fassbender et al, 2001).

1.3.2.2 Die amyloidogene APP-Prozessierung

Der amyloidogene Abbauweg findet seltener statt als die nicht-amyloidogene Prozessierung und beginnt mit einer Spaltung des APP durch die β -Sekretase BACE1 („ β APP cleaving enzyme 1“). Dabei wird durch den Schnitt der β -Sekretase in der extrazellulären Domäne von APP am N-terminus der A β -Domäne ein lösliches N-terminales Fragment gebildet, das als sAPP β bezeichnet wird. Der 99 Aminosäuren große C-terminale Rest (CTF α) verbleibt in der Membran und wird anschließend durch die γ -Sekretase gespalten, wobei A β (Haass et al, 1992) und die AICD („APP intracellular domain“) (Sastre et al, 2001) entstehen. Da die γ -Sekretase an unterschiedlichen Positionen innerhalb der Transmembrandomäne schneiden kann, entstehen A β -Peptide unterschiedlicher Größe bzw. mit einer starken Heterogenität am C-Terminus. Hauptsächlich erfolgt die Spaltung aber nach dem Valin 636 oder dem Alanin

638, wodurch die Produkte A β 42 und AICD57 oder A β 40 und AICD59 gebildet werden (Selkoe, 2001).

Die β -Sekretase BACE1 ist ein Typ I-Membranprotein mit Aspartyl-Protease-Aktivität (Vassar et al, 1999). BACE1 und APP weisen ähnliche Verteilungsmuster in der Zelle auf. Sie sitzen in der Plasmamembran und können in Endosomen aufgenommen werden, in denen auch die Spaltung des APP erfolgt. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass BACE1 mit sogenannten „lipid rafts“, speziellen Mikrodomänen in der Membran, die reich an Glycosphingolipiden und Cholesterin sind, assoziiert ist (Riddell et al, 2001). Weiterhin konnte bestätigt werden, dass die Aktivität von BACE1 durch Glycosphinglipide, Glycerophospholipide und Sterole wie Cholesterol gesteigert werden kann und damit die A β -Produktion durch Veränderungen der Lipidzusammensetzung der Membranen beeinflusst wird (Kalvodova et al, 2005). Unter anderem konnte gezeigt werden, dass Cholesterinentzug die APP-Prozessierung in Richtung des nicht-amyloidogenen Abbauweges verschiebt (Kojro et al, 2001).

Die γ -Sekretase, die letztlich das A β -Peptid freisetzt, setzt sich aus einem Komplex von vier verschiedenen Proteinen zusammen: Präsenilin, Nicastrin, APH-1 und PEN2 (presenilin enhancer protein 2). Dabei scheint das Protein Präsenilin das katalytische Zentrum des Proteasekomplexes zu bilden (De Strooper, 2003). Es existieren zwei verschiedene Homologe des Präsenilins, Präsenilin 1 und Präsenilin 2. Sie durchspannen die Plasmamembran mehrere Male und bilden die katalytische Untereinheit des Komplexes, wobei zwei Aspartatreste in der Transmembrandomäne 6 und 7 für die proteolytische Aktivität verantwortlich sind (Haass, 2004).

Das bei diesem amyloidogenen Abbauweg entstehende A β ist ein hydrophobes Peptid, das in der Lage ist, sich zunächst zu Oligomeren, dann zu Protofibrillen und letztendlich zu Fibrillen zusammenzulagern (Hardy und Selkoe, 2002). Die Protofibrillen erreichen dabei einen Durchmesser von 5 nm und eine Länge von 200 nm und bilden den Hauptbestandteil der für die Alzheimer-Erkrankung charakteristischen Amyloid-Plaques. Der Großteil des in den Zellen gebildeten A β stellt A β 40 dar, A β 42 wird nur zu 5-10 % gebildet. Die beiden Peptide weisen unterschiedliche intrazelluläre Produktionsorte sowie vor allem eine unterschiedliche Toxizität auf. A β 42 wird hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildet,

aggregiert schneller und ist toxischer als das im trans-Golgiapparat gebildete A β 40 (Hartmann et al, 1997). Während man früher davon ausging, dass die A β -Toxizität vom Aggregationsstatus abhängt (Pike et al, 1993), konnte mittlerweile gezeigt werden, dass A β -Oligomere und Protofibrillen ebenfalls toxische Effekte auslösen und somit unter Umständen die toxischere Form von A β darstellen (Walsh et al, 1999; 2002; Klein et al, 2001; Haass und Selkoe, 2007). Die A β -Oligomerisierung beginnt wahrscheinlich intrazellulär in Neuronen (Walsh et al, 2000) und wurde verschiedentlich mit dem Verlust von Synapsen und synaptischer Aktivität, einem frühen Merkmal der Alzheimer-Erkrankung, in Zusammenhang gebracht (Selkoe, 2002). Elektrophysiologische Untersuchungen konnten belegen, dass die löslichen A β -Oligomere und Protofibrillen die synaptische Plastizität stören können. Diese pathophysiologischen Veränderungen an der Synapse könnten wiederum in engem Zusammenhang mit Gedächtnisleistung und Lernprozessen stehen (Morris, 2003).

1.4 Einfluss genetischer Faktoren und Risikofaktoren auf die Alzheimer-Erkrankung

Die Ursachenforschung der Alzheimer-Erkrankung beschäftigt sich neben den molekular- und zellbiologischen Grundlagen mit der Suche nach Risikofaktoren, die das Auftreten und den Verlauf der Krankheit beeinflussen können. Hierbei werden zwei Formen der Alzheimer-Erkrankung unterschieden: die sogenannte „familiäre Form“ der Alzheimer-Erkrankung (FAD), die häufig vor dem 65. Lebensjahr auftritt und von der ca. 5-10 % der Patienten betroffen sind, und die „sporadische Form“ der Krankheit, die in der Regel jenseits des 65. Lebensjahres auftritt und an der 90-95 % der Patienten leiden (Robert Koch-Institut, 2005).

Die familiäre Form der Alzheimer-Erkrankung konnte auf Genmutationen in Alzheimer-assoziierten Genen zurückgeführt werden (Haass, 1996). Diese Form der Erkrankung („early-onset“) ist durch eine autosomal dominant vererbte genetische Prädisposition mit vollständiger Penetranz charakterisiert. Bisher konnten bei der familiären Form drei verschiedene pathogenetisch relevante Gene identifiziert werden: *APP*, *Präsenilin1 (PS1)* und *Präsenilin2 (PS2)*.

In der Tabelle 1 sind die genetischen Faktoren der familiären Form der Alzheimer-Erkrankung sowie der genetische Risikofaktor der sporadischen Form der Alzheimer-Erkrankung (ApoE), ihre Lokalisation und der Erkrankungsbeginn dargestellt.

A. Familiäre Form der Alzheimer-Krankheit (circa 5-10 %)						
Ursache: Genmutationen im APP-Gen, den Präsenilin-Genen und unbekanntem Genen.						
Gen	Relative Häufigkeit (% Alzheimer Erkrankung)	Zahl bekannter Mutationen im Gen	Durchschnittliches Manifestationsalter			
Amyloid precursor protein	ca. 0,1 %	ca. 25	ca. 50 Jahre			
Presenilin 1	ca. 0,85 %	ca. 160	ca. 45 Jahre			
Presenilin 2	ca. 0,05 %	ca. 10	ca. 60 Jahre			
Weitere unbekannte Gene	ca. 4-9 %	unbekannt	unbekannt			
B. Sporadische Form der Alzheimer-Krankheit (circa 90-95 %)						
Ursache: Unbekannt, multifaktoriell. Gene/Allele können als Risikofaktoren wirken ("Risikogene").						
1. Risikofaktor Alter						
Altersgruppe (in Jahren)	65-69	70-74	75-79	80-84	85-89	90+
Häufigkeit von Alzheimer	ca. 1 %	ca. 2 %	ca. 4 %	ca. 8 %	ca. 15 %	ca. 25 %
2. Risikofaktor Apolipoprotein E Gen (APOE)						
Genotypen	$\epsilon 2/\epsilon 2$	$\epsilon 2/\epsilon 3$	$\epsilon 2/\epsilon 4$	$\epsilon 3/\epsilon 3$	$\epsilon 3/\epsilon 4$	$\epsilon 4/\epsilon 4$
Relatives Risiko an Alzheimer zu erkranken (im Vergleich zum $\epsilon 3/\epsilon 3$ Genotyp)	< 0,1	< 1	2	1	3	5-8
3. Weitere Kandidatengene (mögliche Risikofaktoren):						
$\alpha 2$ -macroglobulin-Gen (A2M), Butyrylcholinesterase-Gen (BCHE), 24S-Cholesterin Hydroxylase Gen (CYP46), Interleukin-1 α - und Interleukin-1 β -Gene (IL-1A und IL-1B), Low-density lipoprotein receptor-related protein Gen (LRP) und Saitohin Gen (STH)						

Tabelle 1: Ursachen und Risikofaktoren der Alzheimer-Erkrankung

Bei der familiären Form der Alzheimer-Erkrankung sind einige der verantwortlichen Gene inzwischen identifiziert. Für die sporadische Form der Erkrankung wurden „Risiko-Gene“ ermittelt, die neben dem Risikofaktor Alter die Wahrscheinlichkeit erhöhen, an Alzheimer zu erkranken (entnommen aus Ghebremedin und Deller, 2007).

Allen Mutationen ist gemeinsam, dass sie zu einer stark erhöhten Produktion von A β 42 führen. Bis heute konnten ca. 25 verschiedene Mutationen des APP-Gens ermittelt werden, die zu einer Entstehung der Alzheimer-Erkrankung führen könnten (Mullan et al, 1992; Haass et al, 1994; Sleegers et al, 2006; Thomas und Fenech, 2007). Alle bislang identifizierten relevanten Mutationen liegen in der Umgebung der A β -Region oder in unmittelbarer Nähe der

α -Sekretase-Schnittstelle. Während APP-Mutationen in der Nähe der α - oder β -Sekretase-Schnittstelle allgemein zu einer verstärkten A β -Produktion führen, verschieben Mutationen in der Nähe der γ -Sekretase-Schnittstelle das Verhältnis A β 42/ A β 40 in Richtung des stärker zur Aggregation neigenden A β 42.

Auch bei den Mutationen in den Genen Präsenilin1 und Präsenilin2 kommt es zu einer verstärkten Produktion von A β 42 (Sherrington et al, 1995; Mattson et al, 1998). Die Präseniline stellen das katalytische Zentrum des γ -Sekretase-Proteinkomplexes dar. Insgesamt konnten bislang 160 Mutationen des Präsenilin1-Gens und 10 Mutationen des Präsenilin2-Gens nachgewiesen werden, wobei diese Mutationen zu einem sehr frühen Krankheitsbeginn ab einem Alter von unter 30 Jahren führen.

Im Gegensatz zur familiären Form sind die Ursachen der sporadischen Form der Alzheimer-Erkrankung vermutlich „multifaktoriell“, also nicht durch ein einzelnes Gen verursacht. Bisher konnten mit Hilfe epidemiologischer Studien genetische und epidemiologische Risikofaktoren identifiziert werden, welche die Wahrscheinlichkeit erhöhen, an Alzheimer zu erkranken. Oftmals bleibt es allerdings unklar, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen der Krankheit und den Risikofaktoren besteht. Sicher ist jedoch, dass das Alter der entscheidende Risikofaktor ist (Tabelle 1). Da sich Alterungsprozesse aber nicht aufhalten lassen, sucht und sucht man nach weiteren Risikofaktoren, die sich beispielsweise durch eine Änderung des Verhaltens beeinflussen lassen. Inzwischen zeichnet sich ab, dass geringe geistige und körperliche Aktivität die Wahrscheinlichkeit erhöhen, an Alzheimer zu erkranken. Auch das Bildungsniveau ist von Bedeutung. Inwiefern die Ernährung eine Rolle spielt, bleibt umstritten. Cholesterinarme Kost und verschiedene Vitamine werden empfohlen, allgemeingültige Ernährungsempfehlungen existieren jedoch nicht (Ghebremedhin et al, 2001; Blennow et al, 2006; Bertram et al, 2007). Mit Hilfe genetischer epidemiologischer Studien konnte außerdem belegt werden, dass es auch bestimmte genetische Risikofaktoren gibt (Ghebremedhin et al, 2001; Shih et al, 2004; Bertram et al, 2007).

Bis heute sind allerdings erst wenige dieser Alzheimer „Risiko-Gene“ identifiziert worden (Ghebremedhin et al, 1998; 2001; Bertram et al, 2007). Das in drei Genvarianten vorkommende Apolipoprotein E-Gen (APOE) ist bislang das einzige gesicherte Risiko-Gen für die sporadische Form der Alzheimer-Erkrankung (Ghebremedhin et al, 1998; 2001; Bertram et al, 2007). Das APOE-Genprodukt (ApoE) ist ein Bestandteil der low-density Lipoproteine und wichtig für den Lipid-Transport im Organismus. ApoE ist das wichtigste

Apolipoprotein im Gehirn und fördert dort Entwicklungs-, Regenerations- und Wachstumsprozesse. Das APOE-Gen befindet sich auf Chromosom 19 und kommt in drei Genvarianten (Allelen) vor, die als APO ϵ 2, ϵ 3 sowie ϵ 4 bezeichnet werden und sich nur in zwei Aminosäurepunktmutationen unterscheiden, welche allerdings schwerwiegende konformative Veränderungen bewirken (Cedazo-Minguez und Cowburn, 2001). In der Allgemeinbevölkerung ist das ϵ 3-Allel mit einer Häufigkeit von 78 % weitaus häufiger als das ϵ 4-Allel mit etwa 14 %. Das ϵ 2-Allel ist mit ca. 8 % am seltensten vertreten.

Genetische Studien konnten zeigen, dass das APO ϵ 4-Allel bei Alzheimer-Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung dreifach häufiger nachweisbar ist und daher als Risikofaktor für die Entstehung der Erkrankung angesehen werden kann (Strittmatter et al, 1993; Ghebremedhin et al, 1998; 2001). Bei Trägern der APO ϵ 4-Genvariante kommt es, wenn die Cholesterinwerte einen bestimmten kritischen Wert übersteigen, zu einer vermehrten Bildung von A β -Plaques und Neurofibrillen (Ghebremedhin et al, 2001). Jede Kopie des APO ϵ 4-Allels senkt das Erkrankungsalter um etwa 7 bis 9 Jahre (Corder et al, 1993). Die genetische Assoziation weist zudem einen Gendosis-Effekt auf, so dass homozygote Träger des APO ϵ 4-Allels ein besonders hohes Risiko besitzen, an Alzheimer zu erkranken (Saunders et al, 1993). Patienten mit der sporadischen Form der Alzheimer-Erkrankung mit einem oder zwei APO ϵ 4-Allelen zeigen im Vergleich zu Personen, die kein APO ϵ 4-Allel tragen, eine höhere Plaquedichte im Gehirn. Im Unterschied dazu konnte das APO ϵ 2-Allel negativ mit der Ausbildung der Alzheimer-Erkrankung korreliert werden (Corder et al, 1994). Träger dieser Genvariante haben nur eine geringe Wahrscheinlichkeit, im Alter an Alzheimer zu erkranken (Tabelle 1). Der ApoE-Genotyp modifiziert daher anscheinend in erster Linie das relative Erkrankungsrisiko und das Ersterkrankungsalter (Meyer et al, 1998).

1.5 Neuroinflammation im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung

1.5.1 Die plaqueassoziierte Entzündungsreaktion

Bereits 1910 vermutete Oskar Fischer eine entzündliche Reaktion in der Umgebung von Plaques (Fischer, 1910). Die Entwicklung einer neuen Silberfärbemethode führte zu der Erkenntnis, dass Alzheimergehirne durch die extrazelluläre Ablagerung von abnormalen Fibrillen zusammen mit Nerven- und Gliazellveränderungen charakterisiert sind. Fischer vermutete daraufhin, dass diese Veränderungen des Nervengewebes eine Entzündungsreaktion

darstellen, die durch eine abnormale extrazelluläre Substanz in den Plaques ausgelöst wird. Allerdings konnte er keine der erwarteten zellulären und morphologischen Veränderungen einer Entzündung, wie das Vorhandensein von T-Zellen und Leukozyten oder Komplementproteinen, nachweisen, so dass diese Hypothese relativ schnell wieder in Vergessenheit geriet.

Die aktuellen Forschungsergebnisse zeigen allerdings, dass die für die Alzheimer-Erkrankung typischen A β -Plaques mit einer ausgeprägten Entzündungsreaktion assoziiert sind (Akiyama et al, 2000; McGeer und McGeer, 2003; Eikelenboom und Gool, 2004; Sastre et al, 2006). Dabei konnte eine verstärkte Expression von typischen Botenstoffen, wie Zytokinen (z.B. TNF- α und TGF- β), Komplementproteinen und anderen Entzündungsmediatoren, in der unmittelbaren Umgebung der Amyloidplaques nachgewiesen werden (Pratt und McPherson, 1997; Akiyama et al, 2000; Combs et al, 2001; Eikelenboom et al, 2006; Hoozemans et al, 2006; Bonifati und Kishore, 2007). Außerdem kommt es in der Umgebung der Amyloidplaques zu einer Ansammlung von Mikrogliazellen und Astrozyten (Aisen et al, 1997; Dickson, 1999; Akiyama et al, 2000; Benveniste et al, 2001; Eikelenboom et al, 2002; Hauwel et al, 2005; Walker et al, 2006). Eine verstärkte Einwanderung von T-Zellen und Leukozyten in die Nähe von Plaques konnte allerdings bis heute beim Menschen nicht gezeigt werden (Eikelenboom et al, 2006; McGeer et al, 2006).

Mikrogliazellen sind in der Lage, als Antigen-präsentierende Zellen zu fungieren und können sowohl Zytokine sezernieren als auch auf ihre Freisetzung reagieren (Gordon, 1993; Kalaria, 1993; Kreutzberg, 1996; Nimmerjahn et al, 2005). Durch dieses Zusammenspiel von Mikrogliazellen kann die Entzündungsreaktion rund um die Plaques daher als eine lokal induzierte, nicht durch das adaptive (spezifische) sondern durch das angeborene (unspezifische) Immunsystem vermittelte chronische Entzündung beschrieben werden (Gordon, 1993; Kalaria, 1993; McGeer et al, 1993; Kreutzberg, 1996; Rogers et al, 2002; Streit et al, 2004; 2004a; 2005; Melchior, 2006; Simard et al, 2006).

Die Amyloidplaque-assoziierte Entzündungsreaktion kann dabei durch die folgenden Aspekte näher charakterisiert werden:

a) die Auswirkungen der Effektormoleküle, b) die Rolle des angeborenen Immunsystems sowie c) die Beteiligung des Endothelgewebes, auf die in den folgenden Absätzen näher eingegangen wird.

1.5.2 Effektormoleküle der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion

Die Neuroinflammation kann sowohl vorteilhafte als auch schädliche Auswirkungen auf das Gewebe haben. Aktivierte Gliazellen, vor allem Mikrogliazellen, sind in der Lage, exogene Substanzen und Zelltrümmer zu phagozytieren und damit aus dem Gehirn zu entfernen, was sich potentiell neuroprotektiv auswirkt (Streit, 2002; 2005; Nguyen et al, 2002). Dabei setzen sie aber auch eine Reihe von Zytokinen, Chemokinen, reaktive Sauerstoffspezies, Exotoxine und Proteasen frei, die in der Mehrheit potentiell neurotoxisch auf das umgebende Nervengewebe wirken und somit einen Circulus viciosus auslösen können (Benveniste et al, 2001; Rogers et al, 2002; Melchior et al, 2006).

Weitere freigesetzte Entzündungsmediatoren, wie z.B. die „Supressors of Cytokine Signaling“ (SOCS), können wiederum anti-inflammatorisch wirken (Larsen und Röpke, 2002; Alexander und Hilton, 2004; Baetz et al, 2004; Yoshimura et al, 2007).

Die SOCS bilden eine Gruppe von entzündungsmodulierenden Proteinen, die die JAK/STAT-Signalkaskade mit abschließender Sekretion von proinflammatorischen Proteinen wie NF- κ B, TNF- α und Interferon- β negativ regulieren können (Larsen und Röpke, 2002; Alexander und Hilton, 2004; Baetz et al, 2004; Yoshimura et al, 2007). Diese intrazellulären Proteine werden durch Zytokine induziert, können aber auch durch die Stimulation von Toll-like Rezeptoren (Mitglieder der Familie der „Pattern Recognition Receptors“) auf bzw. in Immunzellen des angeborenen Immunsystems wie Mikrogliazellen, Makrophagen und dendritischen Zellen induziert werden (Baetz et al, 2004; Yoshimura et al, 2007; Dalpke et al, 2008).

Als Folge einer Aktivierung können SOCS einerseits eine „Cross-talk“ Inhibierung vermitteln, d.h. die Sensitivität der Zellen gegenüber nachfolgenden Zytokinsignalen vermindern (Larsen und Röpke, 2002; Alexander und Hilton, 2004; Baetz et al, 2004), andererseits können sie durch autokrine Interferon- β -Freisetzung die folgenden Signalamplifizierungsreaktionen inhibieren, um überschießende Reaktionen der Zellen des angeborenen Immunsystems zu vermeiden (Larsen und Röpke, 2002; Alexander und Hilton, 2004; Baetz et al, 2004; Yoshimura et al, 2007).

1.5.3 Die Beteiligung des angeborenen Immunsystems an der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion

1.5.3.1 Aktivierung des angeborenen Immunsystems

Die Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems bzw. von Entzündungszellen wie Mikrogliazellen und Monozyten kann direkt durch die Bindung von Amyloid- β erreicht werden.

In mehreren Studien konnte bestätigt werden, dass fibrilläres A β direkt an einige Rezeptoren auf Mikrogliazellen und anderen Immun- bzw. Entzündungszellen binden kann, wie zum Beispiel an den Rezeptor für „advanced glycation end products“, RAGE, und andere „Scavenger“- bzw. „Pattern-Recognition“- Rezeptoren (wie z.B. Toll-like Rezeptoren) (El Khoury et al, 1996; Paresce et al, 1996; Yan et al, 1996; Eikelenboom et al, 2006). Dadurch kommt es zu einer Aktivierung der Mikrogliazellen.

Mikrogliazellen sind Zellen des angeborenen Immunsystems, die im Nervensystem als immunkompetente Zellen fungieren. Auf ihrer Oberfläche tragen Mikrogliazellen diverse Rezeptoren wie Scavenger Rezeptoren, Toll-like Rezeptoren und MHC II Glykoproteine, die zur Überwachung der ZNS-Homöostase vielfältige Antigene und verschiedene Pathogenstrukturen erkennen können (Kreutzberg, 1996; Husemann et al, 2002; Ishii et al, 2005). Als Reaktion auf Schädigungen bzw. pathologische Veränderungen des ZNS kommt es zu einer Aktivierung ihrer phagozytischen Funktion und zu einer Expression von Effektormolekülen wie TNF- α , TGF- β , pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen sowie Chemokinen.

Toll-like Rezeptoren bilden eine Gruppe von „Pattern-Recognition-Rezeptoren“ des angeborenen Immunsystems, die u.a. Pathogenstrukturen oder Moleküle, die auf der Oberfläche von Pathogenen vorkommen, sowie doppelsträngige und einzelsträngige Virus-RNA und Bakterien-DNA, detektieren können (Medzhitov, 2001; Olson und Miller, 2004; Takeda und Akira, 2005; Salaun et al, 2007). In verschiedenen Arbeiten konnte *in vitro* gezeigt werden, dass einige Mitglieder dieser Rezeptorenfamilie auch endogene Moleküle, wie z.B. Hitzeschockproteine, Hyaluronsäure und diverse Fettsäuren, erkennen können (Johnson et al, 2003; Park et al, 2004; Takeda und Akira, 2005; Zhou et al, 2005; Lee et al, 2006; Scheibner et al, 2006). Die Toll-like Rezeptoren haben die Aufgabe, Mikrogliazellen, andere phagozytierende Zellen und dendritische Zellen zu aktivieren, um auf Schädigungen durch Pathogene zu reagieren (Medzhitov, 2001; Akira und Takeda, 2004; Olson und Miller,

2004; Salaun et al, 2007). Infolgedessen kommt es zu einer Sekretion von Chemokinen und Zytokinen sowie zur Expression von kostimulatorischen Molekülen, die für die protektiven Immunantworten, die effiziente Beseitigung beschädigten Gewebes und die Aktivierung der adaptiven Immunität benötigt werden (Medzhitov, 2001; Johnson et al, 2003; Akira and Takeda, 2004; Olson und Miller, 2004; Park et al, 2004; Takeda und Akira, 2005; Zhou et al, 2005; Lee et al, 2006; Scheibner et al, 2006; Salaun et al, 2007).

In einigen *in vitro*-Arbeiten wird auch eine Beteiligung der TLRs, insbesondere von Tlr2, Tlr4 und Tlr9, bei der Aufnahme und Beseitigung von Amyloid- β vermutet (Lotz et al, 2005; Chen et al, 2006; Tahara et al, 2006). Lotz et al. (2005) konnten in ihren *in vitro*-Arbeiten nachweisen, dass einige TLRs durch Bindung von A β Mikrogliazellen aktivieren können, wodurch es unter anderem zu einer verstärkten Aufnahme und Beseitigung von A β kommt. Im Falle von Tlr9 konnte außerdem gezeigt werden, dass A β die Tlr9 induzierte Entzündungsreaktion in Mikrogliazellen antagonisieren kann. *In vivo* kommt es allerdings nur zu einer ineffektiven Abräumung von aggregiertem Amyloid, was die Hypothese zulässt, dass es *in vivo* zu einer verminderten oder gestörten Expression der TLRs kommen könnte.

1.5.3.2 Der Einfluss der Phagozytose auf die Alzheimer-Erkrankung

Neben den TLRs gibt es auch andere Rezeptoren, die eine Rolle bei der Erkennung und Abräumung von entzündungs- und infektionsbedingten Antigenen und Zelltrümmern spielen. Trem2 ist ein Mitglied der Familie der „Triggering Receptors expressed on Myeloid Cells“ und wird *in vivo* auf einigen, aber nicht auf allen Mikroglia und *in vitro* auf nahezu allen Mikroglia exprimiert (Schmid et al, 2002; Sessa et al, 2004; Kiiialainen et al, 2005; Takahashi et al, 2005; Melchior et al, 2006; Turnbull et al, 2006). Trem2 gehört zu der Rezeptorgruppe, der ein intrazellulärer signalweiterleitender Teil fehlt, weshalb Trem2 völlig von der Anwesenheit von Dap12 zur Weiterleitung von Signalen abhängig ist (Colonna, 2003; Kiiialainen et al, 2005). Die Aktivierung von Trem2 führt *in vitro* zu verstärkter Phagozytose und zu einer verminderten mikroglialen Antwort (Rogers et al, 2002; Takahashi et al, 2005; 2007; Neumann and Takahashi, 2007).

Da es *in vivo* allerdings nur zu einer ineffektiven Abräumung von aggregiertem Amyloid kommt, wurde in dieser Arbeit die Expression von Trem2 in plaqueassoziiertem Gewebe überprüft, um herauszufinden, ob dies an einer verminderten Expression von Trem2 liegen könnte.

Des Weiteren konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass der Komplementfaktor C1q vermehrt in A β -Plaques vorkommt und an neurotoxisches oligomeres A β binden kann (Rogers et al, 1992; 2002; Walker et al, 2006). Durch Bindung von C1q kommt es sowohl zu reduzierten Spiegeln von neurotoxischem A β als auch zu einer Antikörper-unabhängigen Aktivierung des Komplementsystems und in der Folge zu einer entzündlichen Reaktion. Die Bildung der aus einem Komplex aus hochfibrillärem A β , C1q und Serum Amyloid P Komponente bestehenden Plaques führt also einerseits zu reduzierten Spiegeln des neurotoxischen, schwach fibrillären A β , andererseits aber auch zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen durch aktivierte Mikroglia (Rogers et al, 2002; Eikelenboom et al, 2006; Bonifati und Kishore, 2007).

1.5.3.3 Seneszenz von Mikrogliazellen

Die Neuroinflammation ist somit ein „zweischneidiges Schwert“. Einerseits kommt es zur Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten mit dem Ziel, die extrazellulären Ablagerungen zu entfernen (Frautschy et al, 1992; Weldon et al, 1998; Streit, 2002; Simard et al, 2006). Andererseits kommt es durch die Aktivierung von Gliazellen zur Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren wie Zytokinen und Chemokinen (Benveniste et al, 2001; Meda et al, 1995; Rogers et al, 2002; Melchior et al, 2006). Neuere Untersuchungen vermuten überdies, dass auch die Mikrogliaalterung eine Rolle bei der Amyloidplaque-assoziierten Entzündungsreaktion spielt.

Hierbei wird davon ausgegangen, dass Mikroglia einer altersbedingten strukturellen Schädigung und „Seneszenz“, d.h. Vergreisung, unterliegen (Korotzer et al, 1993; Streit, 2002; 2004; Flanary und Streit, 2004; Streit 2005). Die Gegenwart von A β scheint dabei die mikrogliale Zellseneszenz zu verstärken, was den Schluss nahe legt, dass A β die physiologischen Funktionen der Mikroglia durch Beschleunigung des zellulären Verfalls nachteilig beeinflussen könnte (Flanary et al, 2007). Diese Seneszenz könnte folglich durch verschiedene Mechanismen zu der *in vivo* vorhandenen ausgeprägten plaqueassoziierten Entzündungsreaktion und der ineffizienten Amyloidabräumung beitragen. Eine Möglichkeit wäre hier die verminderte Expression von pro-phagozytären Rezeptoren (wie die TLRs oder Trem2, siehe oben) sowie anti-inflammatorisch wirksamen Effektormolekülen (wie die SOCS, siehe 1.5.1). Durch diese altersbedingte Abnahme der mikroglialen Zellfunktionen könnte es also zu einer verminderten Phagozytosefähigkeit der Mikroglia und somit zu einer vermehrten extrazellulären Aggregation von A β kommen.

1.5.4 Die Beteiligung des Endothelgewebes an der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion

Im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung kommt es zusätzlich zu den bereits erwähnten Gewebeeränderungen durch die A β -Aggregation auch zu strukturellen und funktionellen Veränderungen der Gefäße bzw. des Endothels (Kumar-Singh et al, 2005; Miao et al, 2005; Kouznetsova et al, 2006; Marco und Scaper, 2006; Burbach et al, 2007; Meyer et al, 2008). Diese Veränderungen sind unter anderem durch eine Verdickung der mikrovaskulären Basalmembran, eine Einengung des Gefäßlumens mit chronischer Hypoperfusion sowie eine Atrophie der glatten Gefäßmuskulatur charakterisiert. Des Weiteren treten eine Degeneration der Endothelzellen mit „tight junction“-Verlust sowie eine Akkumulation von Entzündungsmediatoren auf (Kalaria, 1997; Kumar-Singh et al, 2005; Miao et al, 2005; Kouznetsova et al, 2006; Marco und Scaper, 2006; Meyer et al, 2008). Diese zerebrovaskulären Gefäßveränderungen sind mit A β -Ablagerungen assoziiert.

Bisher wurden diese Endothelveränderungen in Verbindung mit A β -Ablagerungen in der Gefäßwand im Rahmen der zerebralen Amyloidangiopathie (CAA) beschrieben (Alonzo et al, 1998; Burgermeister et al, 2000; Jellinger, 2002; Chalmers et al, 2003; Attems et al, 2004; Thal et al, 2008; 2008a). Im Unterschied dazu berichtet unter anderem die Gruppe um Kouznetsova (Kouznetsova et al, 2006), dass es auch durch aggregiertes Amyloid- β aus sich in unmittelbarer Umgebung der Gefäße befindenden A β -Plaques zu strukturellen und funktionellen Veränderungen des umgebenden Endothelgewebes kommt.

Eine verstärkte Freisetzung von proinflammatorisch wirksamen Entzündungsmediatoren aus Endothelzellen könnte zu einer Verstärkung der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion führen. Dadurch kann es insgesamt zu weiteren morphologischen und funktionellen Veränderungen des Endothelgewebes kommen, die eine verminderte Durchblutung und Versorgung des Gehirngewebes zur Folge haben könnten (Thomas et al, 1996; Kalaria, 1997; Crawford et al, 1998; Patel et al, 2005). Zur Untersuchung der Endothelzellen wurde in der vorliegenden Arbeit in Kooperation mit der AG Neuroimmunologie (Prof. Dr. Ingo Bechmann) eine Methode etabliert, mit deren Hilfe gezielt Endothelgewebe in der unmittelbaren Umgebung von Amyloidplaques isoliert werden kann.

In diesem Gewebe wurde die Expression einzelner Chemokine und Chemokinrezeptoren wie CCL3 (MIP-1 α , „Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha“), CXCL10 („CXC Chemokine Ligand 10“) sowie CXCR3 („CXC Chemokine Receptor 3“) untersucht. MIP-1 α und

CXCL10 haben durch die Produktion von Interleukin-1, Interleukin-6 und TNF- α eine proinflammatorische Wirkung (Cook, 1996; Xia et al, 2000; Rappert et al, 2002; 2003). Außerdem kommt es durch die verstärkte Expression dieser Moleküle zu einer verstärkten Rekrutierung von Entzündungszellen wie Mikrogliazellen, die wiederum die proinflammatorische Reaktion unterstützen (Cook, 1996; Babcock et al, 2003; Trifilo et al, 2003). MIP-1 α und CXCL10 werden sowohl von Neuronen als Reaktion auf eine Schädigung des Hirngewebes zur Rekrutierung von Mikrogliazellen als auch von aktivierten Mikrogliazellen exprimiert. CXCR3 konnte auf Mikrogliazellen lokalisiert werden und bindet spezifisch CXCL10 (Biber et al, 2001; 2002; Rappert et al, 2002; 2003). CXCR3 kontrolliert dabei die Migration, nicht aber die Proliferation von Mikrogliazellen in Folge einer Schädigung des Gehirngewebes (Biber et al, 2001; Rappert et al, 2002; 2003).

1.6 Das APP23 transgene Mausmodell

Zur Untersuchung der Alzheimer-Erkrankung mit Hilfe eines Tiermodells wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen transgene Mauslinien generiert, unter anderem die PDAPP-Maus (Games et al, 1995), die Tg2576-Maus (Hsiao et al, 1996), die APP23-Maus (Sturchler-Pierrat et al, 1997) sowie die PSAPP-Maus (Holcomb et al, 1998). Alle diese transgenen Mauslinien zeichnen sich durch eine Überexpression von humanem APP mit einer der genetischen Mutationen der familiären Form der Alzheimer-Erkrankung unter Kontrolle von verschiedenen Promotoren sowie im Falle der PSAPP-Maus durch eine zusätzliche Mutation im Präsenilin1-Gen aus. Diese transgenen Mauslinien zeigen alle die erwarteten Amyloid- β -Ablagerungen (Amyloidplaques, Abbildung 5), wobei die Bildung der Amyloidplaques zu verschiedenen Zeitpunkten beginnt (PDAPP-Maus: 6-8 Monate; Tg2576-Maus: 9-11 Monate; APP23-Maus: 6 Monate; PSAPP-Maus: 6 Monate).

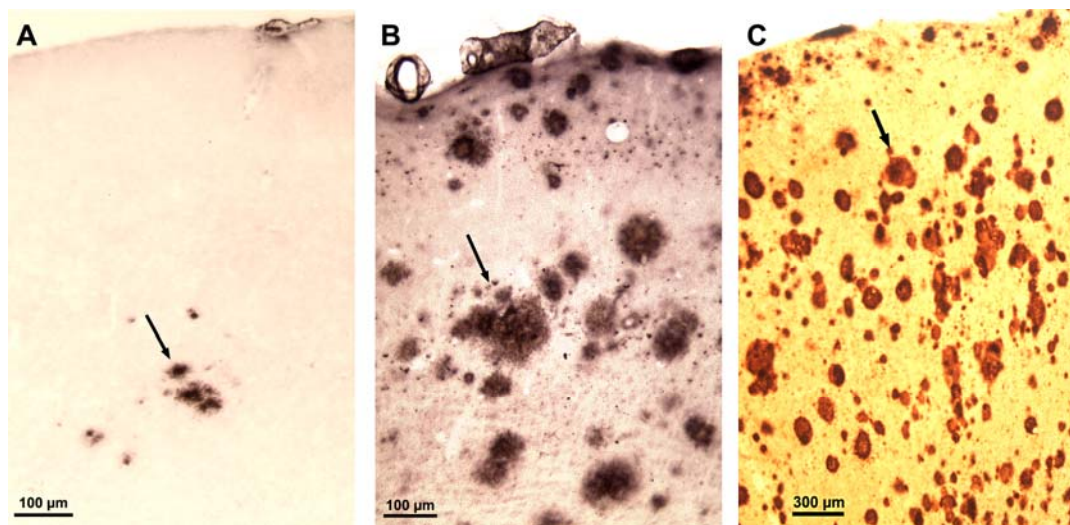


Abbildung 5: Ablagerungen von Amyloid- β (Amyloidplaques) in der Hirnrinde einer APP23 transgenen Maus

Im Gehirn der transgenen Mäuse, die ein mutiertes menschliches APP bilden, entstehen Alzheimer-typische Amyloid- β -Ablagerungen, die sog. Amyloidplaques. Diese Ablagerungen nehmen mit dem Alter der Mäuse zu: In der Hirnrinde junger Mäuse (A) finden sich nur wenige Plaques, während sich im Kortex alter Mäuse (B) eine Plaquemenge und Plaquerzeugung nachweisen lässt, die derjenigen im Gehirn von Menschen mit Alzheimer-Erkrankung (C) ähnlich ist (entnommen aus Ghebremedin und Deller, 2007).

Des Weiteren weisen alle diese Mauslinien eine reaktive Gliose in der Umgebung der Amyloidplaques sowie profunde Störungen ihrer Gedächtnis- und Lernleistungen auf (Games et al, 1995; Hsiao et al, 1996; Sturchler-Pierrat et al, 1997; Holcomb et al, 1998).

Die APP23-Maus ist allerdings die einzige dieser Mauslinien, die überhaupt einen für postmortale Alzheimergehirne typischen begrenzten Neuronenverlust zeigt. Zudem zeichnet sich die APP23 transgene Mauslinie im Vergleich zu den anderen Mauslinien durch eine stärkere Entzündungsreaktion sowie die Ausbildung der zerebralen Amyloidangiopathie aus (Sturchler-Pierrat et al, 1997; Hsiao, 1998). In der APP23 transgenen Mauslinie wird humanes APP751 mit einer schwedischen familiären Doppelmutation unter der Kontrolle des neuronenspezifischen murinen Thy-1.2 Promotors exprimiert (Sturchler-Pierrat et al, 1997). Dabei wird das mutierte Protein APP in der transgenen Maus verglichen mit der Menge an endogenem APP ca. 7mal stärker exprimiert. Die ersten A β -Ablagerungen treten ab einem Alter von 6 Monaten auf und nehmen mit steigendem Alter in Größe und Anzahl zu.

Des Weiteren kommt es in der Umgebung der A β -Ablagerungen zu einer Entzündungsreaktion mit einer Ansammlung von Mikrogliazellen und Astrozyten sowie zu

neuronaler und synaptischer Degeneration (Calhoun et al, 1999; Sommer und Staufenbiel, 1998; Stalder et al, 1999; Sturchler-Pierrat und Staufenbiel, 2000). Weiterhin weisen APP23 transgene Mäuse große Mengen von A β in der zerebrospinalen Flüssigkeit und eine regionale zerebrale Amyloidangiopathie auf. Der in dieser Mauslinie ansatzweise vorhandene Neuronenverlust korreliert mit der Lokalisation der Amyloidplaques (Calhoun et al, 1999; Stalder et al, 1999; Bornemann und Staufenbiel, 2000; Bondolfi et al, 2002).

Im Vergleich zu den anderen Mauslinien zeigt die APP23 transgene Maus somit eine sehr große Übereinstimmung mit den postmortal in humanen Alzheimergehirnen gefundenen Merkmalen der Alzheimer-Erkrankung. Aufgrund ihrer ausgeprägten plaqueassoziierten Entzündungsreaktion und CAA ist sie ein besonders gutes Modell zur Untersuchung und Charakterisierung dieser Aspekte der Alzheimer-Erkrankung.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde die Amyloidplaque-assoziierte Entzündungsreaktion näher charakterisiert. Hierbei wurden mit Hilfe verschiedener Methoden die folgenden Fragen untersucht:

- (1) Welche Moleküle regulieren entzündliche Prozesse in der Umgebung der Amyloidplaques?
- (2) Lassen sich diese Veränderungen auf mRNA-, Protein- und zellulärer Ebene in einem Tiermodell der Alzheimer-Erkrankung nachweisen?

Im Einzelnen ergaben sich die folgenden Aufgaben:

1.7.1 Identifizierung neuer regulatorischer Kandidatenmoleküle

- a) Etablierung der Laser Mikrodisektion in Kombination mit der Mikroarray-Analyse

Durch die Kombination der beiden Methoden wurden Genexpressionsmuster von plaqueassoziiertem Gewebe bestimmt.

- b) Nachweis von Genexpressionsveränderungen in plaqueassoziiertem Gewebe

Durch den Vergleich der im Mikroarray ermittelten Genexpressionsmuster von APP23 transgenen Mäusen und nicht-transgenen Kontrollmäusen konnten Genexpressionsänderungen identifiziert werden.

- c) Überprüfung der Mikroarray-Ergebnisse für ausgewählte Kandidatengene

Mit Hilfe der qPCR-Analyse wurde die Expression ausgewählter Kandidatengene überprüft.

- d) Nachweis der Veränderungen auf Proteinebene

Um zu bestätigen, dass es auch auf Proteinebene zu Veränderungen der Expression kommt, wurden immunhistochemische Versuche sowie Western Blot-Untersuchungen durchgeführt.

1.7.2 Die plaqueassoziierte Entzündungsreaktion und das angeborene Immunsystem

a) Beteiligung des angeborenen Immunsystems

Mit Hilfe der Kombination von Laser Mikrodisektion und qPCR wurde die plaqueassoziierte Genexpression ausgewählter TLRs untersucht. Durch den Vergleich der ermittelten TLR-mRNA Expression von APP23 transgenen Mäusen und Kontrollmäusen konnten plaqueassoziierte Genexpressionsveränderungen nachgewiesen werden. Zudem konnte die zelluläre Lokalisation eines Vertreters der TLR-Familie dargestellt werden.

b) Nachweis von Genexpressionsveränderungen ausgewählter SOCS in plaqueassoziiertem Gewebe

Durch die Kombination von Laser Mikrodisektion und qPCR konnten Unterschiede in der SOCS-Genexpression zwischen plaqueassoziiertem Gewebe und Gewebe aus nicht-transgenen Mäusen nachgewiesen werden.

1.7.3 Beteiligung des Endothels an der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion

a) Etablierung der Laser Mikrodisektion von Endothelgewebe

Durch die Kombination von Laser Mikrodisektion und qPCR konnten plaqueassoziierte Genexpressionsveränderungen von Endothelgewebe im Vergleich zu nicht-transgenen Kontrollen nachgewiesen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Materialien

2.1.1 Geräte

Gerät (Bezeichnung)	Hersteller
LMD 6000	Leica, Wetzlar
Waage TE 1502S	Sartorius, Göttingen
pH-Messgerät (Lab 850)	Schott, Mainz
Analysenwaage (Kern 770)	Kern, Balingen
Schüttelgerät (Polymix 2040)	Heidolph Instruments, Schwabach
Tischzentrifuge (Centrifuge 5415D)	Eppendorf, Hamburg
Agilent 2100 Bioanalyser	Agilent Technologies, Böblingen
NanoDrop® Spektrometer (ND-1000)	NanoDrop, Wilmington, USA
Sequence Detection System/qPCR (ABI Prism 7000)	Applied Biosystems, Darmstadt
Heizplatte (Sakura 1452)	Sakura, Zoeterwoude, NL
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
IKA® Works Vortexer (für Bioanalyser-Chips)	IKA, Wilmington, USA
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Megafuge (1.0R) (für 96well qPCR-Platten)	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge (MiniSpin)	Eppendorf, Hamburg
Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop Olympus BX40	Olympus, Hamburg
Stromversorgung/Transformator (Power Pac 200)	Bio-Rad, München
Semi-Dry Transfer Cell Blotting-Kammer (Trans-Blot SD)	Bio-Rad, München
GeneAmp PCR System 2700	Applied Biosystems, Darmstadt
Kühlbare Zentrifuge (Centrifuge 5417R)	Eppendorf, Hamburg
Schüttelgerät (Unimax 1010)	Heidolph Instruments, Schwabach
Analysenwaage (CP124S)	Sartorius, Göttingen
Gel-Dokumentationssystem	MWG Biotech, Ebersberg
Vibratom (VT 1000S)	Leica, Wetzlar
Gelkammer (SUB-Cell GT)	Bio-Rad, München
Odyssey® Infrared Scanner	LI-COR, Lincoln, USA

2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

2.1.2.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden (falls verfügbar) in Analysen- oder Arzneibuchqualität bzw. „molecular biology grade“ verwendet. Die Chemikalien wurden bei den Firmen AppliChem (Darmstadt), Applied Biosystems (Darmstadt), Bio-Rad (München), Fluka (München), Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (München, Deisenhofen) bezogen.

2.1.2.2 Verbrauchsmaterialien

Glasgefäße zur Aufbewahrung von Lösungen und zur Autoklavierung/Hitzesterilisierung sowie sterilisierte Gefäße wurden von folgenden Firmen bezogen: Falcon (Heidelberg), Fisherbrand (Schwerte), Neolab (Heidelberg), Schott (Mainz). Die Metallrahmenobjektträger mit Folienbespannung (PET- und POL-Folie) zur Laser Mikrodisektion wurden steril und RNase-frei von der Firma Leica (Wetzlar) bezogen.

Materialien für Immunfärbungen

Substanz	Hersteller/Lieferant
BSA (bovines Serumalbumin)	Roth, Karlsruhe
Pferdeserum	Gibco (über Invitrogen, Karlsruhe)
Ziegenserum	Chemicon (Millipore, Schwalbach)
DAB (3,3-Diaminobenzidin)	Sigma-Aldrich, München
NH ₄ NiSO ₄	Fluka, München
CoCl ₂	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	KMF, Lohmar
Hydrogenperoxid	AppliChem, Darmstadt
Vectastain ABC Elite-Kit	Linaris, Wertheim
Tissue Mounting Medium	DAKO, Glostrup, Denmark
Kongorot	Merck, Darmstadt

Molekularbiologische Materialien

Chemikalien/Verbrauchsmaterialien	Hersteller/Lieferant
Acrylamide-Bis Lösung (37,5:1) 40 % [PAA]	Serva, Heidelberg
Acrylamide-Bis Lösung (29:1) 30 %	Bio-Rad, München
Agarose (SeaKem LE Agarose)	Biozyme, über Epicentre/Hess. Oldendorf
β -Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt
Super Signal West Pico Chemilumineszenz. Substrat	Perbio Science, Bonn
Negativ-Entwickler AGFA Rodinal	AGFA, über Technikdirekt- Business.de
TETENAL Roentogen Superfix	Tetenal, über Roentgen Bender, Baden-Baden
Kodak Bio Max MR-1 Film	Sigma-Aldrich, München
Ethidiumbromidlösung 1 % (10 mg/ml)	AppliChem, Darmstadt
DEPC	AppliChem, Darmstadt
RNase Zap®	Fluka, München
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Gibco (über Invitrogen, Karlsruhe)
Tween-20	AppliChem, Darmstadt
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden
Multi Scribe Reverse Transkriptase	Applied Biosystems, Darmstadt
LiChrosolv (Wasser für die Chromatographie)	Merck, Darmstadt
Taq Man Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
TaqMan PreAmp Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
RNEasy Micro Kit® (inklusive Carrier-RNA)	Qiagen, Hilden
RNEasy Mini Kit®	Qiagen, Hilden
SDS	AppliChem, Darmstadt
Tissue Freezing Medium®	Jung, über Leica, Nussloch
RNA 6000 Ladder	Agilent Technologies, Böblingen
Evan's Blue	Merck, Darmstadt
Agilent 6000 PicoLabChip Kit	Agilent Technologies, Böblingen
RNA 6000 Pico Reagents Part 1	Agilent Technologies, Böblingen
Wasser ultrapure	Invitrogen, Karlsruhe

Agilent Low RNA Input Linear AmplifikationsKit	Applied Biosystems, Darmstadt
Whole Mouse Genome Microarray Kit G4122A	Agilent Technologies, Böblingen
In Situ Hybridisierungs-Kit	Agilent Technologies, Böblingen
Proteinase K	Invitrogen, Karlsruhe
Fluorescent Mounting Medium	DAKO, Glostrup, Denmark
Permout	Fisher Scientific, Schwerte
Chaps	AppliChem, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
TE-Puffer	AppliChem, Darmstadt
Cryofect Desinfektionsmittel	Leica, Wetzlar
Trenngelpuffer pH 8,8	Bio-Rad, München
Sammelgelpuffer pH 6,8	Bio-Rad, München
Lämmli Sample Buffer	Bio-Rad, München
Magermilchpulver	Naturaflor
Precision Plus Protein Dual Color	Bio-Rad, München
TaqMan Reverse Transcriptase Reagents	Applied Biosystems, Darmstadt
Tris/Glycine/SDS 10x premixed Electrophoresebuffer	Bio-Rad, München
TBE-Puffer 10x	AppliChem, Darmstadt

Primer und PCR Probe

Oligonukleotid	Sequenz
APP (PCR)	5'-GAA TTC CGA CAT GAC TCA GG-3' (sense) 5'-GTT CTG CTG CAT CTT GGA CA-3' (antisense)
Aktin (PCR)	5'-GAC AGG ATG CAG AAG GAG AT-3' (sense) 5'-TTG CTG ATC CAC ATC TGC TG-3' (antisense)
APP (qPCR)	5'-ATC ACC GCT CTG CAG GCT-3' (sense) 5'-CTT CTG TTC TGC GCG GAC AT-3' (antisense) 5'-CTC CTC GGC CTC GTC ACG TGT TCA AT-3' (Probe)
18S	5'-CGG CTA CCA AGG AA-3' (sense) 5'-GCT GGA ATT ACC GCG GCT-3' (antisense) 5'-TGC TGG CAC CAG ACT TGC CCT C-3' (Probe)

TaqMan-Assays

Oligonukleotid	Assay	PubMed “Accession No.”
Trem2	Mm00451744_m1	NM_031254.2
Dap12	Mm00449152_m1	NM_011662.2
CCL3 (MIP-1 α)	Mm00441258_m1	NM_011337.2
Vip	Mm00660234_m1	NM_011702.2
IL10r b	Mm00434157_m1	NM_008349.4
Hexosaminidase B	Mm00599880_m1	NM_010422.1
Msr2	Mm00472833_m1	NM_030707.3
Cd34	Mm01310770_m1	NM_133654.3
Tlr2	Mm00442346_m1	NM_011905.3
Tlr3	Mm00446577_g1	NM_126166.4
Tlr4	Mm00445274_m1	NM_021297.2
Tlr5	Mm00546288_s1	NM_016928.
Tlr7	Mm00446590_m1	NM_133211.3
Tlr9	Mm00446193_m1	NM_031178.2
TNF- α	Mm00443258_m1	NM_013693.2
TGF- β	Mm00441724_m1	NM_011577.1
Socs1	Mm00782550_s1	NM_009896.2
Socs2	Mm00850544_g1	NM_007706.3
Socs3	Mm00545913_s1	NM_007707.2
Socs5	Mm00465631_s1	NM_019654.2
Socs7	Mm00466905_s1	NM_080843.2
Integrin β 3	Mm00443980_m1	NM_016780.2
Pecam1	Mm00476702_m1	NM_008816.2
CXCL10	Mm00445235_m1	NM_021274.1
CXCR3	Mm00438259_m1	NM_009910.2
18S (Eukaryotic 18S rRNA)	Hs99999901_s1	X03205.1

Primäre Antikörper

Name	Typ	Wirt	Verdünnung	Quelle
Trem2	polyclonal	Ziege	Immunhistochemie: 1:50 Western Blot: 1:200	Santa-Cruz, CA, USA
Iba1	polyclonal	Kaninchen	Kryostatschnitte Fluoreszenz: 1:50 Vibratomeschn. Fluor./DAB: 1:500	Wako Chemicals, Neuss
Tlr2	polyclonal	Ziege	1:100	Santa Cruz, CA, USA
α -Tubulin	monoclonal	Maus	1:10000	Sigma-Aldrich, München

Sekundäre Antikörper

Wirt	Spezifität	Markierung	Verdünnung	Quelle
Affe	anti-Ziege IgG	Alexa 568	1:2000	Molecular Probes, Eugene, USA
Affe	anti-Kaninchen IgG	Alexa 488	1:2000	Molecular Probes, Eugene, USA
Kaninchen	anti-Ziege IgG	Biotin	1:200	Vector Laboratories, über Linaris, Wertheim
Kaninchen	anti-Ziege IgG	HRP	1:5000	Santa Cruz, CA, USA
Kaninchen	anti-Maus IgG	HRP	1:5000	DAKO, Glostrup, Denmark
Kaninchen	anti-Ziege IgG	IRDye 800	1:10000	LI-COR, USA
Kaninchen	anti-Maus IgG	IRDye 680	1:10000	LI-COR, USA

2.2 Tiere und Gewebepräparation

Für die Untersuchungen wurden 18 bis 30 Monate alte männliche APP23 transgene Mäuse (Sturchler-Pierrat et al, 1997) mit einem C57BL/6-Hintergrund sowie altersgleiche nicht-transgene Wurfgeschwister als Kontrollen verwendet (Mikroarray-Untersuchungen +/- und -/- je n=3, qPCR-Analyse +/- und -/- je n=3, Immunfluoreszenzfärbungen +/- und -/- je n=3, immunhistochemische Färbungen +/- n=5 sowie qPCR-Analyse des Endothels +/- und -/- je n=3).

Für die histochemischen Färbungen und die nachfolgende Laser Mikrodisektion sowie für die Immunfluoreszenz-Untersuchungen wurden die Mäuse getötet, das Gehirn wurde präpariert, in Tissue Freezing medium (Jung, über Leica, Nussloch) eingebettet und unmittelbar darauf bei -40 °C eingefroren. Das gefrorene Gewebe wurde bis zum weiteren Schneiden bei -80 °C aufbewahrt. Am Kryostaten wurden bei -20 °C 14 µm dicke Gefrierschnitte hergestellt, die mit Hilfe von RNase-freien Pinseln auf RNase-freie PET (Polyethylenterephthalat)-Folienobjektträger (Leica Microsystems) aufgebracht und angetaut wurden. Die Schnitte wurden anschließend für 8 min bei 40 °C auf der Heizplatte getrocknet und danach histochemisch gefärbt. Für die Immunfluoreszenz-Untersuchungen wurden bei -20 °C 20 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt, die auf Glasobjektträger aufgebracht und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wurden.

Für die immunhistochemischen Studien wurden die Mäuse mit Pentobarbital (300 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert und transkardial zuerst mit 0,9 %iger Kochsalzlösung und anschließend mit 4 % Paraformaldehyd in 0,1M Phosphatpuffer (PB) mit einem pH-Wert von 7,4 perfundiert. Die Gehirne wurden präpariert, über Nacht in 4 % Paraformaldehyd in 0,1M Phosphatpuffer nachfixiert und in 5 %igem Agar eingebettet. Anschließend wurden mittels eines Vibratoms Frontalschnitte mit einer Dicke von 50 µm angefertigt. Für die qPCR-Analyse des Endothels wurden die Mäuse mit Pentobarbital (300 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert und transkardial zuerst mit 0,9 %iger Kochsalzlösung und anschließend mit einer 0,5 %igen Evan's Blue-Lösung perfundiert. Anschließend wurde das Gehirn herauspräpariert, in Tissue freezing medium eingebettet und unmittelbar bei -40 °C eingefroren. Das gefrorene Gewebe wurde bis zum weiteren Schneiden bei -80 °C aufbewahrt. Am Kryostaten wurden bei -20 °C 10 µm dicke Gefrierschnitte hergestellt, die mit Hilfe von Pinseln auf RNase-freie POL (Polyester)-Folienobjektträger (Leica Microsystems) aufgebracht und angetaut wurden.

2.3 Laser Mikrodissektion

Da RNA bei Raumtemperatur sowie in wässriger Umgebung extrem anfällig für RNasen und die daraus folgende Degradierung ist, sollten alle Arbeitsschritte der RNA-Isolierung und Aufreinigung möglichst schnell und möglichst unter Umgehung einer Inkubation in wässriger Umgebung erfolgen.

2.3.1 Histochemische Amyloidfärbung

Für die Anfärbung der Amyloidplaques wurde eine 0,2 %ige Kongorot-Lösung in 0,9 % Kochsalzhaltigem 80 %igen Ethanol (aus RNase-freiem Wasser) hergestellt. Diese Kongorot-Lösung wurde direkt auf die Schnitte aufgebracht und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte zuerst kurz in DEPC-Wasser (RNase-freiem Wasser) und danach in 75 %igem Ethanol gewaschen, 15 min auf der Heizplatte bei 40 °C getrocknet und direkt für die Laser Mikrodissektion weiterverwendet.

2.3.2 Laser Mikrodissektion der Amyloidplaques

Die PET-Folienmetallobjektträger wurden mit der Oberseite (mit den aufgebrachten Schnitten) nach unten in den Objektträgerhalter des Leica AS LMD Systems eingelegt (Abbildung 6).



Abbildung 6: Leica AS LMD System

Die Folienobjektträger werden mit der Oberseite nach unten in den Objektträgerhalter des Leica AS LMD Systems eingelegt.

Der Verlauf des UV-Laserstrahls wurde zunächst mit der Computermaus am Monitor geplant. Schnittlinien in einem Abstand von 50 μm um die Plaques wurden eingezeichnet. Danach wurden diese Bereiche mit Hilfe des 20x Objektivs ausgeschnitten. Außerdem wurden plaquefreie Bereiche desselben Tieres sowie entsprechende Bereiche einer nicht-transgenen Kontrollmaus ausgeschnitten und separat gesammelt. Für eine optimale Schneideeffizienz und maximale Gewebegewinnung wurden die Schneideintensität, die Apertur und die Geschwindigkeit des Lasers in nicht für die Untersuchung verwendeten Gewebeabschnitten so eingestellt, dass das Gewebe mit einem einzelnen Durchgang des Lasers ausgeschnitten werden konnte. Die ausgeschnittenen Gewebebereiche wurden in die Deckel von Mikrozentrifugenreaktionsgefäßen überführt, die direkt unterhalb der Schnitte platziert waren (Abbildung 7).



Abbildung 7: Leica AS LMD System

Die isolierten Gewebestücke werden alleine durch die Schwerkraft in die Deckel der Reaktionsgefäße überführt und dort gesammelt.

Die Gefäßdeckel waren mit einem Guanidin-Isothiocyanathaltigen Puffer (RLT-Puffer, RNEasy MicroKit®/MiniKit®, Qiagen) gefüllt, um die Degradierung der RNA zu vermindern/verhindern. Die Gewebesammlung wurde abschließend durch Inspektion der Gefäßdeckel überprüft. Nach der Gewebesammlung wurden die Reaktionsgefäße verschlossen, direkt auf Eis gegeben und anschließend dreimal in einem Trockeneis/Ethanolbad eingefroren und wieder aufgetaut. Pro LMD-Durchgang wurden ca. 80 Plaques von bis zu vier Schnitten eines Tieres in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Vier

dieser Reaktionsgefäße wurden vor der RNA-Isolierung vereinigt und zusammen auf eine Aufreinigungssäule des RNEasy Mini Kits® bzw. Micro Kits® zur RNA-Isolierung aufgetragen (insgesamt ca. 320 Plaques).

Für die Isolierung der Amyloidplaques und der 30 µm breiten, die Amyloidplaques umgebenden Geweberinge wurde analog vorgegangen. Dabei wurden pro LMD-Durchgang ca. 40 Plaques und ebenso viele 30 µm breite Geweberinge von bis zu vier Schnitten eines Tieres gesammelt.

2.3.3 Histochemische Endothelfärbung

Die Schnitte wurden mit Hilfe einer Alkoholreihe dehydriert. Dazu wurden die Schnitte 10 sec in 75 %igem Alkohol, 10 sec in 96 %igem Alkohol und 30 sec in 100 %igem Alkohol inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger 5 min in einer 0,2 %igen Kongorotlösung in 0,9 % NaCl-haltigem 100 %igem Alkohol inkubiert, kurz in 100 %igem Alkohol gewaschen und 3 min in Xylol inkubiert. Abschließend wurden die Objektträger erneut 4 min in reinem Xylol inkubiert, ca. 5 min bei RT getrocknet und direkt für die Laser Mikrodisektion weiterverwendet.

2.3.4 Laser Mikrodisektion des Endothels

Die POL-Folienmetallobjektträger wurden mit der Oberseite (mit den aufgebrachten Schnitten) nach unten in den Objektträgerhalter des Leica AS LMD Systems eingelegt. Der Verlauf des UV-Laserstrahls wurde zunächst mit der Computermaus am Monitor geplant und Schnittlinien wurden um das rot fluoreszierende Endothel eingezeichnet. Dabei wurde präferentiell Endothelgewebe aus Venulen isoliert, da hier die Strömungsgeschwindigkeit des Blutes niedriger ist als z.B. in Kapillaren. In diesem Teil des Gefäßsystems ist eine Rekrutierung (und ein nachfolgender Übergang) von Entzündungszellen durch die endotheliale Expression von Chemokinen am wahrscheinlichsten. Die Unterscheidung zwischen Venulen und Kapillaren wurde ausschließlich über das Aussehen und die Größe definiert. Es wurde daher nur Endothel ausgewählt, das innerhalb von 50 µm um einen Amyloidplaque lag und einen Durchmesser von 15-40 µm aufwies. Danach wurden diese Bereiche mit Hilfe des 63x Objektivs durch den UV-Laserstrahl ausgeschnitten. Außerdem

wurden endothelfreie Bereiche desselben Tieres sowie entsprechende Endothelbereiche und endothelfreie Bereiche einer nicht-transgenen Kontrollmaus ausgeschnitten und separat gesammelt. Die ausgeschnittenen Gewebebereiche wurden alleine durch Schwerkraft in die Deckel von Mikrozentrifugenreaktionsgefäßen überführt, die mit einem Guanidin-Isothiocyanathaltigen Puffer (RLT-Puffer, RNeasy MicroKit®, Qiagen) gefüllt waren. Nach der Gewebesammlung wurden die Reaktionsgefäße verschlossen, direkt auf Eis gegeben und anschließend dreimal in einem Trockeneis/Ethanolbad eingefroren und wieder aufgetaut. Pro LMD-Durchgang wurden ca. 300 Endothelquerschnitte von bis zu fünf Schnitten eines Tieres gesammelt.

2.4 RNA-Arbeitstechniken

2.4.1 RNA-Isolierung und Aufreinigung

Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit® bzw. RNeasy Micro Kit® (Qiagen) entsprechend der Herstellerangaben aus den gesammelten Gewebebereichen isoliert und aufgereinigt. Dabei wurde für die Aufreinigung der Proben mit Plaques inklusive 50 µm umgebendes Gewebe und entsprechend großen Kontrollgewebereichen das Mini Kit® verwendet, während für die anderen Proben, die lediglich Plaques oder den 30 µm breiten Gewebering und entsprechend große Kontrollgewebestücke enthielten, das Micro Kit® verwendet wurde. Auch für die Aufreinigung der Endothelproben wurde das Micro Kit® verwendet. Unerwünschte DNA wurde durch einen DNase-Verdau (Hydrolyse mit DNase I) entfernt und die aufgereinigte RNA anschließend in RNase-freiem Wasser eluiert. Um die für eine einzelne Mikroarray-Untersuchung benötigten 100 ng RNA zu erhalten, wurden mehrere Proben, die insgesamt ca. 2000 Plaques enthalten haben, vereinigt. Für die qPCR-Analyse wurden Proben mit 1000 bis 1200 Plaques verwendet.

2.4.2 RNA-Qualitätsanalyse

Die isolierte RNA wurde einer Qualitätsuntersuchung unterzogen. Mittels kapillarer Gelelektrophorese wurden die Qualität und Quantität der RNA bestimmt. Die isolierte RNA wurde auf den gemäß den Herstellerangaben vorbereiteten Agilent 6000 PicoLab Chip

aufgetragen und im Agilent 2100 Bioanalyzer untersucht. Die Auswertung erfolgte bei den Proben der Mikroarray-Analyse und deren qPCR-Verifizierung über den neuen Auswertungsalgorithmus (Schroeder et al, 2006) und den dazugehörigen RIN-Wert („RNA Integrity Number“, Skala 1-10), bei den anderen Versuchen überwiegend über das 28S/18S-rRNA-Verhältnis. Für die anschließende Mikroarray- und qPCR-Untersuchung wurde nur intakte RNA, d.h. RNA mit einem RIN-Wert von 6.8 und höher, verwendet.

2.4.3 Reverse Transkription

Für die nachfolgende qPCR-Untersuchung wurde die aufgereinigte Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Erststrangsynthese erfolgte mit der TaqMan-Reversen Transkriptase und Hexanukleotiden als Primer für das Enzym. Die aufgereinigte Gesamt-RNA mit einem Gesamtvolumen von 10 µl (Aufarbeitung RNEasy MicroKit®) wurde mit einem Mix (0,5facher Ansatz) aus 2,5 µl Reverse Transkriptionspuffer, 5,5 µl MgCl₂, 5 µl dNTPs und 1,25 µl Hexanukleotiden („Random Hexamers“) zusammen mit 0,5 µl RNase Inhibitor und 0,625 µl Reverse Transkriptase 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Aufreinigung mit dem RNEasy Mini Kit® wurde für die isolierte Gesamt-RNA mit einem Gesamtvolumen von 30 µl der 1,5fache Ansatz des Reversen Transkriptions-Mix verwendet. Nach 60 minütiger reverser Transkription bei 48 °C und anschließender Inkubation bei 95 °C für 5 min wurde der Mix direkt auf Eis abgekühlt und bei -20 °C weggefroren.

2.5 Mikroarray-Analyse

Die Amplifikationsschritte sowie die Hybridisierung und das Scannen der Mikroarrays wurden von Mitarbeitern der Scienion AG, Berlin, durchgeführt. Dabei wurden die ersten Durchläufe (zu Test- und Trainingszwecken) gemeinsam in Berlin durchgeführt.

2.5.1 RNA-Amplifikation

Für eine einzelne Mikroarray-Untersuchung wurden als Ausgangsmenge ungefähr 100 ng benötigt. Zuerst wurde mit Hilfe des Agilent Low RNA Input Linear Amplifikationskit (Agilent Technologies) gemäß den Herstellerangaben einmalig eine Amplifikationsrunde durchgeführt. Die isolierte Gesamt-RNA wurde zusammen mit dem T7 Promotor Primer 10

min bei 65 °C denaturiert. Anschließend wurde der vorgefertigte cDNA Master Mix zugegeben und die Amplifikationsreaktion durch Inkubation des Mix bei 40 °C im zirkulierenden Wasserbad gestartet. Nach zweistündiger Inkubation bei 40 °C und 15 min bei 65 °C wurde der Reaktionsmix 5 min auf Eis abgekühlt. Anschließend erfolgte die *in vitro*-Transkription und Inkorporation von Cyanin 3- oder Cyanin 5-CTP unter Verwendung des gebrauchsfertigen Transkriptions-Master Mix bei 40 °C für 2 Stunden. Die amplifizierte und markierte RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit[®] (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt und isoliert.

2.5.2 Hybridisierung und Scannen der Mikroarrays

Die Mikroarrays wurden mit der markierten cRNA gemäß den Herstellerangaben hybridisiert und gescannt (Whole Mouse Genome Microarray Kit G4122A, Agilent Technologies). Zuerst wurde die Cyanin 3- und Cyanin 5-markierte cRNA zusammen mit internen Kontrollen in Fragmentierungspuffer bei 60 °C für 30 min im Dunkeln fragmentiert. Nach Zugabe von Hybridisierungspuffer aus dem In Situ Hybridisierungs-Kit (Agilent Technologies) wurde die Hybridisierungslösung umgehend blasenfrei auf eine Dichtungsplatte verteilt. Die Mikroarray-Platte wurde auf die Dichtungsplatte aufgelegt und beides in eine Hybridisierungskammer mit drehbarem Ständer (Robbins Scientific) eingebracht. Die Hybridisierung erfolgte bei 60 °C und 4 rpm für 17 Stunden. Anschließend wurden die Mikroarray-Platten zweimal 10 min mit 0,005 % Triton-X102-haltigem 6x SSC-Puffer, der durch einen 0,2 µm Filter steril filtriert wurde, bei Raumtemperatur gewaschen und dabei von den Dichtungsplatten getrennt. In einem dritten Waschschrift mit steril filtriertem 0,005 % Triton-X102-haltigem 0,1x SSC-Puffer auf einer Magnetührplatte wurden die Mikroarray-Platten 10 min auf Eis gewaschen, abschließend mit einer Stickstoff-gefüllten Luftpistole getrocknet und mit Hilfe eines Mikroarray-Scanners (Agilent Technologies) gescannt.

Jede cRNA-Probe aus Plaquesgewebe eines Tieres wurde dreimal analysiert, jede Probe aus plaquefreiem Gewebe eines Tieres zweimal. Die erhaltenen Rohdaten wurden mit Hilfe des „Agilent Enhanced Feature Extractor-Plugin“ (Agilent Technologies) in die Genespring 7.0-Analysesoftware importiert. Die Intensitätssignale des roten und grünen Kanals wurden jeweils als Signal- und Kontrollkanal genutzt.

2.5.3 Auswertung der Rohdaten

Die erhaltenen Rohdaten wurden vier verschiedenen Normalisierungsschritten unterzogen, die dazu dienen, alle Mikroarray-Daten von unterschiedlichen Chips untereinander/miteinander vergleichbar zu machen. Die Normalisierung begann mit der „LOWESS-Regression“ (locally weighted scatterplot smoothing), die zur Standardisierung der Einbaurate der fluoreszenzmarkierten dCTPs diente. Die nachfolgende „per spot“-Normalisierung wurde zur Kalkulation des Proben/Referenzverhältnisses jedes einzelnen Spots durchgeführt. Die „per chip“-Normalisierung diente dazu, den Gesamtmittelwert (aggregate median) jedes einzelnen Mikroarrays auf eins zu setzen, um alle Mikroarrays miteinander vergleichbar zu machen. Den letzten Schritt bildete die „per gene“-Normalisierung, die die Zentrierung der Expressionsprofile aller Gene um den Wert eins ermöglichte.

Um regulierte Transkripte in Plaquesbereichen zu identifizieren, wurden alle Arrays der drei Mäuse zusammengefasst, woraus sich insgesamt 9 Arrays für Plaquesgewebe und 6 Arrays für plaquefreies Gewebe ergaben. Aus den erhaltenen Daten wurden alle Transkripte mit einer mindestens 2fachen Erhöhung oder Erniedrigung der Expressionslevel im Vergleich von Plaques- zu plaquefreiem Gewebe herausgefiltert („fold-difference filtering“, 2,0 FD-Filter). Die statistische Signifikanz der Daten wurde mit Hilfe des Student's t-Test ermittelt. Mittels Benjamini-Hochberg False discovery Rate wurden die p-Werte korrigiert, um einen p-Wert von $<0,05$ zu erhalten. Die statistische Analyse der Mikroarray-Daten wurde mit der Software „Genespring 7.0“ (Agilent Technologies) durchgeführt, die Netzwerkanalyse mit der „Ingenuity Pathway Analysis“ Software (Ingenuity Systems).

Die für die Mikroarray-Untersuchung notwendigen Arbeitsschritte sind im folgenden in einem Diagramm zusammengefasst:

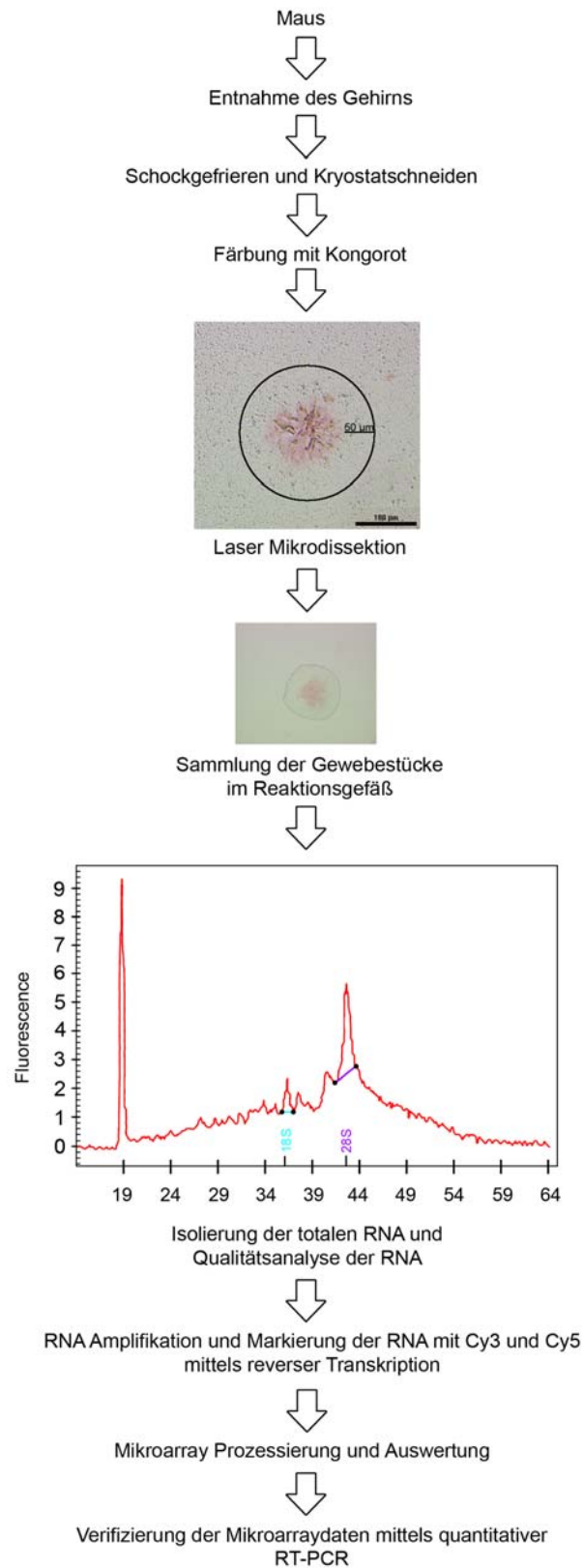


Abbildung 8: Flussdiagramm der Arbeitsschritte

2.6 DNA-Arbeitstechniken

2.6.1 Präparation der Schwanzspitzen-DNA zur Genotypisierung

Die Mäuse wurden mit Isofluran (Abbott, Wiesbaden; Deutschland) anästhesiert und markiert. Danach wurden etwa 3-4 mm der Schwanzspitze mit einer sterilen Skalpellklinge abgetrennt und in ein autoklaviertes Reaktionsgefäß überführt. Sowohl der Ohrlocher als auch die Skalpellklinge wurden nach jeder Maus desinfiziert. Die Schwanzspitzen wurden entweder unverzüglich weiterverarbeitet oder bei -20 °C für mehrere Tage gelagert.

Zur Herstellung der Schwanzspitzenlysate wurden die Schwanzspitzen mit 180µl TNES-Puffer (50mM Tris, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % SDS in ddH₂O) und 20µl Proteinase K (10 mg/ml, Invitrogen, Karlsruhe) für mindestens 4 Stunden oder über Nacht bei 55 °C im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) inkubiert.

Anschließend wurden die Lysate 3 min bei 95 °C inkubiert, um die Proteinase K zu inaktivieren. Um das unlösliche Material auszufällen wurden die Proben danach 5 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues, autoklaviertes Reaktionsgefäß überführt, 1:100 mit destilliertem Wasser verdünnt und weiterverarbeitet oder bei -20 °C aufbewahrt.

2.6.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Mäuse wurden mit Hilfe der PCR genotypisiert. Die PCR stellt eine *in-vitro*-Methode zur Amplifizierung spezifischer Sequenzen einer vorhandenen DNA dar. Während jedes Zyklus binden zwei Oligonukleotidprimer (sense und antisense) in entgegengesetzter Richtung an die mit Hilfe von Hitze getrennten komplementären DNA-Stränge. Anschließend verlängert die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase die Primer durch Anlagern/Einbau von Nukleotiden, die komplementär zum Ausgangsstrang sind (Mullis et al, 1986). Die PCR-Reaktion wurde zur Genotypisierung der transgenen Mäuse sowohl im Thermocycler (GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems) mit anschließender Agarosegelelektrophorese als auch als quantitative RT-PCR (ABI Prism 7000, Applied Biosystems) durchgeführt.

2.6.3 Quantitative RT-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR bzw. qPCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht und zusätzlich durch Fluoreszenzmarkierung die Möglichkeit der Quantifizierung in Echtzeit bietet. Dabei nimmt die gemessene Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgt durch Verwendung spezieller Primersysteme (TaqMan Assays, Applied Biosystems), die sich aus den üblichen zwei Primern am 5'- und 3'-Ende des zu bestimmenden DNA-Fragments („forward“- und „reverse“-Primer) und den sog. TaqMan-Sonden zusammensetzen, die innerhalb der von den Primern begrenzten Sequenz liegen. Die TaqMan-Sonde (die sog. „Probe“) besteht aus einem Oligonukleotid, das an einem Ende einen Reporter- und am anderen Ende einen Quencher-Fluoreszenzfarbstoff trägt. Der Quencher unterdrückt zunächst die Emission des Reporterfarbstoffs. Wird der Reporter durch die Taq-Polymerase, die eine 5'-Exonukleaseaktivität besitzt und dadurch den Quencher abbaut, freigesetzt, wird eine Fluoreszenzemission des Reporterfarbstoffs möglich. Je mehr DNA synthetisiert wird, desto mehr Fluoreszenzsignal entsteht.

Zu Beginn einer PCR ist die DNA-Menge begrenzt (Startphase). Am Schluss einer PCR ist die DNA-Menge der Zielsequenz so stark angestiegen, dass immer häufiger Produktfragmente miteinander hybridisieren und so die PCR hemmen (Plateauphase). Zwischen Startphase und Plateauphase liegt die exponentielle Phase, in der sich die Zielsequenz unter optimalen Bedingungen verdoppelt. Der Anfang der exponentiellen Phase (lineare Amplifizierungsphase) wird zur Quantifizierung genutzt. Dabei wird der Zyklus, an dem die Fluoreszenz signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt, als CT-Wert (Cycle Threshold, „Schwellenwert-Zyklus“, siehe Abbildung 9) angegeben.

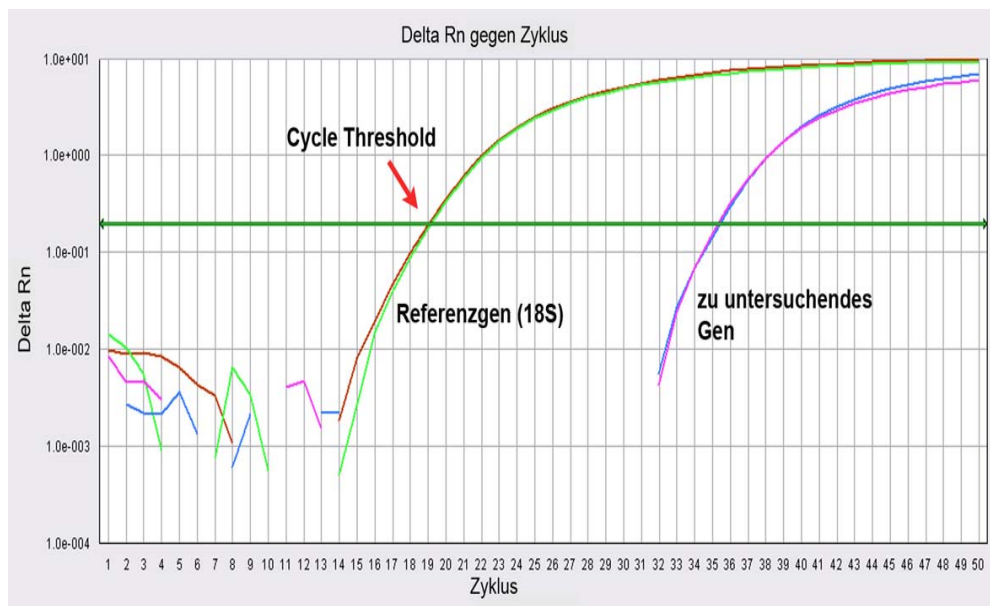


Abbildung 9: Darstellung einer qPCR-Kurve

Darstellung der Amplifizierungskurven des zu untersuchenden Gens und eines Referenzgens sowie des “Cycle Threshold”

Als Kontrollen dienen ein zusätzliches internes Gentranskript oder ein externes Referenzgen (z.B. 18S). Die Expression des Zielgens wird mit dem Referenzgen („housekeeping gene“) normalisiert, indem die Signale des Referenzgens verwendet werden, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten DNA-Probe auszugleichen (relative Quantifizierung, siehe Abbildung 9). Da schon geringe Schwankungen in der PCR-Effizienz zu großen Unterschieden führen können, beinhaltet die Auswertung der relativen Quantifizierung eine Effizienzkorrektur (Delta-Delta-CT-Methode). Das ideale Kontroll-/Referenzgen sollte leicht zu detektieren sein, und seine Expression sollte nicht während eines Zellzyklus, zwischen Zelltypen oder auch als Antwort auf eine experimentelle Behandlung variieren. In diesem Fall stellte 18S für die Untersuchung von Gehirngewebe ein optimales Referenzgen dar.

Die quantitative RT-PCR wurde mit dem ABI7000 qPCR-System (Applied Biosystems) und unter Verwendung der entsprechenden TaqMan-Primer- und Probekomponenten („TaqMan Assays on Demand“, Applied Biosystems, siehe Primertabelle Seite 44) durchgeführt.

Die Auswertung der Genotypisierung mittels qPCR erfolgte durch Detektion eines vervielfältigten DNA-Fragments, d.h. einer Fluoreszenzaktivität, in einem CT-Wert-Bereich von 22 bis 23. Nicht-transgene Mäuse zeigten keine Fluoreszenzaktivität (bzw. erst bei CT-Werten über 40, die dann allerdings eine unspezifische Fluoreszenz darstellen).

Die Auswertung aller anderen qPCR-Analysen erfolgte mit Hilfe der relativen Quantifizierung über das Referenzgen 18S nach der Delta-Delta-CT-Methode (siehe oben).

2.6.4 Amplifizierung der Endothel-cDNA für die qPCR-Analyse

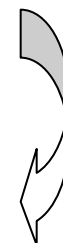
Die Amplifizierung der cDNA erfolgte im Prinzip wie eine PCR mit niedriger konzentrierten Primern und einem speziellen gebrauchsfertigen Mastermix, der das erforderliche Enzym und alle anderen Reagenzien in einer geeigneten Pufferlösung enthält. Die aufgereinigte cDNA wurde zusammen mit einem verdünnten Mix der TaqMan-Sondensysteme (Verdünnung der einzelnen TaqMan-Assays: 1:100; siehe unten), der zu untersuchenden Gene und dem „PreAmp Mastermix“ (Applied Biosystems), der alle entsprechenden Puffer, Salze, Nukleotide und das Enzym enthält, einer Standard-PCR mit 10 Zyklen unterzogen (PCR-Protokoll siehe unten). Das Amplifizierungsprodukt wurde anschließend mit TBE-Puffer 1:5 verdünnt und für die quantitative RT-PCR weiterverwendet. Die genauen Protokolle der Amplifizierungs-PCR und der folgenden qPCR sind in den unten stehenden Tabellen aufgeführt.

Reaktionsmix (APP)	PCR	qPCR
PCR Mastermix	12,5 µl	12,5 µl
H ₂ O	6,5 µl	2,5 µl
„forward“-Primer	2 µl (Ausgangskonzentration 5 pmol/µl)	2,5 µl (Ausgangskonzentration 3µM)
„reverse“-Primer	2 µl (Ausgangskonzentration 5 pmol/µl)	2,5 µl (Ausgangskonzentration 3µM)
„Probe“	-	2,5 µl (Ausgangskonzentration 1 µM)
DNA	2 µl	2,5 µl

Reaktionsmix Preamplifikation-PCR	
TaqMan Assay-Mix	Je 5 µl TaqMan Assay 20x Verdünnen mit TE-Puffer auf eine Endkonzentration Assay von 0,2x
TaqMan Assay Mix	12,5 µl
cDNA	12,5 µl
PreAmp MasterMix	25 µl

Reaktionsmix	qPCR (TaqMan Assays)	qPCR (18S)	qPCR nach Preamplifikation
PCR Mastermix	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
H ₂ O	8,75 µl	8,5 µl	5,0 µl
TaqMan Assay	1,25 µl	-	1,25 µl
„forward“-Primer (18S)	-	0,25 µl	-
„reverse“-Primer (18S)	-	0,25 µl	-
„Probe“ (18S)	-	1,0 µl	-
cDNA	2,5 µl	2,5 µl	6,25 µl

Programm	Normale PCR	qPCR	Amplifizierungs- -PCR
Denaturierung	94 °C 5 min	95 °C 10 min	95 °C 10 min
Aktivierung der Polymerase	-	50 °C 2 min	50 °C 2 min
Denaturierung	94 °C 45 sec	95 °C 15 sec	95 °C 15 sec
Anlagerung	58 °C 45 sec	60 °C 1 min	60 °C 1 min
Elongation	72 °C 45 sec		
Anzahl der Zyklen	35	40-50	10-14



Je Zyklus

2.6.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente zur Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe. Das zugrundeliegende Prinzip soll hier kurz dargestellt werden:

Während der Gelelektrophorese wandern die DNA-Moleküle entlang eines elektrischen Feldes durch die Agarosematrix. Die Entfernung, die ein DNA-Molekül zurücklegt, ist umgekehrt proportional zum Logarithmus seiner Größe gemessen in Basenpaaren. Durch den Vergleich mit einer Referenz-DNA bekannter Größe kann die Größe des untersuchten DNA-Moleküls ermittelt werden. Dabei wird die DNA durch die Zugabe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht, das sich zwischen die Nukleotidbasen einlagert/interpoliert. Nach Anregung mit UV-Licht wird die DNA durch Bildung eines fluoreszierenden DNA/Ethidiumbromid-Komplexes als fluoreszierende Bande sichtbar. Als Laufkontrolle dient die Detektion einer Aktinbande (APP-Produkt: 246 bp; Aktin: 146 bp).

Bei diesem Versuchsansatz wurde die Agarose (SeaKem[®] LE Agarose, Cambrex Bio Science, Rockland, ME, USA; endgültige Konzentration 1 %) in TBE-Puffer aufgekocht. Das flüssige Gel wurde dann unter Vermeidung von Blasenbildung in die Gelelektrophoresekammer eingefüllt, und es wurde 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Appli Chem) zugefügt. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen 6x Probenpuffer gemischt, in die Geltaschen eingebracht und 1 Stunde bei 120V aufgetrennt (Elektrophoresepuffer ist TBE-Puffer). Die Detektion und Dokumentation der DNA-Bandenverteilung wurden mit einem UV-Transilluminator (MWG Biotech, Ebersberg) und dem Elektrophorese Dokumentations- und Analysesystem (Kodak, Rochester, NY) durchgeführt.

Für die Gelelektrophorese verwendete Lösungen:

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Agarosegel	1 % Agarose in TBE-Puffer (gebrauchsfertig)
Probenpuffer 6x	0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylen Cyanol, 15 % Ficoll in TBE-Puffer

2.7 Immunfärbungen

Alle in dieser Arbeit angewendeten Immunfärbungsverfahren beinhalteten die folgenden üblichen Verfahrensschritte, die hier zusammengefasst werden:

Im ersten Schritt wurden Epitope, die zu unspezifischen Färbungsergebnissen führen könnten, abgebunden („Blockierungsschritt“), und das Gewebe wurde durch Zugabe eines Detergens (Triton X-100) permeabilisiert. Im zweiten Schritt erfolgte die Zugabe des primären Antikörpers und dessen Bindung an das entsprechende Antigen. Im letzten Schritt erfolgte die Zugabe des sekundären Antikörpers und dessen Bindung an die konstanten Regionen des primären Antikörpers. Der sekundäre Antikörper war dabei entweder mit einem Fluorophor oder mit Biotin gekoppelt. Im Falle der Biotinkopplung wurde ein Avidin-Biotin-Peroxidase-System mit Diaminobenzidin (DAB) als Chromogen zur Detektion des sekundären Antikörpers genutzt. Die Färbebedingungen (Permeabilisierung, Antikörperverdünnung, Inkubationszeit) wurden für jeden einzelnen Antikörper optimiert.

2.7.1 Immunfluoreszenzfärbungen auf Kryostatschnitten

Am Kryostaten wurden bei -20 °C $20\text{ }\mu\text{m}$ dicke Kryostatschnitte angefertigt, die durch Antauen auf Glasobjektträger überführt wurden. Die Schnitte wurden mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend 10 min in eiskaltem Aceton fixiert. Anschließend wurden die Schnitte 10 min bei 40 °C auf einer Heizplatte getrocknet und in eine feuchte Kammer gelegt. In einem nächsten Schritt wurden die Schnitte mit 5 % normalem Pferdeserum und 0,5 % Triton X-100 in 0,1 M Phosphatpuffer (PB, pH 7,4) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die Lösung direkt auf die Schnitte gegeben wurde. Nach einmaligem Waschen mit Phosphatpuffer wurden die Schnitte über Nacht mit dem primären Antikörper in 1 % bovinem Serumalbumin und 0,3 % Triton X-100 in PB bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PB wurden die Schnitte 2 Stunden mit einem Alexa Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten sekundären Antikörper in 1 % bovinem Serumalbumin in 0,1M PB ohne Zugabe von Triton X-100 bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Schnitte wurden abschließend dreimal mit PB gewaschen und mit „Fluorescent Mounting Medium“ (DAKO) eingedeckt, um die Ausbleichung des Fluoreszenzsignals zu reduzieren. Im Fall der Doppelfärbungen wurden die Schnitte mit einer Mischung aus beiden primären Antikörpern inkubiert.

Nach den Waschschritten wurden die Schnitte zuerst mit dem ersten sekundären Antikörper inkubiert, anschließend wieder gewaschen und dann mit dem zweiten sekundären Antikörper inkubiert.

2.7.2 Immunfluoreszenzfärbung von Vibratomschnitten

Frei flotierende 50 µm dicke Vibratomschnitte wurden vor Beginn der Prozedur dreimal mit PB gewaschen, um alle Rückstände der Kryoprotektionslösung zu entfernen. Die Schnitte wurden mit 5 % normalem Pferdeserum und 0,5 % Triton X-100 in 0,1 M Phosphatpuffer (PB, pH 7,4) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte einmal mit PB gewaschen und über Nacht mit dem primären Antikörper in 1 % bovinen Serumalbumin und 0,3 % Triton X-100 in 0,1M PB bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PB wurden die Schnitte 2 Stunden mit einem Alexa Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten sekundären Antikörper in 1 % bovinem Serumalbumin und 0,3 % Triton X-100 in 0,1M PB bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte noch dreimal mit PB gewaschen, auf Glasobjektträger aufgezogen und mit „Fluorescent Mounting Medium“ (DAKO) eingedeckt. Im Fall der Doppelfärbungen wurden die Schnitte mit einer Mischung aus beiden primären Antikörpern inkubiert. Nach den Waschschritten wurden die Schnitte zuerst mit dem ersten sekundären Antikörper inkubiert, anschließend wieder gewaschen und mit dem zweiten sekundären Antikörper inkubiert.

2.7.3 Histochemische DAB-Färbung auf Vibratomschnitten

Frei flotierende 50 µm dicke Vibratomschnitte wurden vor Beginn der Prozedur dreimal mit TBS („Tris buffered Saline“, pH 7,4) gewaschen, um alle Rückstände der Kryoprotektionslösung zu entfernen. Die Schnitte wurden 60 min in 0,3 % Hydrogenperoxid und 10 % Methanol in TBS inkubiert, um eine Reduktion des Hintergrundes zu erreichen. Als nächstes wurden die Schnitte dreimal mit TBS gewaschen und mit 5 % normalem Pferdeserum und 0,5 % Triton X-100 in 0,1M TBS für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit TBS wurden die Schnitte über Nacht mit dem primären Antikörper in 1 % bovinen Serumalbumin und 0,1 % Triton X-100 in 0,1M TBS bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal mit TBS gewaschen und für 30 min mit

einem biotinylierten Sekundärantikörper bei RT inkubiert. Die Schnitte wurden erneut dreimal mit TBS gewaschen und mit Vectastain ABC Elite-Lösung für 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS wurde die Färbung durch Zugabe von 1 % NH_4NiSO_4 , 1 % CoCl_2 in 0,8 %iger 3,3-Diaminobenzidin-Lösung visualisiert. Anschließend wurden die Schnitte nach weiteren Waschschritten in TBS 30 min mit Kongorot-Lösung (0,2 % Kongorot und 0,9 % NaCl in 80 %igem Ethanol) inkubiert und auf Glasobjektträger aufgezogen. Abschließend wurden die Schnitte durch Inkubation in 96 %igem Ethanol für 5 min und Inkubation in Xylol für 5 min dehydriert, auf der Heizplatte bei 40 °C getrocknet und mit „Permount“ (Fisher Scientific) eingedeckt.

Verwendete Pufferlösungen:

Pufferlösung	Zusammensetzung
Kryoprotektionslösung	30 % Ethylenglycol 25 % Glycerin 0,01 % Thimerosal in 0,1M PBS
PBS	16 g Dinatriumhydrogenphosphat 2,2 g Natriumdihydrogenphosphat 9,54 g Natriumchlorid in 1060 ml ddH ₂ O pH 7,4
TBS	12,11 g Tris 18 g Natriumchlorid 88 ml 1N Salzsäure in 1920 ml ddH ₂ O pH 7,4
PB	16 g Dinatriumhydrogenphosphat 2,2 g Natriumdihydrogenphosphat in 1060 ml ddH ₂ O pH 7,4

2.8 Proteinextraktion und Proteinanalyse

2.8.1 Proteinextraktion

Die Mäuse wurden mit einer Überdosis Isofluran anästhesiert und danach getötet. Das Gehirn wurde entnommen, und der Kortex wurde abgetrennt. Anschließend wurde der Kortex gewogen und mit einer entsprechenden Menge Homogenierungspuffer (10faches Volumen, z.B. 500 µl pro 50 mg Kortexgewebe) und verschiedenen Proteaseinhibitoren (siehe Tabelle Seite 67) mit Hilfe eines Homogenisators auf Eis zerkleinert und homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 25.000 x g (entspricht 16400 rpm) und 4 °C für 30 min zentrifugiert, um unlösliches Material zu pelletieren und abtrennen zu können. Der Überstand (C-Sup, „crude supernatant“) wurde abpipettiert und bei -80 °C eingefroren.

2.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe und Ladung erfolgte in Acrylamidgelen nach der Methode von Lämmli (Lämmli, 1970). Die unspezifische Anlagerung von anionischem Natriumdodecylsulfat (SDS) führt zu einer negativen Gesamtladung des Proteins. Im elektrischen Feld wandern die Proteine durch die Gelmatrix zur Anode. Dabei wandern die kleineren Proteine schneller, da sie weniger durch die Gelmatrix behindert werden.

Zur Auftrennung wurden zwei verschiedene Gele verwendet, das Sammel- und das Trenngel, die sich in ihrer Acrylamidkonzentration und in ihrem pH-Wert unterscheiden. Dabei wurde das Sammelgel, das die Geltaschen zur Aufnahme der Proteinlösungen enthält, auf das Trenngel geschichtet. An der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel entsteht eine scharfe Proteinbande, im Trenngel erfolgt eine reproduzierbare Auftrennung der Proteine.

Die Gelbox wurde in die Gelkammer eingebracht und mit 1x Elektrophoresepuffer bedeckt. Die Proteinproben wurden 1:1 mit Lämmli-Probenpuffer verdünnt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Danach wurden die Proben kurz auf Eis abgekühlt, kurz herunterzentrifugiert und in die Geltaschen eingefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V (Sammelgel) und 160 V (Trenngel).

2.8.3 Western Blot-Analyse

Als Western Blot wird der Transfer von Proteinen aus dem Polyacrylamidgel auf Nitrocellulose- oder Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF) bezeichnet. Dabei wurde für den Transfer ein elektrophoretisches Blotverfahren benutzt. Binden die Proteine an die Membran, werden sie immobilisiert und können nachfolgend mittels Immunodetektion analysiert werden.

Die Elektrophorese erfolgte mittels eines „Semi-Dry-Blotters“, der aus zwei Metallplatten besteht, der Anode und der Kathode. Auf die Anode wurden zwei Lagen mit Transferpuffer getränktem Whatman-Papier gelegt. Darauf wurde die ebenfalls mit Transferpuffer angefeuchtete Membran gelegt, wobei die PVDF-Membran im Gegensatz zur Nitrocellulosemembran vor dem Befeuchten mit Transferpuffer kurz mit Methanol aktiviert werden muss. Auf die Membran wurde nun das im Transferpuffer äquilibrierte Proteingel gelegt und abschließend mit zwei Lagen mit Transferpuffer getränktem Whatman-Papier und der Kathodenplatte bedeckt. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Spannung von 15 mV für 75 min.

2.8.4 Western Blot-Immunodetektion

Um die auf der Membran immobilisierten Proteine spezifisch anzufärben, wurde anschließend eine Immunodetektion durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgte dabei die Absättigung unspezifischer Bindungen mit Blockierungslösung (5 % Magermilchpulver oder 5 % BSA) bei Raumtemperatur für 60 min auf einem Schüttler.

Bei einer Detektion mit dem Odyssey[®] Infrared Imaging System (LICOR, USA) wurde bis nach der Inkubation mit Blockierungslösung auf die Zugabe von Tween 20[®] verzichtet. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper in 5 % BSA in TBS-Puffer mit 0,05 % Tween 20[®] über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Nach drei Waschschritten mit TBS-T_{0,1%} wurde die Membran mit dem entsprechenden Sekundärantikörper in der vom Hersteller angegebenen Verdünnung in 5 % Magermilchpulver in TBS-Puffer mit 0,05 % Tween 20[®] 120 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

Nach anschließendem mehrmaligen Waschen mit TBS-T_{0,1%} erfolgte die abschließende Detektion mit dem ECL (Enhanced Chemilumineszenz)-System oder dem Odyssey[®] Infrared Imaging System. Die verwendeten Antikörper sind in der Tabelle auf Seite 45 aufgeführt.

2.8.4.1 ECL-System

Das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP, horseradish peroxidase) katalysiert die Oxidation von Luminol durch Hydrogenperoxid, wodurch Chemilumineszenz erzeugt wird.

Diese Chemilumineszenz führt auf einem Röntgenfilm zu einer selektiven Schwarzfärbung genau dort, wo der Zweitantikörper an die Membran bzw. an die Primärantikörper-gebundenen Proteine gebunden hat. Dazu wurde die Membran mit der ECL-Lösung (Super Signal West Pico Kit, Perbio Science) 5 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, in eine Klarsichthülle verpackt und in einer Entwicklungskassette mit dem Röntgenfilm bedeckt. Je nach Signalstärke wurde der Film unterschiedlich lange belichtet und in einer Dunkelkammer manuell entwickelt (Entwickler: Rodinal).

2.8.4.2 Infrarot-System

Die Infrarot-gekoppelten Sekundär-Antikörper IRDye 680 (emittiert Licht bei 680 nm, rot) und IRDye 800 (800 nm, grün) wurden direkt mit dem Odyssey[®] Infrared Imaging System (LICOR, USA) detektiert und mit einer entsprechenden Software nach Herstellerangaben bearbeitet.

Für die Proteinextraktion und Proteinanalyse wurden folgende Reagenzien verwendet:

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Trenngelpuffer (Bio-Rad)	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Sammelgelpuffer (Bio-Rad)	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
Lämmli-Probenpuffer (Bio-Rad)	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 25 % Glycerol 2 % SDS 0,01 % Bromphenolblau
Probenpuffer	950 µl Lämmli Probenpuffer (Bio-Rad) 50 µl β-Mercaptoethanol
Elektrophoresepuffer	Verdünnung des fertigen Elektrophoresepuffers (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % M/V SDS, pH 8,3, Bio-Rad) 1:10 mit ddH ₂ O
Homogenisierungspuffer	20 mM Tris 500 mM NaCl pH 7,5, ergänzt/zusammen mit: 0,5 % Chaps 5 mM EDTA 2 µM Pepstatin 2 µM Leupeptin 200 µM Pefabloc } Proteaseinhibitoren
Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % Methanol
TBS	0,05 M Tris 0,9 % NaCl pH 7,4
TBS-T	0,05 M Tris 0,9 % NaCl 0,1 % Tween-20 pH 7,4
Blockierungslösung 1	5 % BSA in TBS
Blockierungslösung 2	5 % Magermilchpulver in TBS

Gele	Konzentration	Zusammensetzung
Sammelgel	4 %	1,3 ml Polyacrylamid, 29:1, 30 % 2,5 ml Sammelgelpuffer (0,5 M) 6,2 ml ddH ₂ O 100 µl 10 % APS 50 µl TEMED
Trenngel 1	10 %	3,3 ml Polyacrylamid, 29:1, 30 % 2,5 ml Trenngelpuffer (1,5 M) 4,2 ml ddH ₂ O 50 µl 10 % APS 25 µl TEMED
Trenngel 2	15 %	3,75 ml PAA (Polyacrylamid) 37,5:1, 40 % 3,75 ml 1 M Trenngelpuffer pH 8,8 2,5 ml ddH ₂ O 100 µl 10 % APS 50 µl TEMED 100 µl 1 % SDS

2.9 Statistische Auswertung

2.9.1 Mikroarray-Untersuchungen

Nach Bearbeitung der Mikroarray-Rohdaten (verschiedene Normalisierungsschritte, siehe Abschnitt 2.5.3) wurde die statistische Signifikanz der erhaltenen Daten mit Hilfe des Student's t-Test ermittelt. Mittels Benjamini-Hochberg False discovery Rate wurden die p-Werte korrigiert, um einen p-Wert von <0,05 zu erhalten. Die statistische Analyse der Mikroarray-Daten wurde mit der Software „Genespring 7.0“ (Agilent Technologies) durchgeführt.

2.9.2 qPCR-Untersuchungen von Plaques und plaqueassoziiertem Gewebe

Die statistische Untersuchung wurde mit den Programmen GraphPad InStat und SPSS für Windows durchgeführt. Die statistische Signifikanz der qPCR-Ergebnisse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt ($p < 0,05$).

2.9.3 qPCR-Untersuchungen des Endothelgewebes

Die statistische Untersuchung wurde mit den Programmen GraphPad InStat und SPSS für Windows durchgeführt. Die statistische Signifikanz der qPCR-Ergebnisse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt ($p < 0,05$).

2.9.4 Auswertung der Western Blot-Ergebnisse und der Mikrogliazählung

Auch hier wurde die statistische Untersuchung mit den Programmen GraphPad InStat und SPSS für Windows durchgeführt. Die statistische Signifikanz der qPCR-Ergebnisse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt ($p < 0,05$).

3. Ergebnisse

3.1 Isolierung qualitativ hochwertiger RNA aus verschiedenen plaqueassoziierten Geweben APP23 transgener Mäuse

Für die Untersuchung der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion wurde Gewebe aus dem Gehirn der APP23 transgenen Mäuse isoliert. Dabei musste sowohl auf die unterschiedlichen inhaltlichen Fragestellungen als auch auf die technischen Anforderungen der Analysemethoden eingegangen werden.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden in einem hypothesefreien Ansatz durch Kombination von LMD und Mikroarray-Analyse neue Kandidatengene für die Regulierung der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion ermittelt.

Im zweiten und dritten Teil der Arbeit wurden bereits in der Literatur diskutierte Kandidatengene im plaqueassoziierten Gewebe untersucht. Dazu wurden einerseits Plaques, plaqueassoziiertes und plaquefreies Gewebe sowie andererseits plaqueassoziiertes Endothelgewebe isoliert und die mRNA Expression möglicher Regulatoren der Entzündungsreaktion ermittelt.

3.1.1 Mikrodissektion von Amyloidplaques für die Mikroarray-Analyse

Mittels Laser Mikrodissektion wurden aus 14 µm dicken Kryoschnitten aus dem Gehirn von APP23 transgenen Mäusen, die auf einen Folienobjektträger aufgebracht wurden, Plaques inklusive 50 µm umgebendes Gewebe sowie entsprechendes plaquefreies Gewebe als interne Kontrolle isoliert.

Dabei wurden die Plaques durch Anfärbung des Amyloids mit Kongorot sichtbar gemacht. Außerdem wurden größenmäßig entsprechende Gewebestücke aus nicht-transgenen Wurfgeschwistern, d.h. nicht-transgenen Kontrollen, isoliert (Abbildung 10).

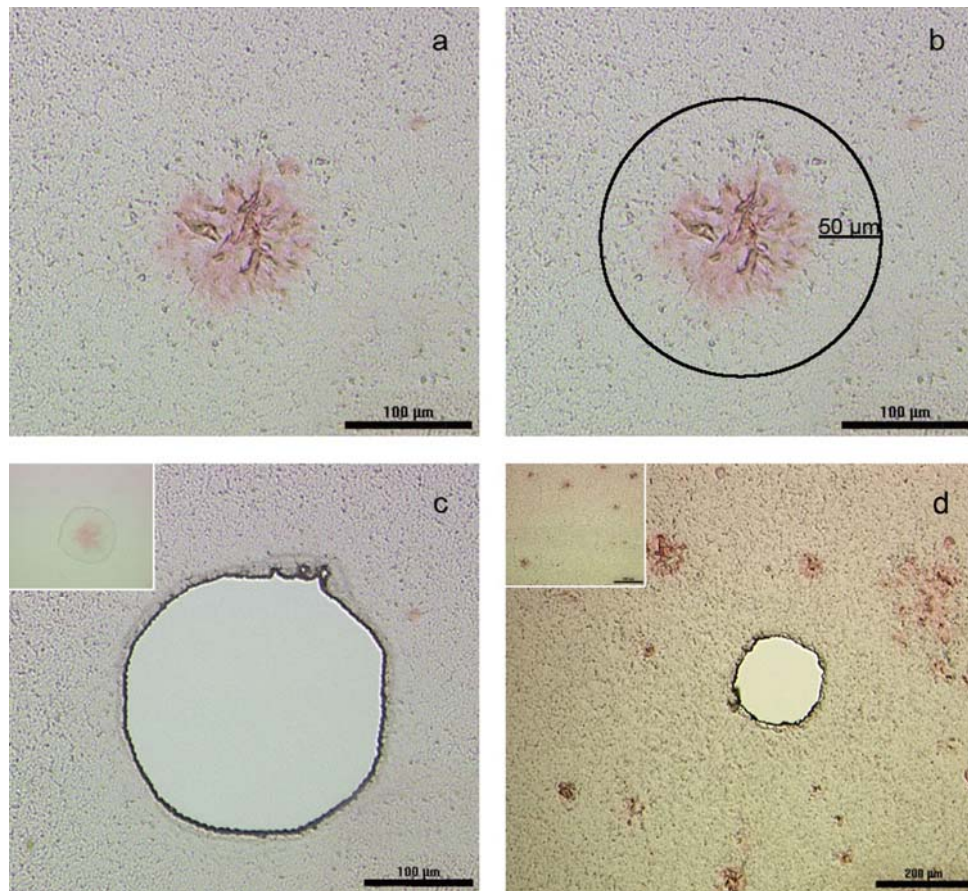


Abbildung 10: Isolierung von Gewebestücken aus APP23 transgenen Mäusen (Kongorot-Färbung)

Durch Anfärbung mit Kongorot konnten die Amyloidplaques in APP23 transgenen Mäusen identifiziert werden (a). Mit Hilfe der Laser Mikrodissektion wurden Plaques inklusive 50 µm plaqueumgebendes Gewebe isoliert (b). Bild (c) zeigt den Schnitt nach der Laser Mikrodissektion sowie das ausgeschnittene Gewebestück (kleines Bild). In (d) ist die Gewinnung von plaquefreiem Gewebe vor (kleines Bild) und nach der Laser Mikrodissektion zu sehen (entnommen aus Frank et al., 2008).

Nach der Gewebegewinnung wurde die RNA isoliert und deren Qualität und Quantität mit Hilfe der kapillaren Gelelektrophorese ermittelt (Abbildung 11).

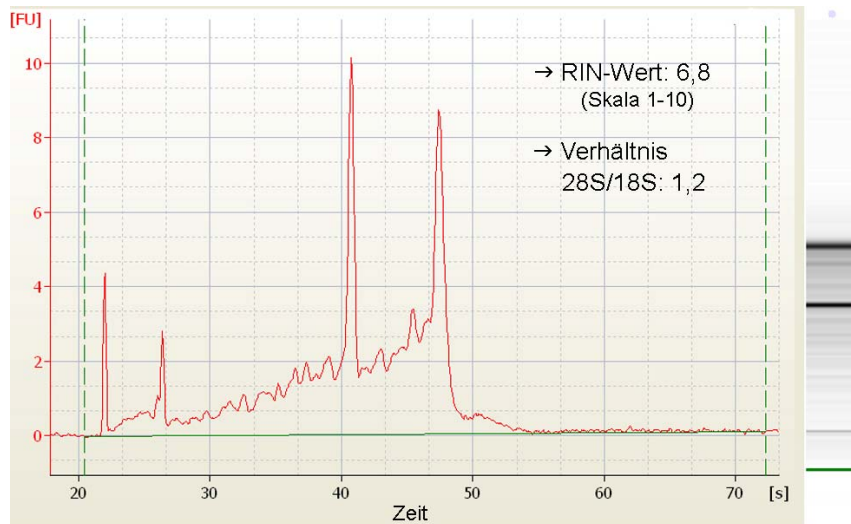


Abbildung 11: Elektropherogramm der aus dem mikrodisektierten Gewebe isolierten RNA

Elektropherogramm der aus mikrodisektierten Gewebestücken von APP23 transgenen Mäusen isolierten RNA. Die 18S und 28S-Peaks ohne Verschiebung zu kleinen Fragmentgrößen zeigen die Integrität der isolierten RNA.

Das Elektropherogramm der untersuchten RNA zeigt deutlich unterscheidbare 18S und 28S rRNA-Peaks ohne wesentliche Verschiebung zu kleineren Fragmentgrößen, ein Qualitätsmerkmal intakter RNA. Der RIN-Wert („RNA Integrity Number“) der isolierten RNA beträgt 6,8 (Skala von 1-10, wobei der RIN-Wert 1 für degradierte und der RIN-Wert 10 für intakte RNA steht), das 28S/18S-Verhältnis beträgt 1,2. Beide Parameter belegen, dass die zur weiteren Analyse verwendete RNA qualitativ hochwertig und für die weiteren Untersuchungen geeignet ist.

3.1.2 Mikrodissektion von Amyloidplaques (qPCR-Analyse)

Um die verschiedenen Aspekte der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion in APP23 transgenen Mäusen zu charakterisieren, wurden mittels Laser Mikrodissektion Amyloidplaques, 30 μm breite, die Amyloidplaques umgebende Geweberinge und plaquefreie Bereiche sowie vergleichbare Bereiche aus nicht-transgenen Kontrollen (Wurfgeschwister) isoliert (Abbildung 12).

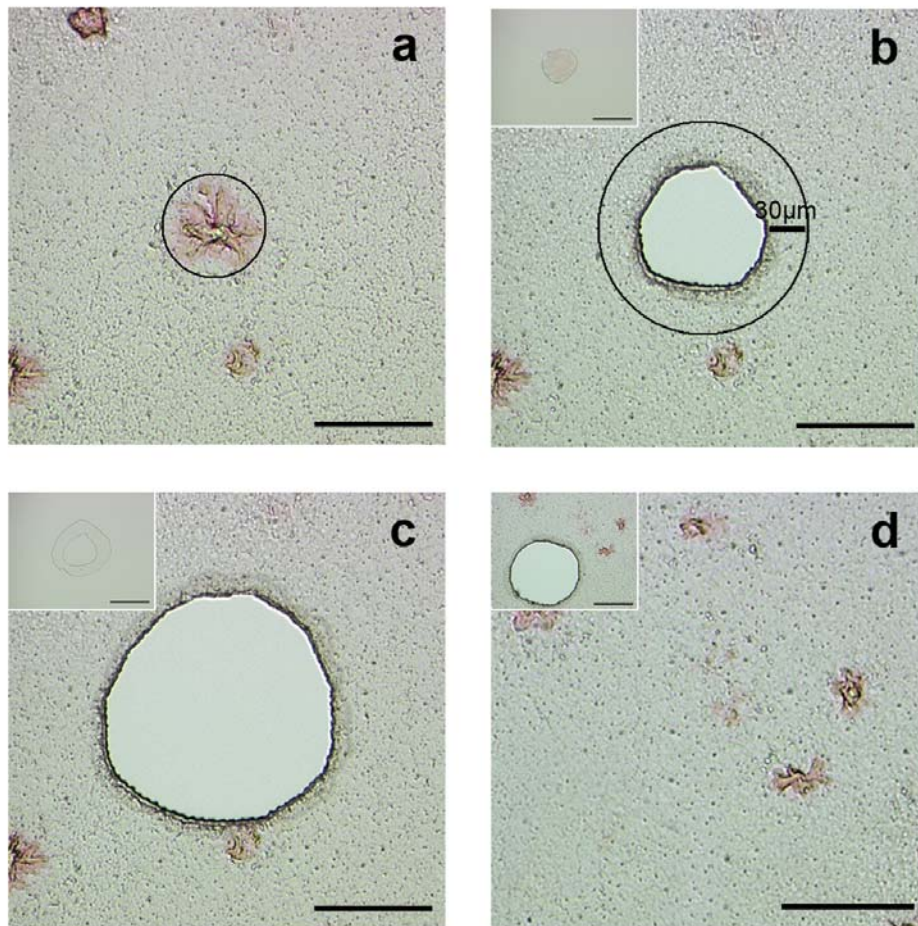


Abbildung 12: Mikrodissektion von Kongorot-gefärbten Amyloidplaques und plaqueassoziiertem Gewebe aus APP23 transgenen Mäusen

Durch Anfärbung mit Kongorot konnten die Amyloidplaques sichtbar gemacht werden (a). Mit Hilfe der Mikrodissektion wurden Plaques (kleines Bild) sowie ein 30 μm breiter Gewebering rund um die Plaques isoliert (b). Bild (c) zeigt das Gewebe nach Laser Mikrodissektion sowie den isolierten Gewebering (kleines Bild). In (d) wird die Isolierung von plaquefreiem Gewebe vor und nach (kleines Bild) der Laser Mikrodissektion dargestellt. Eichstrich: 100 μm

Auch in diesem Versuchsansatz konnte durch kapillare Gelelektrophorese gezeigt werden, dass qualitativ hochwertige und intakte RNA erhalten wurde (Abbildung 13).

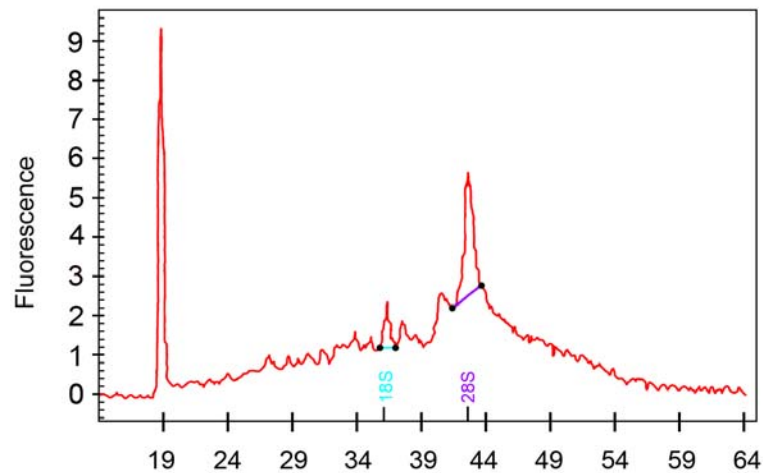


Abbildung 13: Elektropherogramm der aus dem mikrodisssektierten Gewebe isolierten RNA

Das Elektropherogramm (Abbildung 13) zeigt deutlich unterscheidbare 28S und 18S rRNA-Peaks, die nicht zu kleineren Fragmentgrößen verschoben sind und damit ein deutliches Indiz für eine qualitativ gute, intakte mRNA sind (zum Zeitpunkt dieser Messungen stand der RIN-Auswertungsalgorithmus noch nicht zur Verfügung).

3.1.3 Methodenetablierung: Isolierung von Endothelgewebe

Durch die Perfusion der APP23 transgenen Mäuse mit einer 0,5 %igen Evan's Blue-Lösung konnte das Endothel direkt und spezifisch angefärbt werden, ohne dass eine separate Immunfärbung durchgeführt werden musste (Abbildung 14).

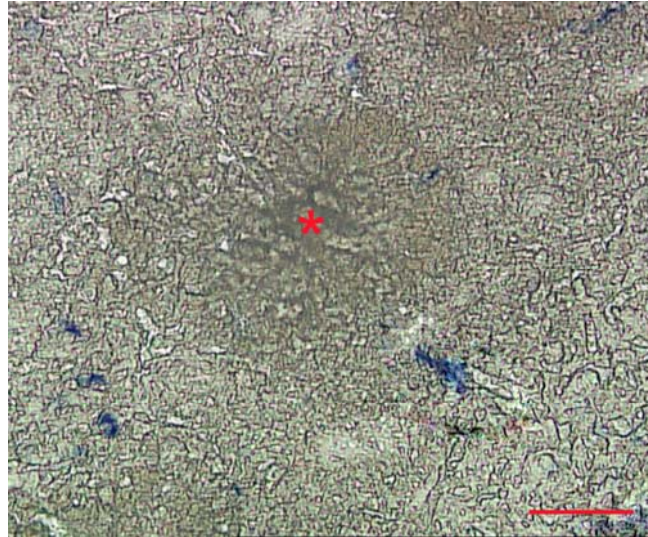


Abbildung 14: Anfärbung von Endothelgewebe in APP23 transgenen Mäusen durch Evan's Blue

Durch die Anfärbung mit Evan's Blue konnte Endothelgewebe (blau) in APP23 transgenen Mäusen identifiziert werden. Der Mittelpunkt eines Amyloidplaques ist mit einem Stern markiert.
Eichstrich: 25 μ m

Außerdem konnte durch Anfärbung des Endothels mit Evan's Blue das Endothel ohne vorhergehende Immunfluoreszenzfärbung dargestellt werden (Abbildung 15).

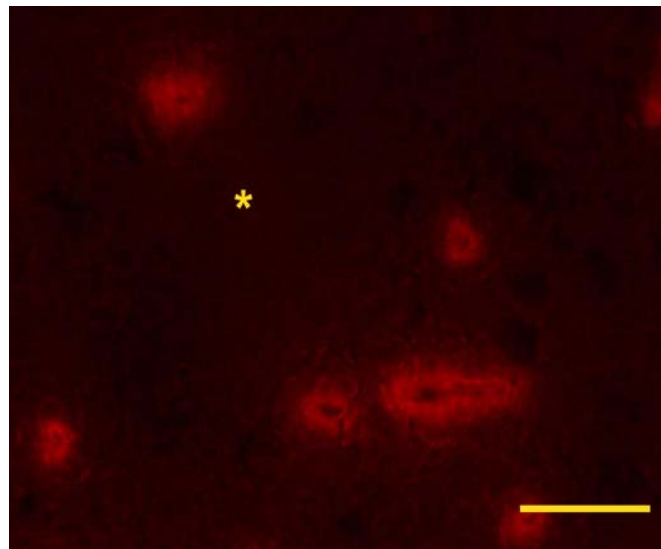


Abbildung 15: Anfärbung von Endothel in APP23 transgenen Mäusen durch Evan's Blue

Durch die Anfärbung mit Evan's Blue konnte Endothel (rote Fluoreszenz) in APP23 transgenen Mäusen identifiziert werden. Der Mittelpunkt eines Amyloidplaques (nicht sichtbar) ist mit einem Stern markiert.
Eichstrich: 25 μ m

Die Anfärbung durch Evan's Blue ermöglichte eine spezifische Markierung des Endothelgewebes, das dadurch eindeutig vom umgebenden Gewebe unterschieden werden konnte. Dadurch gelang es, spezifisch Endothelgewebe aus dem Gehirn von APP23 transgenen Mäusen zu isolieren. Die direkte Anfärbung durch Perfusion mit Evan's Blue ermöglichte zudem durch Einbeziehung der Kongorotfärbung von Amyloid in die Fixierungs- und Dehydrierungsprozedur eine extrem schnelle Vorbereitung der Proben für die Laser Mikrodisektion, so dass die RNA-Degradierung minimiert werden konnte. Die komplette Prozedur inklusive der Anfertigung der Kryoschnitte und Kongorotfärbung der Plaques dauerte insgesamt nur 25 Minuten.

Durch eine Doppelfärbung von Evan's Blue und Kongorot zur Anfärbung der A β -Plaques konnte mittels Laser Mikrodisektion aus 10 μ m dicken Kryoschnitten aus dem Gehirn von APP23 transgenen Mäusen plaqueassoziiertes Endothelgewebe sowie entsprechendes Endothelgewebe aus nicht-transgenen Wurfgeschwistern, d.h. nicht-transgenen Kontrollen, isoliert werden (Abbildung 16).

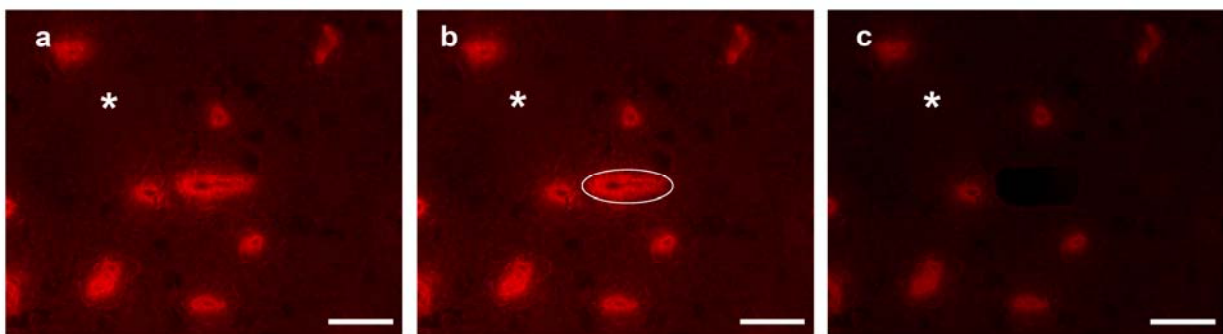


Abbildung 16: Isolierung von mit Evan's Blue markiertem plaqueassoziiertem Endothelgewebe aus APP23 transgenen Mäusen

Durch Anfärbung mit Evan's Blue konnte Endothelgewebe als rote Fluoreszenz (a) sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe der Mikrodisektion wurde Endothelgewebe in der Nähe von Plaques (Stern) isoliert (b). Das Bild (c) zeigt das Gewebe nach Laser Mikrodisektion.

Eichstrich: 25 μ m

3.2 Methodenetablierung: Kombination von LMD und Mikroarray-Analyse zur Identifizierung von Kandidatengen

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde eine Mikroarray-Analyse durchgeführt, um potentielle Kandidatengene, die an der Regulierung der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion beteiligt sein könnten, zu identifizieren. Dabei wurde gezielt plaqueassoziiertes Gewebe untersucht, das mit Hilfe der Laser Mikrodissektion gewonnen werden konnte. Um die biologische Variabilität zwischen den Mäusen und die technische Variabilität bei der Untersuchung zu berücksichtigen, wurden mehrere Arrays pro Gewebereich und Tier untersucht.

3.2.1 Differentielle Genexpression in mikrodissoziierten Amyloidplaques

Bei der Untersuchung wurde Gewebe aus drei verschiedenen Mäusen überprüft, und es wurden drei Arrays pro Tier durchgeführt. Dabei wurden ca. 80 Plaques pro LMD-Durchgang und insgesamt bis zu 2000 Plaques pro Probe gesammelt. Das Ziel der Untersuchung war eine Analyse der Unterschiede zwischen Plaques und plaquefreiem Gewebe (d.h. eine Identifizierung von differentiell exprimierten Kandidatengen) und nicht die Überprüfung vorher festgelegter spezifischer Gene.

Es wurden ausschließlich Gene, die auf allen 9 Arrays des Plaque-Gewebes bzw. allen 6 Arrays des plaquefreien Gewebes differentiell reguliert waren, zur weiteren Untersuchung herangezogen. Auf diese Weise wurden nur solche Gene für die weitere Analyse berücksichtigt, die eine sichere Regulierung zeigten und nicht nur zufällig in einem oder zwei einzelnen Arrays zu finden waren.

Verteilung der im Mikroarray untersuchten Gene

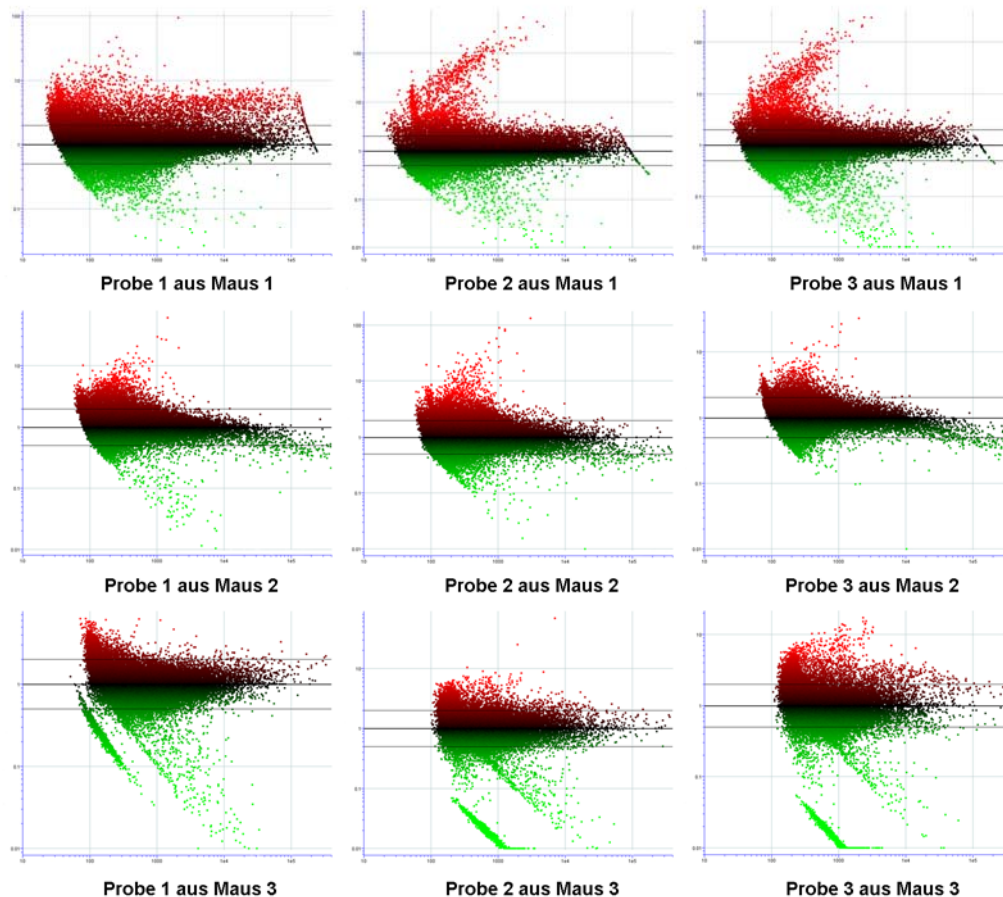


Abbildung 17: Verteilung aller im Mikroarray untersuchten Gene

Es wurde Gewebe aus insgesamt drei verschiedenen APP23 transgenen Mäusen untersucht, wobei pro Maus jeweils drei Proben mit plaqueassoziertem Gewebe analysiert wurden. Die drei Mäuse zeigten nur leichte Unterschiede in ihren Expressionsprofilen, wobei die Transkripte, die als signifikant reguliert ausgewertet wurden, in allen drei Tieren vergleichbare Expressionsmuster zeigten.

Die drei Mäuse zeigten leichte Unterschiede in ihren RNA-Expressionsprofilen (Abbildung 17), aber die Transkripte, deren Expression in den zwei analysierten Geweben (plaqueassoziertes und plaquefreies Gewebe) signifikante Unterschiede aufwies, zeigten in allen drei untersuchten Tieren eine vergleichbare Regulierung.

Die Mikroarray-Analyse der mikrodisezierten Plaques und plaquefreien Bereiche ergab eine Gesamtmenge von 40969 nicht regulierten Transkripten und eine Teilmenge von 538 differentiell regulierten Transkripten (1,3 % der insgesamt untersuchten 41234 Transkripten) (Abbildung 18).

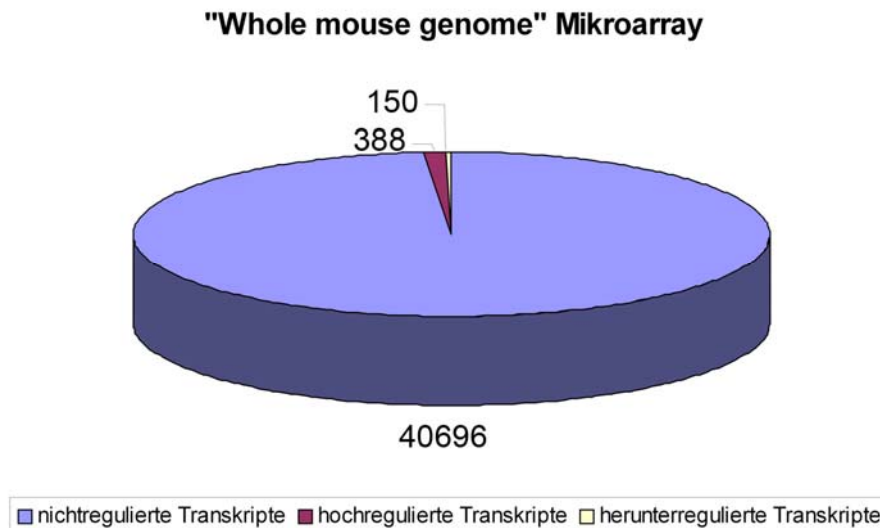


Abbildung 18: Verteilungsmuster der regulierten und nichtregulierten Transkripte des „Whole mouse genome“-Mikroarrays

Die Mikroarray-Untersuchung des plaqueassoziierten verglichen mit plaquefreiem Gewebe ergab 538 regulierte Transkripte (1,3 %) bezogen auf die Gesamtmenge von 41234 untersuchten Transkripten.

Im Vergleich zu anderen Mikroarray-Studien, die das gesamte Mausgehirn bzw. ähnliche Gewebemengen untersuchten (Kamme et al, 2003; Evans et al, 2003; Verheyde et al, 2006), brachte diese Kombination von Laser Mikrodisektion und Mikroarray-Analyse durch die relativ geringe Menge an regulierten Transkripten ein weitaus spezifischeres Ergebnis.

Unter den differentiell regulierten Transkripten befanden sich einige entzündungsrelevante Kandidatengene (Tabelle 2), u.a. MIP-1 α (CCL3), Msr2 (Macrophage scavenger receptor 2), Hex B (Hexosaminidase B), Cd34, Cathepsin D, IL10r b (Interleukin-10 Rezeptor b) und Vip (Vasointestinales Peptid) sowie Trem2 (Triggering receptor expressed on myeloid cells 2) und Dap12.

<u>Proben-ID</u>	<u>Gen-symbol</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Veränderung (x-fach)</u>	<u>P-Wert</u>
A_51_P269546	Trem2	Triggering Receptor expressed on myeloid Cells 2	6,40	0.0000503
A_51_P261517	Tyrobp	TYRO Protein Tyrosine Kinase binding Protein, Dap12	4,63	0.000474
A_51_P453111	Hexb	Hexosaminidase B	4,33	0.00024
A_51_P204740	Cd34	CD34 antigen	3,20	0.000743
A_51_P140710	Ccl3	Chemokine (C-C motif) ligand 3, MIP-1 α	3,13	0.00898
A_51_P368313	Vip	vasoactive intestinal Polypeptide	2,91	0.0102
A_51_P172168	Msr2	Macrophage Scavenger Receptor 2	2,86	0.00191
A_51_P384629	Ctsd	Cathepsin D	2,81	0.000589
A_51_P406454	IL10rb	Interleukin-10 Rezeptor, beta	2,44	0.000609

Tabelle 2: Veränderungen ausgewählter Kandidatengene (Mikroarray)

Die Tabelle zeigt die Proben-ID (Lokalisation auf dem Mikroarray), die Gensymbole sowie die Beschreibung und die Veränderungen (x-fach) ausgewählter Kandidatengene der Mikroarray-Untersuchung

Die oben genannten Kandidatengene zeigten eine 2,8- bis 6,4-fache Erhöhung ihrer mRNA Menge in Plaques im Vergleich zu plaquefreiem Gewebe sowie einen 2,5- bis 14-fachen Anstieg im Vergleich zu nicht-transgenen Kontrollen (Abbildung 19).

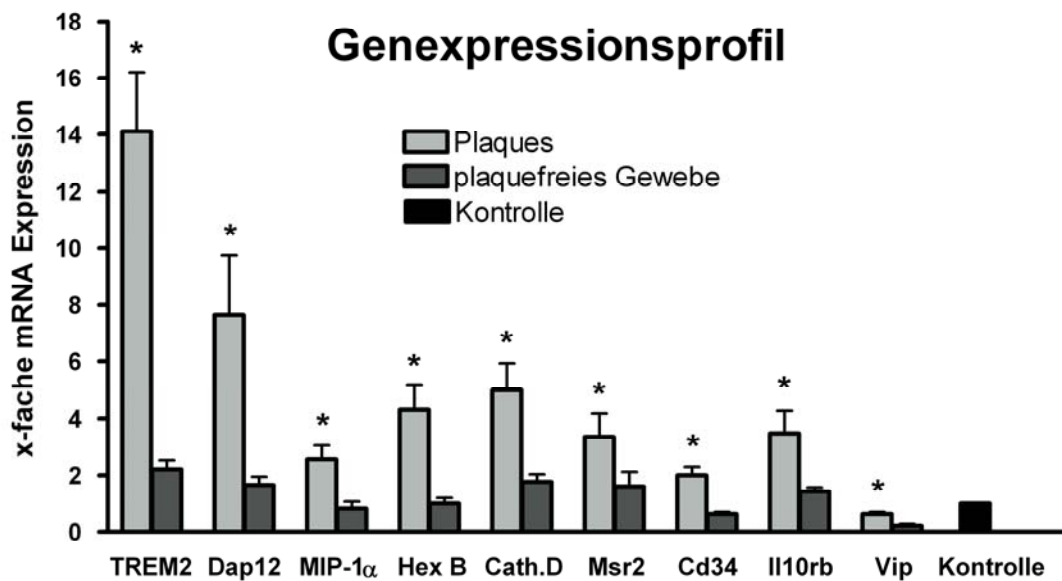


Abbildung 19: Relative Quantifizierung der mRNA Expression ausgewählter Kandidatengene

Plaquesassoziiertes und plaquefreies Gewebe aus APP23 transgenen Mäusen wurde mit Hilfe der Mikroarray-Technik analysiert. Als Kontrolle dienten vergleichbare Gewebereiche aus nicht-transgenen Mäusen. Die ausgewählten Kandidatengene zeigten alle eine verstärkte Expression ihrer mRNA in plaquesassoziiertem im Vergleich zu plaquefreiem Gewebe.

3.2.2 Verifizierung der Mikroarray-Ergebnisse durch qPCR-Analyse

Da die Mikroarray-Analyse eine Screening-Methode ist, die nicht selten zu falsch-positiven Ergebnissen führt (McClintick et al, 2003; Dallas et al, 2005; King et al, 2005), müssen die Mikroarray-Ergebnisse immer mit einer zweiten Methode überprüft werden. Daher wurde die mRNA Expression der regulierten Gene auch mit Hilfe der quantitativen RT-PCR (qPCR) analysiert.

Um einen Eindruck von der Verlässlichkeit der ermittelten Array-Daten zu erhalten, wurden einige regulierte entzündungsrelevante Gene ausgewählt und mit qPCR untersucht.

In den meisten Fällen konnte die qPCR-Untersuchung die Array-Daten bestätigen (Abbildung 20).

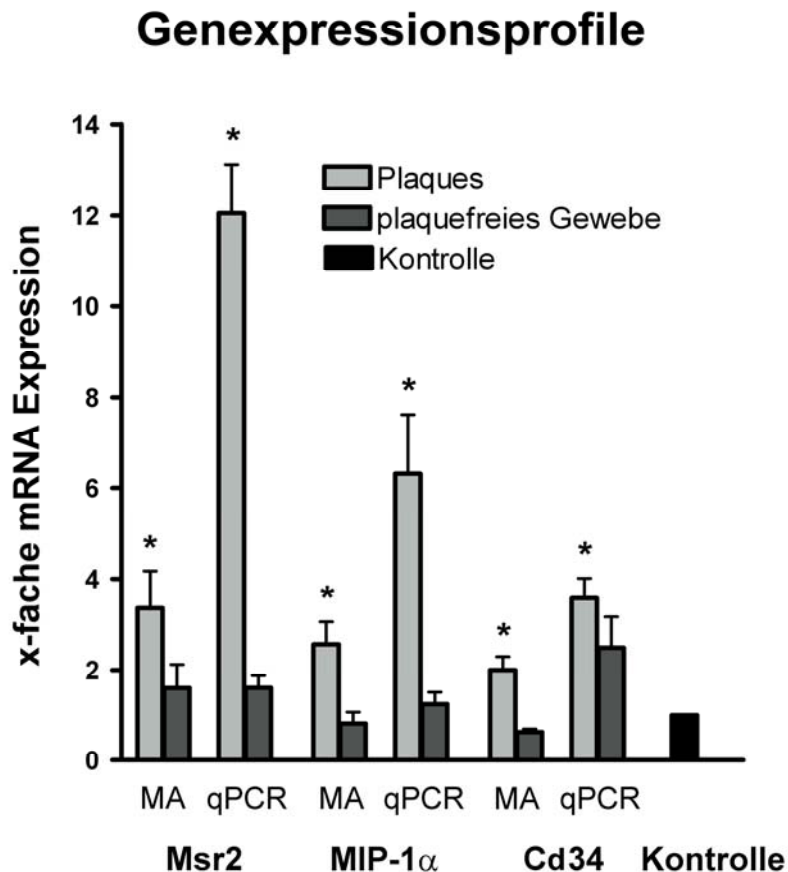


Abbildung 20: Mikroarray- und qPCR-Ergebnisse ausgewählter entzündungsrelevanter Kandidatengene

Die mittels Mikroarray-Untersuchung identifizierten Kandidatengene wurden mit Hilfe der qPCR verifiziert. Dabei konnte eine erhöhte mRNA Expression von Msr2, MIP-1 α und Cd34 mit beiden Methoden nachgewiesen werden.

Zum Beispiel war die mRNA Expression von Msr2, MIP-1 α und Cd34 sowohl in der Mikroarray-Analyse (2,2- bis 3,4-fach) als auch in der qPCR-Untersuchung (3,5- bis 12-fach) in Plaques im Vergleich zu Kontrollgewebe erhöht (Ergebnisse zu Trem2 und Dap12 siehe 3.2.3).

Allerdings konnte der in der Mikroarray-Untersuchung festgestellte Anstieg der mRNA in Plaques in einzelnen Fällen nicht mit der qPCR-Analyse bestätigt werden.

Cathepsin D und Hex B zeigten zwar verglichen mit den Mikroarray-Ergebnissen die gleiche Tendenz der Genexpressionsveränderungen, die Ergebnisse waren aber statistisch nicht-signifikant (Abbildung 21).

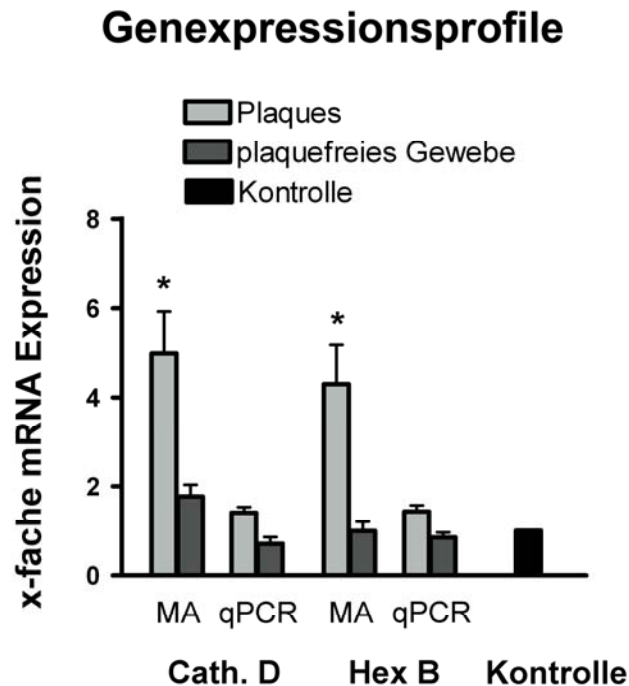


Abbildung 21: Mikroarray- und qPCR-Ergebnisse von Hex B und Cathepsin D

Die mittels qPCR erhaltenen Genexpressionsveränderungen von Hex B und Cathepsin D zeigten zwar die gleiche Tendenz wie die Ergebnisse der Mikroarray-Untersuchung, aber keine statistische Signifikanz.

Im Fall von IL10r b und Vip wurden mittels qPCR-Untersuchung konträre Ergebnisse im Vergleich zur Mikroarray-Analyse ermittelt. Während die Mikroarray-Analyse im Fall von Vip (3-fach) und IL10r b (2,5-fach) eine erhöhte mRNA Expression in plaqueassoziiertem verglichen mit plaquefreiem Gewebe ergab, zeigte die qPCR-Analyse eine verstärkte mRNA Expression von Vip (3,5-fach) und IL10r b (etwa 3-fach) in plaquefreiem Gewebe im Vergleich zu plaqueassoziiertem Gewebe. Die qPCR-Ergebnisse dieser beiden Transkripte zeigen also im Gegensatz zu den Mikroarray-Ergebnissen eine verstärkte mRNA Expression in plaquefreiem Gewebe. In diesen beiden Fällen konnten die Mikroarray-Ergebnisse daher nicht verifiziert werden.

3.2.3 Verstärkte Trem2 und Dap12 mRNA Expression in plaqueassoziiertem Gewebe: Bestätigung der Mikroarray-Daten durch qPCR-Analyse

Die Mikroarray-Analyse zeigte eine 6,4-fache bzw. 4,6-fache Erhöhung der Trem2 und der Dap12 mRNA Expression in plaqueassoziiertem Gewebe (verglichen mit plaquefreiem Gewebe). Diese mRNA Expressionsverhältnisse konnten mittels qPCR bestätigt werden. Mit Hilfe dieser Methode wurde eine 6,3-fache bzw. im Fall von Dap12 eine 3,6-fache Erhöhung der mRNA Expression nachgewiesen (Abbildung 22).

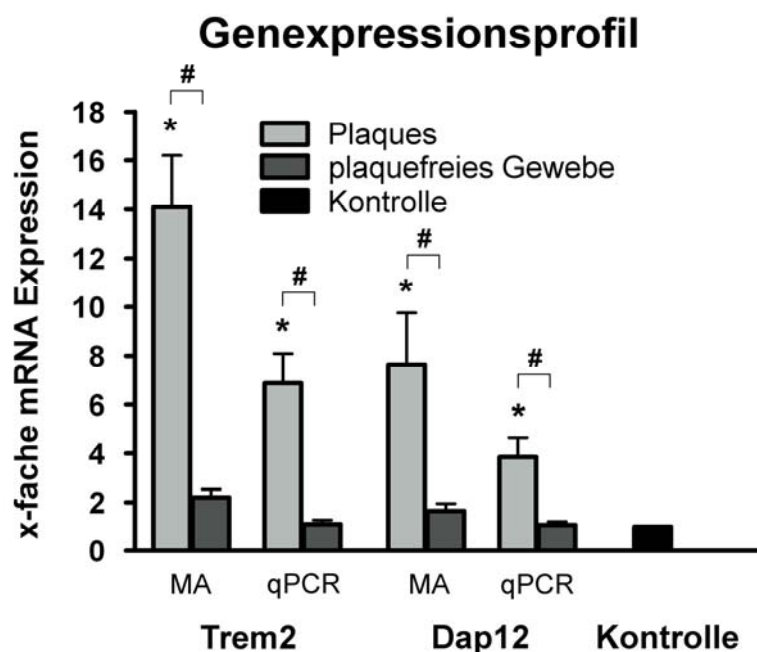


Abbildung 22: mRNA Expression von Trem2 und Dap12 (Mikroarray und qPCR)

Die mittels Mikroarray-Untersuchung erhaltenen Genexpressionsänderungen von Trem2 und Dap12 wurden mit Hilfe der qPCR überprüft. Dabei konnte die erhöhte mRNA Expression von Trem2 und Dap12 in plaqueassoziiertem verglichen mit plaquefreiem Gewebe bestätigt werden.

Die unterschiedlichen mRNA Expressionslevel, die sich beim Vergleich der Mikroarray- und qPCR-Daten ergeben haben, können durch verschiedene Effekte entstanden sein. Diese möglichen Ursachen werden in der Diskussion (siehe 4.2.5) näher erläutert.

Eine mit Hilfe eines Computerprogramms („Ingenuity Pathway Analysis“ Software von Ingenuity Systems) durchgeführte Netzwerkanalyse war durch die Einordnung der untersuchten Kandidatenmoleküle in verschiedene Entzündungsmediatoren-Netzwerke eine

Entscheidungshilfe bei der Überlegung, auf welche der Kandidatenmoleküle in der nachfolgenden Untersuchung fokussiert werden sollte. Trem2 stellte sich dabei als vielversprechendstes Kandidatenmolekül heraus (siehe 1.5.3.2).

3.2.4 Verstärkte Trem2 Proteinexpression im Kortex von APP23 transgenen Mäusen

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde auf die Analyse von Trem2, dem transmembranen Rezeptormolekül des Trem2/Dap12-Komplexes, fokussiert, da dieses den vielversprechendsten Bezug zu Entzündungsreaktionen und außerdem einen möglichen Zusammenhang zur Amyloidabräumung aufwies. Zunächst wurde die Frage geklärt, ob eine verstärkte Expression von Trem2 mRNA auch zu einer vermehrten Synthese von Trem2 Protein führt. Hierzu wurden Western Blots zur Analyse der Trem2 Proteinmenge im Kortex von APP23 transgenen Mäusen und nicht-transgenen Wurfgeschwistern durchgeführt. Mit dieser Methode konnte eine größere Menge an Trem2 Protein im Kortex von APP23 transgenen Mäusen nachgewiesen werden (Abbildung 23).

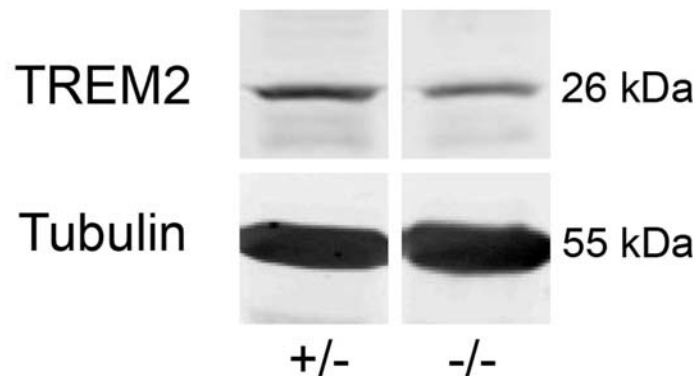


Abbildung 23: Trem2 im Kortex APP23 transgener Mäuse (Western Blot)

Mittels Western Blot wurden Hirnhomogenate des Kortexgewebes von APP23 transgenen und nicht-transgenen Kontrollmäusen untersucht. Die Auftragsmenge der Proteinproben wurde mit Hilfe von α -Tubulin, das als interne Kontrolle diente, überprüft (entnommen aus Frank et al, 2008).

Die Quantifizierung der Trem2 Proteinmenge mittels Infrarotdetektion und Berechnung mit Hilfe des ImageJ-Programms ergab, dass der Kortex von APP23 transgenen Mäusen die 1,8-fache Menge an Trem2 im Vergleich zu Kontrollmäusen enthält (Abbildung 24).

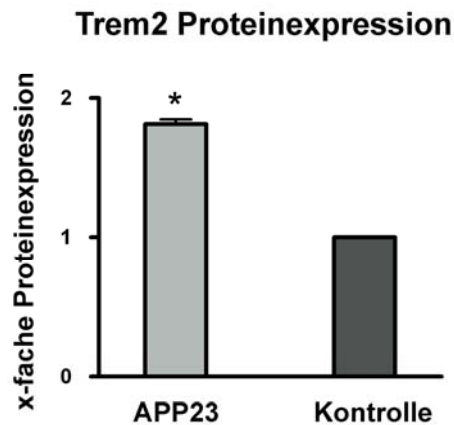


Abbildung 24: Quantifizierung der Proteinexpression von Trem2 im Hirngewebe von APP23 transgenen und nicht-transgenen Kontrollmäusen

Die Quantifizierung der Proteinexpression von Trem2 in Kortexhomogenaten APP23 transgener Mäuse ergab eine 1,8-fach verstärkte Expression von Trem2 im Vergleich zu Kontrollen.

Dieser im Vergleich zur Trem2 mRNA geringe Unterschied der Trem2 Proteinexpression zwischen APP23 transgenen und nicht-transgenen Kontrollmäusen ist vermutlich darin begründet, dass Homogenate des gesamten Kortex APP23 transgener Mäuse untersucht wurden. Eine Isolierung von plaqueassoziiertem Gewebe mittels LMD zur Western Blot-Untersuchung gelang nicht, da keine ausreichende Menge an Protein für eine Western Blot-Analyse gewonnen werden konnte. Im Gegensatz dazu wurden bei den Mikroarray- und qPCR-Untersuchungen genau definierte plaqueassoziierte Gewebereiche analysiert. Es ist daher wahrscheinlich, dass eine Erhöhung von Trem2 im plaqueassoziierten Gewebe durch eine basale Expression von Trem2 in plaquefreiem Gewebe teilweise maskiert wurde.

3.2.5 Lokalisation von Trem2 Protein auf der Oberfläche von Mikrogliazellen in APP23 transgenen und Kontrollmäusen

Um Trem2 auf einem spezifischen Zelltyp in APP23 transgenen Mäusen lokalisieren zu können, wurden Doppelimmunfluoreszenz-Markierungen durchgeführt. Mit Hilfe der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass Trem2 Immunfluoreszenz im Gehirn von APP23 transgenen Mäusen mit Iba1-positiven Mikroglia/Makrophagen assoziiert ist. Iba1 (ionized calcium binding adapter molecule 1) ist ein Oberflächenprotein, das ausschließlich auf Mikrogliazellen und Makrophagen exprimiert wird und zur Markierung von aktivierten und nicht-aktivierten Mikrogliazellen eingesetzt werden kann (Ito et al, 1998; Sasaki et al, 2001).

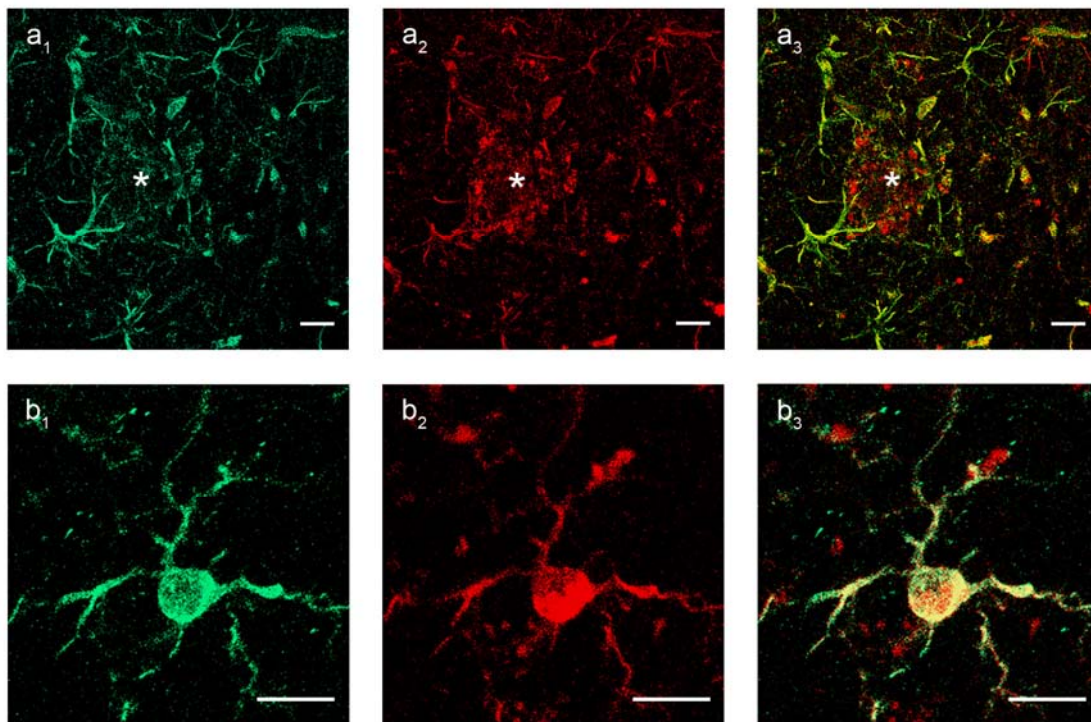


Abbildung 25: Trem2 wird von Iba1-positiven Mikrogliazellen im Gehirn von APP23 transgenen Mäusen exprimiert

Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen von plaqueassoziierten Mikrogliazellen (markiert durch den Iba1-Antikörper in grün; a₁ und b₁) und Trem2 (rot markiert; a₂ und b₂) zeigen eine Assoziation von Trem2 und dem Mikrogliamarker Iba1 (a₃ und b₃) im Neokortex von APP23 transgenen Mäusen. Die Mitte eines Amyloidplaques ist mit einem Stern gekennzeichnet (entnommen aus Frank et al, 2008).

Eichstriche: a₁, a₂, a₃: 20 µm; b₁, b₂, b₃: 10 µm

Diese Assoziation von Trem2 und Iba1-positiven Mikroglia/Makrophagen (Abbildung 25) konnte sowohl in plaqueassoziiertem Gewebe als auch in plaquefreiem Gewebe gezeigt werden.

Da die Trem2-Immunfluoreszenzmarkierung eine spezielle Gewebebehandlung erforderte (unter anderem Gefrierschnitte ohne vorherige Perfusion/Fixation, kurze Acetonfixation), konnte man in diesen Präparaten die Amyloidplaques anhand ihrer Autofluoreszenz erkennen. Kryoartefakte traten aufgrund der besonderen Behandlung des Gewebes gelegentlich auf; diese ließen sich jedoch von spezifischer Färbung ohne Probleme abgrenzen.

3.2.5.1 Mikroglia-dichte in plaqueassoziiertem und plaquefreiem Gewebe

Die Identifikation von Trem2 auf der Oberfläche von aktivierten Mikrogliazellen warf die Frage auf, ob die verstärkte Expression der Trem2 und Dap12 mRNA in plaqueassoziiertem Gewebe durch eine erhöhte Anzahl von Mikrogliazellen in der Umgebung der Plaques oder durch eine erhöhte Expression der Trem2/Dap12 mRNA in einzelnen Mikrogliazellen begründet ist.

Um diese Frage zu klären, wurde die Anzahl von Mikroglia-Zellkörpern in plaqueassoziiertem Gewebe ermittelt und mit der Anzahl von Mikroglia-Zellkörpern in identisch großem plaquefreien Gewebe verglichen (Abbildung 26).

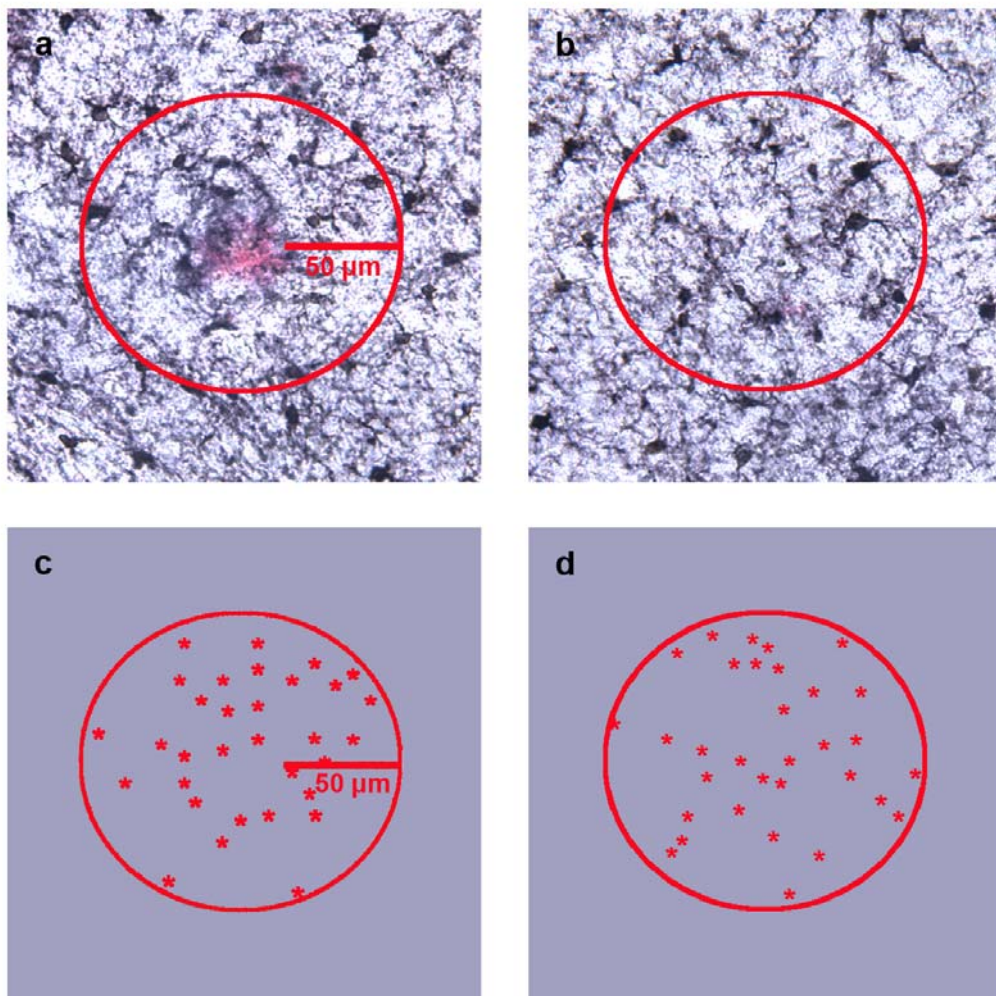


Abbildung 26: Quantifizierung von Iba1-positiven Mikrogliazellen in plaqueassoziiertem und plaquefreiem Gewebe aus APP23 transgenen Mäusen

In plaqueassoziiertem Gewebe (Plaques inklusive 50 µm plaqueassoziiertes Gewebe; a) sowie in plaquefreiem Gewebe gleicher Größe (b) wurde die Anzahl von Iba1-markierten Mikrogliazellen bestimmt. Es wurden nur Zellen mit klar erkennbarem Soma gezählt. Bild (c) und (d) zeigen schematisch die Verteilung der Iba1-positiven Mikrogliazellen in beiden Gewebebereichen (modifiziert nach Frank et al, 2008).

Diese Quantifizierung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Anzahl von Mikroglia-Zellkörpern in plaqueassoziiertem Gewebe und plaquefreiem Gewebe identischer Größe (Abbildung 27).

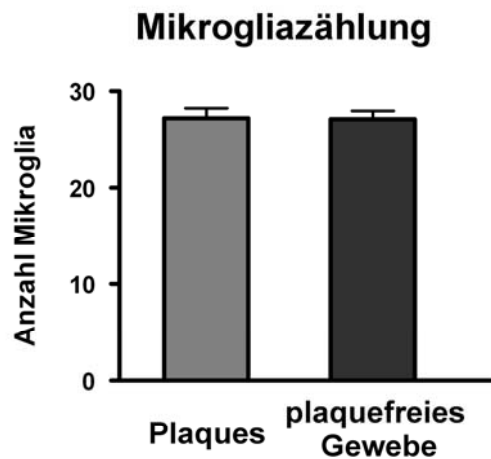


Abbildung 27: Die Quantifizierung der Iba1-positiven Mikrogliazellen in plaqueassoziiertem und plaquefreiem Gewebe

Die Quantifizierung der Iba1-positiven Mikrogliazellen in plaqueassoziiertem Gewebe zeigte keinen Unterschied gegenüber vergleichbar großen plaquefreien Gewebereichen aus APP23 transgenen Mäusen.

Durchschnittlich waren in plaqueassoziiertem Gewebe 27,225 ($\pm 0,97$) Mikrogliazellen und in plaquefreiem Gewebe 27,125 ($\pm 1,16$) Mikrogliazellen vorhanden. Die beiden Gewebe zeigten also keinen Unterschied in der Anzahl von Mikrogliazellen.

Der Anstieg der mRNA Expression von Trem2 und Dap12 in plaqueassoziiertem Gewebe ist daher nicht durch eine erhöhte Mikroglia-Zelldichte bedingt, sondern durch eine erhöhte Expression von Trem2 und Dap12 in den einzelnen Mikrogliazellen selbst.

3.3 Untersuchung spezifischer Regulatoren der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion

Im zweiten und dritten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA Expression verschiedener Kandidatenmoleküle untersucht, die an der Regulierung der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion beteiligt sein könnten.

Dazu wurde im zweiten Teil der Arbeit sowohl die Beteiligung einzelner Effektormoleküle (TNF- α , TGF- β und einzelne SOCS) als auch die Rolle des angeborenen Immunsystems (repräsentiert durch die Untersuchung einzelner Toll-like Rezeptoren) analysiert. Im dritten Teil der Arbeit wurde zudem eine mögliche Reaktion des Endothelgewebes auf Amyloidablagerungen im Gehirn APP23 transgener Mäuse untersucht.

3.3.1 Plaqueassoziierte mRNA Expression von TNF- α und TGF- β

TNF- α und TGF- β stellen pro- und anti-inflammatorisch wirksame Moleküle dar, deren erhöhte Expression bei Entzündungsreaktionen und in Verbindung mit Alzheimer (in Alzheimergehirngewebe sowie Blut-, Serum- und Liquorproben) bereits in der Literatur bekannt ist (Pratt und McPherson, 1997; Combs et al, 2001). In dieser Arbeit wurde nun überprüft, ob diese erhöhte Expression auch in APP23 transgenen Mäusen nachweisbar ist.

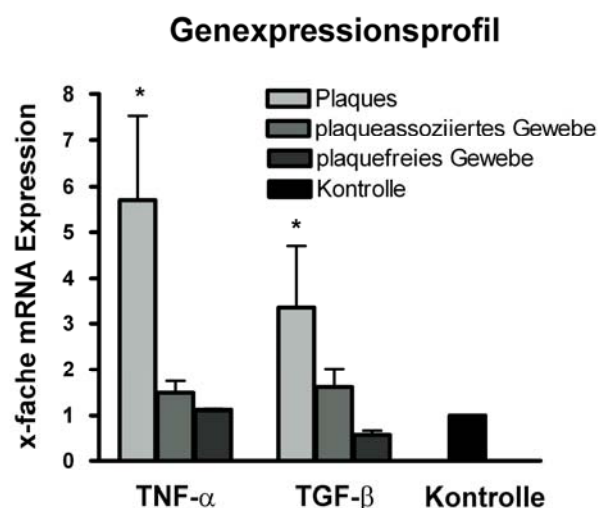


Abbildung 28: Relative Quantifizierung der mRNA Expression von TNF- α und TGF- β mit Hilfe der qPCR

Die relative Quantifizierung der mRNA Expression von TNF- α und TGF- β mittels qPCR zeigte sowohl bei TNF- α als auch bei TGF- β eine verstärkte mRNA Expression im Plaquegewebe. Die mRNA Expression im plaqunenahen und plaquefreien Gewebe aus APP23 transgenen Mäusen zeigte verglichen mit entsprechenden Gewebereichen aus Kontrollmäusen keine signifikante Veränderung.

In diesem Versuchsansatz konnte in APP23 transgenen Mäusen eine Erhöhung der TGF- β mRNA (3,4-fach) sowie der TNF- α (5,7-fach) mRNA Expression in Plaques und in geringerem Maß auch in plaqueassoziiertem Gewebe (TGF- β 1,6-fach und TNF- α 1,5-fach) nachgewiesen werden (Abbildung 28). Die Untersuchung dieser beiden Moleküle diente als Kontrolle und wurde dazu genutzt, die Methode auf ihre Korrektheit und Spezifität hin zu überprüfen. Diese Ergebnisse bestätigen, dass mit diesem Versuchsansatz korrekte und zuverlässige Resultate erzielt werden können und er daher zur Charakterisierung der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion herangezogen werden kann.

3.3.2 Plaqueassoziierte mRNA Expression von Toll-like Rezeptoren

Mittels qPCR-Untersuchung von Plaquegewebe, plaqueassoziiertem Gewebe und plaquefreiem Gewebe wurden Mitglieder der Toll-like Rezeptorenfamilie (Tlr2, Tlr3, Tlr4, Tlr5, Tlr7 und Tlr9) analysiert (Abbildung 29).

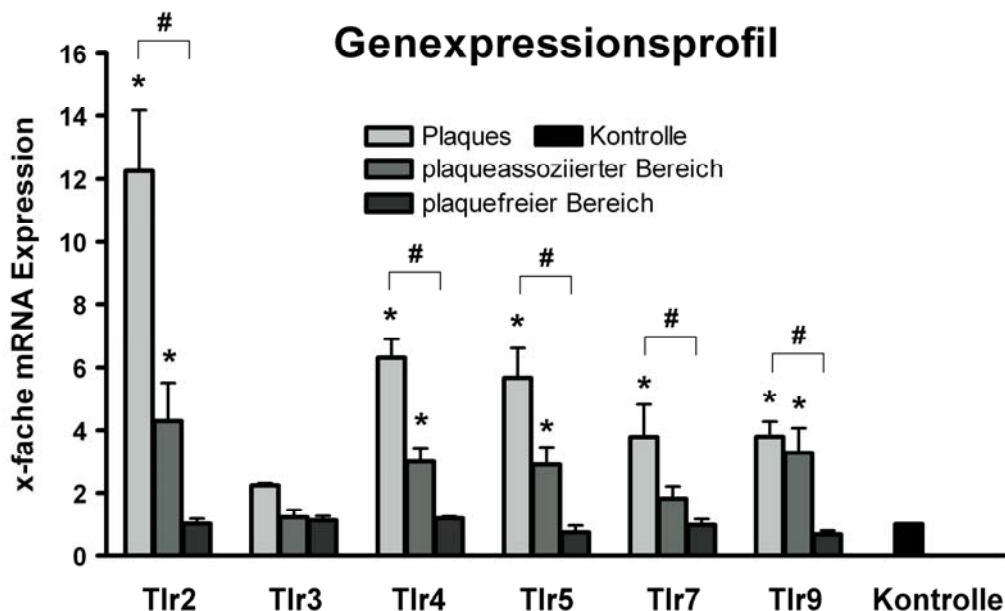


Abbildung 29: Relative Quantifizierung der mRNA Expression ausgewählter Toll-like Rezeptoren mit Hilfe der qPCR

Die relative Quantifizierung einiger ausgewählter Toll-like Rezeptoren mittels qPCR zeigte bei allen Vertretern eine verstärkte mRNA Expression in Plaques, in geringerem Maße auch in plaqueassoziiertem Gewebe (Ausnahme Tlr3) sowie eine unveränderte Expression in plaquefreiem Gewebe aus APP23 transgenen Mäusen im Vergleich zu entsprechenden Gewebebereichen aus nicht-transgenen Kontrollmäusen.

Die qPCR-Ergebnisse zeigten eine deutliche 3- bis 13-fache Erhöhung der mRNA Expression der einzelnen Tlr-Rezeptoren in Plaques und eine weniger stark ausgeprägte 3- bis 5-fache Erhöhung der mRNA Expression in plaqueassoziiertem Gewebe im Vergleich zu plaquefreiem Gewebe.

Dies lässt darauf schließen, dass die untersuchten TLRs mit Ausnahme von Tlr3 an der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion beteiligt sind.

Da Tlr2 das höchste plaqueassoziierte Expressionslevel zeigte, haben wir uns im Weiteren auf Tlr2 fokussiert und die zelluläre Lokalisation von Tlr2 mittels Immunhistochemie untersucht. Durch Immunfluoreszenzmarkierungen konnte nachgewiesen werden, dass der Toll-like Rezeptor 2 auf Mikrogliazellen lokalisiert ist (Abbildung 30).

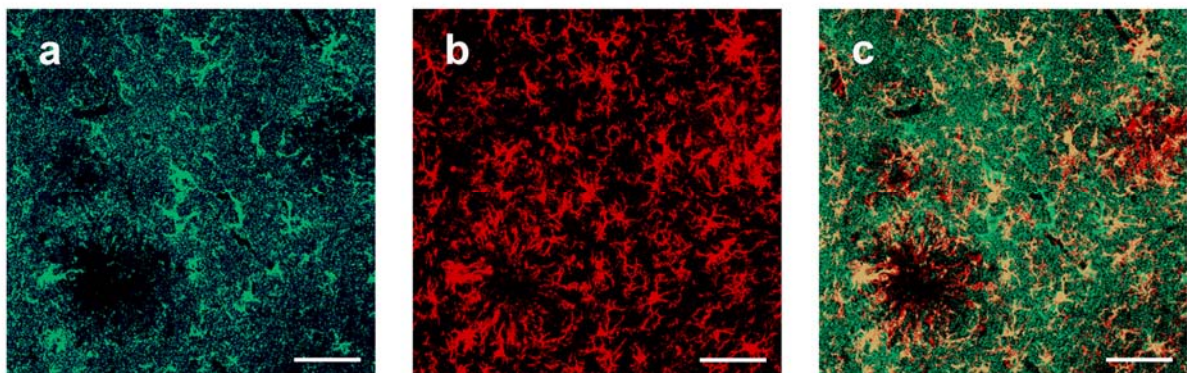


Abbildung 30: Tlr2 wird von Iba1-positiven Mikrogliazellen im Gehirn von APP23 transgenen Mäusen exprimiert

Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen von Tlr2 (grün markiert; Bild (a)) und plaqueassoziierten Mikrogliazellen (markiert durch den Iba1-Antikörper in rot; b) zeigen eine Assoziation von Tlr2 und dem Mikroglia marker Iba1 (c) im Neokortex von APP23 transgenen Mäusen.

Eichstrich: 50 μ m

3.3.3 Plaqueassoziierte mRNA Expression von „Supressors of Cytokine Signaling“ (SOCS)

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der qPCR-Analyse die mRNA Expression von „Supressors of Cytokine Signaling“ (SOCS) untersucht. Es wurde die mRNA Expression von Socs1, Socs2, Socs3, Socs5 und Socs7 in Plaques, plaqueassoziiertem und plaquefreiem

Gewebe sowie entsprechendem Gewebe aus nicht-transgenen Kontrollmäusen ermittelt (Abbildung 31).

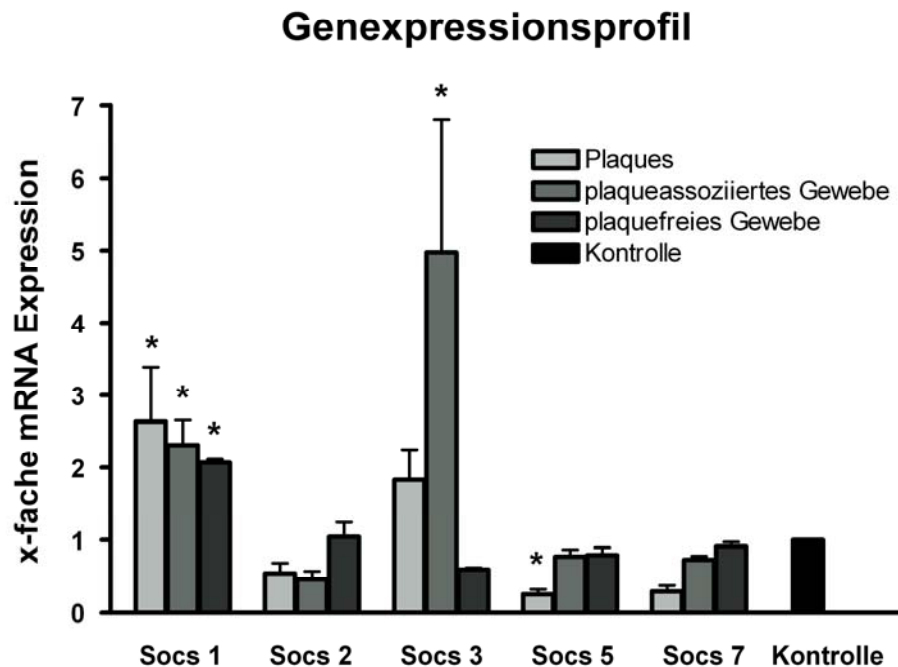


Abbildung 31: Relative Quantifizierung der mRNA Expression ausgewählter „Supressors of Cytokine Signaling“ (SOCS) mit Hilfe der qPCR

Die relative Quantifizierung einiger ausgewählter SOCS mittels qPCR zeigte keine einheitliche mRNA Expression. Während die mRNA Expression von Socs1 und Socs3 in Plaques und plaqueassoziiertem Gewebe erhöht ist, zeigen Socs2, Socs5 und Socs7 eine erniedrigte mRNA Expression in Plaques.

Die Untersuchung der verschiedenen SOCS-Gene ergab eine differentielle Regulierung dieser Gene in APP23 transgenen Mäusen. Während die mRNA Expression von Socs3 in Plaques ca. 2-fach und im plaqueassoziierten Gewebe sogar 5-fach erhöht ist, konnte gezeigt werden, dass die mRNA Expression von Socs2, Socs5 und Socs7 in Plaquegewebe im Vergleich zu plaquefreiem Gewebe 0,25- bis 0,5-fach erniedrigt ist. Die mRNA Expression von Socs1 scheint generell in APP23 transgenen Mäusen verstärkt zu sein, ein signifikanter Unterschied zwischen Plaques, plaqueassoziiertem und plaquefreiem Gewebe ließ sich im vorliegenden Material nicht nachweisen.

3.3.4 Reaktion des Endothelgewebes auf Amyloidablagerungen im Gehirn APP23 transgener Mäuse

Um mögliche funktionelle Veränderungen des Endothels durch aggregiertes Amyloid- β in Amyloidplaques zu überprüfen, wurde die mRNA Expression verschiedener Chemokine (MIP-1 α und CXCL10) sowie die Expression eines Chemokinrezeptors (CXCR3) untersucht. Als Kontrollen zur Überprüfung der Methode dienten Integrin $\beta 3$ sowie Pecam1 (Cd31).

3.3.4.1 Differentielle mRNA Expression in plaqueassoziiertem Endothelgewebe im Vergleich zu Endothelgewebe aus nicht-transgenen Mäusen

Die qPCR-Analyse von verschiedenen Chemokinen (MIP-1 α und CXCL10), einem Chemokinrezeptor (CXCR3), Integrin $\beta 3$ sowie einem Endothelmarker (Pecam1, Cd31) zeigte eine Regulierung der untersuchten Gene bzw. eine gleich bleibende Expression des Endothelmarkers Pecam1 in plaqueassoziiertem Endothelgewebe im Vergleich zu Endothelgewebe aus nicht-transgenen Kontrollen (Abbildung 32).

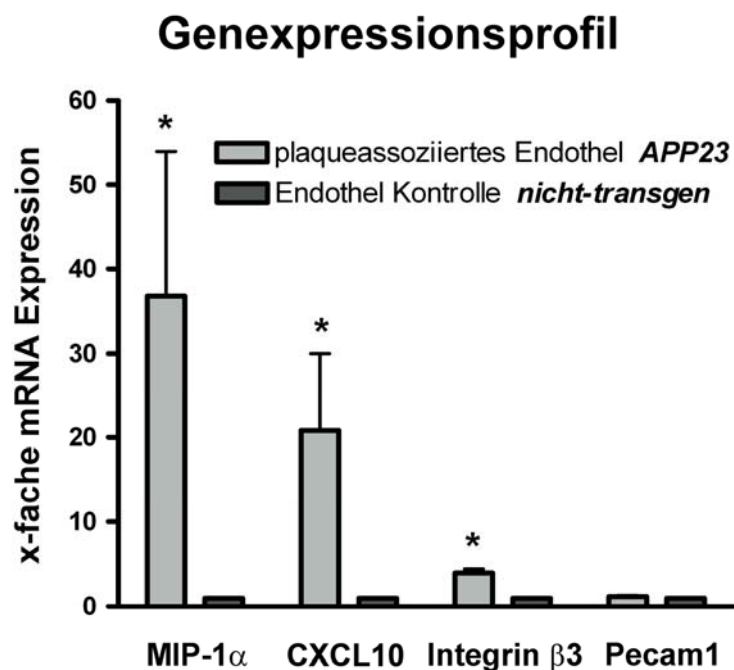


Abbildung 32: Relative Quantifizierung der mRNA Expression ausgewählter Entzündungsmediatoren mit Hilfe der qPCR

Die relative Quantifizierung der mRNA Expression von MIP-1 α , CXCL10 und Integrin $\beta 3$ mittels qPCR ergab eine erhöhte mRNA Expression dieser Gene in plaqueassoziiertem Endothelgewebe aus APP23 transgenen Mäusen. Pecam1 zeigte keinen Unterschied in seiner mRNA Expression.

Die mRNA Expression von MIP-1 α war in plaqueassoziiertem Endothel im Vergleich zu Endothel aus nicht-transgenen Kontrollen 37-fach erhöht, die mRNA Expression von CXCL10 21-fach und die von Integrin β 3 4-fach. Eine mRNA Expression von CXCR3 konnte in Endothelgewebe aus nicht-transgenen Kontrollen nicht detektiert werden, da die Expression unterhalb der Nachweisgrenze lag. Im Gegensatz dazu konnte in plaqueassoziiertem Endothelgewebe eine deutliche CXCR3 mRNA Expression nachgewiesen werden. Diese Befunde legen eine deutlich erhöhte Expression von CXCR3 in plaqueassoziiertem Endothel nahe.

Die beiden anderen untersuchten Proteine, Pecam1 und Integrin β 3, dienten in diesem Versuchsansatz als interne Kontrollen. Da in der Literatur bereits eine Expression von Integrin β 3 in amyloidbeladenen Blutgefäßen beschrieben worden war (Schultheiss et al, 2006), wurde Integrin β 3 in dieser Arbeit als Positivkontrolle zur Validierung des Versuchsansatzes genutzt. Die im Einklang mit der Literatur nachgewiesene erhöhte Expression der Integrin β 3 mRNA zeigt, dass der gewählte Versuchsansatz zur Charakterisierung endothelassoziierter Veränderungen herangezogen werden kann.

Im Gegensatz hierzu ist Pecam1 ein Endothelmarker (DeLisser et al, 1994), der vermutlich in APP23 transgenen Mäusen nicht verändert ist. Er wurde als Negativkontrolle eingesetzt und konnte, nachdem gezeigt wurde, dass Pecam1 in Endothelzellen nicht reguliert ist, zum Vergleich der aus den Endothelien gewonnenen mRNA Menge herangezogen werden.

4. Diskussion

4.1 Die plaqueassoziierte Entzündungsreaktion

Die Alzheimer-Erkrankung ist durch zwei charakteristische Merkmale gekennzeichnet, die Amyloidplaques und die neurofibrillären Bündel (Braak und Braak, 1991; 1996; Goedert, 1996; Jellinger und Brancher, 1998; Thal et al, 2005). Die Amyloidplaques entstehen durch die vermehrte Bildung und Zusammenlagerung von A β 42, das nach der Amyloid-Kaskaden-Theorie als Hauptursache der Alzheimer-Erkrankung gilt (Akiyama et al, 2000; McGeer und McGeer, 2001; Eikelenboom et al, 2002; Hardy und Selkoe, 2002; Rogers et al, 2002). Amyloidplaques sind im Allgemeinen von Gliazellen (z.B. Mikroglia und Astrozyten) umgeben, die auf die Amyloidablagerungen reagieren und Entzündungsmediatoren freisetzen (Rozeumuller et al, 1989; Perlmutter et al, 1990; Rogers et al, 1992; Aisen et al, 1997; Akiyama et al, 2000; Benveniste et al, 2001; Eikelenboom et al, 2002; Hauwel et al, 2005). Die gliale Entzündungsreaktion kann sowohl protektive (wie zum Beispiel Phagozytose und Abbau von A β) (Rogers et al, 2002; Streit, 2002; Nicoll et al, 2003) als auch toxische Auswirkungen (Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine sowie daraus folgende Zellschädigung) (Yates et al, 2000; Benveniste et al, 2001; Rogers et al, 2002; Melchior et al, 2006; Walker et al, 2006) auf das umliegende Nervengewebe haben. Das molekulare Zusammenspiel der Entzündungsmediatoren konnte bis heute noch nicht vollständig entschlüsselt werden.

Im ersten Teil der Arbeit wurden in einem hypothesefreien Ansatz mit Hilfe der Kombination von LMD und Mikroarray-Untersuchungen mehrere Kandidatengene identifiziert, deren mRNA in plaqueassoziiertem Gewebe verstärkt exprimiert wird und die möglicherweise eine Rolle im Rahmen der plaqueinduzierten Entzündungsreaktion spielen.

Im zweiten und dritten Teil der Arbeit wurde mittels LMD und qPCR die plaqueassoziierte mRNA Expression verschiedener Kandidatenmoleküle analysiert, die als wichtige Regulatoren von Entzündungsreaktionen gelten. Ihre Rolle im Kontext der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion ist allerdings noch nicht geklärt. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden verschiedene Aspekte der Entzündungsreaktion, darunter die Beteiligung des angeborenen Immunsystems und einzelner Effektormoleküle sowie des Endothelgewebes, untersucht.

4.2 Methodik

Um eine erfolgreiche Kombination von LMD und Mikroarray zu gewährleisten, wurde eine Vielzahl neuer Protokolle entwickelt. Im Rahmen dieses Kapitels werden diese methodischen Aspekte kritisch diskutiert.

4.2.1 Färbung und Fixierung der Kryoschnitte für die Isolierung von Amyloidplaques

Um die effiziente und RNA-konservierende Gewinnung von Amyloidplaques aus Gefrierschnitten zu gewährleisten, ist die Wahl der Färbemethode und der Fixierungsmethode wichtig. Normalerweise bergen Färbemethoden das Risiko der RNA-Degradierung, besonders wenn die Färbeprozedur in wässriger Umgebung durchgeführt wird. Eine Ausnahme stellt die Kongorot-Färbung dar, die keinen Einfluss auf die RNA-Integrität haben soll (Burbach et al, 2003).

Eine schnelle Fixierung der auf die Objektträgerfolie aufbrachten Gefrierschnitte mit alkoholischen Fixativen während der Färbeprozedur kann zur RNA-Konservierung angewendet werden. Um einen zusätzlichen Schritt zu vermeiden und die Färbezeit so kurz wie möglich zu halten, wurde eine alkoholische Kongorotlösung verwendet. Um die Färbezeit und die Expositionszeit der Schnitte in wässriger Umgebung so gering wie möglich zu halten, wurden die Schnitte zusätzlich zwischen den Färbeschritten auf der Heizplatte bei 40 °C getrocknet, was die RNA-Degradierung weiterhin minimierte.

4.2.2 Mikrodisektionsprozedur

Da generell darauf geachtet werden muss, die Bearbeitungszeit so kurz wie möglich zu halten, um eine RNA-Degradierung zu vermeiden, mussten auch bei der LMD-Prozedur einige Anpassungen vorgenommen werden. Die Auswahl der Objektträger/-folien stellte dabei den ersten Schritt dar. In dieser Untersuchung wies die 1,4 µm dicke PET-Folie (Polyethylenterephthalat) die beste Kombination aus Lasereffizienz und bestmöglich erhaltener Morphologie auf. Die 2,4 µm dicke PEN-Folie (Polyethylenaphthalat), die auf Glasobjektträger aufgebracht ist, zeigte eine bessere Morphologie der Schnitte, aber auch eine weitaus schlechtere Effizienz des Lasers. Die dünnere POL-Folie (0,5 µm) ergab zwar eine weitaus bessere Lasereffizienz, aber dafür auch eine relativ schlechte Morphologie der

Schnitte. Als nächstes musste die Schnittdicke der Gefrierschnitte optimiert werden, um die gesamte LMD-Prozedur zur Minimierung der RNA-Degradierung so kurz wie möglich zu halten. Dabei musste ein Kompromiss gefunden werden zwischen ausreichend guter Gewebemorphologie, d.h. ausreichend dicken Schnitten und möglichst hoher Lasereffizienz, d.h. möglichst dünnen Schnitten. Die gewählte Schnittdicke von 14 μm zeigte dabei eine gute Gewebemorphologie und eine zufrieden stellende Schneideeffizienz.

Abschließend wurden die technischen Parameter des Lasers so angepasst, dass das Gewebe mit einem Durchgang des Lasers durchtrennt werden konnte, um die Bearbeitungszeit zur Konservierung der RNA so kurz wie möglich zu halten. Ein mehrmaliger Durchgang des Lasers könnte sowohl eine RNA-Degradierung als auch eine inkomplette Sammlung der Gewebestücke zur Folge haben. Generell ist intakte RNA eine wichtige Voraussetzung für den Erhalt von verlässlichen Mikroarray-Ergebnissen. Bei degradiertem RNA können Brüche innerhalb der RNA-Hybridisierungsstelle an das Oligomer, das auf den Mikroarray aufgebracht ist, auftreten. Dies wiederum kann zu einer verminderten RNA-/Oligomer-Hybridisierung mit fehlender Detektion und damit zu einem falsch positiven oder falsch negativen Ergebnis führen.

4.2.3 Auswahl der Sammelstellen im Mausgehirn

Zusätzlich zu den oben erwähnten technischen Aspekten der LMD-Prozedur spielt auch die Auswahl der Sammelstellen der Plaques eine große Rolle. Da verschiedene Gehirnregionen, z.B. Zerebellum, Striatum und Kortex, verschiedene Genexpressionsprofile aufweisen, sollte die Sammlung der Plaques möglichst nur in einer Hirnregion erfolgen. In manchen Hirnregionen ist es sogar wichtig, die Gewebestücke in der gleichen Zell- oder Faserschicht zu sammeln, um eine Fehlerquelle zu vermeiden (Bonaventure et al, 2002; Burbach et al, 2003; Dehn et al, 2006).

Daher wurden in dieser Studie nur Plaques aus dem Neokortex von APP23 transgenen Mäusen ausgeschnitten. Aufgrund der zufälligen Verteilung der Plaques in allen Schichten des Neokortex wurden alle Kortexschichten in die Untersuchung einbezogen. Da insgesamt sehr viele Plaques gesammelt wurden und die RNA aus den ausgeschnittenen Gewebestücken gepoolt wurde, wurden eventuelle schichtenspezifische Genexpressionsunterschiede herausgemittelt und hatten keinen Einfluss auf die Ergebnisse. Sollte jedoch nur eine geringe Anzahl an Plaques in Kombination mit einer zweistufigen Amplifikation genutzt werden,

wäre es wichtig, nur gleichartige Sammelbereiche einzubeziehen. Außerdem muss bei der Verifizierung der Mikroarray-Ergebnisse mittels qPCR darauf geachtet werden, dass auch hierbei die Plaques in übereinstimmenden Schichten/Sammelbereichen isoliert werden, da eine geringere Menge an RNA, d.h. geringere Anzahl an Plaques benötigt wird und gewebebedingte Expressionsunterschiede nicht herausgemittelt würden. In dieser Untersuchung wurde zwar eine etwas geringere Anzahl an Plaques gesammelt, die einzelnen Proben wurden anschließend allerdings gepoolt, wodurch eventuelle Unterschiede wieder herausgemittelt wurden.

4.2.4 Amplifikation der RNA und Mikroarray-Analyse

Die Amplifikation der RNA vor der Mikroarray-Analyse wurde bereits von einigen anderen Gruppen in Fällen angewendet, in denen nur sehr geringe RNA-Mengen extrahiert werden konnten (Kamme et al, 2003; Liss und Roeper, 2004; King et al, 2005; McClintick et al, 2005; Nygaard et al, 2005). Allerdings kann die Amplifikation von RNA vor Mikroarray-Untersuchungen die resultierenden Daten durch die Einführung systematischer Fehler sowie erhöhter Hintergrundaktivität aufgrund von Template-unabhängigen Produkten (Baugh et al, 2001; King et al, 2005; Li et al, 2005; McClintick et al, 2005; Nygaard et al, 2005) beeinflussen. Durch die erhöhte Hintergrundaktivität kann es für die Detektion zum Verlust einzelner Gene kommen, die nur eine relativ schwache Expression aufweisen und somit vom „Hintergrundrauschen“ nicht unterscheidbar sind.

Daher können eine oder mehrere Amplifikationsrunden die resultierenden Genexpressionsmuster modifizieren und/oder zu einer erniedrigten Anzahl an identifizierten Genen aufgrund eines erniedrigten Signal-Rausch-Verhältnisses führen (McClintick et al, 2005; Diboun et al, 2006). Die Reliabilität von Mikroarray-Analysen hängt u.a. stark von der Anzahl an Amplifikationsrunden ab, die vorher durchgeführt wurden. Bereits publizierte Daten zeigen, dass eine Amplifikationsrunde zu keiner Reduktion der Reproduzierbarkeit, Wiedergabetreue und Ähnlichkeit der Ergebnisse verglichen mit nicht-amplifizierter RNA derselben Probe führt (Baugh et al, 2001). Die Reproduzierbarkeit einer einzelnen Amplifikationsrunde scheint mit der Chip-Hybridisierung und Ausleseprozedur an sich vergleichbar zu sein (Baugh et al, 2001). Im Unterschied dazu können zwei oder mehr Amplifikationsrunden verzerrte Expressionsverhältnisse zur Folge haben, die eine unproportionale Verschiebung der Intensitäten zwischen biologischen Proben, eine

Reduzierung der Reproduzierbarkeit und Wiedergabetreue sowie eine reduzierte Korrelation zwischen den wiederholten Arrays verursachen (Wilson et al, 2004; McClintick et al, 2005; Diboun et al, 2006). Daher wurde in diesen Untersuchungen nur eine einzelne Amplifikationsrunde vor der Mikroarray-Analyse durchgeführt. Dafür wurde pro Array ca. 100 ng RNA aus plaqueassoziiertem Gewebe isoliert. Unter diesen Bedingungen ist die biologische Variabilität zwischen den verwendeten Tieren größer als die technische Variabilität, die durch die Amplifikation eingeführt wurde (Wilson et al, 2004; McClintick et al, 2005).

4.2.5 Vergleichbarkeit von Mikroarray- und qPCR-Daten

Um die mittels Mikroarray-Analyse ermittelten Genexpressionsveränderungen zu verifizieren, wurde die Expression ausgewählter regulierter Gene per qPCR überprüft. Der Vergleich der erhaltenen Daten zeigte, dass nicht alle im Mikroarray als reguliert ermittelten und daraufhin untersuchten Gene mit den Ergebnissen der qPCR übereinstimmen. Außerdem wurde die Höhe der Genexpressionsveränderungen, die sowohl mit der Mikroarray-Technik als auch mit der qPCR-Technik bestimmt wurden, verglichen. Die Größenordnung der mittels qPCR erhaltenen Genexpressionsveränderungen zwischen plaqueassoziiertem und plaquefreiem Gewebe war vergleichbar, aber nicht identisch.

Normalerweise werden nur positive Mikroarray-Ergebnisse mittels qPCR verifiziert, d. h. nur Gene, die als reguliert ermittelt werden. Gene, die unter Umständen nur in einzelnen Mikroarrays als reguliert detektiert wurden, fallen aus der Analyse heraus. Sie tauchen in der Ergebnisliste nicht als positiv ermittelt auf und können daher auch nicht überprüft werden. Dabei können diese Daten entweder korrekt sein, d.h. die Expression der betreffenden Gene ist sowohl in der Mikroarray- als auch in der nachfolgenden qPCR-Untersuchung erhöht bzw. erniedrigt, oder sie können falsch sein, d.h. die mRNA Expression ist im Mikroarray erhöht oder erniedrigt, aber nicht in der qPCR.

Des Weiteren konnten auch einzelne falsch positive Resultate festgestellt werden, z.B. im Fall von IL10r b und Vip. Falsch positive Ergebnisse können mehrere Ursachen haben. Unter anderem können sie durch Amplifikationseffekte oder Unterschiede in den Sammelbereichen (siehe 4.2) verursacht werden. In dieser Untersuchung konnte die qPCR-Analyse die meisten Mikroarray-Resultate verifizieren, mit oder ohne statistische Signifikanz. Bezüglich der Veränderungen im Expressionsniveau haben die vorliegenden Daten zu ähnlichen, wenn auch

nicht identischen Ergebnissen geführt. Diese Unterschiede der mRNA Expressionshöhe können wieder aufgrund der technischen Variabilität durch Amplifikationseffekte oder des Einflusses der Sammelstelle sowie der biologischen Variabilität entstanden sein. Es ist bekannt, dass zwei Methoden mit unterschiedlichem technischem Hintergrund teilweise abweichende Resultate ergeben können, die nicht direkt miteinander vergleichbar sind. Da die qPCR-Analyse als die verlässlichere Methode angesehen wird (Dallas et al, 2005), wurden bei gleicher Tendenz der Daten aus Mikroarray und qPCR die qPCR-Daten als richtig gewertet und es wurde versucht zu vermeiden, biologische Schlussfolgerungen alleine aus den Mikroarray-Ergebnissen zu ziehen.

4.3 Die Rolle von Trem2 bei der Alzheimer-Erkrankung

Unter den im ersten Teil der vorliegenden Arbeit ermittelten potentiellen Kandidatengen für die Regulierung der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion war unter anderem das Molekül Trem2. Die Literaturrecherche ergab, dass Trem2 eine wichtige Rolle bei der Phagozytose von Zellresten und anderen Substanzen spielt (Rogers et al, 2002; Takahashi et al, 2005; 2007; Neumann und Takahashi, 2007). Daher standen im weiteren Verlauf der Untersuchungen Trem2 und sein Adapter-Molekül Dap12 im Zentrum der Analyse.

Die mikrogliale Expression von Trem2 wird als Antwort auf so gut wie alle neurodegenerativen Signale induziert (Melchior, 2006). Dies zieht *in vitro* eine verstärkte Phagozytose und eine verminderte mikrogliale proinflammatorische Antwort nach sich (Rogers et al, 2002; Takahashi et al, 2005; 2007; Neumann und Takahashi, 2007).

„Loss of function“ Mutationen im Trem2 und Dap12 Gen wurden mit einer seltenen, sehr frühzeitig einsetzenden („early-onset“) Demenzerkrankung (Polyzystische Lipomembranöse Osteodysplasie mit sklerosierender Leukenzephalopathie [PLOS, Nasu-Hakola-Krankheit]) assoziiert, was die Vermutung nahe legt, dass Trem2 für die Prävention von neurodegenerativen Erkrankungen funktionell relevant sein könnte. Untersuchungen zur Allel-Diskriminierung, die der Feststellung von Einzel-Nukleotid-Polymorphismen in der Trem2-kodierenden Region dienten, konnten keine Mutationen bei einer kleinen Gruppe von „early-onset“-Alzheimerpatienten nachweisen (Fenoglio, 2007). Es gibt also gegenwärtig keinen Grund zu der Annahme, dass Mutationen im Trem2 Gen eine Rolle bei der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung spielen. Allerdings kann die in dieser Arbeit gezeigte erhöhte Expression von Trem2 auf plaqueassoziierten Mikrogliazellen als ein Versuch

angesehen werden, die Amyloidablagerungen durch Verstärkung der Phagozytoseaktivität der Mikroglia zu beseitigen (Takahashi et al, 2005; 2007; Neumann und Takahashi, 2007). Ebenso kann die verstärkte Expression von Trem2 eine Manifestation des alternativen Aktivierungszustandes von Mikroglia darstellen (Colton et al, 2006).

Im Gegensatz zu anderen Organen, welche über die Fähigkeit verfügen, abgestorbene Zellen wieder zu ersetzen, hängt die ZNS-Funktion entscheidend von der Erhaltung post-mitotischer Neurone ab. Da Immunantworten nicht nur die Regeneration unterstützen und nützlich für die Entfernung von Infektionserregern oder Zellresten sind, sondern auch zur sekundären Gewebeverletzung beitragen, sind die Immunzellen im Neuropil gezielt kontrolliert (Bechmann et al, 2007; Galea et al, 2007). Andere Arbeitsgruppen haben mittlerweile gezeigt, dass Trem2 *in vitro* eine entscheidende Rolle bei der Herbeiführung eines mikroglialen Aktivierungsstatus spielt, der die Phagozytose unterstützt, während die Entstehung von proinflammatorischen Zytokinen unterdrückt wird, die ansonsten eine systemische Immunantwort auslösen könnten (Rogers et al, 2002; Takahashi et al, 2005; 2007; Neumann und Takahashi, 2007).

Ein Beispiel der immunregulativen Funktion von Trem2 wurde bei der experimentellen Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE) offensichtlich, einem Tiermodell der multiplen Sklerose. In diesem Modell konnte die Injektion von Trem2-transduzierten Mikrogliazellen aus dem Knochenmark, die dann in das entzündete Rückenmark wanderten, degeneriertes Myelin phagozytierten und antiinflammatorische Zytokine sekretierten, die klinischen Symptome verbessern (Takahashi et al, 2007), wohingegen eine Trem2-Blockierung den Krankheitsverlauf verschlechterte (Piccio et al, 2007).

Die aktuellen Vakzinierungsstrategien, die zu einer verbesserten Beseitigung der Amyloidplaques führen, legen allerdings nahe, dass die Therapie der Alzheimer-Erkrankung von einer verstärkten Entzündung und der Induzierung von systemischen Immunantworten profitiert, wobei die nachteiligen Nebeneffekte die heikle Balance von Entzündungen innerhalb des Gehirns unterstreichen (Pfeifer et al, 2002; Heppner et al, 2004; Burbach et al, 2007). Der neueste Fortschritt erlaubt mittlerweile die Vakzinierung von Antigenbestandteilen zur Induktion einer signifikanten anti-Amyloidbeta-Antikörperproduktion, ohne eine schädliche T-Zell-Infiltration zu verursachen (Nikolic, 2007).

Trotz der pro-phagozytären Effekte auf Mikroglia könnte die vorübergehende Antagonisierung der Trem2-vermittelten Unterdrückung der proinflammatorischen Zytokine

(Hamerman et al, 2006; Takahshi et al, 2006; Turnbull et al, 2006) somit eine erweiterte Immunantwort für eine effizientere Eliminierung von Amyloid erlauben.

4.4 Andere Regulatoren der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion

Amyloid- β -Ablagerungen, insbesondere solche in fibrillärer Form, sind assoziiert mit entzündlichen Reaktionen des Gehirns (Akiyama et al, 2000; Eikelenboom und Gool, 2004; McGeer et al, 1993; McGeer und McGeer, 2003; Melchior et al, 2006; Rogers et al, 2002; Sastre et al, 2006). Es kommt neben der lokalen Expressionserhöhung von proinflammatorischen Zytokinen, Komplementkomponenten und Proteasen zu einer Infiltration des Gewebes mit Entzündungszellen wie Mikrogliazellen und Astrozyten (Aisen et al, 1997; Akiyama et al, 2000; Benveniste et al, 2001; Eikelenboom et al, 2002; Rogers et al, 2002; Streit et al, 2004; 2004a; 2005; Hauwel et al, 2005; Eikelenboom et al, 2006; Melchior et al, 2006; Simard et al, 2006; Walker et al, 2006). Im zweiten und dritten Teil dieser Arbeit wurde die plaqueassoziierte Expression von einigen Kandidatengenen untersucht, die Einfluss auf die plaqueassoziierte Entzündung nehmen könnten.

4.4.1 Die Rolle des angeborenen Immunsystems bei der Regulierung der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion

Wie in Kapitel 1.5.3 bereits ausgeführt, handelt es sich bei den Toll-like Rezeptoren (TLRs) um eine Gruppe von „Pattern-Recognition-Rezeptoren“ des angeborenen Immunsystems. Neben charakteristischen Pathogenstrukturen können einige Mitglieder der Rezeptorenfamilie auch endogene Moleküle verschiedener Struktur, darunter Hitzeschockproteine, Hyaluronsäure, Fettsäuren sowie chromatinähnliche Strukturen, erkennen (Medzhitov, 2001; Johnson et al, 2003; Olson und Miller, 2004; Park et al, 2004; Ishii et al, 2005; Takeda und Akira, 2005; Zhou et al, 2005; Akira, 2006; Lee et al, 2006; Scheibner et al, 2006; Tahara et al, 2006; Salaun et al, 2007).

Die TLRs aktivieren Mikrogliazellen, dendritische Zellen sowie andere phagozytierende Zellen und führen zu einer Sekretion von Chemokinen, Zytokinen und anderen Molekülen, die für die protektiven Immunantworten, die effiziente Beseitigung beschädigten Gewebes sowie die Aktivierung der adaptiven Immunität benötigt werden (Johnson et al, 2003; Akira

und Takeda, 2004; Lee et al, 2006; Medzhitov, 2001; Olson and Miller, 2004; Park et al, 2004; Salaun et al, 2007; Scheibner et al, 2006; Takeda und Akira, 2005; Zhou et al, 2005). In einigen Arbeiten wird *in vitro* auch eine Beteiligung der TLRs, insbesondere von Tlr2, Tlr4 und Tlr9, bei der Aufnahme und Beseitigung von Amyloid- β vermutet (Chen et al, 2006; Lotz et al, 2005; Tahara et al, 2006).

Da es *in vivo* jedoch nicht bzw. nur zu einer ineffizienten Abräumung von aggregiertem Amyloid kommt, wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, dass die TLR-mRNA Expression in der Umgebung von Plaques erniedrigt bzw. gestört sein könnte. Die vorliegende Arbeit konnte allerdings zeigen, dass die mRNA Expression der einzelnen Toll-like Rezeptoren in Plaques und teilweise auch in plaquenahem Gewebe erhöht ist. Diese Erhöhung der Rezeptor-mRNA könnte einen ineffizienten Versuch der Phagozytose und Prozessierung von Amyloid- β darstellen. Durch die von Lotz et al. (2005) *in vitro* nachgewiesene und jetzt auch *in vivo* belegte Erhöhung der TLR-mRNAs liegt die Vermutung nahe, dass Tlr2 und Tlr4 direkt von Amyloid- β aktiviert werden können.

Im Falle von Tlr9 scheint es durch die A β vermittelte Aktivierung des Rezeptors zu einer teilweisen Antagonisierung der Entzündungsreaktion zu kommen (Lotz et al, 2005). Dies hat eine geringere Freisetzung von NO und anderen proinflammatorischen Zytokinen als nach Bindung des entsprechenden normalen Liganden an Tlr9 zur Folge (Lotz et al, 2005). Im Normalfall erkennt Tlr9 einzelsträngige Bakterien-DNA (Medzhitov, 2001; Olson und Miller, 2004; Takeda und Akira, 2005; Akira et al, 2006), wobei vermutet wird, dass das Absterben der Neuronen im Verlauf der A β -Ablagerungen und der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion ebenfalls zum Vorhandensein von einzelsträngiger DNA führen könnte (Johnson et al, 2003; Lee et al, 2006).

Dementsprechend könnte es daher in der Umgebung der degenerierten Neuronen zu einer Bindung von endogenen Zelltrümmern/DNA an Tlr9 und somit zu einer weiteren Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen sowie Chemokinen und folglich zu einer weiteren Schädigung des umgebenden Nervengewebes kommen (Medzhitov, 2001; Johnson et al, 2003; Lotz et al, 2005; Takeda und Akira, 2005; Lee et al, 2006). Die Tlr9-vermittelte Bindung von A β scheint daher einen protektiven Mechanismus des Gewebes darzustellen, die durch A β verursachten Schädigungen auf einem anderen Weg als der verstärkten Phagozytose von A β zu minimieren.

Grundsätzlich kommt es *in vivo* trotz der erhöhten TLR-Expression nicht zu einer effizienten Abräumung der A β -Aggregate. Möglicherweise spielen dabei die bereits im Abschnitt 1.5.3.3 erwähnten altersbedingten Mikrogliazellveränderungen eine Rolle. Hierbei wird davon ausgegangen, dass Mikroglia altersbedingten strukturellen Schädigungen und einer zellulären „Seneszenz“ ausgesetzt sind (Korotzer et al, 1993; Streit, 2002; 2004a; Flanary und Streit, 2004; Streit, 2005; 2006). Die Gegenwart von A β scheint die mikrogliale Zellseneszenz dabei zu verstärken, was den Schluss nahe legt, dass A β die physiologischen Funktionen der Mikroglia durch Beschleunigung des zellulären Verfalls nachteilig beeinflussen könnte (Flanary et al, 2007). Eine Folge dieser Seneszenz könnte eine verminderte Kapazität der Mikrogliazellen sein, auf bestimmte Signale wie die Aktivierung der TLRs zu reagieren. Eine denkbare Konsequenz dieser verminderten Kapazität wäre dann eine verminderte oder eine nicht effiziente Phagozytose von aggregiertem A β , wie sie *in vivo* vorliegt.

Die erhöhte plaqueassoziierte mRNA Expression der anderen untersuchten TLRs, Tlr5 und Tlr7, legt die Vermutung nahe, dass auch diese TLRs direkt durch A β aktiviert werden können. In der Literatur sind für diese TLRs verschiedene Liganden wie Virus-RNA, Bakterien-DNA, Peptidoglykan, LPS, sowie einige endogene Moleküle wie diverse Proteine, Fettsäuren oder Nukleinsäuren bekannt (Medzhitov, 2001; Johnson et al, 2003; Ishii et al, 2005; Takeda und Akira, 2005; Zhou et al, 2005; Akira, 2006; Lee et al, 2006; Tahara et al, 2006). Allerdings konnte noch keine Assoziation mit A β festgestellt werden. Infolge dieser *in vivo* Ergebnisse besteht die Notwendigkeit, nachfolgend *in vitro* Untersuchungen durchzuführen, um zu verifizieren, ob A β tatsächlich in der Lage ist, diese TLRs direkt zu aktivieren wie es die vorliegenden *in vivo* Ergebnisse implizieren.

4.4.1.1 Der Einfluss der „Supressors of Cytokine Signaling“ auf die plaqueassoziierte Entzündungsreaktion

Die „Supressors of Cytokine Signaling“ (SOCS) bilden eine Gruppe von entzündungsmodulierenden Proteinen, welche die Sekretion proinflammatorischer Proteine wie NF- κ B, TNF- α und Interferon- β negativ regulieren können (Larsen und Röpke, 2002; Alexander und Hilton, 2004; Baetz et al, 2004; Yoshimura et al, 2007). Sie werden durch Zytokine oder auch durch die Stimulation der oben beschriebenen Toll-like Rezeptoren auf bzw. in Mikroglia, dendritischen Zellen und Makrophagen induziert (Baetz et al, 2004; Yoshimura et al, 2007; Dalpke et al, 2008). Da es in der unmittelbaren Umgebung der

Amyloidplaques zu einer starken und persistierenden Entzündungsreaktion kommt, lautete die Hypothese, dass die untersuchten SOCS eine verminderte plaqueassoziierte mRNA Expression zeigen könnten. In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings nachgewiesen, dass die mRNA Expression von Socs1 und Socs3 im Gegensatz zu Socs2, Socs4, Socs5 und Socs7 in Plaques und plaqueassoziiertem Gewebe erhöht ist.

Eine erhöhte SOCS Expression könnte einen Mechanismus zur Begrenzung der schädlichen Einflüsse wie der verstärkten Produktion von Chemokinen und Zytokinen darstellen. Dies könnte ein Ansatz sein, das Gleichgewicht zwischen schädlichen und nützlichen Wirkungen der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion auf die Seite der positiven Wirkungen wie eine verminderte proinflammatorische Reaktion sowie eine potentielle A β -Aufnahme und Beseitigung zu verschieben. Allerdings scheint dies *in vivo* keinen sichtbaren Erfolg zu zeigen und nur einen ineffizienten Versuch zur Begrenzung der Entzündungsreaktion darzustellen. Hierbei könnte die oben bereits erwähnte mikrogliale Seneszenz eine Rolle spielen, die zu einer verminderten Kapazität, auf erhaltene Signale zu reagieren, führen könnte. Die mRNA Expression von Socs2, Socs4, Socs5 und Socs7 ist im plaqueassoziierten Gewebe nicht erhöht, sondern wie vermutet erniedrigt.

4.4.2 Die Reaktion des Endothels auf Amyloidablagerungen im Gehirn

Im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung beim Menschen sowie in Tiermodellen der Alzheimer-Erkrankung kommt es auch zu amyloidbedingten strukturellen, morphologischen und funktionellen Veränderungen der Gefäße (Kumar-Singh et al, 2005; Miao et al, 2005; Kouznetsova et al, 2006; Marco und Scaper, 2006; Burbach et al, 2007; Meyer et al, 2007). Bisher wurden diese amyloidinduzierten zerebrovaskulären Gefäßveränderungen mit Amyloidablagerungen in Blutgefäßen (zerebrale Amyloidangiopathie) assoziiert (Thomas et al, 1996; Kalara, 1997; Alonzo et al, 1998; Jellinger, 2002; Chalmers et al, 2003). Neueste Untersuchungen vermuten allerdings, dass auch aggregiertes Amyloid- β aus parenchymalen Plaques einen schädlichen Einfluss auf das Endothelgewebe haben kann (Kouznetsova et al, 2006).

Um nun zu überprüfen, ob fibrilläres aggregiertes A β aus Amyloidplaques einen Einfluss auf das Endothelgewebe haben kann und um diese Veränderungen näher zu charakterisieren, wurde in der vorliegenden Arbeit die mRNA Expression von plaqueassoziiertem Endothelgewebe untersucht. Um diese Untersuchung zu ermöglichen, wurde ein Protokoll zur

Laser Mikrodisektion von Endothelien etabliert. Die Perfusion des Hirngewebes mit dem Farbstoff Evan's Blue erlaubte eine extrem zeitsparende und dadurch RNA-konservierende Markierung des zu isolierenden Endothelgewebes, da anschließend lediglich eine kurze Fixierung und Dehydrierung der Kryoschnitte durchgeführt werden musste. Zusätzlich konnte die Anfärbung der Amyloidplaques in die Dehydrierungsprozedur der Schnitte integriert werden. Dadurch wurde eine Doppelfärbung der Kryoschnitte ohne zeitaufwändige zusätzliche Färbeschritte ermöglicht.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass es in plaqueassoziiertem Endothel zu einer erhöhten Expression der Chemokine MIP-1 α und CXCL10, des Chemokinrezeptors CXCR3 und Integrin β 3 kommt. Da die Mäuse zu Beginn der Gewebepräparation mit NaCl und Evan's Blue-Lösung perfundiert wurden, um das Blut zu entfernen, ist es unwahrscheinlich, dass diese Expressionsveränderungen auf in den Gefäßen vorkommende Entzündungszellen zurückzuführen sind. Die Expressionsveränderungen liegen also in den Endothelzellen selbst begründet.

Die vermehrte Produktion von Chemokinen kann eine verstärkte proinflammatorische Reaktion zur Folge haben, die das umliegende plaqueassoziierte Gewebe weiter schädigen sowie das Endothelgewebe auch direkt schädigen kann. Das Endothelgewebe spielt bei der Regulierung der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion also eine die Entzündung unterstützende Rolle. Die untersuchten Chemokine selbst (MIP-1 α und CXCL10) haben eine proinflammatorische Wirkung durch Produktion von Interleukin-1, Interleukin-6 und TNF- α (Cook, 1996; Xia et al, 2000). Außerdem kommt es durch die verstärkte Expression dieser Moleküle zu einer verstärkten Rekrutierung von Entzündungszellen wie Mikrogliazellen und natürliche Killerzellen (NKs), die wiederum die proinflammatorische Reaktion unterstützen (Cook, 1996; Babcock et al, 2003; Trifilo et al, 2003). Dadurch kann es neben der proinflammatorischen Wirkung auf das plaqueassoziierte Gewebe zu weiteren morphologischen und funktionellen Veränderungen des Endothelgewebes kommen. Diese können in der Folge auch zu einer verminderten Durchblutung und Versorgung des Gehirngewebes bzw. der Neuronen und somit zu einer verstärkten neurodegenerativen Reaktion führen (Thomas et al, 1996; Kalaria, 1997; Crawford et al, 1998; Patel et al, 2005).

Wie in der Literatur mehrfach beschrieben, sind funktionelle und morphologische Veränderungen bisher in Verbindung mit A β -Ablagerungen in den Gefäßen, d.h. assoziiert mit der zerebrale Amyloidangiopathie (CAA), dargestellt worden (Kalaria, 1997; Jellinger, 2002;

Thal et al, 2008; 2008a). Zusätzlich gibt es aber Hinweise darauf, dass auch aggregiertes A β aus Amyloidplaques, die in unmittelbarer Umgebung der Gefäße liegen, für verschiedene Veränderungen verantwortlich gemacht werden kann (Thomas et al, 1996; Kalaria, 1997; Crawford et al, 1998; Patel et al, 2005; Kouznetsova et al, 2006). Es wird vermutet, dass die Akkumulation von A β in der Nähe von Gefäßen, wie bereits für lösliches/monomeres A β beschrieben, ebenfalls toxische Auswirkungen auf die funktionelle und strukturelle Integrität des Endothelgewebes hat, indem proinflammatorische Reaktionen induziert werden (Thomas et al, 1996; Crawford et al, 1998; Patel et al, 2005).

5. Zusammenfassung

Ein charakteristisches Merkmal der Alzheimer-Krankheit ist die Ablagerung von Amyloid- β (A β) Protein im Gehirn. Die Proteinaggregate bilden Plaques, in deren Umgebung eine chronische Entzündungsreaktion nachgewiesen werden kann. Welche Rolle diese plaqueassoziierte Inflammation für die Pathogenese der Alzheimerschen Krankheit spielt, ist unklar. Es wird diskutiert, dass es sich um einen Versuch des Immunsystems handelt, A β durch Prozessierung und Phagozytose aus dem Gehirn zu entfernen. Durch die dadurch entstehende chronische Entzündung könnten Nervenzellen in der Umgebung von Plaques geschädigt werden ("bystander attack").

Ein Schritt zu einem besseren Verständnis der plaqueassoziierten Entzündungsprozesse und ihrer pathogenetischen Bedeutung ist die Aufklärung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen. Daher beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit drei zentralen Fragen: (1) Welche Moleküle sind an der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion beteiligt? (2) Sind ausgewählte Kandidatenmoleküle (Toll-like Rezeptoren, SOCS) in der Umgebung von Plaques reguliert? (3) Welche Rolle spielen Entzündungsmediatoren aus Endothelzellen in der Nähe von Plaques?

Die plaqueassoziierten Entzündungsprozesse wurden im Gehirn von alten APP23 transgenen Mäusen, einem Modell der Alzheimer-Erkrankung, untersucht. Plaques, plaquenahes Gewebe und plaquefreies Gewebe wurden mittels Laser Mikrodisektion ausgeschnitten und anschließend mit Hilfe von Mikroarrays und quantitativer RT-PCR analysiert. Dazu wurden zwei methodische Ansätze gewählt: Im ersten Teil der Arbeit wurden in einem hypothesenfreien Ansatz neue regulatorische Kandidatenmoleküle identifiziert, unter ihnen der Rezeptor Trem2. Dabei konnten sowohl eine erhöhte plaqueassoziierte mRNA als auch eine erhöhte Protein Expression von Trem2 sowie dessen Lokalisation auf Mikrogliazellen nachgewiesen werden. Trem2 spielt anscheinend eine Rolle bei der Herbeiführung eines mikroglialen Aktivierungsstatus, der die Phagozytose unterstützt, während die Entstehung von proinflammatorischen Zytokinen unterdrückt wird. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde mit einem hypothesenbasierten Ansatz die plaqueassoziierte mRNA Expression von Molekülen untersucht, die bereits in anderen Untersuchungen mit der Alzheimer-Erkrankung in Zusammenhang gebracht wurden. Dabei konnte eine erhöhte plaqueassoziierte mRNA Expression der Toll-like Rezeptoren Tlr2, 4 und 9 sowie einzelner SOCS in APP23 transgenen Mäusen nachgewiesen werden. Tlr2 und 4 sind in der Lage, Mikrogliazellen und

andere phagozytierende Zellen zu aktivieren und werden mit der Aufnahme und Beseitigung von Amyloid- β in Verbindung gebracht. Im dritten Teil der Arbeit wurde ebenfalls mit einem hypothesenbasierten Ansatz die mRNA Expression von plaqueassoziiertem Endothelgewebe überprüft. Dabei konnte eine erhöhte mRNA Expression von MIP-1 α und CXCL10, zwei Entzündungsmediatoren aus der Familie der Chemokine, in plaqueassoziiertem Endothelgewebe gezeigt werden. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass auch das Endothelgewebe an der Entzündungsreaktion beteiligt ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen zu einem besseren Verständnis der plaqueassoziierten Entzündungsreaktion im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung bei. Die Aufklärung der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung ist entscheidend, um in den nächsten Jahren und Jahrzehnten neue und effektive Medikamente zur Behandlung dieser schweren Demenzerkrankung zu entwickeln.

6. Literaturverzeichnis

- Aisen, P.S. (1997). "Inflammation and Alzheimer's disease: mechanisms and therapeutic strategies". *Gerontology* **43**(1-2): 143-9.
- Akira, S. and Takeda, K. (2004). "Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice". *C.R.Biol.* **327**(6): 581-9.
- Akira, S. (2006). "Tlr signalling". *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **311**:1-16
- Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G.M., Cooper, N.R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B.L., Finch, C.E., Frautschy, S., Griffin, W.S., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L., Mrak, R., Mackenzie, I.R., McGeer, P.L., O'Banion, M.K., Pachter, J., Pasinetti, G., Plata-Salaman, C., Rogers, J., Rydel, R., Shen, Y., Streit, W., Strohmeyer, R., Tooyoma, I., Van Muiswinkel, F.L., Veerhuis, R., Walker, D., Webster, S., Wegrzyniak, B., Wenk, G., and Wyss-Coray, T. (2000). "Inflammation and Alzheimer's disease". *Neurobiol.Aging* **21**(3): 383-421.
- Alexander, W.S. and Hilton, D.J. (2004). "The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response". *Annu.Rev.Immunol.* **22**: 503-29.
- Alonzo, N.C., Hyman, B.T., Rebeck, G.W., and Greenberg, S.M. (1998). "Progression of cerebral amyloid angiopathy: accumulation of amyloid-beta40 in affected vessels". *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* **57**(4): 353-9.
- Alzheimer, A. (1907). "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Allg.Zeitschr.Psychiatr.* **64**: 146-8.
- Attems, J., Lintner, F., and Jellinger, K.A. (2004). "Amyloid beta peptide 1-42 highly correlates with capillary cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease pathology". *Acta Neuropathol.* **107**(4): 283-91.
- Babcock, A.A., Kuziel, W.A., Rivest, S., and Owens, T. (2003). "Chemokine expression by glial cells directs leukocytes to sites of axonal injury in the CNS". *J.Neurosci.* **23**(21): 7922-30.
- Baetz, A., Frey, M., Heeg, K., and Dalpke, A.H. (2004). "Suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins indirectly regulate toll-like receptor signaling in innate immune cells". *J.Biol.Chem.* **279**(52): 54708-15.
- Barger, S.W. and Mattson, M.P. (1996). "Induction of neuroprotective kappa B-dependent transcription by secreted forms of the Alzheimer's beta-amyloid precursor". *Brain Res.Mol.Brain Res.* **40**(1): 116-26.
- Baugh, L.R., Hill, A.A., Brown, E.L., and Hunter, C.P. (2001). "Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription". *Nucleic Acids Res.* **29**(5): E29.

- Bechmann, I., Galea, I., and Perry, V.H. (2007). "What is the blood-brain barrier (not)?" *Trends Immunol.* **28**(1): 5-11.
- Benveniste, E.N., Nguyen, V.T., and O'Keefe, G.M. (2001). "Immunological aspects of microglia: relevance to Alzheimer's disease". *Neurochem.Int.* **39**(5-6): 381-91.
- Berger, A.K., Fratiglioni, L., Forsell, Y., Winblad, B., and Backman, L. (1999). "The occurrence of depressive symptoms in the preclinical phase of AD: a population-based study". *Neurology* **53**(9): 1998-2002.
- Bergeron, C. (1990). "Alzheimer's disease--neuropathological aspects". *Can.J.Vet.Res.* **54**(1): 58-64.
- Bertram, L., McQueen, M.B., Mullin, K., Blacker, D., and Tanzi, R.E. (2007). "Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database". *Nat.Genet.* **39**(1): 17-23.
- Biber, K., Sauter, A., Brouwer, N., Copray, S.C., and Boddeke, H.W. (2001). "Ischemia-induced neuronal expression of the microglia attracting chemokine Secondary Lymphoid-tissue Chemokine (SLC)". *Glia* **34**(2): 121-33.
- Biber, K., Dijkstra, I., Trebst, C., De Groot, C.J., Ransohoff, R.M., and Boddeke, H.W. (2002). "Functional expression of CXCR3 in cultured mouse and human astrocytes and microglia". *Neuroscience* **112**(3): 487-97.
- Blennow, K., de Leon, M.J., and Zetterberg, H. (2006). "Alzheimer's disease". *Lancet* **368**(9533): 387-403.
- Bonaventure, P., Guo, H., Tian, B., Liu, X., Bittner, A., Roland, B., Salunga, R., Ma, X.J., Kamme, F., Meurers, B., Bakker, M., Jurzak, M., Leysen, J.E., and Erlander, M.G. (2002). "Nuclei and subnuclei gene expression profiling in mammalian brain". *Brain Res.* **943**(1): 38-47.
- Bondolfi, L., Calhoun, M., Ermini, F., Kuhn, H.G., Wiederhold, K.H., Walker, L., Staufenbiel, M., and Jucker, M. (2002). "Amyloid-associated neuron loss and gliogenesis in the neocortex of amyloid precursor protein transgenic mice". *J.Neurosci.* **22**(2): 515-22.
- Bonifati, D.M. and Kishore, U. (2007). "Role of complement in neurodegeneration and neuroinflammation". *Mol.Immunol.* **44**(5): 999-1010.
- Bornemann, K.D. and Staufenbiel, M. (2000). "Transgenic mouse models of Alzheimer's disease". *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **908**: 260-6.
- Bowen, D.M. and Davison, A.N. (1980). "Biochemical changes in the cholinergic system of the ageing brain and in senile dementia". *Psychol.Med.* **10**(2): 315-9.
- Braak, H. and Braak, E. (1991). "Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections". *Brain Pathol.* **1**(3): 213-6.

- Braak, H. and Braak, E. (1991a). "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes". *Acta Neuropathol.* **82**(4): 239-59.
- Braak, H., Braak, E., Yilmazer, D., de Vos, R.A., Jansen, E.N., and Bohl, J. (1996). "Pattern of brain destruction in Parkinson's and Alzheimer's diseases". *J.Neural Transm.* **103**(4): 455-90.
- Braak, H. and Braak, E. (1996). "Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease". *Acta Neurol.Scand.Suppl* **165**: 3-12.
- Braaten, A.J., Parsons, T.D., McCue, R., Sellers, A., and Burns, W.J. (2006). "Neurocognitive differential diagnosis of dementing diseases: Alzheimer's Dementia, Vascular Dementia, Frontotemporal Dementia, and Major Depressive Disorder". *Int.J.Neurosci.* **116**(11): 1271-93.
- Burbach, G.J., Dehn, D., Del Turco, D., and Deller, T. (2003). "Quantification of layer-specific gene expression in the hippocampus: effective use of laser microdissection in combination with quantitative RT-PCR". *J.Neurosci.Methods* **131**(1-2): 83-91.
- Burbach, G.J., Vlachos, A., Ghebremedhin, E., Del Turco, D., Coomaraswamy, J., Staufenbiel, M., Jucker, M., and Deller, T. (2007). "Vessel ultrastructure in APP23 transgenic mice after passive anti-Abeta immunotherapy and subsequent intracerebral hemorrhage". *Neurobiol.Aging* **28**(2): 202-12.
- Burgermeister, P., Calhoun, M.E., Winkler, D.T., and Jucker, M. (2000). "Mechanisms of cerebrovascular amyloid deposition. Lessons from mouse models". *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **903**: 307-16.
- Calhoun, M.E., Burgermeister, P., Phinney, A.L., Stalder, M., Tolnay, M., Wiederhold, K.H., Abramowski, D., Sturchler-Pierrat, C., Sommer, B., Staufenbiel, M., and Jucker, M. (1999). "Neuronal overexpression of mutant amyloid precursor protein results in prominent deposition of cerebrovascular amyloid". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**(24): 14088-93.
- Cao, X. and Sudhof, T.C. (2004). "Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation". *J.Biol.Chem.* **279**(23): 24601-11.
- Carlesimo, G.A. and Oscar-Berman, M. (1992). "Memory deficits in Alzheimer's patients: a comprehensive review". *Neuropsychol.Rev.* **3**(2): 119-69.
- Cedazo-Minguez, A. and Cowburn, R.F. (2001). "Apolipoprotein E: a major piece in the Alzheimer's disease puzzle". *J.Cell Mol.Med.* **5**(3): 254-66.
- Chalmers, K., Wilcock, G.K., and Love, S. (2003). "APOE epsilon 4 influences the pathological phenotype of Alzheimer's disease by favouring cerebrovascular over parenchymal accumulation of A beta protein". *Neuropathol.Appl.Neurobiol.* **29**(3): 231-8.
- Chen, K., Iribarren, P., Hu, J., Chen, J., Gong, W., Cho, E.H., Lockett, S., Dunlop, N.M., and Wang, J.M. (2006). "Activation of Toll-like receptor 2 on microglia promotes cell

- uptake of Alzheimer disease-associated amyloid beta peptide". *J.Biol.Chem.* **281**(6): 3651-9.
- Chen, M. and Yankner, B.A. (1991). "An antibody to beta amyloid and the amyloid precursor protein inhibits cell-substratum adhesion in many mammalian cell types". *Neurosci.Lett.* **125**(2): 223-6.
- Citron, M. (2004). "Strategies for disease modification in Alzheimer's disease". *Nat.Rev.Neurosci.* **5**(9): 677-85.
- Colonna, M. (2003). "TREM2 in the immune system and beyond". *Nat.Rev.Immunol.* **3**(6): 445-53.
- Colton, C.A., Mott, R.T., Sharpe, H., Xu, Q., Van Nostrand, W.E., and Vitek, M.P. (2006). "Expression profiles for macrophage alternative activation genes in AD and in mouse models of AD". *J.Neuroinflammation.* **3**: 27.
- Combs, C.K., Karlo, J.C., Kao, S.C., and Landreth, G.E. (2001). "beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis". *J.Neurosci.* **21**(4): 1179-88.
- Cook, D.N. (1996). "The role of MIP-1alpha in inflammation and hematopoiesis". *J.Leukoc.Biol.* **59**(1):61-6.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., and Pericak-Vance, M.A. (1993). "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families". *Science* **261**(5123): 921-3.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Risch, N.J., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Jr., Rimmler, J.B., Locke, P.A., Conneally, P.M., Schmechel, K.E., and . (1994). "Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease". *Nat.Genet.* **7**(2): 180-4.
- Crawford, F., Suo, Z., Fang, C., and Mullan, M. (1998). "Characteristics of the in vitro vasoactivity of beta-amyloid peptides". *Exp.Neurol.* **150**(1): 159-68.
- Cummings, B.J. and Cotman, C.W. (1995). "Image analysis of beta-amyloid load in Alzheimer's disease and relation to dementia severity". *Lancet* **346**(8989): 1524-8.
- Dalla, B.G. and Boller, F. (1998). "Memory and language in neurodegenerative diseases". *Curr.Opin.Neurol.* **11**(5): 429-33.
- Dallas, P.B., Gottardo, N.G., Firth, M.J., Beesley, A.H., Hoffmann, K., Terry, P.A., Freitas, J.R., Boag, J.M., Cummings, A.J., and Kees, U.R. (2005). "Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR -- how well do they correlate?". *BMC.Genomics* **6**(1): 59.

- Dalpke, A., Heeg, K., Bartz, H., and Baetz, A. (2008). "Regulation of innate immunity by suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins". *Immunobiology* **213**(3-4): 225-35.
- De Strooper, B. (2003). "Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex". *Neuron* **38**(1): 9-12.
- Dehn, D., Burbach, G.J., Schafer, R., and Deller, T. (2006). "NG2 upregulation in the denervated rat fascia dentata following unilateral entorhinal cortex lesion". *Glia* **53**(5): 491-500.
- DeLisser, H.M., Newman, P.J., and Albelda, S.M. (1994). "Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31". *Immunol.Today* **15**(10): 490-5.
- Diboun, I., Wernisch, L., Orengo, C.A., and Koltzenburg, M. (2006). "Microarray analysis after RNA amplification can detect pronounced differences in gene expression using limma". *BMC.Genomics* **7**: 252.
- Dickson, D.W. (1999). "Microglia in Alzheimer's disease and Transgenic models". *Am.J.Pathol* **154**(6): 1627-31.
- Eckert, G.P., Cairns, N.J., Maras, A., Gattaz, W.F., and Muller, W.E. (2000). "Cholesterol modulates the membrane-disordering effects of beta-amyloid peptides in the hippocampus: specific changes in Alzheimer's disease". *Dement.Geriatr.Cogn Disord.* **11**(4): 181-6.
- Eckert, G.P., Wood, W.G., and Muller, W.E. (2001). "Effects of aging and beta-amyloid on the properties of brain synaptic and mitochondrial membranes". *J.Neural Transm.* **108**(8-9): 1051-64.
- Eikelenboom, P., Bate, C., van Gool, W.A., Hoozemans, J.J., Rozemuller, J.M., Veerhuis, R., and Williams, A. (2002). "Neuroinflammation in Alzheimer's disease and prion disease". *Glia* **40**(2): 232-9.
- Eikelenboom, P. and van Gool, W.A. (2004). "Neuroinflammatory perspectives on the two faces of Alzheimer's disease". *J.Neural Transm.* **111**(3): 281-94.
- Eikelenboom, P., Veerhuis, R., Scheper, W., Rozemuller, A.J., van Gool, W.A., and Hoozemans, J.J. (2006). "The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease". *J.Neural Transm.* **113**(11): 1685-95.
- El Khoury, J., Hickman, S.E., Thomas, C.A., Cao, L., Silverstein, S.C., and Loike, J.D. (1996). "Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils". *Nature* **382**(6593): 716-9.
- Evans, S.J., Choudary, P.V., Vawter, M.P., Li, J., Meador-Woodruff, J.H., Lopez, J.F., Burke, S.M., Thompson, R.C., Myers, R.M., Jones, E.G., Bunney, W.E., Watson, S.J., and Akil, H. (2003). "DNA microarray analysis of functionally discrete human brain regions reveals divergent transcriptional profiles". *Neurobiol.Dis.* **14**(2): 240-50.

- Fassbender, K., Simons, M., Bergmann, C., Stroick, M., Lutjohann, D., Keller, P., Runz, H., Kuhl, S., Bertsch, T., von Bergmann, K., Hennerici, M., Beyreuther, K., and Hartmann, T. (2001). "Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**(10): 5856-61.
- Fenoglio, C., Galimberti, D., Piccio, L., Scalabrini, D., Panina, P., Buonsanti, C., Venturelli, E., Lovati, C., Forloni, G., Mariani, C., Bresolin, N., and Scarpini, E. (2007). "Absence of TREM2 polymorphisms in patients with Alzheimer's disease and Frontotemporal Lobar Degeneration". *Neurosci.Lett.* **411**(2): 133-7.
- Ferretti, L., McCurry, S.M., Logsdon, R., Gibbons, L., and Teri, L. (2001). "Anxiety and Alzheimer's disease". *J.Geriatr.Psychiatry Neurol.* **14**(1): 52-8.
- Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P.R., Rimmer, E., and Scazufca, M. (2005). "Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study". *Lancet* **366**(9503): 2112-7.
- Fischer, O. (1910). "Die presbyophrene Demenz, deren anatomische Grundlage und klinische Anwendung". *Z.Ges Neurol u Psychiat* **3** 371-471.
- Flanary, B.E. and Streit, W.J. (2004). "Progressive telomere shortening occurs in cultured rat microglia, but not astrocytes". *Glia* **45**(1): 75-88.
- Flanary, B.E., Sammons, N.W., Nguyen, C., Walker, D., and Streit, W.J. (2007). "Evidence that aging and amyloid promote microglial cell senescence". *Rejuvenation.Res.* **10**(1): 61-74.
- Forstl, H. and Kurz, A. (1999). "Clinical features of Alzheimer's disease". *Eur.Arch.Psychiatry Clin.Neurosci.* **249**(6): 288-90.
- Fratiglioni, L., Launer, L.J., Andersen, K., Breteler, M.M., Copeland, J.R., Dartigues, J.F., Lobo, A., Martinez-Lage, J., Soininen, H., and Hofman, A. (2000). "Incidence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group". *Neurology* **54**(11 Suppl 5): S10-S15.
- Frautschy, S.A., Cole, G.M., and Baird, A. (1992). "Phagocytosis and deposition of vascular beta-amyloid in rat brains injected with Alzheimer beta-amyloid". *Am.J.Pathol.* **140**(6): 1389-99.
- Friedhoff, P., von Bergen, M., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (2000). "Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments". *Biochim.Biophys.Acta* **1502**(1): 122-32.
- Galea, I., Bechmann, I., and Perry, V.H. (2007). "What is immune privilege (not)?". *Trends Immunol.* **28**(1): 12-8.
- Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., Gillespie, F., and . (1995). "Alzheimer-type

- neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein". *Nature* **373**(6514): 523-7.
- Ghebremedhin, E., Schultz, C., Braak, E., and Braak, H. (1998). "High frequency of apolipoprotein E epsilon4 allele in young individuals with very mild Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes". *Exp.Neurol* **153**(1): 152-5.
- Ghebremedhin, E., Schultz, C., Thal, D.R., Rub, U., Ohm, T.G., Braak, E., and Braak, H. (2001). "Gender and age modify the association between APOE and AD-related neuropathology". *Neurology* **56**(12): 1696-701.
- Ghebremedhin, E. and Deller, T. (2007). "Risikofaktoren der Alzheimer-Krankheit". *Forschung Frankfurt* **2**: 90-3.
- Glenner, G.G. and Wong, C.W. (1984). "Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein". *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **122**(3): 1131-5.
- Goedert, M., Wischik, C.M., Crowther, R.A., Walker, J.E., and Klug, A. (1988). "Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **85**(11): 4051-5.
- Goedert, M., Sisodia, S.S., and Price, D.L. (1991). "Neurofibrillary tangles and beta-amyloid deposits in Alzheimer's disease". *Curr.Opin.Neurobiol.* **1**(3): 441-7.
- Goedert, M., Jakes, R., Spillantini, M.G., Hasegawa, M., Smith, M.J., and Crowther, R.A. (1996). "Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans". *Nature* **383**(6600): 550-3.
- Gordon, M.N. (1993). "Microglia and immune activation in Alzheimer's disease". *J.Fla.Med.Assoc.* **80** (4): 267-70.
- Haass, C., Koo, E.H., Mellon, A., Hung, A.Y., and Selkoe, D.J. (1992). "Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments". *Nature* **357**(6378): 500-3.
- Haass, C., Hung, A.Y., Schlossmacher, M.G., Teplow, D.B., and Selkoe, D.J. (1993). "beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms". *J.Biol.Chem.* **268**(5): 3021-4.
- Haass, C., Hung, A.Y., Selkoe, D.J., and Teplow, D.B. (1994). "Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor". *J.Biol.Chem.* **269**(26): 17741-8.
- Haass, C., Koo, E.H., Teplow, D.B., and Selkoe, D.J. (1994a). "Polarized secretion of beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide in MDCK cells". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**(4): 1564-8.
- Haass, C. (1996). "Presenile because of presenilin: the presenilin genes and early onset Alzheimer's disease". *Curr.Opin.Neurol.* **9**(4): 254-9.

- Haass, C. and De Strooper, B. (1999). "The presenilins in Alzheimer's disease--proteolysis holds the key". *Science* **286**(5441): 916-9.
- Haass, C. (2004). "Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation". *EMBO J.* **23**(3): 483-8.
- Haass, C. and Selkoe, D.J. (2007). "Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide". *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **8**(2): 101-12.
- Hamerman, J.A., Jarjoura, J.R., Humphrey, M.B., Nakamura, M.C., Seaman, W.E., and Lanier, L.L. (2006). "Cutting edge: inhibition of TLR and FcR responses in macrophages by triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-2 and DAP12". *J.Immunol.* **177**(4): 2051-5.
- Hardy, J. and Selkoe, D.J. (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics". *Science* **297**(5580): 353-6.
- Hardy, J. (2006). "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis: an update and reappraisal". *J.Alzheimers.Dis.* **9**(3 Suppl): 151-3.
- Hartmann, T., Bieger, S.C., Bruhl, B., Tienari, P.J., Ida, N., Allsop, D., Roberts, G.W., Masters, C.L., Dotti, C.G., Unsicker, K., and Beyreuther, K. (1997). "Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides". *Nat.Med.* **3**(9): 1016-20.
- Hauwel, M., Furon, E., Canova, C., Griffiths, M., Neal, J., and Gasque, P. (2005). "Innate (inherent) control of brain infection, brain inflammation and brain repair: the role of microglia, astrocytes, "protective" glial stem cells and stromal ependymal cells". *Brain Res.Brain Res.Rev.* **48**(2): 220-33.
- Heppner, F.L., Gandy, S., and McLaurin, J. (2004). "Current concepts and future prospects for Alzheimer disease vaccines". *Alzheimer Dis.Assoc.Disord.* **18**(1): 38-43.
- Holcomb, L., Gordon, M.N., McGowan, E., Yu, X., Benkovic, S., Jantzen, P., Wright, K., Saad, I., Mueller, R., Morgan, D., Sanders, S., Zehr, C., O'Campo, K., Hardy, J., Prada, C.M., Eckman, C., Younkin, S., Hsiao, K., and Duff, K. (1998). "Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes". *Nat.Med.* **4**(1): 97-100.
- Honig, L.S. and Mayeux, R. (2001). "Natural history of Alzheimer's disease". *Aging (Milano.)* **13**(3): 171-82.
- Hoozemans, J.J., Veerhuis, R., Rozemuller, J.M., and Eikelenboom, P. (2006). "Neuroinflammation and regeneration in the early stages of Alzheimer's disease pathology". *Int.J.Dev.Neurosci.* **24**(2-3): 157-65.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., and Cole, G. (1996). "Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice". *Science* **274**(5284): 99-102.

- Hsiao, K. (1998). "Transgenic mice expressing Alzheimer amyloid precursor proteins". *Exp.Gerontol.* **33**(7-8): 883-9.
- Husemann, J., Loike, J.D., Anankov, R., Febbraio, M., and Silverstein, S.C. (2002). "Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system". *Glia* **40**(2): 195-205.
- Iqbal, K., Alonso, A.C., Gong, C.X., Khatoon, S., Pei, J.J., Wang, J.Z., and Grundke-Iqbal, I. (1998). "Mechanisms of neurofibrillary degeneration and the formation of neurofibrillary tangles". *J.Neural Transm.Suppl* **53**: 169-80.
- Ishii, K.J., Coban, C., and Akira, S. (2005). "Manifold mechanisms of toll-like receptor-ligand recognition". *J.Clin.Immunol.* **25**(6): 511-21.
- Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., and Kohsaka, S. (1998). "Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1". *Brain Res.Mol.Brain Res.* **57**(1): 1-9.
- Jelicic, M., Bonebakker, A.E., and Bonke, B. (1995). "Implicit memory performance of patients with Alzheimer's disease: a brief review". *Int.Psychogeriatr.* **7**(3): 385-92.
- Jellinger, K.A. and Bancher, C. (1998). "Neuropathology of Alzheimer's disease: a critical update". *J.Neural Transm.Suppl* **54**: 77-95.
- Jellinger, K.A. (2002). "Alzheimer disease and cerebrovascular pathology: an update". *J.Neural Transm.* **109**(5-6): 813-36.
- Johnson, G.B., Brunn, G.J., and Platt, J.L. (2003). "Activation of mammalian Toll-like receptors by endogenous agonists". *Crit Rev.Immunol.* **23**(1-2): 15-44.
- Kalaria, R.N. (1993). "The immunopathology of Alzheimer's disease and some related disorders". *Brain Pathol.* **3**(4): 333-47.
- Kalaria, R.N. (1997). "Cerebrovascular degeneration is related to amyloid-beta protein deposition in Alzheimer's disease". *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **826** 263-71.
- Kalvodova, L., Kahya, N., Schwille, P., Eehalt, R., Verkade, P., Drechsel, D., and Simons, K. (2005). "Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids in vitro". *J.Biol.Chem.* **280**(44): 36815-23.
- Kamal, A., Stokin, G.B., Yang, Z., Xia, C.H., and Goldstein, L.S. (2000). "Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I". *Neuron* **28**(2): 449-59.
- Kamme, F., Salunga, R., Yu, J., Tran, D.T., Zhu, J., Luo, L., Bittner, A., Guo, H.Q., Miller, N., Wan, J., and Erlander, M. (2003). "Single-cell microarray analysis in hippocampus CA1: demonstration and validation of cellular heterogeneity". *J.Neurosci.* **23**(9): 3607-15.

- Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Muller-Hill, B. (1987). "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor". *Nature* **325**(6106): 733-6.
- Kiialainen, A., Hovanes, K., Paloneva, J., Kopra, O., and Peltonen, L. (2005). "Dap12 and Trem2, molecules involved in innate immunity and neurodegeneration, are co-expressed in the CNS". *Neurobiol.Dis.* **18**(2): 314-22.
- King, C., Guo, N., Frampton, G.M., Gerry, N.P., Lenburg, M.E., and Rosenberg, C.L. (2005). "Reliability and reproducibility of gene expression measurements using amplified RNA from laser-microdissected primary breast tissue with oligonucleotide arrays". *J.Mol.Diagn.* **7**(1): 57-64.
- Klein, W.L., Krafft, G.A., and Finch, C.E. (2001). "Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum?". *Trends Neurosci.* **24**(4): 219-24.
- Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., Marz, W., and Fahrenholz, F. (2001). "Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**(10): 5815-20.
- Koo, E.H., Sisodia, S.S., Archer, D.R., Martin, L.J., Weidemann, A., Beyreuther, K., Fischer, P., Masters, C.L., and Price, D.L. (1990). "Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**(4): 1561-5.
- Koo, E.H., Sisodia, S.S., Cork, L.C., Unterbeck, A., Bayney, R.M., and Price, D.L. (1990). "Differential expression of amyloid precursor protein mRNAs in cases of Alzheimer's disease and in aged nonhuman primates". *Neuron* **4**(1): 97-104.
- Korotzer, A.R., Pike, C.J., and Cotman, C.W. (1993). "beta-Amyloid peptides induce degeneration of cultured rat microglia". *Brain Res.* **624**(1-2): 121-5.
- Kouznetsova, E., Klingner, M., Sorger, D., Sabri, O., Grossmann, U., Steinbach, J., Scheunemann, M., and Schliebs, R. (2006). "Developmental and amyloid plaque-related changes in cerebral cortical capillaries in transgenic Tg2576 Alzheimer mice". *Int.J.Dev.Neurosci.* **24**(2-3): 187-93.
- Kreutzberg, G.W. (1996). "Microglia: a sensor for pathological events in the CNS". *Trends Neurosci.* **19**(8): 312-8.
- Kumar-Singh, S., Pirici, D., McGowan, E., Serneels, S., Ceuterick, C., Hardy, J., Duff, K., Dickson, D., and Van Broeckhoven, C. (2005). "Dense-core plaques in Tg2576 and PSAPP mouse models of Alzheimer's disease are centered on vessel walls". *Am.J.Pathol.* **167**(2): 527-43.
- Lämml, U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* **227**(5259): 680-85

- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., and Fahrenholz, F. (1999). "Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**(7): 3922-7.
- Larsen, L. and Ropke, C. (2002). "Suppressors of cytokine signalling: SOCS". *APMIS* **110**(12): 833-44.
- Lee, J.Y. and Hwang, D.H. (2006). "The modulation of inflammatory gene expression by lipids: mediation through Toll-like receptors". *Mol.Cells* **21**(2): 174-85.
- Li, L., Roden, J., Shapiro, B.E., Wold, B.J., Bhatia, S., Forman, S.J., and Bhatia, R. (2005). "Reproducibility, fidelity, and discriminant validity of mRNA amplification for microarray analysis from primary hematopoietic cells". *J.Mol.Diagn.* **7**(1): 48-56.
- Lichtenthaler, S.F. and Haass, C. (2004). "Amyloid at the cutting edge: activation of alpha-secretase prevents amyloidogenesis in an Alzheimer disease mouse model". *J.Clin.Invest* **113**(10): 1384-7.
- Liss, B. and Roeper, J. (2004). "Correlating function and gene expression of individual basal ganglia neurons". *Trends Neurosci.* **27**(8): 475-81.
- Lotz, M., Ebert, S., Esselmann, H., Iliev, A.I., Prinz, M., Wiazewicz, N., Wiltfang, J., Gerber, J., and Nau, R. (2005). "Amyloid beta peptide 1-40 enhances the action of Toll-like receptor-2 and -4 agonists but antagonizes Toll-like receptor-9-induced inflammation in primary mouse microglial cell cultures". *J.Neurochem.* **94**(2): 289-98.
- Luo, J.J., Wallace, M.S., Hawver, D.B., Kusiak, J.W., and Wallace, W.C. (2001). "Characterization of the neurotrophic interaction between nerve growth factor and secreted alpha-amyloid precursor protein". *J.Neurosci Res.* **63**(5): 410-20.
- Mandelkow, E. (1999). "Alzheimer's disease. The tangled tale of tau". *Nature* **402**(6762): 588-9.
- Mandelkow, E.M. and Mandelkow, E. (1998). "Tau in Alzheimer's disease". *Trends Cell Biol.* **8**(11): 425-7.
- Mann, D.M. (1991). "The topographic distribution of brain atrophy in Alzheimer's disease". *Acta Neuropathol.* **83**(1): 81-6.
- Marco, S. and Skaper, S.D. (2006). "Amyloid beta-peptide1-42 alters tight junction protein distribution and expression in brain microvessel endothelial cells". *Neurosci.Lett.* **401** (3): 219-24.
- Mattson, M.P., Cheng, B., Culwell, A.R., Esch, F.S., Lieberburg, I., and Rydel, R.E. (1993). "Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein". *Neuron* **10**(2): 243-54.
- Mattson, M.P. (1997). "Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives". *Physiol Rev.* **77**(4): 1081-132.

- Mattson, M.P., Guo, Q., Furukawa, K., and Pedersen, W.A. (1998). "Presenilins, the endoplasmic reticulum, and neuronal apoptosis in Alzheimer's disease". *J.Neurochem.* **70**(1): 1-14.
- Mattson, M.P. (2004). "Pathways towards and away from Alzheimer's disease". *Nature* **430**(7000): 631-9.
- McClintick, J.N., Jerome, R.E., Nicholson, C.R., Crabb, D.W., and Edenberg, H.J. (2003). "Reproducibility of oligonucleotide arrays using small samples". *BMC.Genomics* **4**(1): 4.
- McGeer, E.G. and McGeer, P.L. (2003). "Inflammatory processes in Alzheimer's disease". *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* **27**(5): 741-9.
- McGeer, P.L., Kawamata, T., Walker, D.G., Akiyama, H., Tooyama, I., and McGeer, E.G. (1993). "Microglia in degenerative neurological disease". *Glia* **7**(1): 84-92.
- McGeer, P.L., Rogers, J., and McGeer, E.G. (2006). "Inflammation, anti-inflammatory agents and Alzheimer disease: the last 12 years". *J.Alzheimers.Dis.* **9**(3 Suppl): 271-6.
- Meda, L., Cassatella, M.A., Szendrei, G.I., Otvos, L., Jr., Baron, P., Villalba, M., Ferrari, D., and Rossi, F. (1995). "Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma". *Nature* **374**(6523): 647-50.
- Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity". *Nat.Rev.Immunol.* **1**(2): 135-45.
- Melchior, B., Puntambekar, S.S., and Carson, M.J. (2006). "Microglia and the control of autoreactive T cell responses". *Neurochem.Int.* **49**(2): 145-53.
- Meyer, E.P., Ulmann-Schuler, A., Staufenbiel, M., and Krucker, T. (2008). "Altered morphology and 3D architecture of brain vasculature in a mouse model for Alzheimer's disease". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105**(9): 3587-92.
- Meyer, M.R., Tschanz, J.T., Norton, M.C., Welsh-Bohmer, K.A., Steffens, D.C., Wyse, B.W., and Breitner, J.C. (1998). "APOE genotype predicts when--not whether--one is predisposed to develop Alzheimer disease". *Nat.Genet.* **19**(4): 321-2.
- Miao, J., Vitek, M.P., Xu, F., Previti, M.L., Davis, J., and Van Nostrand, W.E. (2005). "Reducing cerebral microvascular amyloid-beta protein deposition diminishes regional neuroinflammation in vasculotropic mutant amyloid precursor protein transgenic mice". *J.Neurosci.* **25**(27): 6271-7.
- Morris, R.G. (2003). "Long-term potentiation and memory". *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **358**(1432): 643-7.
- Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B., and Lannfelt, L. (1992). "A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid". *Nat.Genet.* **1**(5): 345-7.

- Muller, T., Concannon, C.G., Ward, M.W., Walsh, C.M., Tirniceriu, A.L., Tribl, F., Kogel, D., Prehn, J.H., and Egensperger, R. (2007). "Modulation of gene expression and cytoskeletal dynamics by the amyloid precursor protein intracellular domain (AICD)". *Mol.Biol.Cell* **18**(1): 201-10.
- Neumann, H. and Takahashi, K. (2007). "Essential role of the microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM2) for central nervous tissue immune homeostasis". *J.Neuroimmunol.* **184**(1-2): 92-9.
- Nguyen, V.T. and Benveniste, E.N. (2002). "Critical role of tumor necrosis factor-alpha and NF-kappa B in interferon-gamma -induced CD40 expression in microglia/macrophages". *J.Biol.Chem.* **277**(16): 13796-803.
- Nicoll, J.A., Wilkinson, D., Holmes, C., Steart, P., Markham, H., and Weller, R.O. (2003). "Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report". *Nat.Med.* **9**(4): 448-52.
- Nikolic, W.V., Bai, Y., Obregon, D., Hou, H., Mori, T., Zeng, J., Ehrhart, J., Shytle, R.D., Giunta, B., Morgan, D., Town, T., and Tan, J. (2007). "Transcutaneous beta-amyloid immunization reduces cerebral beta-amyloid deposits without T cell infiltration and microhemorrhage". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **104**(7): 2507-12.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). "Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo". *Science* **308**(5726): 1314-8.
- Nygaard, V., Holden, M., Loland, A., Langaas, M., Myklebost, O., and Hovig, E. (2005). "Limitations of mRNA amplification from small-size cell samples". *BMC.Genomics* **6**: 147.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y. and LaFerla, F.M. (2003). "Triple transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction". *Neuron* **39**: 409-21.
- Olson, J.K. and Miller, S.D. (2004). "Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs". *J.Immunol.* **173**(6): 3916-24.
- Paresce, D.M., Ghosh, R.N., and Maxfield, F.R. (1996). "Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor". *Neuron* **17**(3): 553-65.
- Park, H.S., Jung, H.Y., Park, E.Y., Kim, J., Lee, W.J., and Bae, Y.S. (2004). "Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B". *J.Immunol.* **173**(6): 3589-93.
- Patel, N.S., Paris, D., Mathura, V., Quadros, A.N., Crawford, F.C., and Mullan, M.J. (2005). "Inflammatory cytokine levels correlate with amyloid load in transgenic mouse models of Alzheimer's disease". *J.Neuroinflammation.* **2**(1): 9.

- Perlmutter, L.S., Barron, E., and Chui, H.C. (1990). "Morphologic association between microglia and senile plaque amyloid in Alzheimer's disease". *Neurosci.Lett.* **119**(1): 32-6.
- Pfeifer, M., Boncristiano, S., Bondolfi, L., Stalder, A., Deller, T., Staufenbiel, M., Mathews, P.M., and Jucker, M. (2002). "Cerebral hemorrhage after passive anti-Abeta immunotherapy". *Science* **298**(5597): 1379.
- Piccio, L., Buonsanti, C., Mariani, M., Cella, M., Gilfillan, S., Cross, A.H., Colonna, M., and Panina-Bordignon, P. (2007). "Blockade of TREM-2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis". *Eur.J.Immunol.* **37**(5): 1290-301.
- Pike, C.J., Burdick, D., Walencewicz, A.J., Glabe, C.G., and Cotman, C.W. (1993). "Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state". *J.Neurosci.* **13**(4): 1676-87.
- Postina, R., Schroeder, A., Dewachter, I., Bohl, J., Schmitt, U., Kojro, E., Prinzen, C., Endres, K., Hiemke, C., Blessing, M., Flamez, P., Dequenue, A., Godaux, E., van Leuven, F., and Fahrenholz, F. (2004). "A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model". *J.Clin.Invest* **113**(10): 1456-64.
- Pratt, B.M. and McPherson, J.M. (1997). "TGF-beta in the central nervous system: potential roles in ischemic injury and neurodegenerative diseases". *Cytokine Growth Factor Rev.* **8** (4): 267-92.
- Rappert, A., Biber, K., Nolte, C., Lipp, M., Schubel, A., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., Boddeke, H.W., and Kettenmann, H. (2002). "Secondary lymphoid tissue chemokine (CCL21) activates CXCR3 to trigger a Cl⁻ current and chemotaxis in murine microglia". *J.Immunol.* **168**(7): 3221-6.
- Rappert, A., Bechmann, I., Pivneva, T., Mahlo, J., Biber, K., Nolte, C., Kovac, A.D., Gerard, C., Boddeke, H.W., Nitsch, R., and Kettenmann, H. (2004). "CXCR3-dependent microglial recruitment is essential for dendrite loss after brain lesion". *J.Neurosci.* **24**(39): 8500-9.
- Riddell, D.R., Christie, G., Hussain, I., and Dingwall, C. (2001). "Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts". *Curr.Biol.* **11**(16): 1288-93.
- Ring, S., Weyer, S.W., Kilian, S.B., Waldron, E., Pietrzik, C.U., Filippov, M.A., Herms, J., Buchholz, C., Eckman, C.B., Korte, M., Wolfer, D.P., and Muller, U.C. (2007). "The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice". *J.Neurosci.* **27**(29): 7817-26.
- Robert-Koch-Institut (Hrsg.) (2005). "Altersdemenz". *Gesundheitsberichterstattung des Bundes* **28**
- Rocca, W.A., Hofman, A., Brayne, C., Breteler, M.M., Clarke, M., Copeland, J.R., Dartigues, J.F., Engedal, K., Hagnell, O., Heeren, T.J., and . (1991). "Frequency and

- distribution of Alzheimer's disease in Europe: a collaborative study of 1980-1990 prevalence findings. The EURODEM-Prevalence Research Group". *Ann.Neurol.* **30**(3): 381-90.
- Rogers, J., Schultz, J., Brachova, L., Lue, L.F., Webster, S., Bradt, B., Cooper, N.R., and Moss, D.E. (1992). "Complement activation and beta-amyloid-mediated neurotoxicity in Alzheimer's disease". *Res.Immunol.* **143**(6): 624-30.
- Rogers, J., Strohmeyer, R., Kovelowski, C.J., and Li, R. (2002). "Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide". *Glia* **40**(2): 260-9.
- Roush, W. (1996). "Live long and prosper?". *Science* **273**(5271): 42-6.
- Rozemuller, J.M., Eikelenboom, P., Pals, S.T., and Stam, F.C. (1989). "Microglial cells around amyloid plaques in Alzheimer's disease express leucocyte adhesion molecules of the LFA-1 family". *Neurosci.Lett.* **101**(3): 288-92.
- Salaun, B., Romero, P., and Lebecque, S. (2007). "Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis". *Eur.J.Immunol.* **37**(12): 3311-8.
- Sandbrink, R., Masters, C.L., and Beyreuther, K. (1994). "Similar alternative splicing of a non-homologous domain in beta A4-amyloid protein precursor-like proteins". *J.Biol.Chem.* **269**(19): 14227-34.
- Sasaki, Y., Ohsawa, K., Kanazawa, H., Kohsaka, S., and Imai, Y. (2001). "Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia". *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **286**(2): 292-7.
- Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condrón, M.M., Teplow, D.B., and Haass, C. (2001). "Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch". *EMBO Rep.* **2**(9): 835-41.
- Sastre, M., Klockgether, T., and Heneka, M.T. (2006). "Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms". *Int.J.Dev.Neurosci.* **24**(2-3): 167-76.
- Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D., George-Hyslop, P.H., Pericak-Vance, M.A., Joo, S.H., Rosi, B.L., Gusella, J.F., Crapper-MacLachlan, D.R., Alberts, M.J., and . (1993). "Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease". *Neurology* **43**(8): 1467-72.
- Scheibner, K.A., Lutz, M.A., Boodoo, S., Fenton, M.J., Powell, J.D., and Horton, M.R. (2006). "Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2". *J.Immunol.* **177**(2): 1272-81.
- Schmid, C.D., Sautkulis, L.N., Danielson, P.E., Cooper, J., Hasel, K.W., Hilbush, B.S., Sutcliffe, J.G., and Carson, M.J. (2002). "Heterogeneous expression of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 on adult murine microglia". *J.Neurochem.* **83**(6): 1309-20.

- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., and Ragg, T. (2006). "The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements". *BMC.Mol.Biol.* **7**: 3.
- Schubert, D., Jin, L.W., Saitoh, T., and Cole, G. (1989). "The regulation of amyloid beta protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion". *Neuron* **3**(6): 689-94.
- Schubert, D. and Behl, C. (1993). "The expression of amyloid beta protein precursor protects nerve cells from beta-amyloid and glutamate toxicity and alters their interaction with the extracellular matrix". *Brain Res.* **629**(2): 275-82.
- Schubert, W., Prior, R., Weidemann, A., Dirksen, H., Multhaup, G., Masters, C.L., and Beyreuther, K. (1991). "Localization of Alzheimer beta A4 amyloid precursor protein at central and peripheral synaptic sites". *Brain Res.* **563**(1-2): 184-94.
- Schultheiss, C., Blechert, B., Gaertner, F.C., Drecoll, E., Mueller, J., Weber, G.F., Drzezga, A., and Essler, M. (2006). "In vivo characterization of endothelial cell activation in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease". *Angiogenesis.* **9**(2): 59-65.
- Selkoe, D.J., Podlisny, M.B., Joachim, C.L., Vickers, E.A., Lee, G., Fritz, L.C., and Oltersdorf, T. (1988). "Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **85**(19): 7341-5.
- Selkoe, D.J. (1994). "Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease". *Annu.Rev.Cell Biol.* **10**: 373-403.
- Selkoe, D.J. (1999). "Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease". *Nature* **399**(6738 Suppl): A23-A31.
- Selkoe, D.J. (2001). "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy". *Physiol Rev.* **81**(2): 741-66.
- Selkoe, D.J. (2002). "Alzheimer's disease is a synaptic failure". *Science* **298**(5594): 789-91.
- Sessa, G., Podini, P., Mariani, M., Meroni, A., Spreafico, R., Sinigaglia, F., Colonna, M., Panina, P., and Meldolesi, J. (2004). "Distribution and signaling of TREM2/DAP12, the receptor system mutated in human polycystic lipomembraneous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy dementia". *Eur.J.Neurosci.* **20**(10): 2617-28.
- Sherrington, R., Rogaeve, E.I., Liang, Y., Rogaeve, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., and . (1995). "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease". *Nature* **375**(6534): 754-60.
- Simard, A.R., Soulet, D., Gowing, G., Julien, J.P., and Rivest, S. (2006). "Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease". *Neuron* **49**(4): 489-502.

- Sisodia, S.S. (1992). "Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**(13): 6075-9.
- Sleegers, K., Brouwers, N., Gijssels, I., Theuns, J., Goossens, D., Wauters, J., Del Favero, J., Cruts, M., van Duijn, C.M., and Van Broeckhoven, C. (2006). "APP duplication is sufficient to cause early onset Alzheimer's dementia with cerebral amyloid angiopathy". *Brain* **129**(Pt 11): 2977-83.
- Sommer, B. and Staufenbiel, M. (1998). "A beta peptide deposition in the brains of transgenic mice: evidence for a key event in Alzheimer's disease pathogenesis". *Mol.Psychiatry* **3**(4): 284-3.
- Stalder, M., Phinney, A., Probst, A., Sommer, B., Staufenbiel, M., and Jucker, M. (1999). "Association of microglia with amyloid plaques in brains of APP23 transgenic mice". *Am.J.Pathol.* **154**(6): 1673-84.
- Streit, W.J. (2002). "Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS". *Glia* **40**(2): 133-9.
- Streit, W.J., Mrak, R.E., and Griffin, W.S. (2004). "Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective". *J.Neuroinflammation.* **1**(1): 14.
- Streit, W.J., Sammons, N.W., Kuhns, A.J., and Sparks, D.L. (2004a). "Dystrophic microglia in the aging human brain". *Glia* **45**(2): 208-12.
- Streit, W.J. (2004). "Microglia and Alzheimer's disease pathogenesis". *J.Neurosci.Res.* **77**(1): 1-8.
- Streit, W.J., Condeelis, J.R., Fendrick, S.E., Flanary, B.E., and Mariani, C.L. (2005). "Role of microglia in the central nervous system's immune response". *Neurol.Res.* **27**(7): 685-91.
- Streit, W.J. (2005). "Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease". *Brain Res.Brain Res.Rev.* **48**(2): 234-9.
- Streit, W.J. (2006). "Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date?". *Trends Neurosci.* **29**(9): 506-10.
- Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., and Roses, A.D. (1993). "Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**(5): 1977-81.
- Sturchler-Pierrat, C., Abramowski, D., Duke, M., Wiederhold, K.H., Mistl, C., Rothacher, S., Ledermann, B., Burki, K., Frey, P., Paganetti, P.A., Waridel, C., Calhoun, M.E., Jucker, M., Probst, A., Staufenbiel, M., and Sommer, B. (1997). "Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**(24): 13287-92.
- Tahara, K., Kim, H.D., Jin, J.J., Maxwell, J.A., Li, L., and Fukuchi, K. (2006). "Role of toll-like receptor signalling in A β uptake and clearance". *Brain* **129**(11): 3006-19.

- Takahashi, K., Rochford, C.D., and Neumann, H. (2005). "Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2". *J.Exp.Med.* **201**(4): 647-57.
- Takahashi, K., Prinz, M., Stagi, M., Chechneva, O., and Neumann, H. (2007). "TREM2-transduced myeloid precursors mediate nervous tissue debris clearance and facilitate recovery in an animal model of multiple sclerosis". *PLoS.Med.* **4**(4): e124.
- Takeda, K. and Akira, S. (2005). "Toll-like receptors in innate immunity". *Int.Immunol.* **17**(1): 1-14.
- Thal, D.R., Schultz, C., Botez, G., Del Tredici, K., Mrak, R.E., Griffin, W.S., Wiestler, O.D., Braak, H., and Ghebremedhin, E. (2005). "The impact of argyrophilic grain disease on the development of dementia and its relationship to concurrent Alzheimer's disease-related pathology". *Neuropathol.Appl.Neurobiol.* **31**(3): 270-9.
- Thal, D.R., Griffin, W.S., de Vos, R.A., and Ghebremedhin, E. (2008). "Cerebral amyloid angiopathy and its relationship to Alzheimer's disease". *Acta Neuropathol.* **115**(6): 599-609.
- Thal, D.R., Capetillo-Zarate, E., Larionov, S., Staufenbiel, M., Zurbrugg, S., and Beckmann, N. (2008a). "Capillary cerebral amyloid angiopathy is associated with vessel occlusion and cerebral blood flow disturbances". *Neurobiol.Aging*
- Thomas, P. and Fenech, M. (2007). "A review of genome mutation and Alzheimer's disease". *Mutagenesis* **22**(1): 15-33.
- Thomas, T., Thomas, G., McLendon, C., Sutton, T., and Mullan, M. (1996). "beta-Amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage". *Nature* **380**(6570): 168-71.
- Trifilo, M.J., Montalto-Morrison, C., Stiles, L.N., Hurst, K.R., Hardison, J.L., Manning, J.E., Masters, P.S., and Lane, T.E. (2004). "CXC chemokine ligand 10 controls viral infection in the central nervous system: evidence for a role in innate immune response through recruitment and activation of natural killer cells". *J.Virol.* **78**(2): 585-94.
- Tsuchiya, K., Ikeda, K., Niizato, K., Watabiki, S., Anno, M., Taki, K., Haga, C., Iritani, S., and Matsushita, M. (2002). "Parkinson's disease mimicking senile dementia of the Alzheimer type: a clinicopathological study of four autopsy cases". *Neuropathology.* **22**(2): 77-84.
- Turnbull, I.R., Gilfillan, S., Cella, M., Aoshi, T., Miller, M., Piccio, L., Hernandez, M., and Colonna, M. (2006). "Cutting edge: TREM-2 attenuates macrophage activation". *J.Immunol.* **177**(6): 3520-4.
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins,

- F., Treanor, J., Rogers, G., and Citron, M. (1999). "Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE". *Science* **286**(5440): 735-41.
- Verheyde, J., Saint-Georges, L., Leyns, L., and Benotmane, M.A. (2006). "The role of Trp53 in the transcriptional response to ionizing radiation in the developing brain". *DNA Res.* **13**(2): 65-75.
- Virchow, R. (1853). "Über eine im Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefundene Substanz mit der chemischen Reaktion der Cellulose". *Virchows Arch Path Anat* **6**: 135-8.
- von Rotz, R.C., Kohli, B.M., Bosset, J., Meier, M., Suzuki, T., Nitsch, R.M., and Konietzko, U. (2004). "The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor". *J.Cell Sci.* **117**(19): 4435-48.
- Walker, D.G., Link, J., Lue, L.F., Dalsing-Hernandez, J.E., and Boyes, B.E. (2006). "Gene expression changes by amyloid beta peptide-stimulated human postmortem brain microglia identify activation of multiple inflammatory processes". *J.Leukoc.Biol.* **79**(3): 596-610.
- Walsh, D.M., Hartley, D.M., Kusumoto, Y., Fezoui, Y., Condron, M.M., Lomakin, A., Benedek, G.B., Selkoe, D.J., and Teplow, D.B. (1999). "Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates". *J.Biol.Chem.* **274**(36): 25945-52.
- Walsh, D.M., Tseng, B.P., Rydel, R.E., Podlisny, M.B., and Selkoe, D.J. (2000). "The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain". *Biochemistry* **39**(35): 10831-9.
- Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Rowan, M.J., and Selkoe, D.J. (2002). "Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition". *Biochem.Soc.Trans.* **30**(4): 552-7.
- Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J.F., Tanzi, R.E., and Solomon, F. (1992). "Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**(22): 10758-62.
- Wasco, W., Gurubhagavatula, S., Paradis, M.D., Romano, D.M., Sisodia, S.S., Hyman, B.T., Neve, R.L., and Tanzi, R.E. (1993). "Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor". *Nat.Genet.* **5**(1): 95-100.
- Weldon, D.T., Rogers, S.D., Ghilardi, J.R., Finke, M.P., Cleary, J.P., O'Hare, E., Esler, W.P., Maggio, J.E., and Mantyh, P.W. (1998). "Fibrillar beta-amyloid induces microglial phagocytosis, expression of inducible nitric oxide synthase, and loss of a select population of neurons in the rat CNS in vivo". *J.Neurosci.* **18**(6): 2161-73.

- Wilson, C.L., Pepper, S.D., Hey, Y., and Miller, C.J. (2004). "Amplification protocols introduce systematic but reproducible errors into gene expression studies". *Biotechniques* **36**(3): 498-506.
- Xia, M.Q., Bacskai, B.J., Knowles, R.B., Qin, S.X., and Hyman, B.T. (2000). "Expression of the chemokine receptor CXCR3 on neurons and the elevated expression of its ligand IP-10 in reactive astrocytes: in vitro ERK1/2 activation and role in Alzheimer's disease". *J.Neuroimmunol.* **108**(1-2): 227-35.
- Yamaguchi, H., Hirai, S., Morimatsu, M., Shoji, M., and Harigaya, Y. (1988). "Diffuse type of senile plaques in the brains of Alzheimer-type dementia". *Acta Neuropathol.* **77**(2): 113-9.
- Yamaguchi, H., Nakazato, Y., Hirai, S., Shoji, M., and Harigaya, Y. (1989). "Electron micrograph of diffuse plaques. Initial stage of senile plaque formation in the Alzheimer brain". *Am.J.Pathol.* **135**(4): 593-7.
- Yan, S.D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., Slattery, T., Zhao, L., Nagashima, M., Morser, J., Migheli, A., Nawroth, P., Stern, D., and Schmidt, A.M. (1996). "RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease". *Nature* **382**(6593): 685-91.
- Yates, S.L., Burgess, L.H., Kocsis-Angle, J., Antal, J.M., Dority, M.D., Embury, P.B., Piotrkowski, A.M., and Brunden, K.R. (2000). "Amyloid beta and amylin fibrils induce increases in proinflammatory cytokine and chemokine production by THP-1 cells and murine microglia". *J.Neurochem.* **74**(3): 1017-25.
- Yoshimura, A., Naka, T., and Kubo, M. (2007) . "SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation". *Nat.Rev.Immunol.* **7**(6): 454-65.
- Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M.E., Sirinathsinghji, D.J., Hopkins, R., Smith, D.W., Heavens, R.P., Dawson, G.R., Boyce, S., Conner, M.W., Stevens, K.A., Slunt, H.H., Sisoda, S.S., Chen, H.Y., and Van der Ploeg, L.H. (1995). "beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity". *Cell* **81**(4): 525-31.
- Zhou, J., An, H., Xu, H., Liu, S., and Cao, X. (2005). "Heat shock up-regulates expression of Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in human monocytes via p38 kinase signal pathway". *Immunology* **114**(4): 522-30.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre nicht ohne die Unterstützung einiger Personen zustande gekommen, denen ich an dieser Stelle herzlich danken möchte:

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Deller danke ich für die Überlassung des überaus interessanten Themas und für die vielfältigen Möglichkeiten, die er mir zur Bearbeitung des Themas geboten hat. Seine Anregungen und Hilfestellungen sowie die hervorragende Betreuung haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ferner finanzierte er diese Dissertation aus Drittmitteln.

Herrn Prof. Dr. Dieter Steinhilber vom Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Frankfurt danke ich für die Begutachtung der Arbeit als externe Dissertation und den dadurch bedingten organisatorischen und administrativen Aufwand.

Für die besonders herzliche und ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung, für sein Engagement, seine Geduld und hilfreichen Anregungen sowie die kritische Durchsicht der Arbeit danke ich Herrn PD Dr. Guido Burbach.

Frau Dr. Angelika Rappert danke ich für die angenehme und konstruktive Zusammenarbeit, die anregenden Gespräche sowie für ihre großartige Unterstützung, auch über das gemeinsame Projekt hinaus. Im Rahmen des gemeinsamen Projekts mit der Arbeitsgruppe Neuroimmunologie danke ich auch Herrn Prof. Dr. Ingo Bechmann für seine Anregungen und Hilfestellungen.

Frau Charlotte Nolte-Uhl danke ich für die exzellente und besonders herzliche Zusammenarbeit und tatkräftige Unterstützung bei allen Arbeiten sowie für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft. Durch ihre Unterstützung hat sie wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Den Kolleginnen und Kollegen des Instituts für klinische Neuroanatomie der Universität Frankfurt danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die stetige Hilfsbereitschaft. Insbesondere danke ich Herrn PD Dr. Estifanos Ghebremedhin für seine hervorragende

Unterstützung bei den statistischen Auswertungen, Herrn PD Dr. Christian Schulz und Herrn Dr. Christian Müller für ihre ständige Hilfsbereitschaft bei technischen und Computer-Problemen sowie ihre großartige Unterstützung bei der konfokalen Mikroskopie, außerdem Heike Korff und Martina Hütten für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und Unterstützung. Mandy Paul und Jürgen Sobotzik danke ich für ihre tolle Kameradschaft und Zusammenarbeit und wünsche ihnen viel Glück bei ihrem weiteren Werdegang.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Familie und meinen Freunden, ohne deren stetigen Beistand Studium und Promotion nicht möglich gewesen wären. Meiner Familie danke ich von ganzem Herzen für ihre Liebe und Unterstützung, ohne die ich nie soweit gekommen wäre.

Besonders meiner Schwester Manuela danke ich für ihren unermüdlichen Einsatz und ihre schier endlose Geduld beim Korrekturlesen dieser Arbeit.

Publikationen

Originalarbeiten

Frank, S., Burbach, G.J., Bonin, M., Walter, M., Streit, W., Bechmann, I., und Deller, T. (2008). "TREM2 is upregulated in amyloid plaque-associated microglia in aged APP23 transgenic mice". *Glia* **56** (13):1438-47

Frank, S., Copanaki, E., Burbach, G.J., Müller, U.C., und Deller, T. (2009). "Differential regulation of toll-like receptor mRNAs in amyloid plaque-associated brain tissue of aged APP23 transgenic mice". *Neuroscience Letters* **453** (1): 41-44

Poster und Abstracts

G. J. Burbach, D. DelTurco, **S. Frank**, und T. Deller. „Zygosity determination of enhanced green fluorescent protein (EGFP) transgenic mice by quantitative PCR”. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft 2005, Würzburg

S. Frank, G. J. Burbach, M. Walter, M. Bonin, M. Staufenbiel, und T. Deller. „Combination of laser microdissection with microarray analysis allows plaque-associated transcriptome analysis in APP23 transgenic mice”. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft 2006, Würzburg

Vorträge

2004, 2006 und 2007: Deutsch- und englischsprachige Vorträge beim neurowissenschaftlichen Symposium in Riezlern, Österreich

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Stefanie Frank
Geburtsdatum/-ort	26.05.1979 in Frankfurt am Main
Familienstand	ledig, keine Kinder

Berufliche Tätigkeiten

10/2008 – dato	STADA R&D GmbH Projektbearbeiterin in der Abteilung Zulassungs- koordination und Produktpflege Schwerpunkte: Planung und Koordination von Stabilitäts- studien, Initiierung und Betreuung von extern durchge- führten Methodenentwicklungen und –validierungen, Bearbeitung von Mängelrügen
----------------	--

Promotion

Seit 03/2004	Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt Institut für klinische Neuroanatomie der Dr. Senckenbergischen Anatomie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Deller Thema: Charakterisierung der Amyloidplaque-assoziierten Entzündungsreaktion in einem transgenen Alzheimer- Mausmodell
--------------	--

2004/2006/2007 deutsch- und englischsprachige Vorträge beim neurowissenschaftlichen Symposium in Riezlern, Kleinwalsertal, Österreich

Studium

10/1998 – 12/2003 **Studium der Pharmazie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt**
Zweites Staatsexamen im Oktober 2002
Approbation als Apothekerin im Dezember 2003

11/2002 – 04/2003 Pharmaziepraktikum bei der **Aventis Pharma GmbH**
Abteilung DI&A Pharmaceutical Sciences
Thema: Entwicklung von Mikropartikeln und Bestimmung der Verkapselungseffizienz und Freigabe des verkapselten Proteins

05/2003 – 10/2003 Pharmaziepraktikum in der **Schiller-Apotheke, Frankfurt am Main**

Schulbildung

1985 – 1989 Grundschule in Frankfurt am Main

1989 – 1998 Ziehen-Gymnasium in Frankfurt am Main